

PACTO DA BIOECONOMIA AZUL

WP8 Plataforma de Coprodutos

Deliverables

Work Package (WP)	WP 8 – Plataforma de coprodutos
Deliverables	#3 (D8.3.1) Metodologias para a caracterização dos coprodutos

#3 (D8.3.1) Metodologias para a caracterização dos coprodutos			
	Parceiro	Resumo do Método	Referência
1. Caraterização físico-química, microbiológica e sensorial			
1.1 Composição química e nutricional			
Humidade	IPMA/CIIMAR	Secagem a 105 ± 2 °C, até obtenção de massa constante	IPQ, 2009. NP 2282:2009. Produtos da pesca e da aquicultura; Determinação da humidade. Instituto Português da Qualidade, Caparica, Portugal, 7 p.
Proteína bruta	IPMA/CIIMAR	Combustão a elevadas temperaturas (=900 °C)	Saint-Denis, T.; Goupy, J., 2004. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. <i>Analytica Chimica Acta</i> , Amsterdam, v.515:191- 198.
Gordura livre	IPMA/CIIMAR	Extração com solvente orgânico apolar	IPQ, 2009. NP1972 – Produtos da pesca e da aquicultura; Determinação do teor de matéria gorda livre. Instituto Português da Qualidade, Caparica, Portugal, 7 p.
Gordura total	IPMA/CIIMAR	Extração com mistura metanol:clorofórmio	Folch, J., Lees, M., Stanley, G.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. <i>Journal of biological chemistry</i> , 226: 497-509.
Cinza	IPMA/CIIMAR	Secagem seguida de carbonização e incineração a 500 ± 25 °C	IPQ, 2009. NP 2032 – Produtos da pesca e da aquicultura; Determinação do teor de cinza total. Instituto Português da Qualidade, Caparica, Portugal, 7 p.
Ácidos gordos	IPMA/CIIMAR; UAveiro	Transesterificação dos ácidos gordos com base em metilação básica e análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS).	1) Cohen, Z., Vonshak, A., Richmond, A., 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae <i>Porphyridium cruentum</i> : Correlation to growth rate. <i>Journal of Phycolgy</i> , 24: 328-332; 2) Lepage, G., & Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. <i>Journal of Lipid Research</i> , 27(1), 114–119. https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38861-1 ; 3) Aued-Pimentel, S.; Lago, J.H.G.; Chaves, M.H.; Kumagai, E.E. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclo-propenoids fatty acids from <i>Sterculia striata</i> St. Hil. Et Nauds seed oil. <i>J. Chromatogr. A</i> 2004, 1054, 235–239.
Aminoácidos	ISEP; CIIMAR/IPMA	Hidrólise ácida com ácido metanossulfónico, com adição de triptamina e atmosfera de azoto; derivatização com ortoftalaldeído (OPA) e clorofórmio de 9-fluorenilmetilo (FMOC), seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.	Vieira, E. F., Soares, C., Machado, S., Correia, M., Ramalhosa, M. J., Oliva-teles, M. T., Paula Carvalho, A., Domingues, V. F., Antunes, F., Oliveira, T. A. C., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2018). Seaweeds from the Portuguese coast as a source of proteinaceous material: Total and free amino acid composition profile. <i>Food Chemistry</i> , 269(5), 264–275. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.145
Na, K, Mg, Fe, Cu, Zn, Cr, Mn, Ni	IPMA	Digestão ácida por micro-ondas ou incineração seguida de solubilização em ácido nítrico e leitura em espectrofotómetro de absorção atómica	1) NP EN 14084, 2003. Foodstuffs – Determination of trace elements – Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion, CEN, Brussels, 16p; 2) Jorhem, L. (2000). Determination of Metals in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after Dry Ashing: NMKL1 Collaborative Study. <i>Journal of AOAC International</i> , 83(5), 1204–1211. https://doi.org/10.1093/jaoac/83.5.1204
1.2 Qualidade química			
