



Detalhes deliciosos

A excelência no laboratório agroalimentar

Nutrir a crescente população do século XXI exige ideias inovadoras, desde cultivos resistentes às secas a processos de produção alimentar simplificados e controlo de qualidade.

Cultivar ideias para grandes soluções requer determinação, paixão e materiais

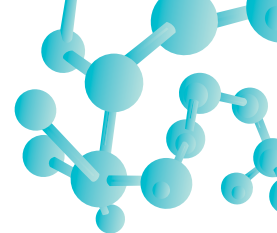
de excelência. Por isso, deixe que a Eppendorf, com os seus 70 anos de experiência, resolva os seus desafios diários com instrumentos de investigação, produção e análise alimentar. Assim, poderá investir as suas energias na Ciência Alimentar de amanhã.

www.eppendorf.com/food

Contactos:

Eppendorf Ibérica S.L.U. · Tel.: +34 91 651 76 94 · E-mail: eppendorf-portugal@eppendorf.pt





O Sector Agro-alimentar constitui um espaço muito importante da Economia Europeia e Nacional, sendo a Indústria Alimentar e de Bebidas aquela que gera maior Volume de Negócios das Indústrias Transformadoras (ca. 14 mil milhões €), com um peso de 20% do total do Volume de Negócios das indústrias transformadoras nacionais.

São várias as áreas de intervenção da Biotecnologia no setor agro-alimentar que vão desde o melhoramento das plantas até ao desenvolvimento biotecnológico dos processos de transformação (processos tão tradicionais como a produção de bebidas alcoólicas e de produtos lácteos são processos biotecnológicos) passando pelo aproveitamento e transformação dos sub-produtos agro-alimentares em produtos de valor acrescentado para diferentes aplicações.

E, é cada vez maior a associação entre a alimentação e a saúde o que faz aumentar a importância da biotecnologia no agro-alimentar.

Sendo assim, depois da publicação de números temáticos orientados para o mar, a saúde e a biotecnologia industrial, a SPBT considera ser da maior relevância a publicação de um número ligado à Biotecnologia Alimentar onde também é evidenciada a qualidade e quantidade de trabalho que os grupos de investigação portugueses têm vindo a desenvolver neste tema.

José Teixeira
(Presidente da SPBT)

Contamos com todos para uma
SPBT dinâmica e participativa

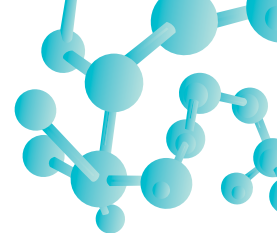


Índice

- 1 Editorial**
José A. Teixeira; Presidente da SPBT
- 3 Biotecnologia Alimentar**
Ivonne Delgadillo
- 5 Biotecnologia alimentar - novas e “velhas” oportunidades nos alimentos fermentados**
Catarina Prista
- 7 Subprodutos Agroindustriais**
Sónia Ferreira, Pedro Fernandes, Susana M. Cardoso e Dulcineia Ferreira Wessel
- 10 Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado**
Manuela E. Pintado e José A. Teixeira
- 13 Brassicas como fonte de compostos anticancerígenos: matéria prima para o desenvolvimento de nutracêuticos ricos em isotiocianatos**
Ana A. Matias, Ana T. Serra e Catarina M. M. Duarte
- 16 (Poli)fenóis de pequenos frutos: digestão, metabolização, biodisponibilidade e evidências de efeitos protetores em doenças neurodegenerativas**
Cláudia N. Santos, Inês S. Costa, Inês Figueira, Lucélia Tavares e Ricardo B. Ferreira
- 19 Reinventando as leguminosas de grão na vanguarda da qualidade alimentar**
Maria Carlota Vaz Patto
- 22 Cápsulas de café expresso: modulação das propriedades sensoriais às expetativas e comodidade do consumidor**
Guido R. Lopes, Andreia S. Ferreira, Mariana Pinto, Cláudia P. Passos, Elisabete Coelho, Carla Rodrigues, Marco Miranda, Sílvia M. Rocha e Manuel A. Coimbra
- 25 O potencial da quitosana para embalagens alimentares funcionais**
Cláudia Nunes, Paula Ferreira, Manuel A. Martins e Manuel A. Coimbra
- 28 Biotecnologia microbiana sob alta pressão: estado atual e potencial futuro**
Rita P. Lopes, Maria J. Mota, Ivonne Delgadillo e Jorge A. Saraiva
- 31 O impacto de biofilmes microbianos na higiene e segurança alimentar**
Pilar Teixeira, Diana Rodrigues e Joana Azeredo
- 35 Águas tempestuosas: efeitos da presença de *Aeromonas* spp.**
Cynthia Alves-Barroco, Maria Teresa Barreto Crespo e Teresa Semedo-Lemsaddek
- 38 Metodologias para a identificação de microrganismos patogénicos em amostras alimentares: a técnica de PNA-FISH**
Rui Rocha, Carina Almeida e Nuno Filipe Azevedo
- 41 Aquecimento Óhmico: uma ferramenta ao serviço da biotecnologia**
Ricardo N. Pereira, Rui. M. Rodrigues, José A. Teixeira e António A. Vicente

ERRATA:

Na página 8 do Boletim de Biotecnologia, série 2, número 5 de Junho de 2014, a afiliação completa dos autores é: Centro de Ciências do Mar (CCMar), Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal



Biotecnologia Alimentar

Ivonne Delgadillo

Departamento de Química, Unidade de Investigação em Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares, Universidade de Aveiro, Campus Universitário, 3810-193 Aveiro, Portugal

E-mail: ivonne@ua.pt

De acordo com a definição da Convenção sobre Diversidade Biológica da ONU (Convention on Biological Diversity Article 2. Use of Terms, United Nations 1992) a Biotecnologia refere-se a toda aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos e organismos vivos ou seus derivados para a criação ou modificação de produtos ou processos para usos específicos. Todos os processos que utilizavam microorganismos para fermentações (alcoólicas, de produtos cárnicos e lácteos), utilização de enzimas em biocatálise ou culturas de células estavam englobados no termo Biotecnologia.

O desenvolvimento de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) foi o grande avanço em matéria de aplicações biotecnológicas no campo da alimentação. O uso de OGMs recorrendo a DNA recombinante já era conhecido e usado na indústria farmacêutica, tendo em 1990 surgido a primeira aplicação na área alimentar com a produção da quimosina por microrganismos, aos quais tinham sido introduzidos genes de origem bovina. Contudo, o alimento propriamente dito, o queijo, não é considerado como alimento geneticamente modificado (GM) por não conservar a enzima de coagulação no produto final. Muito mudou desde o início dos anos 90. Em 1992, foi solicitada autorização à FDA para a comercialização do primeiro alimento GM, a qual foi concedida em 1994. Tratava-se do tomate Flavr Savr, no qual tinha sido silenciado um gene da síntese da poligalacturonase e desta forma o tomate não amolecia com o amadurecimento e podia ser apanhado quando a sua cor e aroma eram ideais.

Em Janeiro de 2000, durante a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) em Cartagena, Colômbia, foi assinado o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança o qual “reconhece que a Biotecnologia moderna tem imensas possibilidades de contribuir para o bem-estar humano **se é desenvolvida com medidas de segurança adequadas para o meio ambiente e a saúde humana**” [1]. São estas preocupações com o meio ambiente e a saúde humana que têm levantado controvérsia, um pouco pelo mundo todo, com particular relevância na Europa.

Deve aqui ser feita a diferença entre Organismos Geneticamente Modificados e Organismos Transgénicos. No caso do transgénico existe a introdução de DNA exógeno, enquanto no OGM a modificação pode ter sido atingida por engenharia genética através da sobre-expressão ou do silenciamento de genes. Todo o transgénico é geneticamente modificado, enquanto o contrário não se verifica.

Os detractores dos OGMs alegam perigos ambientais, tais como a polinização cruzada, o desenvolvimento de resistência a insectos e fungos ou a eventual introdução de alergénios em produtos produzidos por plantas transgénicas. Existem estudos que demonstram a possibilidade destas ocorrências, os quais pela sua vez têm sido muito criticados e desacreditados por parte da comunidade científica e certamente pelas companhias biotecnológicas. Uma das desconfianças mais arraigadas foca-se em que a maioria dos estudos de inocuidade dos OGM têm sido apresentados ou encomendados pelas próprias empresas produtoras. Por outro lado, a criação de obrigatoriedades de compra anual das sementes, por parte dos agricultores, e os monopólios das empresas que comercializam, não só as sementes, senão também os pesticidas a utilizar, é susceptível de criar facilmente desconfiança. A distribuição gratuita de sementes GM produzidas por entidades públicas, como no caso de Embrapa no Brasil, que tem desenvolvido uma série de plantas geneticamente modificadas, ajudará sem dúvida a diminuir a percepção de se estar nas mãos de monopólios.

Há 20 anos, quando a engenharia genética estava a dar os seus primeiros passos na produção de plantas GM para alimentação, as ferramentas utilizadas para inserir o DNA produziam “eventos” aleatórios e existia a introdução de genes de resistência a antibióticos para reconhecer a presença dos “eventos”, situações que estão hoje a ser melhor resolvidas. Por outro lado os objectivos estavam focados no aumento da produção, através de culturas resistentes a herbicidas e a pragas, o que de fato traduziu-se num aumento da produtividade. Nos 16 anos decorridos entre 1996 e 2011 a área plantada com culturas GM registou um incremento de 94 vezes: de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 160 milhões de hectares em 2011 [2].

Numa escala global a utilização de produtos derivados de plantas GM tem aumentado, com alguma melhoria da aceitação social em relação à percepção do risco dos OGM. A isto tem ajudado o controlo do cumprimento dos protocolos de segurança, a percepção do avanço do conhecimento e da ciência, assim como as políticas públicas de protecção à saúde do consumidor. Todavia, existem vozes que denunciam um excesso na legislação e consideram que o problema da não aceitação por parte dos governos é mais de índole política do que científica [3, 4].

Neste momento estamos perante uma situação completamente diferente na qual uma das grandes aplicações das

plantas GM consiste em obter alimentos de melhor qualidade, por serem, ou mais apropriados do ponto de vista nutricional ou mais apelativos do ponto de vista organoléptico ou funcional. O conhecimento sobre o genoma e a função dos genes vegetais progrediu de tal forma que é possível agora desenhar plantas que expressem níveis alterados do produto do gene em estudo [5]. O metabolismo vegetal pode ser direccionado para gerar produtos com aplicações específicas. Um exemplo é a soja com alto teor em ácido oleico, com diminuição do conteúdo de ácidos gordos polinsaturados, conferindo estabilidade térmica ao produto, evitando desta forma o recurso à hidrogenação. Existem reportes que demonstram que a engenharia metabólica multigene pode aumentar o nível de carotenóides em tecidos de plantas edíveis. Foi desenvolvido um método de transformação nuclear combinatória que permitiu escrutinar a via de síntese de carotenóides em milho e que possibilita a produção de diversas populações de plantas transgénicas com diferentes perfis em carotenóides [4]. Por outro lado as ferramentas de engenharia genética permitem hoje inserir, remover ou provocar mutações em sítios específicos, os genes de interesse. Isto significa que em muitos casos pode ser evitada a introdução de DNA externo (transgene) e desta forma ter culturas que não sejam transgénicas [5], as quais eventualmente tenham melhor aceitação por parte dos consumidores. Em teoria, este tipo de abordagem é mais benévolo com a conservação da biodiversidade, porque abre o caminho à exploração de variedades pouco utilizadas, mas com características fenotípicas e composicionais interessantes sob o ponto de vista nutricional, organoléptico e de capacidade produtiva.

Enquanto a utilização de microorganismos GM não levanta a celeuma das plantas GM, a situação com os animais está longe de ser pacífica. A FDA aprovou, em 2013, o salmão transgénico, primeiro animal a ser licenciado para cultura e consumo. A agência ambiental do Canadá aprovou a produção e exportação de 100 mil ovos de salmão geneticamente modificado por ano, mas não permite o consumo do salmão transgénico em solo canadense, tendo a exportação como alvo os Estados Unidos. Este salmão no qual foram introduzidos genes que controlam as hormonas de crescimento da enguia, cresce em metade do tempo [6].

Os microorganismos e plantas GM parecem ter vindo para ficar, abrindo inúmeros e interessantes desafios e frentes de investigação na Biotecnologia Alimentar. O próximo interrogante é ver qual será a aceitação e implantação de animais GM na dieta alimentar.

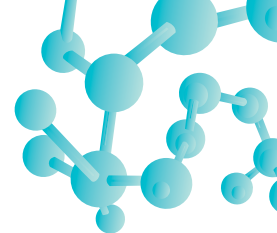
Referências

- [1] Convention on Biotechnological Diversity. In <http://bch.cbd.int/protocol> (Acedida em 15/12/2014)
- [2] Chen H, Lin Y (2013) Promise and issues of genetically modified crops. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 255-260
- [3] Potrykus I (2013) Unjustified regulation prevents use of GMO technology for public good. *Trends in Biotechnology* 31: 131-133
- [4] Farre G, Twyman RM, Zhu C, Capell T, Christou P (2011) Nutritionally enhanced crops and food security: scientific achievements versus political expediency. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 245-251
- [5] Kanchiswamy CN, Sargent DJ, Velasco R, Maffei ME, Malnoy M (2014) Looking forward to genetically edited fruit crops. *Trends in Biotechnology* (in press), DOI doi:10.1016/j.tibtech.2014.07.003
- [6] <http://aquabounty.com/wp-content/uploads/2014/01/Chronology-of-AquAdvantage-Salmon-F1.pdf>. (acedida em 15/12/2014)



spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Visite o nosso site
www.spbt.pt



Biotecnologia alimentar - novas e “velhas” oportunidades nos alimentos fermentados

Catarina Prista

LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

E-mail: cpista@isa.ulisboa.pt

Resumo

A Biotecnologia Alimentar é um termo muito lato que se aplica ao uso de organismos vivos para melhorar a produção de alimentos, quer para aumentar a produtividade quer para obter alimentos melhores e/ou com características específicas, e envolve técnicas que vão das mais simples às mais sofisticadas.

Alimentos fermentados – alimentos do futuro com raízes ancestrais

Desde os tempos mais ancestrais que o Homem produz e melhora os processos fermentativos de produção de alimentos, fazendo cruzamentos de espécies e selecionando os microrganismos que permitiam maiores rendimentos ou os que conferiam as características desejadas ao alimento. No entanto, as técnicas ancestrais de melhoramento eram técnicas morosas e pouco controladas. Com o advento da engenharia genética e das técnicas de DNA recombinante surge a biotecnologia alimentar moderna em que se utilizam os conhecimentos moleculares adquiridos ao longo dos últimos anos com o objectivo de aumentar o rendimento, melhorar as qualidades nutricionais e/ou introduzir novas funcionalidades nos produtos alimentares destinados ao consumo humano e animal, sejam eles matérias primas resultantes da atividade agrícola ou alimentos processados.

De acordo com a Comissão para o Codex Alimentarius os alimentos produzidos através da biotecnologia moderna podem ser classificados em:

- Alimentos consistindo ou contendo organismos vivos;
- Alimentos produzidos por ou contendo ingredientes produzidos por OGMs, como por exemplo: farinhas, produtos à base de proteína ou óleo de soja;
- Alimentos contendo aditivos produzidos por microrganismos geneticamente modificados, como por exemplo: corantes, vitaminas ou aminoácidos essenciais;
- Alimentos contendo ingredientes processados por enzimas produzidas por microrganismos, como por exemplo: xarope de frutose produzido a partir de amido usando a enzima glucose isomerase produzida por microrganismos geneticamente modificados;

que correspondem aos três grandes tipos de transformações biotecnológicas de alimentos: transformação microbiana, transformação genética e transformação enzimática.

Nos últimos anos, o aumento das ocorrências de doenças relacionadas com um estilo de vida sedentário e maior consumo de alimentos nutricionalmente pobres tem levado a uma maior consciencialização da população em relação ao tipo de alimentos consumidos e consequentemente a um aumento da procura de alimentos ditos saudáveis, o que por sua vez tem levado a um crescente investimento por parte da indústria alimentar na sua produção e comercialização [1]. Entre estes alimentos, os alimentos funcionais enquanto “alimentos para os quais é possível demonstrar que apresentam efeito fisiológico benéfico para a saúde e/ou redução dos riscos de doenças crónicas, para além da função nutricional básica” são cada vez mais procurados [1].

Uma gama importante do sector dos alimentos funcionais são os alimentos fermentados. A fermentação desempenha nos dias de hoje três funções importantes no processamento de alimentos:

- enriquecimento da dieta humana através do desenvolvimento de uma variedade de sabores, aromas e texturas nos alimentos;
- aumento da segurança e tempo de conservação;
- enriquecimento dos substratos alimentares por via biológica com vitaminas, proteínas, aminoácidos essenciais e ácidos gordos essenciais.

No caso dos alimentos fermentados obtidos a partir de leite há a acrescentar a redução dos problemas de intolerância, em resultado da hidrólise da lactose. Já no caso dos alimentos fermentados a partir de leguminosas existem muitas outras vantagens tais como o aumento da biodisponibilidade de micronutrientes essenciais em resultados da eliminação de fitatos e de inibidores da tripsina, o aumento da digestibilidade em resultado da ação de enzimas hidrolíticas sobre proteínas, lípidos e celulose, o aumento do conteúdo em ácidos gordos voláteis bem como uma redução nos factores anti-nutricionais como a estaguirose e a rafinose [2].

Todas estas vantagens levam a que os alimentos fermentados sejam mais saudáveis, seguros e capazes de aportar nutrien-

tes específicos a grupos populacionais com necessidades específicas [2].

Até à utilização das técnicas de engenharia genética, a produção de alimentos fermentados dependia inteiramente da seleção tradicional de estirpes, baseada em processos de tentativa e erro, morosos e pouco controlados. O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante veio trazer novas perspectivas à biotecnologia alimentar e à produção de alimentos fermentados com base em microrganismos geneticamente modificados.

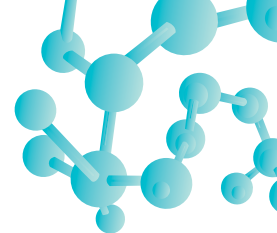
Atualmente, existem várias estirpes geneticamente modificadas de microrganismos que têm vindo a ser desenvolvidas não só para produção de alimentos fermentados inovadores mas também de alimentos mais tradicionais. Estas estirpes permitem, não só melhorar os processos em termos tecnológicos (aumentando o rendimento e a reprodutibilidade dos processos fermentativos), como também introduzir novas características ou melhorar as existentes, fornecer uma maior segurança alimentar e prolongar o tempo de conservação desses alimentos. De entre os casos mais emblemáticos de novas estirpes desenvolvidas para alimentos fermentados “ancestrais”, estão estirpes de levedura utilizadas na produção de vinho capazes de produzir aromas específicos e resistir aos vários tipos de stresses que encontram ao longo da fermentação [3] e estirpes cervejeiras com maior capacidade de transporte de maltose e maltotriose ou com maior capacidade de floculação (facilitando o processo de separação) [4]. Outro caso é o das novas estirpes de leveduras de panificação com maior atividade fermentativa e maior resistência à crio-conservação (de forma a manterem a capacidade fermentativa após o descongelamento das massas). Para além destas, são de citar várias estirpes de bactérias lácticas com resistência acrescida a ambientes ácidos similares aos encontrados no trato digestivo, o que aumenta o seu potencial enquanto probióticos que poderão ser incorporados em vários alimentos que sofrem fermentação láctica [5].

A par das técnicas de manipulação genética, com o desenvolvimento de técnicas de análise em larga escala (as chamadas “ômicas”), da sequenciação do genoma de várias estirpes e da biologia de sistemas, ocorreu mais recentemente uma mudança de paradigma em termos de abordagem aos processos fermentativos, procurando-se olhar para os microrganismos numa perspectiva holística [6, 7]. Esta nova abordagem, tornou possível fazer a caracterização fenotípica e

genotípica detalhada de um grande número de estirpes [8] e estabelecer uma correlação entre as características fenotípicas de interesse para a produção de alimentos fermentados e os níveis de mRNA/proteínas específicos facilitando o desenvolvimento de estratégias de modificação genética mais fundamentadas [3]. A existência de programas de sequenciação massiva de estirpes de vários nichos ecológicos naturais e industriais [9, 10] permitirá ainda revelar os efeitos da seleção natural e humana nas estirpes fermentativas comerciais (sejam elas leveduras, fungos filamentosos ou bactérias, e desenhar estratégias para obter novos microrganismos “tailor-made” adequados à resolução dos problemas tecnológicos levantados pela produção industrial de vários alimentos fermentados, e que a par de uma maior produtividade, qualidade e segurança, permitam realçar as características particulares de cada alimento [1, 6, 7, 10].

Referências

- [1] El SN, Simsek S (2012) Food Technological Applications for Optimal Nutrition: An Overview of Opportunities for the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 2-12
- [2] Hutkins RW (2006) *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. 1ª ed, Blackwell Publishing Professional, USA
- [3] Borneman AR, Schmidt SA, Pretorius IS (2013) At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. *Trends in Genetics* 29: 263–271
- [4] Saerens S, Duong C, Nevoigt E (2010) Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives, and limits. *Applied Microbiology Biotechnology* 86: 1195-1212
- [5] Wu C, Huang J, Zhou R (2014) Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 1055-1063
- [6] Flahaut NAL, de Vos WM (2015) Systems biology and metabolic engineering of lactic acid bacteria for improved fermented foods. In: *Advances in Fermented Foods and Beverages : Improving Quality, Technologies and* Holzapfel W, Woodhead Publishing, Cambridge, UK
- [7] Pretorius IS, Curtin CD, Chambers PJ (2015) Designing wine yeast for the future. In: *Advances in Fermented Foods and Beverages : Improving Quality*, Holzapfel W, Woodhead Publishing, Cambridge, UK
- [8] Engel SR, Cherry JM (2013) The new modern era of yeast genomics: community sequencing and the resulting annotation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* strains at the *Saccharomyces Genome Database*. *Database* 2013: bat012
- [9] Borneman AR, Desany BA, Riches D, Affourtit JP, Forgan AH, Pretorius IS, Egholm M, Chambers PJ (2011) Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics* 7:e1001287
- [10] Douillard FP, de Vos WM (2014) Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial Cell Factories* 13(Suppl 1):S8



Subprodutos Agroindustriais

Sónia Ferreira¹, Pedro Fernandes¹, Susana M. Cardoso², Dulcineia Ferreira Wessel^{1,3}

¹Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu, Quinta da Alagoa, Estrada de Nelas, 3500-606 Viseu, Portugal

²QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

³CI&DETS, Instituto Politécnico de Viseu, Av. Cor. José Maria Vale de Andrade, Campus Politécnico, 3504-510 Viseu, Portugal

E-mail: ferdulcineia@esav.ipv.pt

Introdução

A crescente preocupação do consumidor na manutenção de um estilo de vida saudável tem levado ao aumento do consumo de produtos de origem vegetal. Usualmente, estes são ingeridos na forma de polpas, sumos, saladas e outro tipo de produtos minimamente processados, com origem em matérias-primas rigorosamente selecionadas de forma a garantir a qualidade e aceitabilidade do produto por parte do consumidor. Como consequência deste processo de seleção, grandes quantidades de resíduos são geradas pelo setor agroindustrial que, de acordo com a FAO (do inglês *Food and Agriculture Organization*), podem atingir aproximadamente um terço da parte comestível dos alimentos produzidos globalmente [1]. Estes resíduos, também designados por subprodutos, são constituídos maioritariamente por sementes, cascas, folhas e matérias-primas com características indesejáveis.

O conceito de subproduto, regulado a nível nacional pelo artigo 44 do Regime Geral de Gestão de Resíduos (Diploma DGGR), é aplicado a compostos secundários que resultam

de um processo produtivo, e que podem ser aplicados diretamente, sem qualquer outro processamento, que não seja o da prática industrial normal. Os principais subprodutos em Portugal estão correlacionados com os seus principais setores agroindustriais, destacando-se os subprodutos do vinho, azeitona, indústria cervejeira, arroz, alfarroba, indústrias de processamento de vegetais e frutos [2]. Estes subprodutos são atualmente muito pouco valorizados, sendo grande parte direcionados para inceneração e apenas uma pequena percentagem para o desenvolvimento de fertilizantes ou rações animais [3]. Assim sendo, torna-se imperativa a realização de esforços por parte do setor agroindustrial com o intuito de valorizar os seus subprodutos.

A valorização dos subprodutos agroindustriais é uma das principais estratégias do novo plano de financiamento da Comunidade Europeia, o Programa Horizonte 2020, e de estratégia nacional, Programa Portugal 2020. Este novo plano de financiamento tem como principais objetivos a promoção e criação de oportunidades para o desenvolvimento de um sector agroindustrial sustentável e competitivo. Uma

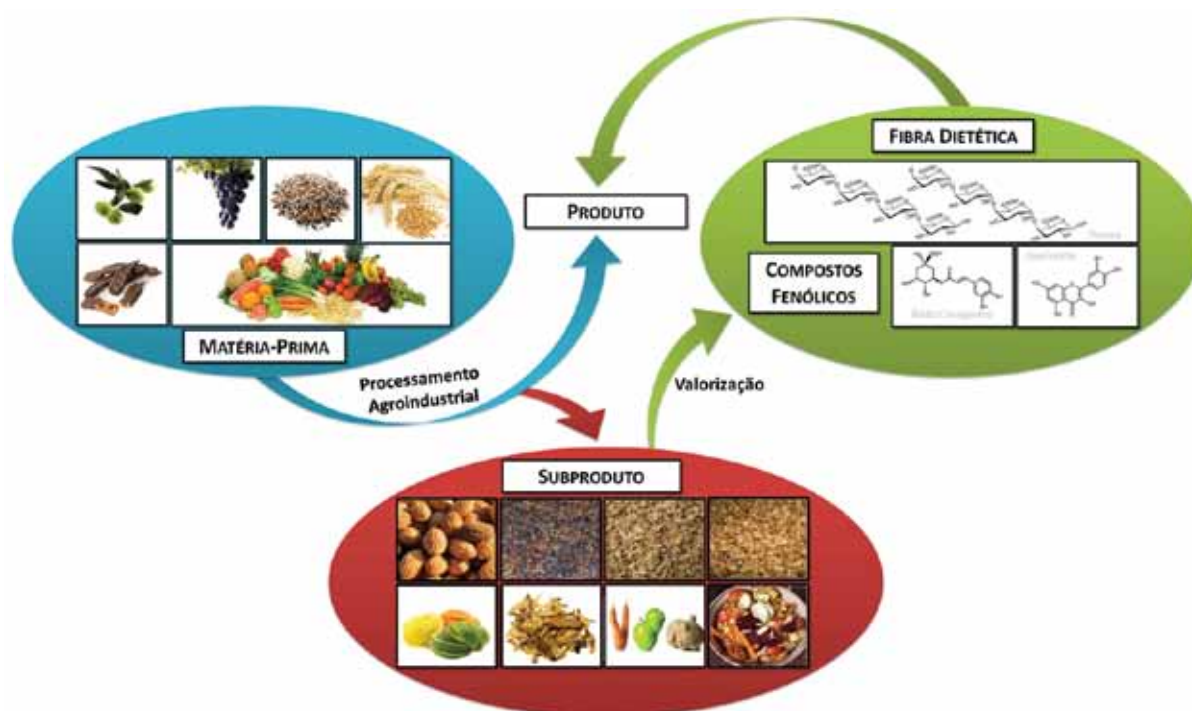


Figura 1 – Representação da valorização dos subprodutos do processamento agroindustrial como fonte de novos ingredientes alimentares.

das abordagens que podem ser delineadas incluem o aproveitamento do elevado valor nutricional dos subprodutos no desenvolvimento de novas formulações de alimentos. No entanto, deve ser realçado que além do valor nutricional, os subprodutos são excelentes fontes de metabolitos secundários tais como carotenoides, fibras e compostos fenólicos (Figura 1), cujas propriedades bioativas culminam em diversas aplicações alimentares (ex.: nutracêuticos, antimicrobianos e corantes). Especial atenção tem sido dada à fibra e aos compostos fenólicos dada a sua abundância nos subprodutos agroalimentares e, em geral, às propriedades biológicas a eles associados.

Fibra dietética

A fibra dietética consiste nos componentes que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano com fermentação completa ou parcial no intestino grosso [4]. Grande parte da fibra dietética tem origem vegetal, sendo um constituinte das paredes celulares dos frutos, vegetais, leguminosas e cereais. De acordo com a sua solubilidade as fibras dietéticas podem ser ainda classificadas de fibras insolúveis, incluindo lenhina, celulose e hemiceluloses; ou fibras solúveis, como pectinas e uma vasta gama de oligossacarídeos resistentes à digestão, como a inulina [5]. Associados à fibra dietética podem estar outros componentes minoritários que são benéficos para a saúde humana, tais como compostos fenólicos e carotenoides [3].

As fibras de trigo, milho e arroz têm sido as mais utilizadas na indústria alimentar, quer pelos seus atributos para a saúde quer pelas suas aplicações tecnológicas [3]. No entanto, a competitividade do mercado para a fibra dietética tem levado ao estudo de novas fontes e fibras de modo a satisfazer o desejo do consumidor por produtos naturais e saudáveis. Seguindo a tendência dos produtos naturais, o uso de subprodutos ricos em fibra dietética e compostos bioativos tem ganho atenção, sendo a valorização destes subprodutos uma mais-valia para as agroindústrias, tendo em conta que são matérias-primas de baixo custo.

Subprodutos ricos em fibra dietética podem ser incorporados em produtos alimentares como ingredientes não calóricos e de baixo custo para a substituição parcial de farinhas, gorduras ou açúcares, e funcionar como agentes espessantes, aumentar a retenção de água e óleos, e/ou melhorar a estabilidade de emulsões [4, 6]. Além destas propriedades tecnológicas, a presença de outros compostos associados às fibras pode conferir efeito antioxidante e por isso prolongar o tempo de vida de prateleira [4]. Já foram descritas na literatura algumas aplicações de fibras dietéticas de subprodutos em produtos lácteos, concentrados ou doces de fruta, produtos à base de carne ou peixe, sopas, bebidas, e bolos [5].

Além das propriedades tecnológicas, a fibra dietética tem um papel importante nos processos fisiológicos e na prevenção de doenças de diferentes origens [5]. Dietas ricas em fibra dietética, tais como aquelas ricas em cereais, frutos e vegetais, estão associadas à regulação do trânsito intestinal, à diminuição dos níveis de colesterol e da absorção da glu-

cose intestinal e à prevenção de algumas doenças, tais como doenças cardiovasculares e cancro.

Embora a utilização das fibras dos subprodutos já seja uma realidade, é necessário dar continuidade ao estudo das propriedades funcionais da fibra dietética, uma vez que estas propriedades dependem não só da fonte de fibra dietética, mas também das metodologias de extração e quantificação. É fundamental desenvolver processos biotecnológicos que permitam uma preparação eficiente de fibras a partir dos subprodutos e que minimizem as perdas dos compostos bioativos associados. Por outro lado, como a percentagem da fibra que pode ser adicionada é finita, sob pena de causar alterações indesejáveis às propriedades sensoriais do produto final (cor e textura dos alimentos), será necessário estudar cada caso em particular. Por fim, será necessário ter em conta não só uma perspetiva tecnológica, mas também avaliar o potencial efeito benéfico na saúde inerente à adição da fibra dietética dos subprodutos.

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas que desempenham um papel determinante nas propriedades sensoriais dos frutos e vegetais. Numa escala industrial, estes compostos são amplamente utilizados como conservantes alimentares e também como corantes na indústria papelreira. No entanto, a sua relevância não passa apenas pela aplicação industrial uma vez que os compostos fenólicos aparentam possuir propriedades relevantes para a saúde humana [7]. Vários estudos epidemiológicos apontam para uma correlação entre uma dieta rica em compostos fenólicos e a diminuição da prevalência de doenças cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas, cujos mecanismos de ação ainda se encontram em estudo. Devido às diferentes aplicações e propriedades dos compostos fenólicos, a competitividade entre a indústria alimentar, cosmética e farmacêutica por fontes ricas nestes compostos tem sido cada vez maior. Apesar de já serem conhecidas várias fontes de origem vegetal, os subprodutos agroindustriais têm recebido uma atenção especial dada a sua abundância em compostos fenólicos e o seu baixo custo de exploração [3].

Os subprodutos do vinho, azeite, alfarroba e maçã têm-se revelado como algumas das mais promissoras fontes de compostos fenólicos dada a forte atividade antioxidante de extratos obtidos a partir destes subprodutos. A alguns destes extratos já foram associadas atividades biológicas importantes, nomeadamente a ação anti-inflamatória, anti-proliferativa e inibitória a nível da oxidação do LDL responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares [3, 6, 7]. Estas propriedades permitem assim expandir a aplicação de compostos fenólicos no desenvolvimento de alimentos funcionais, isto é, alimentos que potenciam uma ação benéfica na saúde do consumidor, para além da sua normal função nutricional [8]. Outros estudos avaliam também o potencial de incorporação dos subprodutos agroalimentares em pão, pastelaria e bebidas com o objetivo de extensão do seu tempo de vida.

A capacidade de extratos de subprodutos ricos em compostos fenólicos em minimizar a formação de compostos nocivos à saúde durante o processamento dos alimentos tem sido também uma das aplicações de elevado interesse. No entanto, para estas aplicações é necessário ter em consideração que a composição dos subprodutos agroindustriais em compostos fenólicos é bastante diversificada, levando à obtenção de extratos com diferentes características. Adicionalmente, dentro do mesmo tipo de subprodutos é possível observar variações composicionais como consequência da variabilidade entre espécies, fatores ambientais e extensão do processamento da matéria-prima que podem ter impacto na sua atividade antioxidante e propriedades biológicas.

Conclusão

A exploração dos subprodutos agroindustriais como fonte de ingredientes e compostos bioativos tem-se revelado bastante promissora, no sentido em que estes podem corresponder na totalidade à contínua procura de ingredientes por parte da indústria. Contudo, para perspetivar possíveis programas de valorização, são necessários dados experimentais que, na sua maioria, ou não se encontram disponíveis, ou se encontram dispersos. São exemplos disto a caracterização dos subprodutos e a quantidade disponível, o custo do transporte, as aplicações existentes e eventuais restrições socioeconómicas, todos eles fatores determinantes da viabilidade económica de qualquer processo de valorização de subprodutos.

Nos subprodutos destaca-se a abundância em fibra e compostos fenólicos cujas propriedades biológicas se encontram a ser investigadas, potenciando assim o desenvolvimento de novos produtos, nomeadamente os alimentos funcionais. Esta gama de produtos, com um mercado crescente e altamente inovador, requer uma especial atenção no sentido em que existe a necessidade de avaliar os potenciais riscos associados aos compostos isolados dos subprodutos agroindustriais, bem como a sua estabilidade e interações com outros ingredientes. Dadas as múltiplas questões subjacentes à

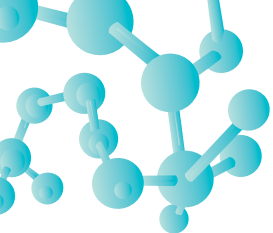
valorização dos subprodutos é expectável que esta se torne uma das maiores tendências para os próximos anos, principalmente como consequência do forte investimento e estratégias europeias definidas pelo Plano Horizonte 2020.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento através do projeto *ProfitApple* 38162, QREN, FEDER, COMPETE e à FCT por financiar a unidade de investigação QOPNA (PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER- 037296).

Referências

- [1] Gustavsson J, Cederberg C, Sonesson U, van Otterdijk R, Meybeck A. Global food losses and food waste. Extend, causes and prevention. Rome: Food and Agriculture organization of the United Nations. 2011. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/ags/publications/GFL_web.pdf
- [2] Duarte LC, Esteves MP, Carvalheiro F, Vicente P, Gírio FM. Os subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa. *Dossier Tecnologia Agro-Alimentar*. 2012;56–62
- [3] O'Shea N, Arendt EK, Gallagher E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2012(16):1–10
- [4] Elleuch M, Bedigian D, Roiseux O, Besbes S, Blecker C, Attia H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*. 124(4):411–21
- [5] Rodríguez R, Jiménez A, Fernández-Bolaños J, Guillén R, Heredia A. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology*. 2006(17):3–15
- [6] Coimbra MA, Cardoso SM, Lopes-Da-Silva JA. Olive Pomace, a Source for Valuable Arabinan-Rich Pectic Polysaccharides. *Carbohydrates in Sustainable Development I. Topics in Current Chemistry*. 2010(294): 129-141
- [7] Schieber A, Stintzing F, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*. 2001(12):401–13
- [8] Galanakis CM. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*. 2013(91):575–9



Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado

Manuela E. Pintado¹ e José A. Teixeira²

¹Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Arquitecto Lobão Vital, 4202-401 Porto, Portugal

²Centro de Engenharia Biológica, Campus de Gualtar, Universidade do Minho, 4710-057 Braga, Portugal

E-mail: mpintado@porto.ucp.pt; jateixeira@deb.uminho.pt

Nas orientações para uma Europa de recursos eficientes, a Comissão Europeia prevê que, até 2020, os resíduos sejam geridos como um recurso, e por isso a reciclagem e reutilização de resíduos, para além da sua elevada relevância, tornaram-se opções economicamente atraentes. Atualmente cerca de 1/3 dos alimentos para consumo humano é perdida mundialmente (como resíduo de processamento ou perda na cadeia), correspondendo a uma produção mundial de resíduos alimentares de cerca de 1,3 bilhões toneladas/ano [1]. Nesse sentido, a valorização de resíduos e subprodutos agro-alimentares apresenta-se hoje em dia, não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos de valor acrescentado e com grande impacto na economia das indústrias.

A mais-valia para as indústrias alimentares advém tanto da redução de custos de eliminação ou tratamento do resíduo, como do ganho de transformação dos subprodutos em produtos de valor, entre os quais se podem incluir novos aditivos ou ingredientes alimentares, que podem vir a incorporar nos seus produtos, diversificando e aumentando o seu portfólio.

De acordo com Regulamento Europeu (442/1975/EEC;689/1991/EEC), *Resíduo alimentar* corresponde a resíduos de carga orgânica elevada, os quais são geralmente obtidos durante transformação de matérias-primas em produtos alimentares resultando em forma líquida ou sólida, enquanto *Subprodutos* corresponde a uma designação que permite transmitir que “os resíduos alimentares” constituem substratos para a recaptura de compostos funcionais com viabilidade no desenvolvimento de novos produtos com valor de mercado.

Nesse sentido, um dos grandes desafios atuais centra-se no processamento de subprodutos agro-alimentares para a recuperação de compostos de elevado valor e produção de metabolitos relevantes, através de processos químicos e biotecnológicos.

Os subprodutos, dependendo da matéria-prima e processamento que os originou, podem conter níveis variáveis de nutrientes básicos como proteína, lípidos, minerais e hidratos de carbono (açúcares e fibras), podendo ainda incluir compostos funcionais de elevado valor diferenciado, como por exemplo, vitaminas, carotenoides, polifenóis, péptidos, entre outros.

Assim, seguindo metodologias apropriadas, a maioria dos compostos referidos anteriormente podem ser obtidos e aplicados sobretudo nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. No entanto, as restrições legislativas impostas, sobretudo na área alimentar pela EFSA, com a entrada do Regulamento (CE) N°1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, podem dificultar a valorização de alguns dos ingredientes com bioatividade, para os quais as alegações de saúde ainda não foram aprovadas, por falta de evidências científicas suficientes. No entanto, sempre que existem limitações de legislação, deve ser valorizado e validado o papel tecnológico ou nutricional que muitos ingredientes podem ter, como sejam propriedades espessantes, gelificantes, valor energético, entre outros.

A abordagem de recuperação de componentes de alto valor a partir de resíduos alimentares compreende habitualmente várias fases que, de acordo com o grau de pureza a atingir, apresentam crescente complexidade e custo (ver Figura 1), sendo a sequência mais frequente uma fase de pré-tratamento (usa métodos como centrifugação, prensagem, etc), seguida de uma fase de separação ou extração de moléculas (usa métodos como ultrafiltração, extração por solvente, etc), e finalmente a fase de isolamento e purificação (usa métodos como cromatografia, nanofiltração, etc). O produto é depois estabilizado para armazenamento por liofilização, atomização ou outro.

Outros métodos de valorização incluem vias de transformação, que permitam libertar ou obter compostos de maior valor, como seja a hidrólise e a fermentação, que se podem combinar (de forma integrada ou isolada) com o processo de recuperação (Figura 1). A hidrólise implica a degradação (ex: via enzimática, química, etc) de compostos, em geral de elevado peso molecular, para produção de novos compostos de maior valor, em geral pela sua bioatividade, onde se incluem mais frequentemente péptidos e aminoácidos ou oligossacáridos. Finalmente, os subprodutos, geralmente após algum pré-tratamento, também podem servir de substrato para microrganismos produzirem compostos de valor, através de fermentação, que podem ser posteriormente recuperados pelos processos já referidos.

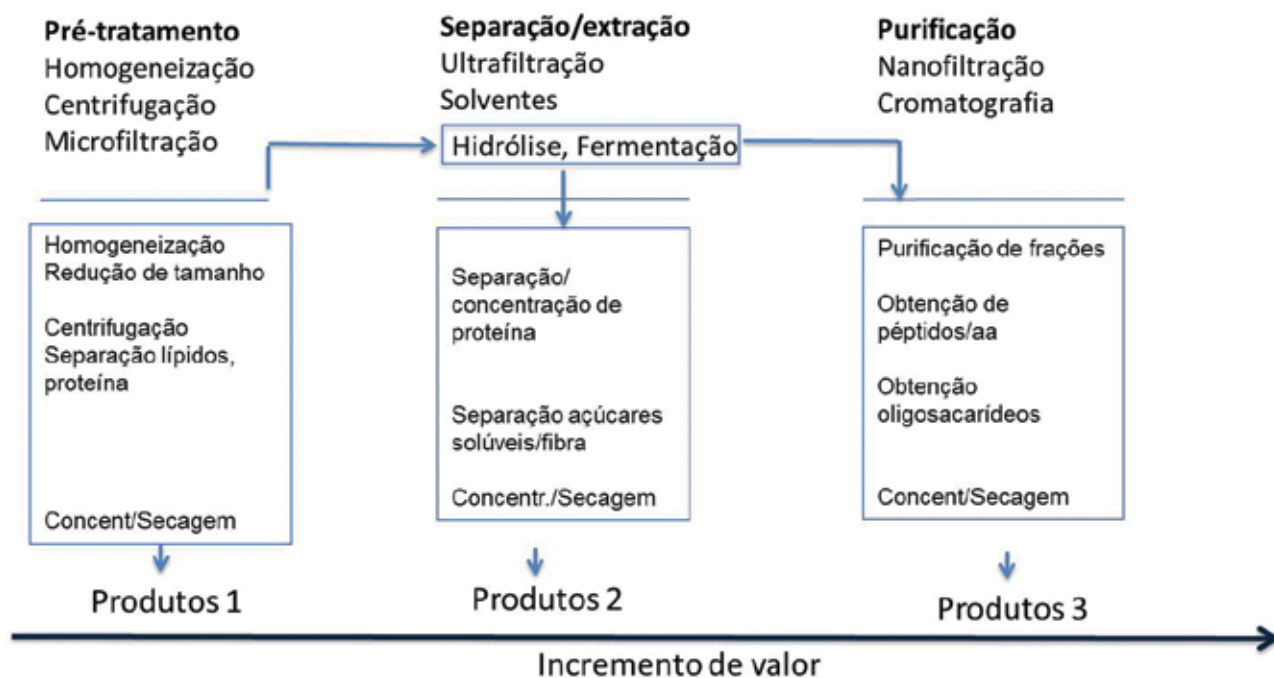


Figura 1 – Esquema de processamento de subprodutos com obtenção de produtos de valor acrescentado, exemplificando o incremento de valor, com aumento de complexidade de processo ou integração de processos de transformação (hidrólise, fermentação).

Durante a recuperação ou produção de compostos para aplicação alimentar, alguns aspetos devem ser tidos em conta, nomeadamente: seleção do método de extração de forma a maximizar o rendimento dos compostos-alvo e adequar às exigências do processamento industrial, purificar os ingredientes de alto valor, eliminando impurezas e compostos tóxicos, evitar a deterioração e perda de funcionalidade durante processamento e garantir a natureza de grau alimentar do produto final.