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	IPMA/CIIMAR	Reação dos produtos secundários da oxidação lipídica, como o malondialdeído, com o ácido tiobarbitúrico, formando um cromóforo quantificado por espectrofotometria a 532 nm.	NP 3356. (2009). Produtos da pesca e da aquicultura: determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA); método espectrofotométrico. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. 1-8.
Aminas biogénicas	ISEP	As amostras foram extraídas com ácido perclórico e os extratos posteriormente derivatizados com cloreto de dansilo. A quantificação das aminas biogénicas foi efetuada por cromatografia líquida com detecção por fluorescência.	Herrero, A., Sanllorente, S., Reguera, C., Ortiz, M. C., & Sarabia, L. A. (2016). A new multiresponse optimization approach in combination with a D-Optimal experimental design for the determination of biogenic amines in fish by HPLC-FLD. <i>Analytica Chimica Acta</i> , 945, 31-38; and Almeida, C. M. R., J. L. A. Miranda, M. M. Moreira, J. M. C. S. Magalhães, M. F. Barroso and L. Durães (2026). "Potentiometric Determination of Biogenic Amines Using a Cucurbit[6]uril-PVC Sensing Membrane." <i>Chemosensors</i> 14(1): 4.
1.3 Contaminantes químicos			
Cd, Pb	IPMA	Digestão ácida por micro-ondas ou incineração seguida de solubilização em ácido nítrico e leitura por absorção atómica em forno de grafite	1) NP EN 14084, 2003. Foodstuffs – Determination of trace elements – Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion, CEN, Brussels, 16p; 2) Jorhem, L. (2000). Determination of Metals in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after Dry Ashing: NMKL1 Collaborative Study. <i>Journal of AOAC International</i> , 83(5), 1204–1211. https://doi.org/10.1093/jaoac/83.5.1204
Hg	IPMA	Decomposição térmica e química em forno e posterior leitura por absorção atómica	EPA, 2007. Test method 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry. SW-846, USA, Environment Protection Agency, 17p.
OCP	ISEP	Extração com QuEChERS EN e clean-up por d-SPE Fatty Samples AOAC (dispersive solid-phase extraction)	Fernandes, V. C., Podlasiak, M., Vieira, E. F., Rodrigues, F., Grosso, C., Moreira, M. M., & Delerue-Matos, C. (2023). Multiple Organic Contaminants Determination Including Multiclass of Pesticides, Polychlorinated Biphenyls, and Brominated Flame Retardants in Portuguese Kiwano Fruits by Gas Chromatography. <i>Foods</i> 2023, Vol. 12, Page 993, 12(5), 993. https://doi.org/10.3390/foods12050993
PCB	ISEP		
BDE	ISEP		
OPE	ISEP	Extração com UAE (ultrasonic-assisted extraction) clean-up por SPE com cartuchos Si (500 mg/3ml) (solid-phase extraction)	Rey-Salgueiro, L., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M. S., & Simal-Gándara, J. (2009). Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources. <i>Food Research International</i> , 42(8), 983–988. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.003
PAH	ISEP		
1.4 Caracterização física			
Cor	CIIMAR/IPMA	Quantificação objetiva da cor através dos parâmetros L* (luminosidade), a* (eixo verde-vermelho) e b* (eixo azul-amarelo), obtidos a partir da luz refletida pela amostra	1) ISO/CIE 11664-4:2019(en) Colorimetry — Part 4: CIE 1976 L*a*b* colour space; 2) Schubring, R. (2009). Colour measurement. In H. Rehbein, & J. Oehlenschläger (Eds.), <i>Fishery products: Quality, safety and authenticity</i> (pp. 127–172). Wiley Blackwell.
Atividade da água	CIIMAR/IPMA	Determinação da água livre disponível na amostra, através da medição da pressão de vapor de água em equilíbrio entre a amostra e o ar circundante.	ISO 18787:2017 – Géneros alimentícios — Determinação da atividade da água
Índice de escurecimento	CIIMAR/IPMA	Medição da absorvância a 420 nm	Elavarasan, K., & Shamasundar, B. A. (2016). Effect of oven drying and freeze drying on the antioxidant and functional properties of protein hydrolysates derived from freshwater fish (<i>Cirrhinus mrigala</i>) using papain enzyme. <i>Journal of food science and technology</i> , 53(2), 1303-1311.