Vários estudos atuais têm contemplado a obtenção de inúmeros ingredientes a partir de subprodutos, incluindo subprodutos de cereais (ex: farelo de arroz, drêche, etc) com obtenção principal de fibras, hemiceluloses, beta-glucanas e oligossacarídeos prebióticos, a partir de raízes e tubérculos (ex: resíduos de cana, mandioca, etc), com obtenção principal de polifenóis e ácidos orgânicos, a partir de culturas oleaginosas (ex: soja, bagaço de azeitona, etc) com obtenção de fitoesteróis, polifenóis e pectinas, a partir de frutos e vegetais (ex: cascas de vários frutos, bagaço de tomate, etc) com obtenção principal de pectinas, fibras, carotenoides e polifenóis, a partir de cárnico (ossos, sangue, vísceras de bovinos e aves e suínos) com principal obtenção de proteínas, péptidos ou aminoácidos, a partir de peixe e crustáceos (espinhas, peles, cascas, etc) com principal obtenção de proteínas, péptidos ou aminoácidos, ou quitina e quitosana, e finalmente a partir de subprodutos de leite principalmente o soro, com obtenção de várias proteínas e péptidos ou lactose [2] que pode posteriormente originar uma gama variada de produtos por fermentação (ex. álcool) ou ação enzimática (ex: galactooligosacarídeos).

Inúmeros projetos têm sido desenvolvidos em Portugal nesta área, em particular integrados em parcerias com a indústria.

Na sua maioria, a valorização económica de resíduos e subprodutos em compostos de valor, apesar de atrativa, não é facilmente sustentável economicamente, pois embora contemple uma matéria-prima de baixo custo, implica um elevado custo de logística, armazenamento e transporte da mesma, bem como a utilização de processamentos associados a elevado consumo energético ou técnicas onerosas. Nesse sentido, por forma assegurar a viabilidade económica da valorização, é fundamental o processamento de quantidades elevadas de matéria-prima, que na maioria dos casos, não é possível obter com os subprodutos gerados por uma só empresa.

A associação de várias empresas geradoras do mesmo subproduto pode ser uma das possibilidades, mas tal nem sempre é fácil, quer pela difícil conjugação de interesses ou pela distância geográfica.

Outra possibilidade consiste na utilização de processos integrados, que permitam a transformação de subprodutos com proximidade composicional e compatibilidades de origem, maximizando assim os equipamentos instalados e assegurando quantidades de subproduto geograficamente conciliáveis, minimizando os custos de transporte e armazenamento.

Na Figura 2 apresenta-se um exemplo de uma abordagem de subprodutos ricos em fibra e com subprodutos ricos em proteínas, onde se pode ver a utilização de processos integrados de hidrólise, separação e purificação, que podem ser aplicados com maximização de valorização, com obtenção de produtos finais de menor valor (ex: farinhas ricas em fibras e concentrados proteicos) até produtos de valor acrescentado como péptidos ou oligossacarídeos, permitindo assim colmatar a sazonalidade e variabilidade de subprodutos, para assegurar produtos finais mais sustentáveis.

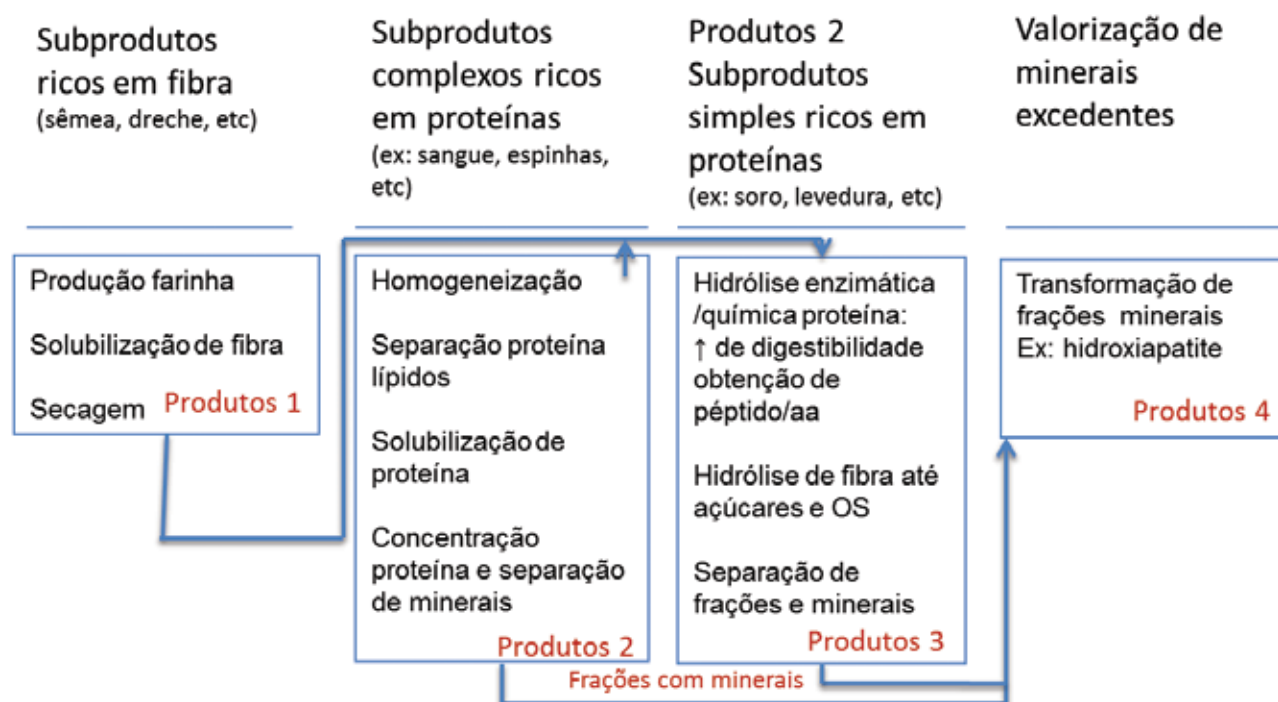


Figura 2 – Exemplo de integração de valorização de subprodutos com utilização de processos comuns, com complexidade diferenciada, de acordo com o nível de valor esperado de produto final.

Esta é a abordagem do projeto VALOR INTEGRADOR (em curso) no âmbito do qual o Centro de Biotecnologia e Química Fina da EBUCP e o Centro de Engenharia Biológica da UM, o ICBAS e a Faculdade de Medicina da UP, em parceria com várias entidades do setor agro-alimentar – Sorgal, UNICER, Central Carnes, Avicasal, Germen, Poveira, Savinor, Vallinox, Queijo Saloio, Portugal Foods e ANICP - pretendem desenvolver soluções modelo para a valorização integrada dos sub-produtos de diferentes origens e com diferentes características.

Conclusão

A valorização de subprodutos deve ser vista como uma oportunidade de negócio numa realidade de escassez de alimentos e água e implementação de normas ambientais cada vez mais rigorosas. E, embora reconhecendo que a sua implementação está dependente da sua viabilidade económica e financeira, deve ser lembrado que, aquilo que não é economicamente viável ou interessante agora, o poderá ser num futuro próximo.

Uma das grandes limitações no desenvolvimento economicamente sustentado destes processos está na disponibilidade das quantidades de subproduto necessárias. Tal não deve

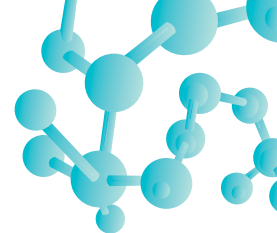
constituir uma limitação, mas sim, ser uma oportunidade para as indústrias se agregarem ou desenvolverem soluções integradas com subprodutos de várias empresas com composição semelhante ou complementar.

As restrições de legislação são outro fator a ter em conta, nomeadamente na valorização dos novos ingredientes (em particular funcionais) para garantir que o produto final seja facilmente valorizável no mercado com o retorno esperado.

Concluindo, a valorização de sub-produtos é uma questão da maior importância para o setor agro-alimentar, pois são várias as oportunidades existentes para o desenvolvimento sustentado de novos produtos de valor acrescentado variável. As empresas agro-alimentares devem estar conscientes deste desafio e, desde já, assumirem esta questão como determinante para o seu desenvolvimento e do setor.

Referências

- [1] Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R. and Meybeck, A. 2011. Global food losses and Food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1-23 pages
- [2] Galanakis, C.M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. Trends in Food Science & Technology, 26, 68-87



Brassicac como fonte de compostos anticancerígenos: matéria prima para o desenvolvimento de nutracêuticos ricos em isotiocianatos

Ana A. Matias, Ana T. Serra e Catarina M. M. Duarte

Laboratório de Nutracêuticos e Libertação Controlada - Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica;
Instituto de Tecnologia Química e Biológica - Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

E-mail: cduarte@ibet.pt

Brócolos, agrião, rúcula, couve-flor, são exemplos de vegetais crucíferos da família *Brassicaceae*, e são reconhecidos como uma importante fonte de fitoquímicos ativos num largo espectro de ação biológica. Em particular, vários estudos epidemiológicos suportam a correlação entre o consumo de vegetais desta família e a diminuição de risco ou incidência de vários tipos de cancro. Um número elevado de trabalhos publicados nas duas últimas décadas mostram que os isotiocianatos (ITC's, metabolitos resultantes da ação da enzima mirosinase sobre os glucosinolatos existentes nos vacúolos das células vegetais) possuem elevada atividade anti-cancerígena, sendo vários os mecanismos possíveis de atuação.

No entanto, por consumo direto destes vegetais na dieta diária, é difícil atingirmos as doses terapêuticas necessárias, devido tanto às baixas concentrações em que se encontram os compostos como à degradação dos mesmos durante o processamento a que são sujeitos na sua confeção ou ingestão. Neste contexto, surge a necessidade de se desenvolverem processos limpos para a extração e fracionamento de ITC's (compostos lipofílicos) a partir de fontes naturais, que permitam a sua posterior utilização em formulações nutracêuticas, alimentos funcionais e fitofármacos.

Glucosinolatos e Isotiocianatos

Os glucosinolatos são metabolitos secundários ricos em enxofre, que existem nos vacúolos das células vegetais e que são convertidos nos correspondentes isotiocianatos, quer

pela ação da enzima mirosinase existente na planta, ou por tio-glucosidases microbianas presentes no cólon. Num primeiro passo, a enzima cliva o glucosinolato, dando origem a β -D-glucose e tiorhidroximato-O-sulfonato, e é esta forma aglicona muito instável que se transforma, através do chamado rearranjo de Lossen, em isotiocianato, ou se decompõe num nitrilo correspondente e enxofre [1].

Os ITC's são passivamente absorvidos no intestino e imediatamente conjugados com glutathione, sendo então ativamente transportados para dentro da circulação sistémica onde são libertados por ação enzimática e I) induzem atividade biológica nas células, ou II) são metabolizados (via do ácido mercatúrico) e excretados na urina.

Apesar de terem sido descritas mais de 120 estruturas de diferentes glucosinolatos, apenas um número restrito destes compostos são encontrados nos vegetais crucíferos mais consumidos (Fig. 1). Todos estes têm uma mistura de derivados de triptofano, e ou um pequeno número de derivados de metionina ou a fenilalanina.

Actividade anticancerígena

A maioria dos estudos epidemiológicos publicados, relacionados com o consumo de vegetais crucíferos e efeito de proteção no desenvolvimento de cancro, descreve os glucosinolatos como sendo os compostos ativos e responsáveis por essa ação. No entanto, existem já múltiplas evidências de

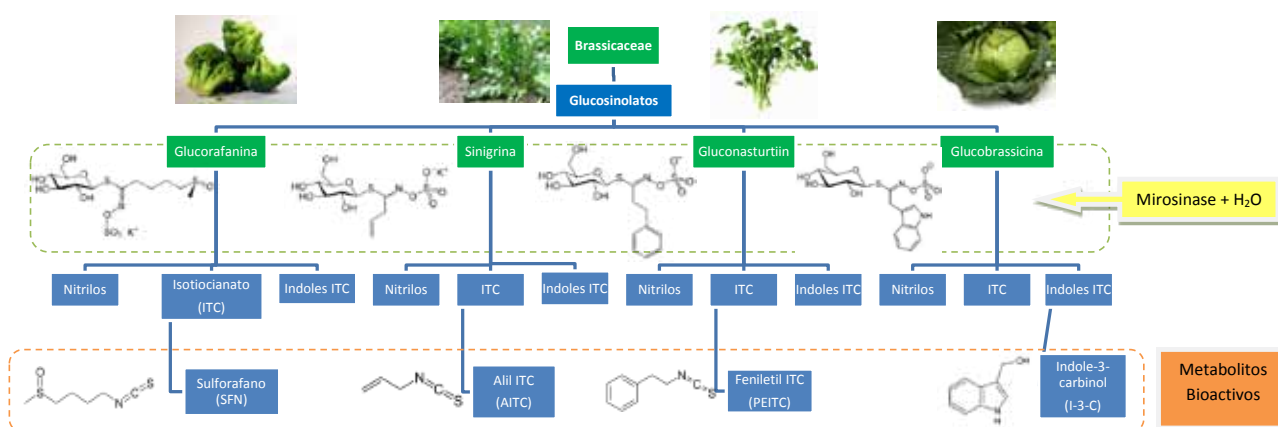


Figura 1 – Glucosinolatos e isotiocianatos mais comuns

que os glucosinolatos não são bioativos, e que os seus produtos de degradação, os isotiocianatos, é que são extremamente potentes evidenciando notável capacidade de agir sobre o processo de carcinogénese, afetando a fase de iniciação do tumor, promoção e progressão, e também, na angiogénese e formação de metástases.

O isotiocianato mais estudado é o sulforafano, derivado da glucorafanina, presente nos brócolos. No entanto, existem já evidências fortes das propriedades anticancerígenas do feniletil isotiocianato (PEITC), derivado de gluconasturtiina e encontrado no agrião, do alil isotiocianato (AITC), derivado de sinigrina e presente na couve e couve-flor e do indole-3-carbinol, derivado de glucobrassicina e existente em diversos vegetais crucíferos.

São vários os mecanismos de ação quimiopreventiva e quimioterapêutica propostos para a atuação dos ITC's, que podem atuar a nível biológico de diversas formas sendo capazes, por exemplo, de inibir tanto a formação como o desenvolvimento de células cancerígenas através de indução de apoptose, inibição da angiogénese ou inibição da progressão do ciclo celular [2]. Existem evidências que o efeito quimiopreventivo dos ITC's é conseguido através da modulação de enzimas de fase I e II, que são enzimas responsáveis pelo metabolismo e desintoxicação de xenobióticos e agentes carcinogénicos. No caso das enzimas de fase I, diversos estudos têm demonstrado que os ITC's inibem a ação destes enzimas reduzindo a bioativação de carcinogénicos (metabolitos electrofílicos muito reativos capazes de produzir danos a nível do ADN, conduzindo à carcinogénese) que são por vezes produzidos durante o metabolismo de determinados

xenobióticos. Relativamente às enzimas fase II (ex: glutatio-na-s-transferase - GST, NADPH), o efeito quimiopreventivo dos ITC's está relacionado com a indução destes enzimas promovendo assim a desintoxicação de xenobióticos e carcinogénicos.

Análises de proteómica muito recentes levaram à identificação de mais de 30 proteínas que são modeladas através da sua interação a nível intracelular com diferentes moléculas de isotiocianatos. Muitas das proteínas presentes no citoesqueleto da célula são responsáveis pela regulação redox e estão implicadas nas diferentes vias de sinalização de apoptose/morte celular [3, 5].

Desenvolvimento de nutracêuticos - Extração de ITC's

As relevantes propriedades farmacológicas dos ITC's, juntamente com uma crescente preocupação da população por consumir produtos naturais capazes de ajudar na prevenção de doenças crónicas como o cancro, tem conduzido à necessidade de desenvolvimento de processos de separação adequados para isolar especificamente estes compostos bioativos de elevado valor acrescentado a partir das suas matrizes naturais. Apesar dos isotiocianatos existirem naturalmente nos vegetais crucíferos a ingestão diária deste tipo de vegetais pode não ser suficiente para estes compostos bioativos atingirem concentrações fisiológicas capazes de promover efeitos benéficos na saúde, uma vez que I) a ingestão de isotiocianatos é fortemente dependente da conversão dos compostos precursores glucosinolatos e II) a maioria das vezes estes vegetais são ingeridos após processamento térmico,

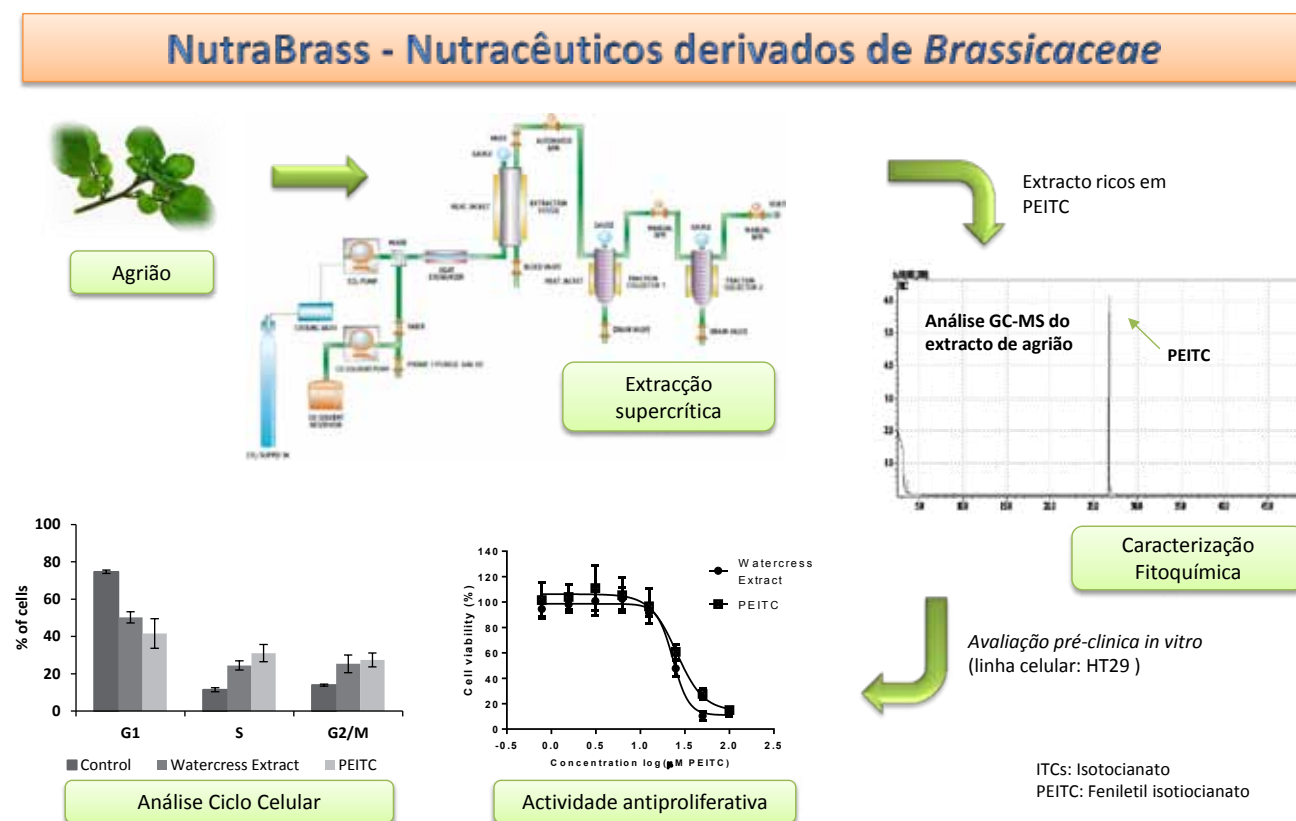


Fig. 2 – Extração de PEITC no âmbito de Projeto NutraBrass

como a cozedura, durante a qual, a mirosinase, é desnaturada favorecendo a presença de glucosinolatos intactos nos vegetais consumidos [6].

Recentemente, alguns métodos considerados de química verde têm vindo a ser aplicados para extrair isotiocianatos, nomeadamente a extração assistida com microondas utilizando como solvente etanol [7], hidrodestilação [8, 9], extração sólido-líquido com água fervente [10] e destilação com água e etanol [11]. No entanto, todos estes métodos têm demonstrado não ser seletivos para os isotiocianatos tendo sido obtidos rendimentos de extração baixos. As desvantagens destes métodos relacionam-se com a aplicação de temperaturas elevadas e com a utilização, em alguns deles, de etanol como solvente, que se sabe que pode reagir com os isotiocianatos.

Atualmente, no âmbito do projeto NutraBrass – Nutracêuticos derivados de Brassicaceae, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, está a ser desenvolvido, pelo Grupo de Nutracêuticos e Libertação Controlada do IBET/ITQB-UNL, um processo de extração supercrítica utilizando dióxido de carbono como solvente, que já demonstrou ser adequado para extrair de forma seletiva o feniletil isotiocianato, PEITC, presente no agrião (Fig. 2). O processo aplicado, para além de seletivo permitiu obter extratos com elevado rendimento. Foi também otimizado o pré-tratamento da matriz para promover a conversão de glucosinolatos em ITC's sem inativar a enzima responsável por esta conversão. Tecnologias que operam com alta pressão, tais como extração com líquidos pressurizados ou com fluidos supercríticos, como a que foi utilizada, são exemplos típicos de processos de química verde que, além das vantagens relacionadas com a não toxicidade e condições de processamento relativamente suaves, proporcionam um ambiente de processamento isento de oxigénio, que preservam as propriedades biológicas dos compostos, minimizando a sua degradação.

O melhor extrato obtido mostrou atividade anticancerígena semelhante ao feniletil isotiocianato quando avaliado o efeito anti-proliferativo e paragem do ciclo celular, utilizando uma linha celular humana de cancro colorectal, HT-29.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Vitacress Portugal por fornecer a matéria prima utilizada nos estudos apresentados e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia através do projecto PTDC/AGR-TEC/3790/2012 e da bolsa PEst-OE/EQB/LA0004/2011.

Referências

- [1] Hanschen FS, Lamy E, Schreiner M, Rohn S. (2014) Angew Chem Int Ed Engl. 53(43):11430-50
- [2] Gupta P, Kim B, Kim SH, Srivastava SK, (2014) Mol Nutr Food Res. 58: 1685-707
- [3] Mi L, Chung FL. (2008) Nutr Cancer. 60 Suppl 1:12-20
- [4] Mi L, Xiao Z, Veenstra TD, Chung FL. (2011) J Proteomics. 74:1036-44
- [5] Mi L, Wang X, Govind S, Hood BL, Veenstra TD, Conrads TP, Saha DT, Goldman R, Chung FL. (2007) Cancer Res. 67; 6409-16
- [6] Traka, M., Mithen, R. (2009) Phytochem Rev. 8, 269-282
- [7] Tanongkankit, Y, Sablani, S.S., Chiewchan, N., Devahastin, S. (2013). J Food Eng. 117, 151-157
- [8] Wu, H., Zhang, G.A., Zeng, S., Lin, K.c. (2009). Pest Manag Sci. 65, 1003-1008
- [9] Dey, M., Ribnicky, D., Kurmukov, A.G., Raskin, I. (2006). J Pharmacol Exp Ther. 317, 326-333
- [10] Herzallah, S. & Holley, R. (2012) LWT – Food Sci Technol. 47, 293-299
- [11] Sharma, H., Ingle, S., Singh, C., Sarkar, B., Upadhyay, A. (2012). J Food Sci Technol. 49, 368-372



Visite o nosso site
www.spbt.pt

(Poli)fenóis de pequenos frutos: digestão, metabolização, biodisponibilidade e evidências de efeitos protetores em doenças neurodegenerativas

Cláudia N. Santos^{1,2,*}, Inês S. Costa^{1,2}, Inês Figueira², Lucélia Tavares^{1,2} e Ricardo B. Ferreira^{2,3}

¹Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET), 2781-901 Oeiras

²Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, Apartado 127, 2781-901 Oeiras

³Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

*E-mail: csantos@ibet.pt; csantos@itqb.unl.pt

Os (poli)fenóis¹ são o grupo de metabolitos secundários com maior dispersão nas plantas e são, portanto, constituintes normais da alimentação humana. A ingestão regular de alimentos contendo (poli)fenóis tem sido associada a um menor risco de desenvolver doenças crónicas e muitos estudos estão a tentar corroborar esta teoria. No entanto, a contribuição exata dos (poli)fenóis para a prevenção de doenças ainda é desconhecida. Para melhor compreender como atuam os (poli)fenóis no corpo humano é essencial compreender a sua biodisponibilidade. Depois da ingestão dos alimentos, os compostos sofrem diversas transformações no trato gastrointestinal, bem como depois da sua absorção para a corrente sanguínea. Para além disso, uma grande quantidade de compostos que não são absorvidos no intestino delgado chegam ao cólon onde são catabolizados pela microbiota aí presente, originando fenóis mais simples que ainda poderão ser absorvidos e metabolizados (Figura 1). No entanto, estes eventos não estão totalmente elucidados, tal como não são ainda conhecidos a maioria dos metabolitos originados durante a digestão a partir dos (poli)fenóis.

Os (poli)fenóis que ingerimos mais frequentemente não são necessariamente os mais ativos no organismo humano. Isto prende-se com o fato de os diferentes compostos apresentarem diferentes atividades e serem diferencialmente absorvidos, metabolizados e excretados. Durante a digestão e metabolismo os (poli)fenóis sofrem várias alterações estruturais, resultando em metabolitos que circulam no sangue e atingem tecidos, mas que diferem dos compostos nativos quanto à sua estrutura química e atividade biológica. Absorção, metabolismo e excreção são assim passos essenciais para se compreender o efeito dos (poli)fenóis na saúde humana e consequentemente estratégias para potenciar os seus efeitos.

Estudos de intervenção em humanos

Com o intuito de identificar os metabolitos biodisponíveis mais abundantes após a ingestão de (poli)fenóis presentes nos alimentos e prever a sua importância para a saúde hu-

mana, realizam-se estudos de intervenção com humanos. Após ingestão dos alimentos é feito um estudo cinético em amostras de sangue e urina. O grupo da Biologia da Doença e do Stress do IBET/ITQB realizou um estudo de intervenção nutricional com esse objetivo, onde os voluntários ingeriram um puré de pequenos frutos. A inexistência de *standard* para os metabolitos dos (poli)fenóis constitui uma grande limitação para o estudo do seu metabolismo. Foi adotada uma abordagem analítica direcionada a alguns metabolitos por pesquisa da sua massa exata, o que pressupõe uma predição teórica da sua estrutura com base no metabolismo (Pimpão *et al.* 2014). Pode no entanto recorrer-se a uma abordagem não direcionada para a definição do perfil metabolómico, pesquisando metabolitos (GC, LC, etc) com base na sua semelhança estrutural com o composto que lhe deu origem, pressupondo uma ligação do espectrómetro de massa a uma biblioteca de compostos.

No entanto, a crescente existência de mais estudos que põem em evidência a biodisponibilidade na circulação sanguínea dos (poli)fenóis e dos seus metabolitos (Pimpão *et al.* 2014, Manach *et al.* 2004, Manach *et al.* 2005, Williamson & Manach 2005) não colmata ainda a pouca informação que existe disponível acerca da sua capacidade para alcançar alguns órgãos-alvo, e aí, exercer os seus efeitos. Em particular, é muito importante entender a permeabilidade de alguns órgãos considerados santuários farmacológicos, como o cérebro, placenta e testículos, a estes metabolitos circulantes, que são os verdadeiros compostos com potencialidade para efeitos biológicos. E embora os estudos com humanos sejam mais relevantes, os mecanismos de ação podem ser estudados usando sistemas modelo *in vitro* baseados em células humanas por analogia ao que acontece na avaliação das propriedades dos fármacos (del Rio *et al.* 2013).

Estudos das bioatividades para o cérebro

Atualmente existem várias evidências científicas do benefício da ingestão de pequenos frutos para a memória e ma-

¹ O termo fenol é usado para descrever um composto que tenha na sua estrutura pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo ligados. Os flavonoides, com vários anéis aromáticos são normalmente designados de polifenóis. Contudo outros compostos, incluindo os ácidos fenólicos, com apenas um anel aromático são também designados de polifenóis. Neste artigo será utilizado o termo genérico de (poli)fenóis que inclui todas as subclasses do fenóis incluindo os ácidos fenólicos.

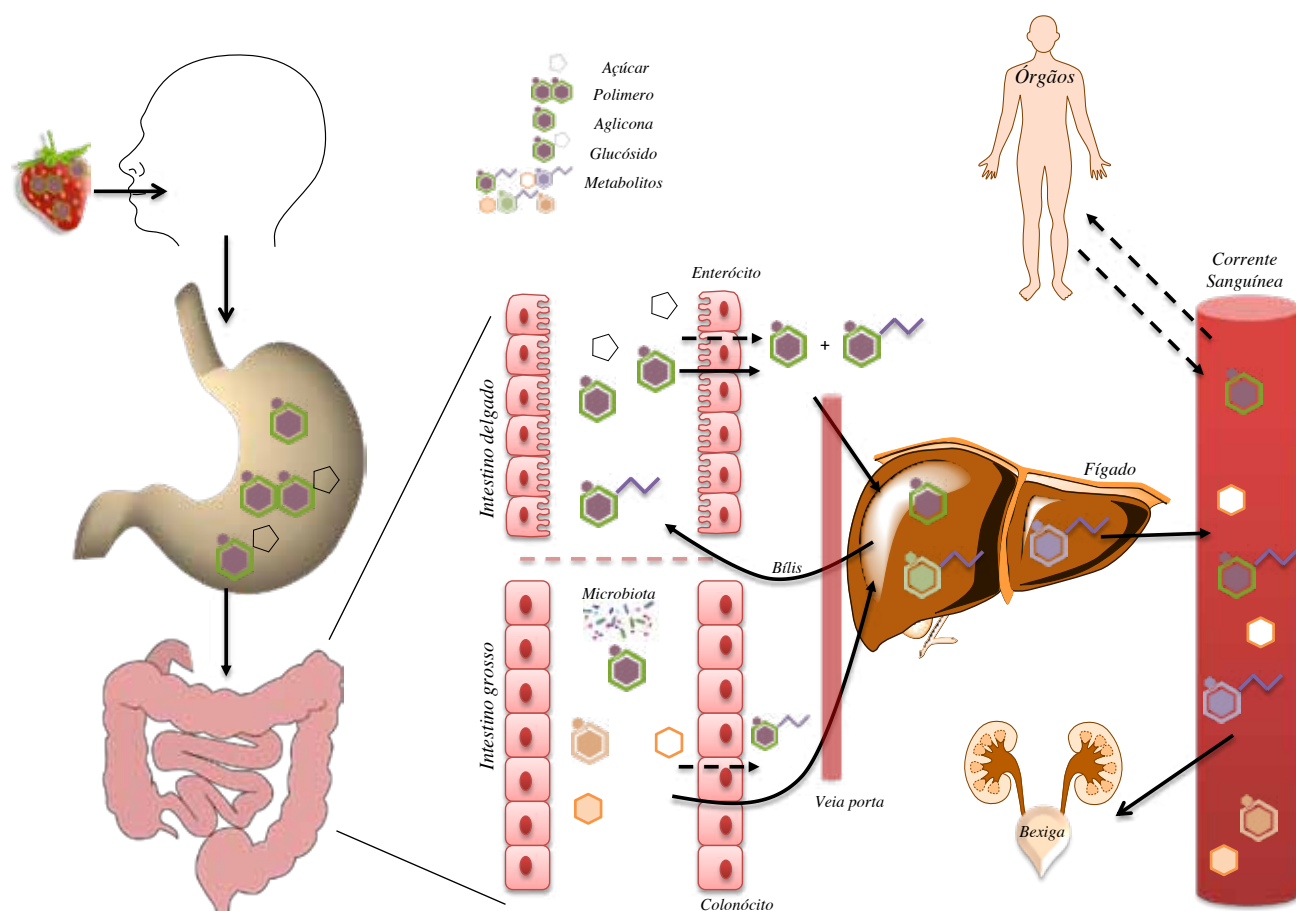


Figura 1 - Diagrama geral de absorção, biotransformação e excreção dos (poli)fenóis no organismo humano. Nas plantas, os (poli)fenóis estão normalmente presentes sob a forma de ésteres, glucosídeos e polímeros. A maioria destas formas não são absorvidas diretamente e poderão sofrer algumas alterações estruturais até alcançar o duodeno. A absorção dos compostos glucosilados é usualmente precedida pela separação do açúcar e da aglicona, o que pode ocorrer no intestino delgado ou no cólon onde são metabolizados pela microbiota e posteriormente absorvidos. Outras alterações na estrutura dos (poli)fenóis incluindo O- e C-deglucosilação, hidrólise de ésteres e amidas e desglucoronidação ocorrem devido à microbiota no cólon. Após absorção, os metabolitos originados a partir dos (poli)fenóis são ainda conjugados, via reações de fase I e fase II que ocorrem principalmente no fígado. O passo final é a eliminação e/ou destoxificação através da excreção.

nutrição do estado cognitivo, o qual é deteriorado com o envelhecimento [1, 2]. Em modelos animais, usando ratos envelhecidos, o consumo de pequenos frutos melhorou a performance em testes motores relacionados com equilíbrio e coordenação motora, bem como em testes que avaliaram a memória espacial [2, 3].

A abordagem mais utilizada atualmente contempla a avaliação *in vitro* dos (poli)fenóis em condições de ensaio próximas das condições fisiológicas, em modelos celulares de doença (Figura 2). Não utilizando os (poli)fenóis isolados mas recorrendo alternativamente aos seus metabolitos biodisponíveis, quando conhecidos, ou ainda recorrendo a modelos *in vitro* de digestão gastrointestinal, podem assim ser testados os metabolitos obtidos em células humanas em concentrações passíveis de serem encontradas no plasma sanguíneo (0-4 μ M) [4, 5] (Figura 2). Numa primeira fase, os estudos decorreram em modelos recorrendo a linhas celulares para que, de forma mais expedita, se identificassem mecanismos-alvo de metabolitos de amoras [4, 5]. No entanto, para se validar a neuroproteção obtida e os mecanismos identificados, foi implementado um ensaio de neuroproteção num modelo de neurodegeneração *ex vivo*, desenvolvido a partir de células cerebelares granulares extraídas de ratinhos, em que a morte celular foi induzida pela aplicação de glutamato [6]. O glu-

tamato é o neurotransmissor endógeno mais predominante no cérebro humano; no entanto, quando este atinge elevados níveis extracelulares é desencadeado um mecanismo de excitotoxicidade que conduz à morte neuronal. Neste último modelo confirmou-se que o contacto das células cerebelares granulares com metabolitos de (poli)fenóis protegeu-as de forma significativa, quando comparadas com células expostas apenas ao estímulo tóxico (glutamato).

Por outro lado, de forma a validar a abordagem anteriormente proposta como fisiológica, é também essencial assegurar, pelo menos numa pequena extensão, que os metabolitos dos (poli)fenóis conseguem atravessar a barreira hematoencefálica ou interagir com as células que a constituem e desencadear cascatas de sinalização que possam ativar processos no sistema nervoso central. A barreira hematoencefálica é essencialmente constituída por células endoteliais, perócitos e astrócitos, formando uma camada semi-permeável que exerce um controlo altamente regulado no tráfego molecular transendotelial. Os metabolitos poderão conseguir atravessar esta barreira através de mecanismos de difusão passiva, por transporte ativo, ou ainda um transporte mediado por componentes especializados [7]. Estudos *in vivo* com animais [8, 9] demonstraram que determinados (poli)fenóis são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica independen-

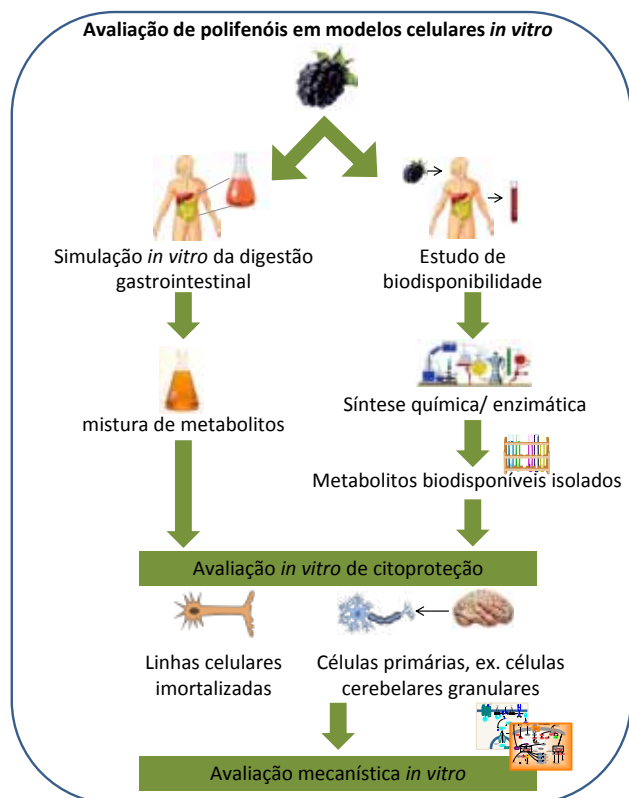


Figura 2 – Representação esquemática da abordagem de análise da capacidade neuroprotetora dos metabolitos de (poli)fenóis em células humanas.

temente da via de administração, tendo sido detetados nos tecidos cerebrais.

Recorrendo a um modelo simplificado da barreira hematoencefálica, constituído por células humanas endoteliais imortalizadas [10, 11], pode-se avaliar o transporte de metabolitos de (poli)fenóis através destas células e quais os efeitos diretos que estes compostos podem exercer nas mesmas. De forma a elucidar os mecanismos de transporte dos metabolitos dos (poli)fenóis através da barreira hematoencefálica dever-se-á analisar a cinética de transporte dos metabolitos, bem como o papel de diferentes transportadores de efluxo (através de inibidores), sempre assegurando a integridade celular da barreira [10].

Conclusão

À luz do conhecimento atual, propõem-se mecanismos de ação dos (poli)fenóis muito para além das suas propriedades como sequestradores de radicais livres (antioxidantes): pensa-se que os (poli)fenóis possam exercer os seus efeitos no cérebro por vias indiretas, por ativação de mecanismos de hormese e através de efeitos nos sistemas periféricos do corpo humano, que, em última instância, influenciam o funcionamento do sistema nervoso central [12]. A hormese descreve o mecanismo pelo qual a exposição a doses baixas de um metabolito, que poderá ser tóxico em doses mais elevadas, é capaz de desencadear efeitos benéficos nas células ou no organismo [13]. Neste sentido, é importante ajustar o estudo dos (poli)fenóis para além do dogma reducionista polifenol-efeito: é preciso abranger não só os (poli)fenóis,

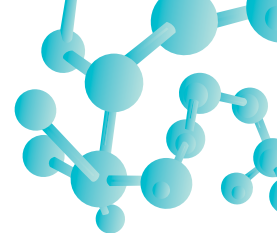
como também os metabolitos resultantes da sua digestão em concentrações que, apesar de baixas, sejam fisiologicamente relevantes, tendo em conta a multiplicidade de ações entre diferentes órgãos do corpo humano num benefício global para o sistema nervoso central.

Agradecimentos

Os trabalhos foram suportados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PEst-OE/EQB/LA0004/2011 e bolsas individuais) e pela Comissão Europeia (FP7 EUBerry KBBE-2010-4 265942). Agradece-se Alexandra Brito e Dora Brites do iMED da Faculdade de Farmácia de Lisboa pela colaboração nos trabalhos relacionados com a barreira hematoencefálica.

Referências

- [1] Shukitt-Hale, B.; Lau, F. C.; Joseph, J. A., Berry fruit supplementation and the aging brain. *J Agric Food Chem* 2008, 56, (3), 636-41
- [2] Malin, D. H.; Lee, D. R.; Goyarzu, P.; Chang, Y. H.; Ennis, L. J.; Beckett, E.; Shukitt-Hale, B.; Joseph, J. A., Short-term blueberry-enriched diet prevents and reverses object recognition memory loss in aging rats. *Nutrition* 2010, 27, (3), 338-342
- [3] Shukitt-Hale, B.; Cheng, V.; Joseph, J. A., Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci* 2009, 12, (3), 135-40
- [4] Tavares, L.; Figueira, I.; Macedo, D.; McDougall, G. J.; Leitão, M. C.; Vieira, H. L. A.; Stewart, D.; Alves, P. M.; Ferreira, R. B.; Santos, C. N., Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus sp.*) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2012, 131, (4), 1443-1452
- [5] Tavares, L.; Figueira, I.; McDougall, G.; Vieira, H.; Stewart, D.; Alves, P.; Ferreira, R.; Santos, C., Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species. *Eur J Nutr* 2013, 52, (1), 225-236
- [6] Mehta, A.; Prabhakar, M.; Kumar, P.; Deshmukh, R.; Sharma, P. L., Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 2013, 698, (1-3), 6-18
- [7] Faria, A.; Mateus, N.; Calhau, C., Flavonoid transport across blood-brain barrier: Implication for their direct neuroprotective actions. *Nutr Aging* 2012, 1, (2), 89-97
- [8] El Mohsen, M. A.; Marks, J.; Kuhnle, G.; Moore, K.; Debnam, E.; Srai, S. K.; Rice-Evans, C.; Spencer, J. P. E., Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *Br J Nutr* 2006, 95, (01), 51-58
- [9] Talavéra, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Gil-Izquierdo, A.; Lamaison, J.-L.; Révész, C., Anthocyanin Metabolism in Rats and Their Distribution to Digestive Area, Kidney, and Brain. *J Agric Food Chem* 2005, 53, (10), 3902-3908
- [10] Palmela, I.; Cardoso, F. L.; Bernas, M.; Correia, L.; Vaz, A. R.; Silva, R. F. M.; Fernandes, A.; Kim, K. S.; Brites, D.; Brito, M. A., Elevated Levels of Bilirubin and Long-Term Exposure Impair Human Brain Microvascular Endothelial Cell Integrity. *Curr Neurovasc Res* 2011, 8, 153-169
- [11] Stins, M. F.; Badger, J.; Sik Kim, K., Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 2001, 30, (1), 19-28
- [12] Schaffer, S.; Halliwell, B., Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes Nutr* 2012, 7, (2), 99-109
- [13] Mattson, M. P.; Cheng, A., Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci* 2006, 29, (11), 632-639



Reinventando as leguminosas de grão na vanguarda da qualidade alimentar

Maria Carlota Vaz Patto

Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal | Tel: +351 21 446 9631

E-mail: cpatto@itqb.unl.pt | Website: <http://www.itqb.unl.pt/~BCV/carlota.htm>



As atuais tendências, tanto no crescimento demográfico como no consumo humano, levam a crer que a procura mundial de produtos alimentares continuará a crescer pelo menos por mais 40 anos. No entanto, neste momento, é não só necessário aumentar o abastecimento alimentar, como também a sua qualidade e em particular o seu valor nutricional (Varshney *et al.*, 2010).

A qualidade das culturas alimentares tem presentemente importantes repercussões a nível dos mercados económicos. Os consumidores estão cada vez mais conscientes da influência que a alimentação pode ter na sua saúde e exigem alimentos que para além de serem práticos e saborosos, sejam também mais saudáveis e nutritivos. Verifica-se ainda que os agricultores e as agroindústrias procuram produzir alimentos alternativos, que aumentem a diversidade da oferta alimentar, mas de forma mais sustentável, com uma reduzida pegada de carbono (Boye *et al.*, 2010).

As leguminosas de grão, para além de serem ricas em proteínas e compostos benéficos para a saúde, são amigas do ambiente cumprindo com os requisitos acima referidos e representando excelentes alternativas à produção de alimentos mais tradicionais.

Os benefícios para a saúde das leguminosas de grão, como é o caso da prevenção de doenças crónicas (Basset *et al.*, 2010), são atribuídos ao seu importante conteúdo em fibra solúvel e insolúvel, amido resistente e oligossacáridos pré-bióticos. Alguns destes componentes regulam a glicémia e

a função gastrointestinal, enquanto outros apresentam propriedade antioxidante (Cardador-Martinez *et al.*, 2002). Adicionalmente, através de sua particular capacidade de fixação biológica de azoto atmosférico e grande facilidade de incorporação em rotações com outras culturas, as leguminosas de grão contribuem para a mitigação dos efeitos adversos da produção agrícola no meio ambiente e aumentam a sustentabilidade dos ecossistemas.

Embora os benefícios das leguminosas de grão sejam reconhecidos por governos e organizações de saúde ao nível mundial e recomendadas como fundamentais numa dieta alimentar saudável, assiste-se presentemente a uma redução do seu consumo. Esta redução tem-se verificado mesmo nos mercados mais tradicionais como a Índia ou a Espanha. Nestes países esta redução tem sido acompanhada por um aumento dos problemas de saúde típicos dos mercados não tradicionais como a América do Norte (Curran, 2012), o que realça a necessidade de desafiar e inverter esta tendência.