#3 (D8.3.1) Metodologias para a caracterização dos coprodutos (cont.)			
	Parceiro	Resumo do Método	Referência
1.5 Indicadores microbiológicos			
Contagens totais	CIIMAR	Enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos viáveis através da contagem de colônias desenvolvidas em meio de cultura após incubação	ISO 4833-1:2013: Microbiologia da cadeia alimentar — Método horizontal para a enumeração de microrganismos — Parte 1: Contagem de colônias a 30 °C pela técnica de incorporação.
<i>Clostridium</i> spp. redutores de sulfito	CIIMAR	Enumeração de esporos viáveis capazes de reduzir sulfito, através da formação de colônias negras em meio seletivo sob condições anaeróbicas	ISO 15213-1:2023 Microbiologia da cadeia alimentar — Método horizontal para a detecção e enumeração de <i>Clostridium</i> spp. — Parte 1: Enumeração de <i>Clostridium</i> spp. redutores de sulfito pela técnica de contagem de colônias.
<i>Enterobacteriaceae</i>	CIIMAR	Contagem de colônias características desenvolvidas em meio seletivo após incubação, permitindo quantificar bactérias viáveis da família	ISO 21528-2:2017 Microbiologia da cadeia alimentar — Método horizontal para a detecção e enumeração de <i>Enterobacteriaceae</i> — Parte 2: Técnica de contagem de colônias.
Bolores e leveduras	CIIMAR	Contagem de colônias viáveis desenvolvidas em meio seletivo após incubação, permitindo quantificar leveduras e fungos filamentosos	ISO 21527-2:2008 Microbiologia de alimentos e alimentos para animais — Método horizontal para a enumeração de leveduras e bolores. Parte 2: Técnica de contagem de colônias em produtos com atividade de água inferior ou igual a 0,95.
Bactérias ácido-láticas	CIIMAR	Contagem de colônias viáveis desenvolvidas em meio seletivo após incubação, permitindo quantificar bactérias ácido-láticas mesófilas	ISO 15214:1998 Microbiologia de alimentos e alimentos para animais — Método horizontal para a enumeração de bactérias ácido-láticas mesófilas — Técnica de contagem de colônias a 30 °C.
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIIMAR	Enriquecimento seletivo da amostra, seguido de isolamento em meios seletivos, identificação de colônias presumíveis e confirmação por testes microbiológicos e bioquímicos específicos	ISO 11290-2:2017 Microbiologia da cadeia alimentar — Método horizontal para a detecção e enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> e de <i>Listeria</i> spp. — Parte 1: Método de detecção.
1.6 Análise sensorial	IPMA	Método descritivo quantitativo que avalia a intensidade dos atributos/ descritores selecionados por meio de um painel treinado.	1) ISO 8589. (2007). Sensory analysis — General guidance for the design of test rooms. Em Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization. Genebra; 2) Meilgaard, M.C., Cville, G.V., Carr, B.T., 2016. Sensory Evaluation Techniques, 5th ed. CRC press, Boca Raton.
2. Atividades biológicas			
2.1 Atividade antioxidante			
Atividade de eliminação de radicais DPPH	IPMA	Capacidade dos antioxidantes da amostra eliminarem o radical livre DPPH, promovendo uma diminuição da sua absorvância a 517 nm	Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(6):945-948.
Atividade de eliminação de radicais ABTS	IPMA	Capacidade dos antioxidantes da amostra eliminarem o radical livre ABTS, promovendo uma diminuição da sua absorvância a 734 nm	Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26 (9-10), 1231-1237.
Poder Redutor	IPMA	Capacidade dos compostos presentes na amostra reduzirem íons Fe ³⁺ a Fe ²⁺ , e quantificada a 700 nm	Oyaizu, M. (1988). Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 35:771-775.
2.2 Atividades quelantes			
Fe ²⁺	IPMA	Capacidade dos compostos da amostra quelarem os íons Fe ²⁺ , e reduzindo a formação do complexo ferrozina-Fe ²⁺ medido a 562 nm.	Welch, E.A.; Welch, B. (1990) Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agric. Food Chem., 38, 674–677.
Cu ²⁺	IPMA	Capacidade dos compostos da amostra quelarem os íons Cu ²⁺ , e reduzindo a formação do complexo violeta de pirocatecol-Cu ²⁺ medido a 626 nm.	Saiga, A.; Tanabe, S.; Nishimura, T. (2003). Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. J. Agric. Food Chem., 51, 3661–3667.
2.3 Atividade inibidora da Enzima Conversora da Angiotensina I (ECA)			
	IPMA	Identificação e quantificação por HPLC do ácido hipúrico, resultante da reação da ECA com o HHL	Wu, J., Aluko, R.E., Muir, A.D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. J. Chromatogr. A, 950 (1–2), 125-130
3. Bioacessibilidade	CIIMAR/IPMA	Reprodução padronizada das condições fisiológicas do sistema digestivo humano, permitindo avaliar a digestão dos alimentos e a bioacessibilidade de nutrientes em condições controladas e reprodutíveis	Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bour-lieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A. R., Martins, C., Marze, S., & Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. Nature Protocols, 14(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1