Na verdade, também o cultivo das leguminosas de grão tem, pelo menos na Europa, estado em constante declínio nos últimos 50 anos (Rubiales & Mikic, 2015). Este decréscimo tem sido devido principalmente à instabilidade produtiva das variedades existentes. Durante este período, Portugal e outros países europeus tornaram-se totalmente dependentes do exterior no que diz respeito à proteína vegetal, importando cerca de 70% das suas necessidades na forma de leguminosas de grão (www.ine.pt).

Para aumentar a produção e o consumo destas leguminosas os objetivos do melhoramento genético vegetal e as preferências dos consumidores e produtores devem ser mais consonantes. É portanto necessário o desenvolvimento de variedades de leguminosas de grão produtivas e resistentes, mas também associadas a uma maior qualidade, seja esta nutricional, organolética ou de processamento.

O melhoramento de variedades de leguminosas de grão com maior qualidade é, no entanto, uma tarefa complexa. Esta complexidade advém da existência de grande interação entre os diferentes fatores que influenciam a qualidade. Muitos dos componentes das leguminosas de grão benéficos para a saúde podem causar um gosto amargo ou adstringente, razão geralmente citada para o desinteresse dos consumidores (Cox *et al.*, 2012). Adicionalmente e dependendo da dieta, estes mesmos componentes (tais como taninos ou inibidores da tripsina) podem ser considerados fatores anti nutricionais, reduzindo a absorção de nutrientes, a disponibilidade em certos minerais e a digestibilidade da proteína (Diaz-Batalla *et al.*, 2006). Finalmente alguns destes componentes podem ainda estar associados à resistência a pragas e doenças (Islam *et al.*, 2003) ou a stresses abióticos (Winkel-Shirley, 2002).

A atual ausência de uma abordagem integradora que tenha em conta a complexidade da qualidade nestas plantas, está a limitar a exploração do potencial destas leguminosas para a alimentação humana. A falta de ferramentas rápidas e eficientes que simplifiquem a complexa seleção para as múltiplas características de qualidade valorizadas quer pelos consumidores, quer pelos produtores, tem dificultado seriamente o trabalho dos melhoradores destas espécies.

O trabalho desenvolvido pelo meu grupo de investigação no ITQB está a contribuir para colmatar esta lacuna.

Trabalhamos atualmente com duas das mais importantes leguminosas de grão para a dieta mediterrânica, mas que tal como outras leguminosas de grão na Europa, se encontram subutilizadas. São elas o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e o chícharo (*Lathyrus sativus* L.). O feijão é a leguminosa de sementeira de Primavera mais importante na alimentação humana. Em Portugal representa 80% do consumo interno de leguminosas de grão, dos quais apenas 10% são produzidos no País (www.ine.pt). O chícharo é uma leguminosa de sementeira Outono-Inverno considerada como uma das mais promissoras fontes de calorias e proteínas nas áreas propensas à seca e com um grande potencial de reintrodução nas zonas mais marginais da Europa (Vaz Patto *et al.*, 2006).

Sabendo que a grande interação existente entre as características de qualidade se reflete a nível genético, temos vindo a dedicar esforços na elucidação do complexo controlo genético da qualidade nestas duas espécies de leguminosas.

Muitas das características de qualidade, sejam elas organoléticas, nutricionais ou de processamento, são características quantitativas, dependendo da expressão concertada de múltiplos genes (Diaz *et al.*, 2010). Assim estamos a identificar e localizar os genes que controlam estas características e respetivas interações mediante uma análise de QTL (Quantitative Trait Loci – loci de características quantitativas) ou através

de estudos de associação genómica em larga escala (GWA - genome wide association). Esta informação vai permitir o posterior desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para apoiar o melhoramento genético de precisão para a qualidade nestas leguminosas. Uma destas ferramentas são os marcadores moleculares associados às diferentes características de qualidade, cuja utilização reduzirá a complexidade do processo de seleção dos genótipos de interesse. A sua utilização aumentará a eficiência e velocidade dos programas de melhoramento, permitindo a implementação rotineira da seleção para a qualidade em conjunto com a seleção para o aumento da produtividade e resistência a stresses bióticos e abióticos.

Este tipo de investigação na vanguarda da qualidade alimentar só tem sido possível através de uma colaboração multidisciplinar e participativa, envolvendo diferentes grupos de investigação do ITQB e do INIAV, de áreas tradicionalmente distantes como a tecnologia alimentar, a química analítica, a genética quantitativa e o melhoramento de plantas. Estas disciplinas estão a ser apoiadas por um extenso trabalho de campo, que permite integrar uma caracterização detalhada de diferentes aspetos de qualidade em coleções de germoplasma de feijão e chícharo. De entre as características de qualidade que estudamos podemos destacar o teor em proteína, fibra, compostos antioxidantes e voláteis, a capacidade de enlatamento ou de panificação e as preferências dos consumidores, estas últimas medidas através de análises sensoriais de produtos alimentares com leguminosas. Estas características estão a ser correlacionadas com a presença de variantes alélicas do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism), identificadas por genotipagem de alto débito dos mesmos materiais vegetais. É através desta integração que identificamos os genes/QTLs que controlam as diferentes características de qualidade, e caracterizamos as redes de interação génica existentes, desenhando ferramentas biotecnológicas para uma seleção inteligente e de precisão.

Em conclusão, as novas variedades de leguminosas de grão que serão selecionadas através do melhoramento genético de precisão com base na tecnologia por nós desenvolvida, apresentarão maior qualidade para a alimentação humana. Subsequentemente, os produtos destas variedades terão uma maior aceitação e procura por parte dos consumidores, favorecendo um aumento da produção de leguminosas de grão no País, o que irá diversificar a oferta de proteína vegetal no mercado e aumentar a sustentabilidade da nossa agricultura bem como a autonomia económica nacional.

Agradecimentos

Agradeço a todos os estudantes e colaboradores que contribuíram e contribuem para os estudos mencionados e em particular à Rosário Bronze (ITQB/IBET/FFUL), Carla Brites e Manuela Veloso (INIAV). Estes estudos são suportados financeiramente pela União Europeia, através do projecto LE-GATO (FP7-KBBE-2013-7-613551) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC-AGR-TEC-3555-2012, UID/Multi/04551/2013).

Referências

Basset C, Boye J, Tyler R, Oomah BD (2010) Molecular, functional and processing characteristics of whole pulses and pulse fractions and their emerging food and nutraceutical applications. *Food Res Int* 43: 397-398

Boye J, Zare F, Pletch A (2010) Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res Int* 43: 414-431

Cardador-Martinez, Loarca-Pina G, Oomah BD (2002) Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 50: 6975-6980

Cox DN, Melo L, Zabarás D, Delahunty CM (2012) Acceptance of health-promoting Brassica vegetables: the influence of taste perception, information and attitudes. *Public Health Nutr* 15: 1474-1482

Curran J (2012) The nutritional value and health benefits of pulses in relation to obesity, diabetes, heart disease and cancer. *Brit J Nutr* 108: S1-S2

Diaz AM, Caldas GV, Blair MW (2010) Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Res Int* 43: 595-601

Diaz-Batalla L, Widholm JM, Fahey GC, Castano-Tostado E, Paredes-Lopez O (2006) Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 54: 2045-20526

Islam FMA, Rengifo J, Redden RJ, Basford KE, Beebe SE (2003) Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. *Plant Foods Human Nutr* 58: 285-297

Rubiales D, Mikic A (2015) Introduction: Legumes in Sustainable Agriculture. *Crit Rev Plant Sci* 34: 2-3

Varsheney RK, Glaszmann JC, Leung H, Ribaut JM (2010) More genomic resources for less-studied crops. *Trends Biotechnol* 28: 452-460

Vaz Patta MC, Skiba B, Pang ECK, Ochatt SJ, Lambein F, Rubiales D (2006) *Lathyrus* improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical breeding to marker assisted selection. *Euphytica* 147: 133-147

Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5: 218-223



nzytech
genes & enzymes

Don't spoil your food analysis
we can be your partner

 **Molecular Biology**
DNA purification
DNA amplification
DNA sequencing

 **Analytical analysis**
Enzymatic test kits
Analytical enzymes


NZYTech: an ISO 9001 certified company for research and development of biotech products

Cápsulas de café expresso: modulação das propriedades sensoriais às expectativas e comodidade do consumidor

Guido R. Lopes¹, Andreia S. Ferreira¹, Mariana Pinto¹, Cláudia P. Passos¹, Elisabete Coelho¹, Carla Rodrigues², Marco Miranda², Sílvia M. Rocha¹ e Manuel A. Coimbra^{1*}

¹Departamento de Química, QOPNA, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

²Diverge, Centro de Inovação do Grupo Nabeiro, Lisboa, Portugal

*E-mail: mac@ua.pt

Enquadramento

As propriedades diferenciadoras e características do café expresso devem-se, em grande parte, ao método de preparação da bebida e ao facto do processo extrativo ser exercido sob pressão. Assim, durante a preparação de um café expresso, uma pequena quantidade de água quente é percolada através de uma porção de café torrado moído, sob pressão e durante um curto período de tempo [1]. É este processo que conduz à extração de uma enorme quantidade de compostos para a bebida de café expresso. Da vasta gama de compostos extraídos, alguns têm papel preponderante no corpo da bebida, outros na cor e na formação do creme, enquanto os mais voláteis são responsáveis pelo aroma característico percebido aquando da toma do café expresso.

Nos últimos anos, a oferta de café expresso em cápsula tem oferecido aos consumidores a possibilidade de, de uma forma cómoda e individualizada, experimentar diferentes blends com características distintas. O processo de torra, a proveniência geográfica e a composição varietal do café são fatores que influenciam as características do café torrado moído [1, 6]. No entanto, pouco se sabe acerca das características dos cafés expresso obtidos em sistema de cápsulas e de que modo este recente método de preparação de cafés expresso influencia a bebida. O Projeto Coffee Art, realizado em parceria entre a Novadelta S.A. e a Universidade de Aveiro, financiado através de uma candidatura QREN individual, permitiu, de uma forma sistematizada, estudar 8 blends de café expresso em cápsula, e estabelecer as características químicas associadas a este tipo de café expresso perspetivando a sua perceção sensorial pelo consumidor.

Características físico-químicas dos cafés expresso em cápsula

A Figura 1 sistematiza, através de um gráfico *Heat Map*, os teores relativos em termos de densidade, sólidos totais, cinzas, lípidos totais, pH, diterpenos (kahweol, cafestol e 16-O-metilcafestol), proteína, fibra dietética, polissacarídeos, ácidos clorogénicos, cafeína e melanoidinas de 8 blends de café expresso. A representação *Heat Map* está normalizada pelo mínimo e pelo máximo de cada variável, tendo como limites a cor azul e vermelha representativas do teor relativo mínimo e máximo, respetivamente. Esta representação evidencia que cada blend tem um padrão distintivo em termos de propriedades químicas. O blend descafeinado é caracterizado por ter menor teor relativo no que respeita à maioria das características químicas estudadas, o que poderá ser refletido na perceção sensorial do café expresso, dando origem a um café menos encorpado que os restantes. O teor de sólidos totais é um parâmetro que reflete a quantidade de compostos extraídos para a bebida de café expresso e que está intimamente relacionado com o corpo da bebida. A generalidade dos blends analisados caracteriza-se por conter cerca de 1,20 g de sólidos totais por café expresso de 40 mL, valor semelhante ao obtido com outro sistema de cápsulas

(1,21 g) [7]. No entanto, o blend descafeinado apresentou uma diminuição de cerca de 18% em relação ao conteúdo de sólidos da generalidade dos blends o que poderá indicar que o processo de descafeinação leva à alteração das propriedades extrativas dos compostos do café, diminuindo, neste caso, o seu conteúdo. Por outro lado, a obtenção de uma quantidade superior de sólidos utilizando processos de extração convencionais (1,58-1,75 g) [1, 8] evidencia uma menor capacidade extrativa dos sistemas de cápsulas em relação aos restantes processos de extração de café expresso.

A Figura 1 mostra que o blend E apresenta um teor de cafeína superior aos restantes blends o que se deve à adição de extratos de ginseng e guaraná. Além deste parâmetro, o blend E apresenta teores elevados de polissacarídeos, ácidos clorogénicos e proteína. Este incremento reflete-se na maior quantidade de sólidos totais da bebida preparada com este blend (1,67 g por café), correspondendo a um aumento de cerca de 40% em relação aos restantes blends. Os polissacarídeos do café (galactomananas e arabinogalactanas) presentes nos cafés expresso analisados contribuem com cerca de 200 mg para a fibra dietética solúvel, um componente importante na dieta humana, resistente à digestão e absorção no intestino delgado, sendo completa ou parcialmente fermentado apenas no intestino grosso [9]. Deste modo, beber dois a três

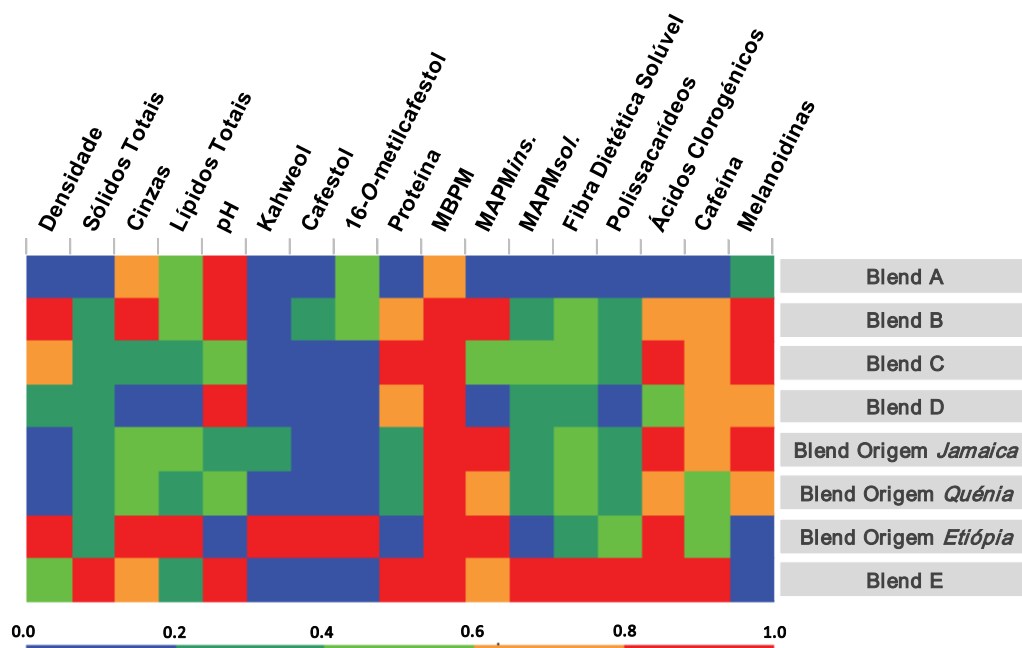


Figura 1 – Heat Map dos parâmetros físico-químicos analisados com os cafés expresso: densidade, sólidos totais, cinzas, lípidos totais, pH, kahweol, cafestol, 16-O-metilcafestol, proteína, material de baixo peso molecular (MBPM), material de alto peso molecular insolúvel em água fria (MAPMins.), material de alto peso molecular solúvel em água fria (MAPMsol.), fibra dietética solúvel, polissacarídeos, ácidos clorogênicos, cafeína e melanoidinas.

Nota: Os dados foram normalizados tendo em conta o valor máximo e mínimo em cada parâmetro, sendo que a cor azul representa valores mínimos ou próximos do mínimo e a cor vermelha são representados resultados máximos ou próximo do máximo.

cafés expresso por dia corresponde à ingestão de cerca de 10% da fibra dietética solúvel recomendada [10]. Na bebida de café expresso, cerca de 50% dos ácidos clorogênicos, que são compostos com propriedades antioxidantes, encontram-se adsorvidos aos polissacarídeos e ao material castanho de alto peso molecular, denominado de melanoidinas. Este sistema permite a libertação controlada dos ácidos clorogênicos ao longo do trato gastrointestinal, doseando os efeitos antioxidantes destes compostos durante a digestão [11].

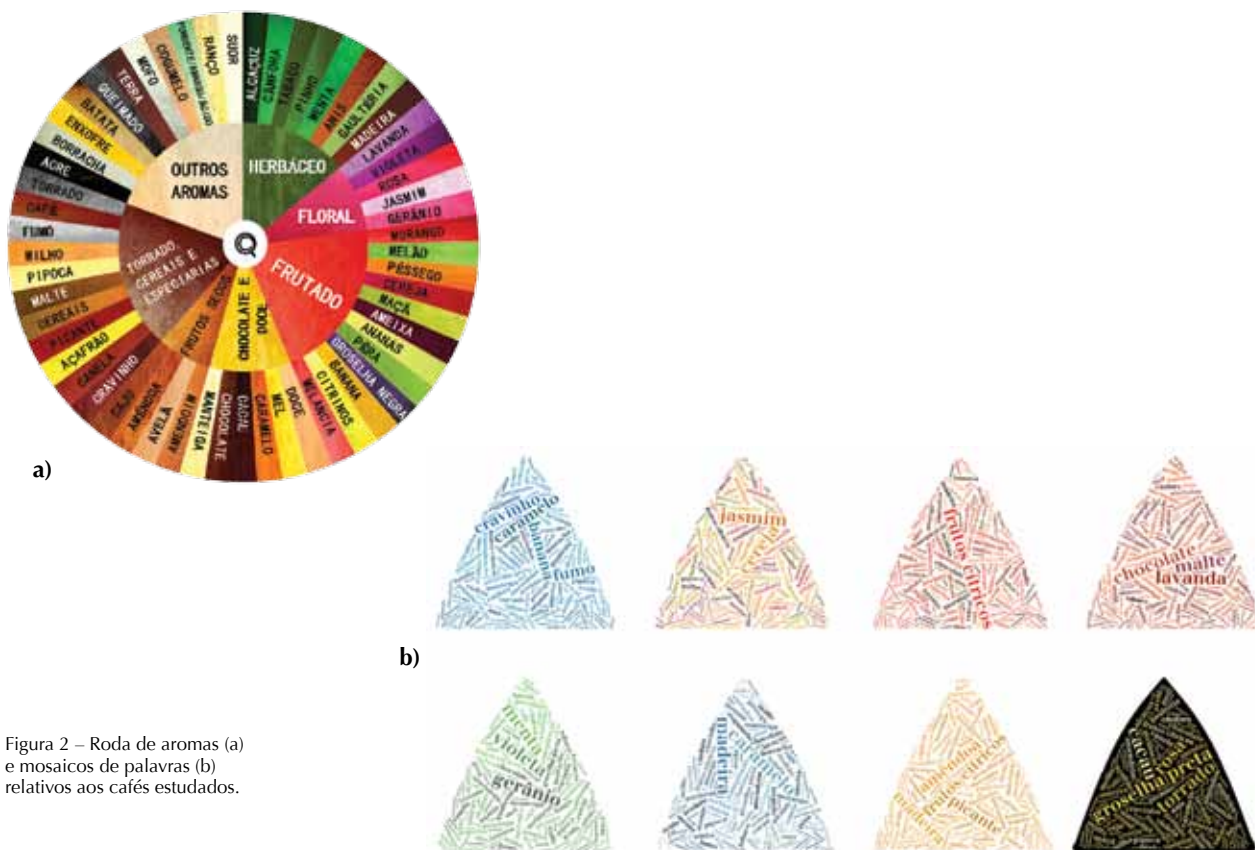
Os blends analisados, em concordância com outros sistemas de cápsula [7], apresentam um teor de lípidos de 7,40-35,10 mg, um valor inferior ao referido na literatura para cafés expresso [1, 8]. Este baixo teor lipídico poderá permitir maior quantidade de creme [12] e também menor quantidade de diterpenos, muitas vezes associados a efeitos colesterolémicos [13, 14]. Foi ainda possível verificar que apenas uma pequena fração da quantidade de lípidos que se encontram em cada cápsula (390-830 mg) passa para a bebida (1,9-5,1%). O facto da grande maioria dos diterpenos que se encontram nas cápsulas não serem extraídos para a bebida, revela-se deste modo, uma vantagem.

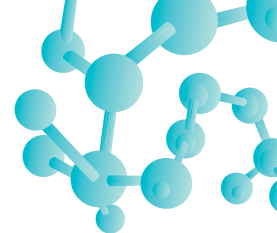
Características dos compostos voláteis dos cafés expresso em cápsula

A microextração em fase sólida combinada com a cromatografia de gás bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massa com analisador de tempo de voo (HS-SPME/GC×GC–ToFMS) foi usada na caracterização da composição volátil do café, uma vez que combina uma técnica de extração de elevada eficiência com uma técnica de análise de elevada sensibilidade e resolução. Assim, foi possível por análise direta do pó e da bebida de café, obter informação detalhada

sobre a composição desta amostra complexa, inclusive sobre os compostos presentes em concentrações vestigiais, mas com potencial impacto nas características de aroma. O estudo detalhado da composição volátil dos cafés expresso permitiu identificar mais de 700 compostos voláteis. Através da bibliografia foi possível atribuir descritores de aroma a 165 destes compostos, o que possibilitou a construção de *aromas networks* (redes de aromas) para poder explicar os aromas dos cafés expresso. Um *aroma network* é uma rede que integra os potenciais aromas presentes no café expresso e os compostos que explicam cada um desses aromas de acordo com o descritor de aroma de cada composto. A roda de aromas apresentada na Figura 2a integra a informação dos *aromas networks*, constituindo uma ferramenta importante na identificação dos diferentes aromas característicos do café. Esta divide-se em dois círculos: um círculo interior que corresponde a cada um dos 7 *aromas networks* desenvolvidos e um círculo exterior que diz respeito a aromas mais específicos associados a cada um dos *aromas networks*.

A Figura 2b representa os aromas que se destacam em cada um dos 8 cafés expresso analisados, salientando-se os aromas que poderão estar mais potenciados em cada um dos cafés expresso. Esta análise foi realizada tendo somente em conta as áreas cromatográficas dos compostos voláteis identificados e não as concentrações destes compostos nos cafés expresso nem os limites de percepção sensorial a eles associados. Apesar de preliminar, permite perspetivar e identificar possíveis compostos associados ao aroma de cada blend. Esta análise química global terá de ser complementada com a análise de compostos padrão específicos do aroma, determinação dos limites de percepção sensorial e análise sensorial por um painel treinado.





O potencial da quitosana para embalagens alimentares funcionais

Cláudia Nunes^{1*}, Paula Ferreira², Manuel A. Martins² e Manuel A. Coimbra¹

¹QOPNA, Departamento de Química

²CICECO, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

*Autor Correspondente, E-mail: claudianunes@ua.pt

Resumo

A quitosana tem elevado potencial para ser utilizada na preservação de uma variedade de alimentos devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, associadas à sua não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A modificação química da quitosana, por reticulação e/ou ligação de moléculas com propriedades específicas, tem sido usada para aumentar a sua funcionalidade de forma a ampliar as aplicações na indústria alimentar. A aplicação da nanotecnologia à quitosana é promissora como forma de desenvolver materiais para serem usados como embalagens alimentares ativas e inteligentes.

As propriedades da quitosana

As preocupações sobre o impacto ambiental negativo das embalagens atualmente em uso, assim como a crescente procura por alimentos mais naturais e saudáveis, têm levado ao desenvolvimento de filmes com origem biológica e que contribuam para uma melhor segurança alimentar e aumento do prazo de validade dos alimentos. Neste contexto, e tomando em consideração a necessidade de encontrar alternativas aos polímeros derivados do petróleo, o uso de biopolímeros abundantes e biodegradáveis, como a quitosana, parece ser uma solução viável.

A quitosana é um polissacarídeo linear constituído maioritariamente por resíduos de 2-amino-desoxi- β -D-glucose em ligação (β 1,4). Este polímero é o derivado desacetilado da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois de celulose. A quitosana tem um grande potencial para o desenvolvimento de materiais funcionais na área das embalagens alimentares devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade e propriedades físico-químicas que permitem a formação de filmes. Este polímero tem sido muito estudado também devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, que podem evitar a oxidação dos alimentos e a contaminação microbiológica de fungos e bactérias (Gram positivas e Gram negativas) [1]. Têm sido sugeridos dois mecanismos para explicar a inibição do crescimento de microrganismos pelas quitosanas: 1) a interação do polímero policationico com os grupos aniônicos na superfície de células de bactérias Gram-negativas, o que pode obstruir o transporte de substâncias essenciais para o seu interior ou provocar a rutura celular; 2) a complexação de metais, oligoelementos ou nutrientes essenciais que ficam indisponíveis para que o microrganismo cresça [2]. A capacidade antioxidante da quitosana está também relacionada com a sua capacidade de complexar com os iões metálicos [3] como o Fe^{2+} ou o Cu^+ (participantes na reação de Fenton,

que converte o O_2 em radicais $\text{HO}\cdot$). A quitosana tem sido descrita como tendo atividade coagulante, efeito analgésico, efeito imunoestimulador e propriedades anti-colesterolémicas e anti-tumorais [4].

Como a quitosana é solúvel em soluções com pH abaixo de 6,0 devido à protonação do grupo $-\text{NH}_2$ dos resíduos de D-glucosamina ($\text{pK}_a = 6,3$), a aplicação em produtos alimentares requer a sua modificação para a tornar estável. Uma das estratégias possíveis é a reticulação do polímero por uma molécula que ligue duas ou mais moléculas de quitosana originando a formação de uma rede covalente tridimensional. A escolha adequada do agente reticulante e das condições de reação pode permitir obter materiais com maior estabilidade em meios ácidos, aumentando a sua resistência mecânica e química, e a capacidade de absorção de água, mantendo as propriedades biológicas. A genipina, a aglicona do genipósido presente no fruto de gardénia, é um composto natural com capacidade para reticular a quitosana. Este composto tem a vantagem de reagir rapidamente com os grupos amina e ser menos citotóxico [5], 5 mil a 10 mil vezes menos do que o glutaraldeído, o agente reticulante mais utilizado para a quitosana. Os filmes de quitosana com ligação covalente à genipina apresentam baixa solubilidade em meio ácido ($< 20\%$ de perda de massa), não alterando significativamente a atividade antioxidante e antimicrobiana dos filmes [6]. Estes filmes de quitosana reticulados com genipina foram testados na produção de vinho branco em substituição da adição de anidrido sulfuroso, permitindo manter a segurança microbiológica do produto final, favorecendo a sua longevidade com uma boa qualidade organolética [7].

A incorporação de compostos antimicrobianos e/ou antioxidantes de origem natural em filmes de quitosana é uma maneira viável de melhorar as suas propriedades funcionais, alargando as suas potenciais aplicações [8]. A presença do grupo amina no carbono 2 da glucosamina proporciona al-

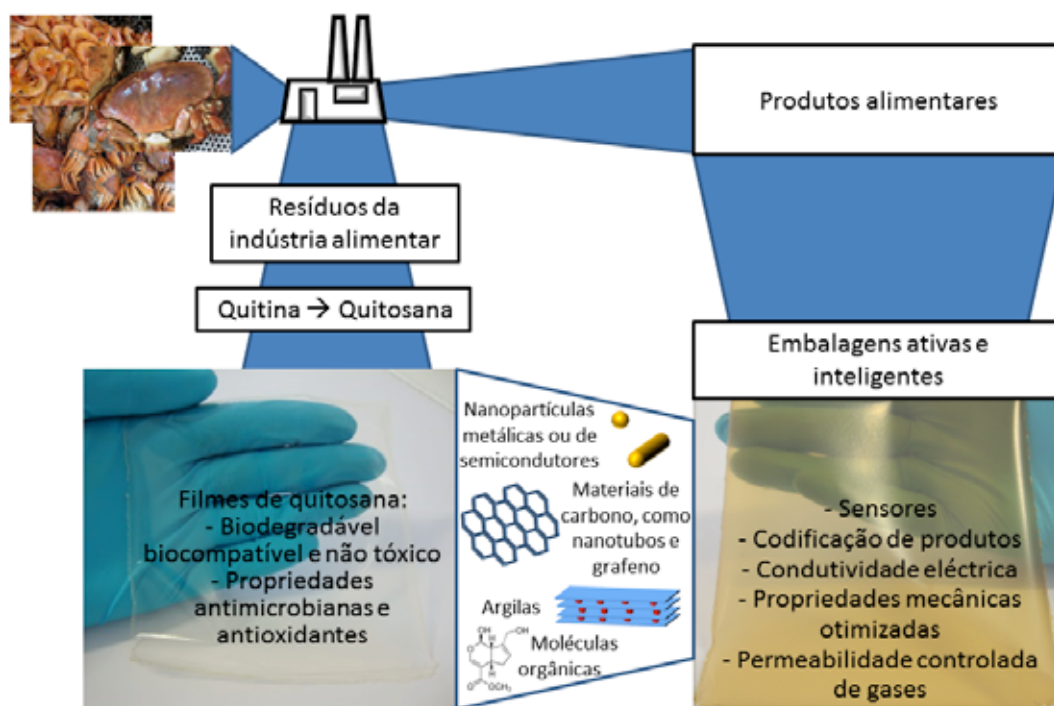


Figura 1 – Valorização de resíduos da indústria de crustáceos na preparação de embalagens ativas e inteligentes.

guma reatividade à molécula o que permite a ligação covalente de moléculas à cadeia principal de quitosana. Uma vez que a oxidação é um problema grave que afeta a qualidade dos alimentos, materiais à base de quitosana foram desenvolvidos para a melhoria da atividade antioxidante por ligação de antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos ou extratos de uva ou vinho, ricos nestes compostos [8, 9]. Os compostos fenólicos potenciam a atividade antioxidante pois atuam como captadores de radicais livres, um mecanismo diferente do que o que se verifica para a atividade antioxidante da quitosana, que atua devido à capacidade de quelar os iões metálicos envolvidos nas reações oxidativas. A introdução de grupos fenólicos na estrutura da quitosana permite a obtenção de um material com os dois tipos de propriedades antioxidantes. Assim, a modificação da quitosana por ligação covalente de compostos fenólicos permite obter filmes com maior atividade antioxidante (> 100% em relação a um filme de quitosana). Além disso, o uso simultâneo de genipina permite a obtenção de filmes estáveis numa ampla gama de pH [9]. Portanto, estes filmes são materiais promissores para serem utilizados na conservação de alimentos.

Nanotecnologia em embalagens alimentares ativas e inteligentes

O grande desafio dos nossos dias é o desenvolvimento de embalagens alimentares que sejam simultaneamente ativas e inteligentes. As embalagens ativas pressupõem a interação da embalagem com o alimento e atmosfera circundante de forma a serem funcionais na conservação e expansão do tempo de vida do alimento. O conceito de embalagens inteligentes engloba a capacidade de adquirir informação sobre o alimento desde a sua origem, monitorizando as condições

a que o alimento esteve sujeito, avaliando o estado do alimento num dado momento de forma qualitativa ou semi-quantitativa e possibilitando o acesso fácil a esses dados [10].

A nanotecnologia pode ser uma solução viável para a obtenção de filmes à base de quitosana com características que permitam a sua utilização como embalagens alimentares ativas e inteligentes. As nanopartículas, devido ao seu tamanho, têm proporcionalmente uma maior superfície de interação/reacção com o meio envolvente. Filmes de quitosana com nanopartículas podem apresentar melhores propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas, tornando a quitosana uma alternativa competitiva aos polímeros sintéticos. Por exemplo, nanopartículas de argilas do tipo montmorillonite são utilizadas em compósitos poliméricos para melhorar a permeabilidade ao oxigénio [11] bem como as propriedades mecânicas [12]. O controlo da atmosfera da embalagem para impedir a entrada de oxigénio em embalagens em vácuo e para evitar a libertação de dióxido de carbono em embalagens em condições anaeróbicas é fundamental para a conservação dos alimentos. A adição de nanopartículas de prata à quitosana permite aumentar cumulativamente as suas características antimicrobianas, tendo também contribuído para a melhoria das propriedades de barreira mecânica e a gases [13]. O óxido de grafeno [14], a magnetite e os nanotubos de carbono [15] têm sido utilizados como aditivos no aumento da resistência mecânica e na atribuição de propriedades de condutividade elétrica.

As embalagens podem também ser dotadas de “inteligência” por inserção de nanopartículas sensíveis à presença de compostos formados durante a degradação dos alimentos, alteração de acidez do meio ou mudanças de temperatura, modificando as suas características e permitindo a determinação

do estado de conservação do alimento. Nanopartículas de ouro em quitosana foram utilizadas na detecção de dopamina utilizando espectroscopia de Raman [16]. Existem também sistemas de identificação por rádio frequência (RFID) que, apesar de ainda dispendiosos, podem permitir fazer registos das temperaturas a que está sujeito o alimento, bem como monitorizar a cadeia de distribuição [10].

Conclusões

A aplicação da quitosana como matéria-prima base no fabrico de embalagens alimentares está ainda no início mas parece promissora desde que associada a outras moléculas ou à nanotecnologia, tornando-a competitiva. A engenharia da sua estrutura poderá melhorar as suas propriedades gerais e potenciar a sua atividade no aumento da longevidade do alimento, bem como permitir a ligação de grupos funcionais que funcionem como sensores moleculares para detecção de indicadores do estado de conservação dos alimentos e monitorizar o estado durante a distribuição e armazenamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FCT, União Europeia, QREN, FEDER e COMPETE pelo financiamento da Unidade de Investigação QOPNA (FCOMP-01-0124-FEDER-037296, PEst-C/QUI/UI0062/2013) e do CICECO (FCOMP-01-0124-FEDER-037271, PEst-C/CTM/LA0011/2013). Cláudia Nunes (SFRH/BPD/46584/2008) e Paula Ferreira (IF/00327/2013) agradecem à FCT a bolsa de Pós-Doc e a posição de Investigador, respetivamente.

Referências

- [1] M. Aider, *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 837-842
- [2] Y. C. Chung, C. Y. Chen, *Bioresource Technology* 99 (2008) 2806-2814
- [3] S. I. Park, Y. Y. Zhao, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 1933-1939
- [4] W. S. Xia, P. Liu, J. L. Zhang, J. Chen, *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 170-179
- [5] F. L. Mi, C. T. Huang, H. F. Liang, M. C. Chen, Y. L. Chiu, C. H. Chen, H. W. Sung, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 3290-3296
- [6] C. Nunes, É. Maricato, Â. Cunha, A. Nunes, J. A. Lopes da Silva, M. A. Coimbra, *Carbohydrate Polymers* 91 (2013) 236-243
- [7] C. Nunes, Â. Cunha, É. Maricato, J. A. Lopes da Silva, S. Mendo, S. M. Rocha, J. A. Saraiva, M. A. Coimbra, *127º Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* (2012) 39-44
- [8] A. S. Ferreira, C. Nunes, A. Castro, P. Ferreira, M. A. Coimbra, *Carbohydrate Polymers* 113 (2014) 490-499
- [9] C. Nunes, É. Maricato, Â. Cunha, A. Nunes, J. A. Lopes da Silva, M. A. Coimbra, *Carbohydrate Polymers* 91 (2013) 236-243
- [10] A. L. Brody, B. Bugusu, J. H. Han, C. Koelsch Sand, T. H. McHugh, *Journal of Food Science* 73 (2008) R107-R116
- [11] M. A. Priolo, D. Gamboa, J. C. Grunlan *ACS Application Mater Interfaces* 2 (2010) 312-320
- [12] S. F. Wang, L. Shen, Y. J. Tong, L. Chen, I. Y. Phang, P. Q. Lim, T. X. Liu, *Polymer Degradation and Stability* 90 (2005), 123-131
- [13] D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, X. Ma, *Carbohydrate Research* 344 (2009) 2375-2382
- [14] X. Wang, H. Bai, Z. Yao, A. Liu, G. Shi, *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010) 9032-9036
- [15] J. B. Marroquina, K. Y. Rhee, S. J. Park, *Carbohydrate Polymers* 92 (2013) 1783-1791
- [16] J. Lim, I. Kang, *Korean Chemistry Society* 2013, 34, 237-242

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Actualize as suas quotas em
www.spbt.pt

Biotecnologia microbiana sob alta pressão: estado atual e potencial futuro

Rita P. Lopes*, Maria J. Mota*, Ivonne Delgadillo e Jorge A. Saraiva

Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

E-mail: jorgesaraiva@ua.pt

*Estas autoras deram contribuições equivalentes para este artigo

Introdução

Na última década, a tecnologia de Alta Pressão (AP) tem sido cada vez mais estudada e usada comercialmente para pasteurização a frio de produtos alimentares, com o objetivo de destruir microrganismos vegetativos patogênicos presentes nos alimentos. Deste modo, garante-se a segurança alimentar e alarga-se o prazo de validade comercial, com um impacto mínimo nas características sensoriais, nutricionais e funcionais dos alimentos [1].

A crescente compreensão dos efeitos da AP em sistemas biológicos tem despoletado o desenvolvimento de uma série de novas e interessantes aplicações, particularmente na área da biotecnologia [2]. Um desses casos corresponde ao crescimento de microrganismos e à realização de processos fermentativos sob AP, com o objetivo quer de obter novos produtos, quer de melhorar processos, como por exemplo, realizá-los em condições ambientalmente mais sustentáveis [3]. Os principais estudos realizados neste contexto encontram-se resumidos neste artigo, dando enfoque ao potencial de novas aplicações.

Efeitos da alta pressão nas células microbianas

De um modo geral, todos os efeitos da AP advêm da influência da redução do volume do sistema, que favorece a aquisição de estruturas celulares mais compactas [4]. Na Figura 1 estão representados alguns exemplos dos efeitos da AP nas células microbianas.

A membrana citoplasmática corresponde a uma das primeiras estruturas celulares a ser alterada pela AP. O aumento da pressão provoca diminuição de fluidez da bicamada fosfolipídica que, em consequência, se torna mais impermeável à passagem de água e de outras moléculas. Adicionalmente, as interações lípido-proteína são enfraquecidas, prejudicando o funcionamento ótimo da membrana [5]. Os efeitos da AP nas proteínas estão relacionados com a rutura das ligações

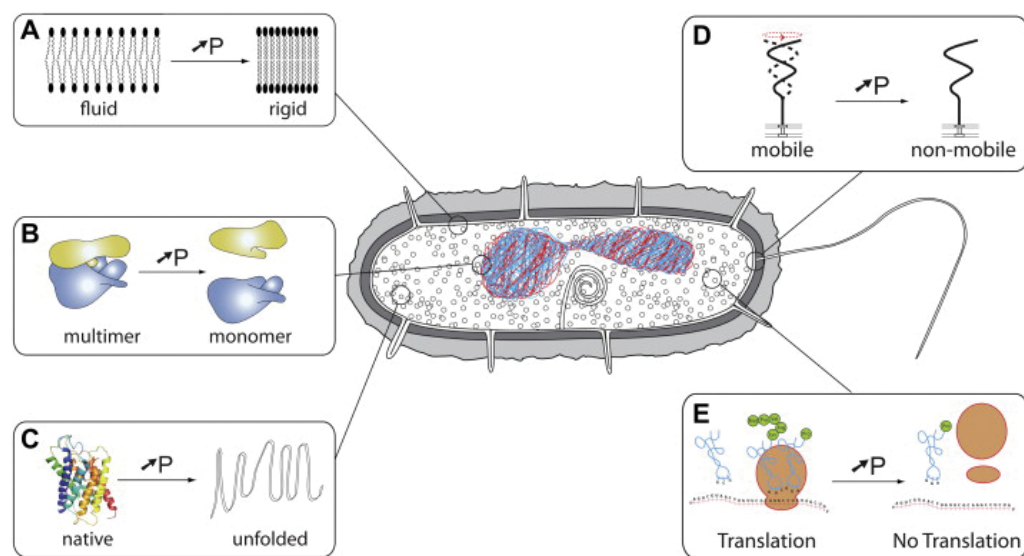


Figura 1 – Efeitos da AP nas células e nos respetivos componentes. A: Lípidos da membrana citoplasmática; B: associação de proteínas multiméricas; C: estrutura de proteínas; D: mobilidade das células; E: síntese de proteínas pelos ribossomas¹.

¹Reproduzido a partir de Oger, P. M., Jebbar, M. (2010). The many ways of coping with pressure. Res Microbiol 161, pp. 799-809. Copyright © 2014, publicado por Elsevier Masson SAS. Todos os direitos reservados.

não-covalentes, essenciais para manter a estrutura proteica. Para além disso, a AP inibe a síntese de proteínas, devido à dissociação das subunidades ribossômicas (50S e 30S) e consequente perda de funcionalidade dos ribossomas [6]. A estrutura do ADN também é afetada pela AP, uma vez que a dupla cadeia é estabilizada pelo aumento da pressão e, portanto, a sua transição para cadeia simples é dificultada. Desta forma, verifica-se inibição de processos como a replicação de ADN ou a síntese de proteínas [5].

A amplitude dos danos causados pela AP depende da tolerância dos microrganismos, da extensão e da duração do tratamento. Ou seja, dependendo destes fatores, é possível aplicar tratamentos de AP sem que ocorra, necessariamente, a destruição dos microrganismos. Em alguns casos, a utilização de AP poderá resultar até na aceleração dos processos fermentativos.

Fermentação microbiana sob alta pressão

A aplicabilidade de AP em processos fermentativos encontra-se ainda pouco documentada na literatura. Esta abordagem utiliza níveis sub-letais de AP, uma vez que o objetivo não passa pela destruição dos microrganismos, mas sim pelo desenvolvimento de respostas metabólicas e fisiológicas ao *stress* causado pela pressão. Assim, poderão verificar-se alterações nos processos fermentativos, como, por exemplo, o aumento do rendimento de determinados produtos, o aumento da velocidade fermentativa ou até a produção de novos compostos devido a desvios/alterações metabólicas, um pouco à semelhança do que ocorre em profundidade nos fundos marinhos [3].

Picard *et al.* (2007) [7] avaliaram a capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* sob diferentes condições de pressão e observaram que a produção máxima de etanol foi atingida a 5 MPa. Para além disso, a 5 e 10 MPa a fermentação decorreu a uma velocidade superior à observada à pressão atmosférica. A aceleração da fermentação alcoólica poderá ser aplicada na produção mais rápida e económica de bebidas alcoólicas e bioetanol. No entanto, falta identificar as modificações genéticas e moleculares despoletadas na fermentação de *S. cerevisiae* sob pressão, de modo a compreender as implicações que estes ajustamentos representam para o processo e para o produto final.

Lactobacillus sanfranciscensis é uma bactéria ácido-lática que é usada na fermentação de uma grande variedade de pães, bolos e bolachas. A indução de resistência a AP desta bactéria através de proteção cruzada foi analisada recorrendo a vários fatores de *stress*. Verificou-se aumento de tolerância à exposição a AP (300 MPa), quando as células eram previamente incubadas sob diferentes condições de *stress*, nomeadamente condições hipertónicas, acídicas ou de baixa temperatura. A indução de resistência à AP estará provavelmente associada à síntese de proteínas *de novo* e/ou à alteração de propriedades dos componentes celulares [8].

Lactobacillus rhamnosus é um organismo probiótico utilizado na suplementação de iogurte e outros produtos lácteos. Ananta *et al.* (2004) [9] avaliaram se a resistência deste

microrganismo à temperatura poderia ser afetada por pré-tratamentos de pressão. Os autores verificaram que a morte celular, resultante da exposição a temperaturas letais, foi reduzida nas células pré-tratadas com AP. Este efeito da AP baseou-se na síntese de proteínas simultaneamente envolvidas na adaptação das células à AP e à temperatura elevada. Estes mecanismos de proteção cruzada poderão representar um avanço muito relevante para a indústria dos laticínios, uma vez que as estirpes probióticas são bastante sensíveis às temperaturas elevadas aplicadas durante o processamento dos produtos lácteos. A utilização de um pré-tratamento de AP para obtenção de estirpes mais termotolerantes poderá facilitar a sobrevivência dos organismos probióticos, permitindo assim ultrapassar um desafio associado à suplementação de produtos alimentares com probióticos.

Num estudo recente realizado pelo nosso grupo de investigação, foi estudada a realização da fermentação láctica envolvida na produção de iogurte, com e sem probióticos (*Bifidobacterium lactis*), sob AP. Para os dois casos, pressões na gama 5-100 MPa reduziram a velocidade fermentativa (relativamente aos controlos à pressão atmosférica), sendo o efeito progressivamente mais acentuado com o aumento da pressão até se verificar uma inibição total a 100 MPa. Como caso de estudo, a 5 MPa, quando o tempo de fermentação foi alargado para 10 horas, foi possível atingir o pH característico do iogurte e uma produção de iogurte aparentemente normal. Através de uma análise sensorial informal, verificou-se que os iogurtes produzidos sob AP possuíam um perfil aromático diferente dos iogurtes controlo, o que abre a possibilidade de utilizar a AP para produzir iogurtes com características sensoriais e organolépticas diferentes.

De modo a verificar se a ausência de atividade fermentativa a 100 MPa se devia à inativação de microrganismos ou à inibição da sua atividade metabólica, amostras sujeitas a 100 MPa durante 180 minutos foram posteriormente colocadas à pressão atmosférica durante 10 horas. Tal como esperado, não foi detetada atividade fermentativa durante o período a 100 MPa. No entanto, quando as amostras foram transferidas para a pressão atmosférica, observou-se atividade fermentativa, tendo-se atingido o pH característico do iogurte. Estes resultados demonstram que ocorreu inibição da atividade metabólica das bactérias sob 100 MPa e a 43 °C, mas não a sua inativação, visto que se verificou uma atividade fermentativa aparentemente normal após retorno para a pressão atmosférica. Deste modo, abre-se a possibilidade da pressão poder ser usada como um interruptor on/off dos processos fermentativos, tal como a temperatura (refrigeração). Estudos realizados com o objetivo de conservar alimentos, utilizando uma abordagem denominada conservação hiperbárica, mostraram um efeito reversível de inibição/redução da atividade microbiana para estes níveis de pressão, suportando claramente esta possibilidade. Este é um novo conceito de conservação de alimentos, a qual permite a sua conservação à temperatura ambiente, sem necessidade de controlar a temperatura e, portanto, sem gastos energéticos [10].

Estes e outros processos de biotecnologia microbiana sob AP são hoje um dos focos principais de investigação do nosso



Figura 2 – Atual portefólio de equipamentos de Alta Pressão da Plataforma Tecnológica Multidisciplinar de Alta Pressão da Universidade de Aveiro: escala laboratorial, piloto e industrial, da esquerda para a direita.

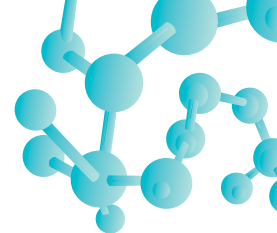
grupo de investigação. De modo a dinamizar estes e outros estudos, foi criada uma Plataforma Tecnológica Multidisciplinar de Alta Pressão na Universidade de Aveiro (<http://www.ua.pt/ptaltapressao/>). Esta plataforma possui um portefólio de equipamentos que engloba a escala laboratorial, piloto e industrial, com capacidade para gerar pressão até 900 MPa (~9000 atm), simultaneamente com temperatura desde -20 °C até 120 °C (Figura 2), pretendendo ser um pólo dinamizador de investigação e desenvolvimento de aplicações industriais de AP, em colaboração com outras instituições de ensino superior e indústrias.

Conclusão

A utilização da tecnologia de AP em processos fermentativos é uma área emergente, com elevado potencial para aplicação em biotecnologia microbiana. Relativamente à aplicação da AP em processos fermentativos, pouca informação se encontra disponível na literatura, uma vez que esta corresponde a uma área pouco desenvolvida. No entanto, espera-se que surjam mais estudos nos próximos anos, dado o grande interesse atual. Numa fase mais avançada, será importante testar estes processos à escala industrial, de modo a que, num futuro próximo, a fermentação microbiana sob AP possa vir a representar uma realidade para a indústria, abrindo novas e interessantes oportunidades.

Referências

- [1] Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004) New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int Dairy J* 14, pp. 273-285
- [2] Aertsen, A., Meersman, F., Hendrickx, M. E. G., Vogel, R. F., Michiels, C. W. (2009) Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends Biotechnol* 27, pp. 434-441
- [3] Mota, M. J., Lopes, R. P., Delgadillo, I., Saraiva, J. A. (2013) Microorganisms under high pressure - Adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnol Adv* 31, pp. 1426-1434
- [4] Bartlett, D. H. (2002) Pressure effects on *in vivo* microbial processes. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1595, pp. 367-381
- [5] Oger, P. M., Jebbar, M. (2010) The many ways of coping with pressure. *Res Microbiol* 161, pp. 799-809
- [6] Marteinsson, V. T., Moulin, P., Birrien, J., Gambacorta, A., Vernet, M., Prieur, D. (1997) Physiological responses to stress conditions and barophilic behavior of the hyperthermophilic vent archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl Environ Microbiol* 63, pp. 1230-1236
- [7] Picard, A., Daniel, I., Montagnac, G., Oger, P. (2007) *In situ* monitoring by quantitative Raman spectroscopy of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure. *Extremophiles* 11, pp. 445-452
- [8] Scheyhing, C. H., Hörmann, S., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2004) Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T. *Lett Appl Microbiol* 39, pp. 284-289
- [9] Ananta, E., Knorr, D. (2004) Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *Int J Food Microbiol* 96, pp. 307-313
- [10] Fernandes, P. A. R., Moreira, S. A., Fidalgo, L. G., Santos, M. D., Queirós, R. P., Delgadillo, I., Saraiva, J. A. (2014) Food preservation under pressure (Hyperbaric Storage) as a possible improvement/alternative to refrigeration. *Food Eng Rev* 1-10



O impacto de biofilmes microbianos na higiene e segurança alimentar

Pilar Teixeira, Diana Rodrigues, Maria João Romeu e Joana Azeredo

Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

E-mail: jazeredo@deb.uminho.pt

Introdução

Em 2012 foram reportados na União Europeia 5363 surtos de origem alimentar, resultando em 55453 casos humanos, os quais causaram 5118 hospitalizações e 41 mortes [1]. A maioria dos surtos notificados foi provocada por *Salmonella*, toxinas bacterianas, vírus e *Campylobacter*. Além destes microrganismos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão também entre os patogénicos alimentares mais problemáticos. A formação de biofilmes nas superfícies de processamento de alimentos é uma das principais causas destes surtos. De facto, todos estes microrganismos apresentam uma grande capacidade para formar biofilmes e estes podem desenvolver-se em todo o tipo de superfícies na indústria alimentar, incluindo aço inoxidável, polipropileno, vidro, etc. Os biofilmes constituem uma fonte de contaminação dos alimentos com que contactam e o seu desprendimento das superfícies causa ainda a contaminação do ambiente circundante. Pode definir-se biofilme como um agregado de células microbianas formado sobre uma superfície ou interface frequentemente envolto numa matriz de substâncias poliméricas, a maioria de origem microbiana [2]. Estas estruturas apresentam uma grande tolerância a agressões externas, nomeadamente a agentes antimicrobianos químicos. A tolerância inerente dos biofilmes a biocidas químicos tem suscitado o interesse no desenvolvimento de métodos alternativos de controlo de patogénicos alimentares. Neste artigo serão abordados os princípios fundamentais de adesão e persistência de patogénicos alimentares nas superfícies alimentares e de contacto com alimentos. Será referido o papel dos biofilmes na resistência cruzada e por fim serão apresentados 2 métodos inovadores de controlo de biofilmes.

Adesão a superfícies de contacto com alimentos

A adesão de microrganismos a superfícies de processamento de alimentos é um processo rápido (geralmente ocorre entre 5 a 30 segundos), pelo que, frequentemente, a limpeza e desinfeção dessas superfícies não é suficiente para impedir que essa adesão ocorra. Na fase inicial do processo são determinantes as propriedades superficiais (carga e hidrofobicidade) e a morfologia (rugosidade e porosidade) dos materiais. No entanto, outros fatores como a disponibilidade de nutrientes no meio envolvente, o pH, temperatura e concentração iónica do meio, a fase de crescimento das células bacterianas, a presença de estruturas celulares, como as substâncias poliméricas extracelulares e os flagelos influenciam também o processo de adesão.

Para prevenir e/ou evitar a adesão é assim fundamental a seleção dos materiais adequados bem como o desenvolvimento de produtos e protocolos de desinfeção mais eficientes. A principal estratégia para se obter um material que impede, ou pelo menos minimiza, a adesão bacteriana, consiste na modificação das suas propriedades superficiais. Os materiais podem ser cobertos ou impregnados com agentes antimicrobianos ou alterada a sua hidrofobicidade e /ou rugosidade. A hidrofobicidade de uma superfície traduz a sua afinidade/repulsão em relação à água, e sabe-se que o processo de adesão é facilitado pela hidrofobicidade das superfícies que

interagem. Por seu lado, a rugosidade está relacionada com a topografia do material podendo aumentar/reduzir a área superficial de contato e potenciar/restringir a existência de locais protegidos favoráveis à colonização microbiana.

Assim, é fundamental um conhecimento aprofundamento das características dos materiais que promovem a adesão de patogénicos alimentares. Como a hidrofobicidade e a rugosidade dos materiais podem ser alteradas, têm sido efetuados vários estudos que avaliam a capacidade de adesão de vários microrganismos a diferentes tipos de materiais comumente utilizados em superfícies alimentares, tanto de cozinhas como na indústria alimentar [3, 4, 5, 6, 7, 8].

Num estudo em que foi avaliada a capacidade de adesão de 10 estirpes de *Listeria monocytogenes* a 6 materiais normalmente usados em cozinhas (aço inoxidável 304 (SS304), mármore, granito, vidro, polipropileno e silestone (o silestone é um material composto por quartzo com um biocida incorporado - o Microban)), verificou-se que todas as estirpes aderiram a todos os materiais, inclusivamente aos silestones [7]. No entanto, o número de células aderidas foi diferente consoante a estirpe e o material em estudo (Figura 1). Este estudo permitiu concluir que as superfícies com maior propensão para a adesão são o mármore e o granito e que o polipropileno é o material menos sujeito a colonização por parte de *Listeria*.

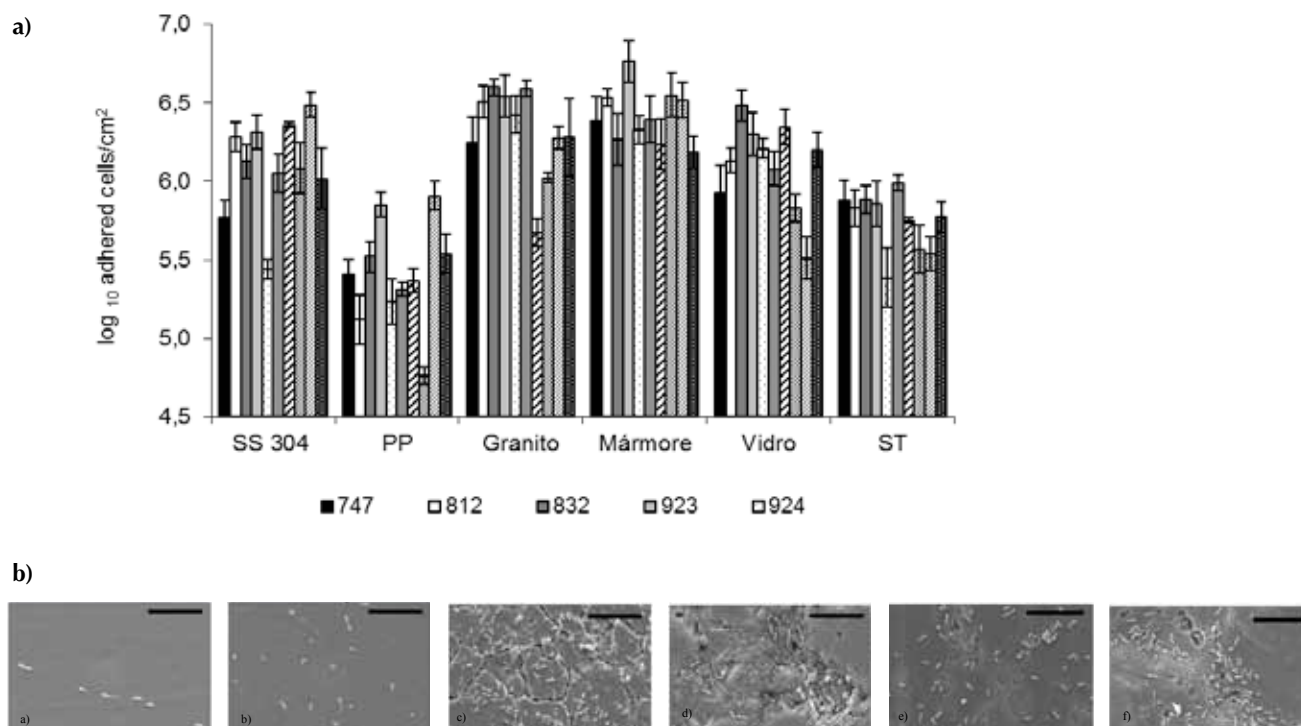


Figura 1 – a) Adesão de vários isolados clínicos e alimentares de *L. monocytogenes* (estirpes 747, 812, 832, 923 e 924) a materiais utilizados no processamento de alimentos: aço inoxidável (SS 304), polipropileno (PP), granito, mármore, vidro e silestone (ST).

b) Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento de células de *L. monocytogenes* aderidas a PP, vidro, SS 304, Silestone, mármore e granito, respectivamente da esquerda para a direita (de a) a f)). As barras correspondem a 10 µm.

Persistência em alimentos e superfícies

A maior parte dos produtos comerciais usados na limpeza e desinfecção de superfícies é baseada em compostos fenólicos, ácidos orgânicos, álcoois, cloro, compostos de amônio quaternário e iodóforos. Para todos eles, foi verificada uma maior eficácia contra suspensões bacterianas do que contra células aderidas e biofilmes. Este facto chamou a atenção para a necessidade de reformular os procedimentos padronizados que são usados para testar a eficácia dos desinfetantes, para que os mesmos incluam testes em células aderidas e biofilmes, além das células planctônicas. Entre os vários métodos que têm sido usados para estudar biofilmes microbianos o “Calgary Biofilm Device” (CBD) é um dos mais conceituados, dado que consiste numa técnica *high-throughput* baseada em microplacas e que serve para avaliar a suscetibilidade dos biofilmes a agentes antimicrobianos [9]. Trata-se, portanto, de uma técnica altamente versátil que permite determinar a Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB, ou “MBEC” em inglês) em relação a uma vastíssima gama de produtos e compostos, tais como antibióticos, biocidas, metais e desinfetantes.

Um estudo realizado por nós focado na suscetibilidade de biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. enterica* a diferentes desinfetantes (hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogénio e triclosan) mostrou que, de uma forma geral, os biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. enterica* são mais suscetíveis ao hipoclorito de sódio do que a qualquer outro desinfetante testado, indicando este composto como um dos mais eficazes para aplicação prática em ambientes

de processamento alimentar [10]. Por outro lado, este estudo aponta o triclosan como um composto a evitar nos processos de limpeza e higienização, dado que se verificou que todos os biofilmes de *S. enterica* apresentaram elevada tolerância a este agente na gama de concentrações usada. Adicionalmente foi possível observar que, de uma forma geral, a desinfecção foi influenciada por variabilidade intra- e inter-específica, o que realça um problema acrescido no combate aos biofilmes destes patogénicos alimentares (Figura 2).

A importância da resistência cruzada

Outro aspeto importante relacionado com a desinfecção de superfícies é a aquisição de resistência bacteriana a agentes desinfetantes e, mais preocupante ainda, a possível relação entre a utilização de biocidas químicos e a emergência de resistência a antibióticos. A suscetibilidade e resistência de *S. enterica* a diferentes tipos de antimicrobianos têm sido vastamente analisadas, mas o efeito de desinfetantes químicos sobre células de biofilme que sobrevivem à ação destes compostos é ainda pouco estudada. Neste contexto, um dos nossos estudos (ainda não publicado) focou-se na avaliação do efeito da exposição a desinfetantes químicos de uso comum em áreas de processamento alimentar sobre células de biofilme de *S. enteritidis*, em termos de suscetibilidade a antibióticos. Apesar de este estudo não ter revelado a aquisição de uma verdadeira resistência aos antibióticos testados (tendo em conta os valores de referência do “Clinical and Laboratory Standards Institute”), verificou-se que a ação de alguns dos desinfetantes testados promoveu um decréscimo da sus-

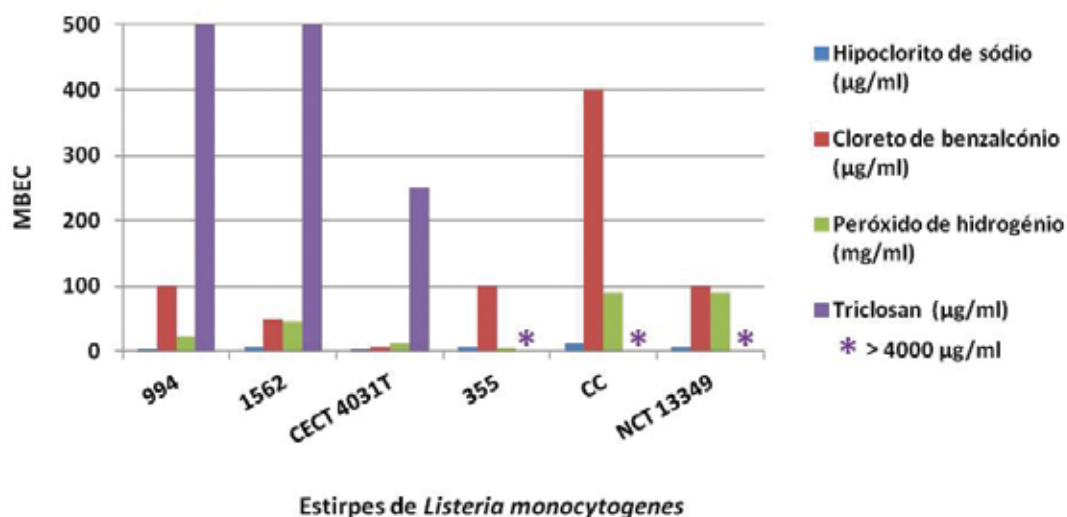


Figura 2 – Concentração Mínima de Erradicação (MBEC) do Biofilme de 4 agentes antimicrobianos testados contra biofilmes de várias estirpes de *Listeria* (994, 1562, CECT4031T, 355, CC e NCTC13349)

cetibilidade a certos antibióticos. Em relação ao cloreto de benzalcónio, uma menor suscetibilidade foi observada para a ampicilina e cloranfenicol, enquanto a exposição ao triclosan promoveu uma diminuição da suscetibilidade à ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina e tetraciclina. Finalmente, no que respeita à ação do hipoclorito de sódio, verificou-se que este desinfetante também promoveu um decréscimo na suscetibilidade das células de biofilme de *S. enteritidis* a quatro antibióticos de diferentes classes (ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina e cloranfenicol).

Os resultados acima referidos permitem inferir que uma possível infecção causada por células de biofilme de *Salmonella* sobreviventes a desinfecção química poderá estar associada a uma suscetibilidade diminuída em termos de terapia com antibióticos. Evidencia-se, assim, a importância de avaliar as características fenotípicas das células de biofilmes de agentes patogénicos após exposição a agentes químicos dado que, além de permitir obter mais informação sobre os mecanismos envolvidos na resistência a biocidas, esta abordagem poderá conduzir ao desenvolvimento de tratamentos adicionais que não promovam a ocorrência de resistência cruzada.

Novos métodos de Controlo

A procura de novos métodos de desinfecção continua a ser um assunto relevante nos nossos dias. Embora os métodos tradicionais de desinfecção sejam intensivamente usados pela indústria alimentar, tal como se pode constatar pela informação apresentada nos tópicos anteriores eles são também quimicamente intensivos e estão associados a vários aspetos negativos, incluindo a promoção do fenómeno de resistência cruzada a outros agentes antimicrobianos. Recentemente, a nanotecnologia veio trazer novas possibilidades para melhorar as estratégias antimicrobianas. Dentro deste vasto campo de investigação, revela-se de grande interesse a síntese e aplicação de nanopartículas superparamagnéticas, isto é, nanopartículas magnéticas com capacidade de produzir calor (hipertermia magnética - HM) quando submetidas a um campo magnético oscilante. Neste contexto, um estudo por nós

realizado avaliou o efeito da HM em células planctónicas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* (um dos principais microrganismos causadores de deterioração de alimentos), tendo também sido comparada a sua eficiência em relação a uma técnica de aquecimento convencional (em “thermoblock”). Os resultados obtidos confirmaram que a HM consegue inativar a bactéria em questão, sendo mais eficaz contra células planctónicas e biofilmes do que a técnica de aquecimento convencional usada [11]. Conclui-se, portanto, que as nanopartículas magnéticas podem ser eficazmente usadas como fonte de aquecimento, permitindo o aquecimento eficiente e rápido de soluções contendo nanopartículas e células bacterianas. De realçar que, embora a HM tenha revelado um maior efeito bactericida contra as células planctónicas do que contra os biofilmes, a sobrevivência e a estrutura destas comunidades microbianas foram também afetadas por este tratamento [11]. Em suma, ainda que preliminar, este estudo introduziu a possibilidade de usar a HM fora da área biomédica como um potencial método de desinfecção em áreas de processamento alimentar.

Os bacteriófagos (fagos) constituem outra opção promissora para o controlo de agentes patogénicos uma vez que são predadores naturais de bactérias, ubíquos no meio ambiente, são fáceis de isolar, apresentam uma elevada especificidade, ausência de toxicidade, baixo custo de produção, são inofensivos aos seres humanos e têm uma grande capacidade de evolução para superar a resistência bacteriana. Esta última característica deve-se à capacidade que os fagos apresentam de lisar os hospedeiros (bactérias) utilizando mecanismos de controlo bacteriano diferente dos antibióticos, sendo assim capazes de matar bactérias resistentes a antibióticos.

Estas características fazem com que os fagos constituam uma boa alternativa de controlo de biofilmes. De facto, os fagos e as suas endolisinas já foram usados para controlar o desenvolvimento de biofilme de *L. monocytogenes* e *E. coli* [12, 13] e o efeito sinérgico de um fago com um desinfetante alcalino foi descrito para a erradicação de biofilme de *E. coli* O157:H7 em aço inoxidável [13]. Podem ser eficazes tanto em biofilmes simples como em biofilmes mistos [14].

Conclusão

Devido à capacidade que os microrganismos patogênicos de origem alimentar têm de aderir às superfícies de processamento de alimentos e de nelas formar biofilmes, que vão contaminar os alimentos com que contactam, a sua prevenção e eliminação são uma preocupação constante da indústria alimentar. A melhor estratégia consiste numa higienização e desinfecção eficiente dessas superfícies. No entanto, devido a falhas de projeto dos equipamentos e à cada vez maior resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias de controlo. Apesar de alguns estudos já versarem sobre a aplicação destes agentes em biofilmes de patogênicos alimentares, ainda é necessário um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na formação desses biofilmes, para que, deste modo, seja possível a sua eliminação.

Referências

- [1] EFSA (2014) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012, EFSA Journal, 12(2), 3547
- [2] Bryers, J. D., editor (2000). Biofilms. 2. New York, NY: J. Wiley Interscience
- [3] Oliveira K., Oliveira T., Teixeira P., Azeredo J., Henriques M., Oliveira R. (2006) Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella enteritidis* serotypes to materials used in kitchens. J Food Prot 69 (10):2352–2356
- [4] Oliveira K., Oliveira T., Teixeira P., Azeredo J., Henriques M., Oliveira R. (2007) Factors involved in attachment of *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* to stainless steel. Brazilian J Microbiol 38 (2), 318-323
- [5] Teixeira P., Lima J. C., Azeredo J., Oliveira R. (2007) Note. Colonisation of bench cover materials by *Salmonella typhimurium*. Food Sci Technol Int 13 (1):5–10
- [6] Teixeira P., Lima J., Azeredo J., Oliveira R. (2008) Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. Int J Food Sci Technol 43 (7):1239–1244
- [7] Silva S., Teixeira P., Oliveira R., J. Azeredo (2008) Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. J. Food Protect 71 (7), 1379-1385
- [8] Rodrigues D., Teixeira P., Oliveira R., Azeredo J. (2011) *Salmonella enterica enteritidis* biofilm formation and viability on regular and triclosan incorporated bench cover materials. J Food Protect 74 (6):32–37
- [9] Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 37, 1771-1776
- [10] Rodrigues, D., Cerca, N., Teixeira, P., Oliveira, R., Ceri, H., Azeredo, J. (2011) *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica Enteritidis* biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. Microb Drug Resist 17 (2), 181-189
- [11] Rodrigues, D., Bañobre-López, M., Espiña, B., Rivas, J., Azeredo J. (2013) Effect of magnetic hyperthermia on biofilm structure and cellular viability of a food spoilage bacterium. Biofouling 29, 1225-1232
- [12] Gaeng S., Scherer S., Neve H., Loessner M. J. (2009) Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophageytic enzymes in *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 66:951–2958
- [13] Sharma M., Ryu J., Beuchat L.R. (2005) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. J Appl Microbiol 99:449–459
- [14] Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J. (2010) Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. Biofouling 26 (5):567–575

Congressos

EUROPEAN BIOTECHNOLOGY CONGRESS 2015
7-9 maio 2015 | Bucharest, Roménia | <http://www.eurobiotech2015.eu>

6th CONGRESS OF EUROPEAN MICROBIOLOGISTS
7-11 junho 2015 | Maastricht, Holanda | <http://fems-microbiology.kenes.com/>

ENF2015 - EuroNanoForum 2015
10-12 junho | Riga, Latvia | <http://euronanoforum2015.eu/>

GORDON RESEARCH CONFERENCE - Biomaterials and Tissue Engineering
19-24 julho 2015 | Girona, Espanha | <http://www.grc.org/programs.aspx?id=10960>

EUCHIS / ICCS 2015 - 12th International Conference of the European Chitin Society / 13th International Conference on Chitin and Chitosan
30 agosto - 2 setembro 2015 | Münster, Alemanha | <http://chitin2015.eu>

BIOFLAVOUR 2015 - International Conference on Flavor and Fragrance Biotechnology
9-11 setembro 2015 | Frankfurt, Alemanha | <http://www.bioflavourconference.com>

ECCE 10 + ECAB 3 + EPIC 5
27 setembro - 1 outubro, 2015 | Nice, France | <http://www.ecce2015.eu>

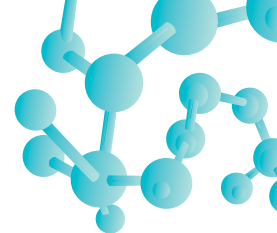
AFFINITY 2015 - 21st Biennial Meeting of the International Society of Molecular Recognition
27 setembro - 1 outubro 2015 | Puerto Vallarta, Mexico | <http://affinity2015.org>

16th EMBO | EMBL Science and Society Conference: Emerging Biotechnologies: Hype, Hope and Hard Reality
5-6 novembro 2015 | Heidelberg, Alemanha | <http://events.embo.org/science-society-conference/index.html>

BIOFABRICATION 2015
7-9 novembro 2015 | Utrecht, Holanda | <http://www.biofabrication2015.org/>

4th ANNUAL CELL CULTURE & BIOPROCESSING CONGRESS 2015
9-10 novembro 2015 | London, Inglaterra | <http://www.cellculture-congress.com/>

MBC - 5th Munich Biomarker Conference
1-2 dezembro 2015 | Munich, Alemanha | <http://www.bio-m.org/mbc>



Águas tempestuosas: efeitos da presença de *Aeromonas* spp.

Cynthia Alves-Barroco¹, Maria Teresa Barreto Crespo^{2,3} e Teresa Semedo-Lemsaddek^{1*}

¹Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

²iBET - Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal

³Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal

Aeromonas é um género de bactérias ubíquas de ambientes aquáticos que constituem um grupo fenotípica e genotipicamente heterogéneo. Este género compreende 31 espécies reconhecidas à data [1], espécies que são fisiologicamente versáteis, o que permite a sua disseminação e manutenção nos mais diversos nichos ecológicos [2, 3, 4].

A sua ampla distribuição em ecossistemas aquáticos, aliada à elevada plasticidade metabólica e considerável potencial de virulência, contribui de forma inequívoca não só para a sua persistência nestes ambientes, mas também para potenciar o contacto com o Homem. Embora a via de transmissão não esteja ainda totalmente esclarecida, consideram-se como fontes mais prováveis a água ou os alimentos contaminados com este microorganismo, sendo as gastroenterites a manifestação clínica mais comum [5]. Embora a prevalência real de *Aeromonas* em amostras clínicas seja actualmente desconhecida, observa-se um número crescente de relatos de infeções extra-intestinais, provavelmente devido ao contacto com águas contaminadas após situações de trauma que resultaram em feridas abertas [5, 6].

Etiologia

Os membros do género *Aeromonas* são reconhecidos como microorganismos patogénicos emergentes responsáveis por uma vasta panóplia de doenças infecciosas em humanos [1]. A gastroenterite é a manifestação clínica mais comum; no entanto, o espectro de infeções causadas por *Aeromonas* em seres humanos tem expandido e atualmente inclui também septicemia [6] - a doença invasiva por excelência associada a este género bacteriano - celulite, peritonite, endocardite, meningite, infeções do trato urinário, doenças hepatobiliares, infeções oculares e pneumonia [7]. Complicações raras, porém graves e alarmantes são as associações de *Aeromonas* spp. com o síndrome hemolítico-urémico e fasciite necrotizante.

Os mecanismos de virulência associados a estes microorganismos não estão ainda completamente elucidados [8]. Apesar de não estar estabelecido um modelo animal que reproduza fielmente as manifestações clínicas acima referidas, ensaios com mutantes isogénicos em células animais demonstram que diversos determinantes de virulência estão associados à patogenicidade destas bactérias [6]. Tais facto-

res estão envolvidos nos processos de adesão e invasão das células do hospedeiro (e.g. flagelos, pili e adesinas); evasão aos mecanismos de defesa inata e adquirida do hospedeiro (e.g. cápsulas, *S-layer*, leucocidinas e lipopolissacarídeos), incluindo ainda inúmeros factores secretados que contribuem para a versatilidade metabólica e estão associadas à obtenção de nutrientes de forma a permitir sua multiplicação e disseminação no hospedeiro (e.g. enterotoxinas, proteases, amilases, quitinases, lipases, proteases, DNases e hemolisinas) [4, 7].

Aeromonas móveis produzem um flagelo polar expresso constitutivamente e múltiplos flagelos laterais expressos diferencialmente para mobilidade em superfícies sólidas, onde o flagelo polar não o permite [10]. Estes flagelos actuam também como factores fundamentais para a sua capacidade de formação de biofilmes [4]. Um dos possíveis mecanismos envolvidos na patogenicidade associada a *Aeromonas* é a produção do sistema de secreção tipo III (T3SS) ou injectisoma. Este sistema possui dupla função de adesão e injeção de exotoxinas como AexT (despolimerizador do citoesqueleto) e AexU (indução de apoptose). As nucleases extracelulares produzidas por estas bactérias também apresentam dupla função, pois constituem uma barreira à entrada de DNA exógeno, funcionando paralelamente como enzimas alimentares, uma vez que permitem a libertação de azoto e fósforo dos nucleótidos degradados, que são posteriormente utilizados como fontes nutricionais. Vários genes codificantes para

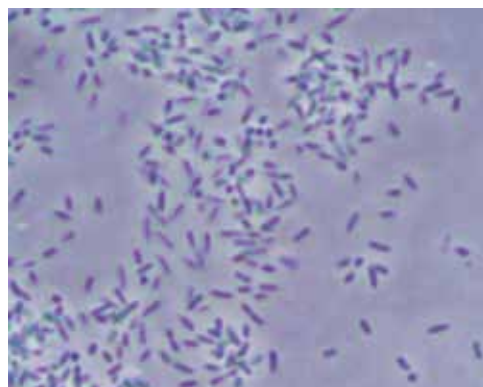


Figura 1 – *Aeromonas hydrophila*, a espécie mais encontrada em água e alimentos contaminados. Imagem de microscopia ótica de contraste de fase.

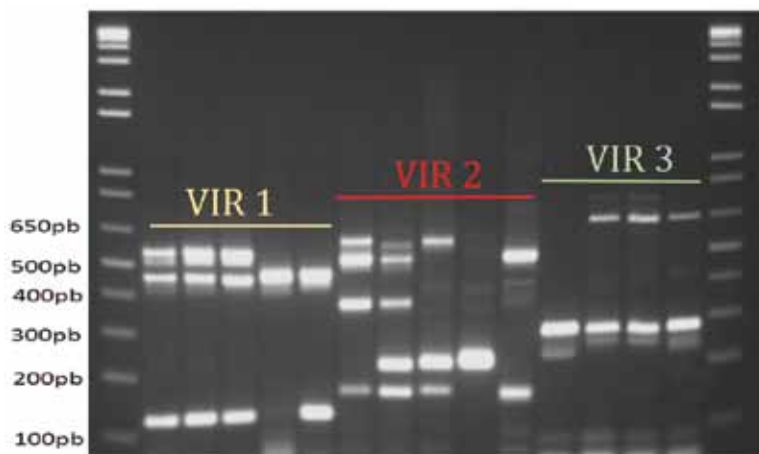


Figura 2 – Grupos de genes de virulência pesquisados (em três PCRs multiplex): VIR1: sistema de excreção tipo III (*ascV*, 557pb), enterotoxina citotônica termolábil (*alt*, 480pb), hemolisina (*hlyA*, 130pb), VIR 2: flagelo (*flaA/B*, 608pb), elastase (*ahyB*, 513pb), lipases (*pla/lip/lipH3/alp-I*, 382pb), AexT-toxinaADP-ribosiltransferase (*aext*, 226 pb); VIR3: enterotoxina citotônica termotável (*ast*, 536pb), hemolisina (*act* 232pb), aerolysin (cytotoxic enterotoxin). Imagem representativa dos resultados obtidos que revelam múltiplas combinações de potenciais factores de virulência entre os isolados de *Aeromonas* em estudo.

lipases com (e.g. *gcat*, *plc*, *pla*, e *apl-1*) e sem (e.g. *lip*, *lipH3*) actividade fosfolipídica, foram já identificados neste género, e os respetivos produtos têm sido reconhecidos como potenciais factores de virulência, embora a sua função primária seja a degradação de lípidos enquanto fonte de carbono.

Sabe-se ainda que as bactérias do género *Aeromonas* produzem diversas enterotoxinas. Alt e Ast apresentam actividade citotónica, enquanto que HlyA, Act e aerolisina são citotóxicas. Sendo consensual que Act é o mais importante factor de virulência em *Aeromonas*, apresentando actividade enterotoxinogénica, hemolítica e citotóxica [5, 6, 8, 9].

Relativamente ao problema de relevância crescente que constituem as resistências aos antibióticos, as bactérias do género *Aeromonas* são reconhecidas como intrinsecamente resistente às penicilinas (e.g. penicilina, ampicilina, carbenicilina, e ticarcilina) e cefalosporinas de primeira e segunda geração, com algumas estirpes a produzirem β -lactamases de três classes diferentes. Em geral, a maioria das estirpes apresentam perfis de suscetibilidade aos aminoglicósidos, cefalosporinas de terceira e quarta geração, carbapenémicos, tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas e trimetoprim/sulfametoxazol [3]. No entanto, níveis elevados de resistência a estes agentes antibacterianos foram identificados tanto em estirpes clínicas como ambientais de *Aeromonas* [9].

A problemática anteriormente relatada, aliada à escassez de dados relativos à prevalência deste microorganismo em Portugal, levou à realização de um estudo [10], em que se pesquisou a ocorrência de *Aeromonas* numa fábrica de queijos, num matadouro de suínos e num hipermercado, da região da Grande Lisboa. Analisaram-se 85 amostras, que incluíram água, alimentos e superfícies de contacto com os mesmos.

Dessas amostragens obtiveram-se 72 *Aeromonas* spp., que foram caracterizadas de acordo com os seus perfis de virulência e antibiorresistência. Os resultados obtidos para a detecção de factores de virulência revelaram uma elevada capacidade de produção de proteínas extracelulares ativas: DNases (86%), lipases (61%), proteases (93%), e hemolisinas (99%). Relativamente aos genes de virulência associados, as percentagens mais elevadas foram observadas para as ente-

rotoxinas *act* (55%), *ahyB* (54%) e *alt* (53%) e lipase sem actividade fosfolipídica *lip* (53%), frequências inferiores a 40% foram observadas para os genes codificantes para o flagelo *flaA/B*, enterotoxinas *hlyA*, *ascV* e *ast* e despolimerizador do citoesqueleto do sistema de secreção do tipo III, *aext*. Na globalidade, os resultados revelam múltiplas combinações de potenciais factores de virulência entre os isolados obtidos nos três locais amostrados (Figura 2).

Quanto à resistência a antibióticos, os níveis mais elevados foram observados para amoxicilina/ácido clavulânico (36%), ácido nalidíxico (29%) e tetraciclina (17%). Níveis mais reduzidos de resistência (<10%) foram detectados para a ampicilina, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina e trimetoprim/sulfametoxazol. Todos os isolados apresentaram sensibilidade ao imipenem e levofloxacina (Figura 3).

Considerações finais

Os resultados obtidos para os isolados recolhidos dos três locais em estudo revelaram a ampla disseminação de *Aeromonas* potencialmente patogénicas nos diferentes ambientes, tendo-se detectado fenótipos de resistência a antibióticos clinicamente importantes e diferentes combinações de factores potenciais de virulência relacionados com a adesão, invasão e disseminação no hospedeiro. No entanto, as estirpes com maior potencial de patogenicidade foram maioritariamente recolhidas de alimentos crus, ou seja, a preparação destes alimentos utilizando tratamento térmico adequado antes do seu consumo, deverá reduzir de forma significativa o risco associado a presença de *Aeromonas* nestes produtos. Ainda assim, a disseminação de *Aeromonas* potencialmente patogénicas em locais de processamento e distribuição de alimentos promovem a contínua exposição ao agente, constituindo um potencial perigo para o consumidor, principalmente para os indivíduos mais susceptíveis, membros de grupos de risco (e.g. crianças, grávidas, idosos). Assim sendo, é importante avaliar, de forma continuada e fidedigna, a incidência de infecções associadas a estes microrganismos, de forma a poder estimar o seu real impacto na população portuguesa e mundial.

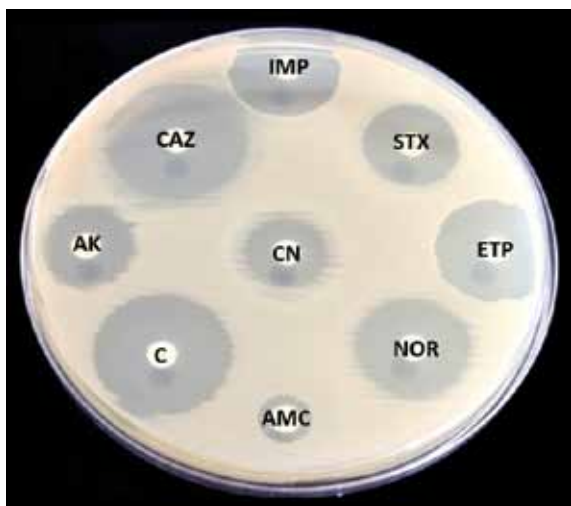


Figura 3 – Exemplo de teste de difusão em placa para pesquisa de resistência a diferentes antibióticos. Imagem representativa de uma estirpe ambiental de *Aeromonas* resistente ao AMC- amoxicilina/ácido clavulânico e suscetível à AK – ampicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; C – cloranfenicol; CAZ – ceftazidima; CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; ETP – ertapenem; IMP – imipenem; NOR – norfloxacina; STX - trimetoprim/sulfametoxazol.

Referências

- [1] <http://www.bacterio.net/aeromonas.html>, acessado em Novembro de 2014
- [2] Seshadri R., Joseph S. W., Chopra A. K., Sha J., Shaw J., Graf J., Haft D., Wu M., Ren Q., Rosovitz M. J., Madupu R., Tallon L., Kim M., Jin S., Vuong H., Stine O. C., Ali A., Horneman A. J. and Heidelberg J. F., (2006). *Genome sequence of Aeromonas hydrophila ATCC 7966T: jack of all trades*. Journal of Bacteriology 188 (23): 8272 - 8282
- [3] Martin-Carnahan A. and Joseph S.W. 2005. Family I. Aeromonadaceae Colwell, MacDonell and De Ley 1986, 474VP. In: Brenner, Krieg, Staley and Garrity, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. 2nd ed. New York: Springer
- [4] Scoaris D. O., Colacit J., Nakamura C. V. Ueda-Nakamura T., Abreu, B. A. and Dias B. P., (2008). Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. Isolated from drinking water. Antonie Van Leeuwenhoek. 93 (1-2): 111 - 122
- [5] Parker J. L. and Shaw J. G., (2011). *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. Journal of Infection. 62 (2): 109 - 118
- [6] Janda J. M. and Abbott S. L., (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clinical Microbiology Reviews. 23 (1): 35 - 73
- [7] Khajanchi B. K., Fadl A. A., Borchardt M. A., Richard L. Berg R. L., Amy J. Horneman A. J., Stemper M. E., Joseph S. W., Moyer N. P., Sha J., and Chopra A. K., (2010). Distribution of Virulence Factors and Molecular RAPD of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission. Applied and Environmental Microbiology. 76 (7): 2313 - 2325
- [8] Naharro G., Rubio P., Luengo M. J., (2011). Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. Chapter 68. *Aeromonas*
- [9] Wu C. J., Wu J. J., Yan J. J., Lee H. C., Lee N. Y., Chang C. M., Shih H. I., Wu H. M., Wang L. R., Ko W. C. (2007). Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. Journal of Infection. 54 (2): 151 - 158
- [10] Barroco, C. (2013) *Antibiorresistência e pesquisa de fatores de virulência em Aeromonas spp.* Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, Lisboa

Metodologias para a identificação de microrganismos patogénicos em amostras alimentares: a técnica de PNA-FISH

Rui Rocha^{1,2,3}, Carina Almeida^{1,2,3} e Nuno Filipe Azevedo¹

¹LEPABE, Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

²Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

³BIOMODE, Zona Industrial da Gandra, Apartado 4152, 4806-909 Guimarães, Portugal

E-mail: nazevedo@fe.up.pt

A população mundial tem crescido a um ritmo sem precedentes, estando estimada atualmente na ordem dos 7 mil milhões de pessoas. Com ela, aumenta também a pressão sobre a produção alimentar. Com efeito estima-se que em 2013 foram produzidas mundialmente 308 milhões de toneladas de carne, 780 milhões de toneladas de leite e derivados, 160 milhões de toneladas de peixe e derivados e 1640 milhões de toneladas de fruta e vegetais¹. Destes, um valor no total de 1,15 triliões de dólares (USD) foram gerados por exportação [1, 2]. De facto, nas últimas décadas, com a globalização dos mercados agro-alimentares, tem-se verificado um aumento do tráfego internacional de géneros alimentares. Estes 2 factos traduzem-se em potenciais problemas de segurança alimentar, quer pela quantidade produzida e/ou transportada, quer pelas diferenças nas práticas de segurança alimentar praticadas por cada um dos países de origem dos alimentos.

As doenças causadas por patogénios alimentares são um importante problema de saúde pública a nível mundial, resultando numa elevada taxa de morbilidade e mortalidade. Atualmente são reconhecidos cerca de 31 patogénios, dos quais *Escherichia coli* patogénica, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Sigella* spp. e *Yersinia* spp. são os principais responsáveis pela maioria das doenças, hospitalizações e mortes associadas a infeções de origem alimentar [3].

Os últimos dados disponibilizados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), relativos a 2012 estão sumarizados na tabela 1. Nela é possível observar que o número de casos com mais ocorrências foram as campilobacterioses (infeções causadas por *Campylobacter* spp.) e que os casos que se traduziram numa maior taxa de hospitalizações e mortes foram os casos de listeriose (infeções causadas por *L. monocytogenes*) com, respetivamente, 91,6% e 17,8%. Relativamente às colites (infeções causadas por *E. coli* patogénicas) o serotipo O157 foi o mais identificado, seguido pelos serotipos O26 e O91 [4]. Em 2012 foram contabilizados cerca de 5 363 surtos alimentares, dos quais 7 tiveram origem em Portugal [4]. Até hoje, o surto alimentar Europeu de 2011 com *E. coli* O104:H4 continua a ser o caso mais grave, em grande parte devido aos erros e atrasos na deteção da fonte do surto [5].

A prevenção da contaminação de géneros alimentares é de vital importância, dado que uma grande percentagem destes produtos é consumida crua e sem qualquer tratamento pós colheita. A juntar a este facto, existe a possibilidade de contaminação cruzada de produtos processados e a sua disseminação a nível local, nacional e internacional.

Os testes microbiológicos de alimentos foram sempre parte integrante da produção alimentar, mas eram geralmente empregues em controlos de produto final, que hoje em dia

¹ Dados relativos a 2011

Tabela 1 - Dados relativos às infeções causadas por patogénios alimentares na Europa em 2012 [4,6]. Apenas os casos mais relevantes (> 1000 casos), confirmados e comunicados à EFSA, foram considerados.

Doença	Área	Casos	Taxa de hospitalização (%)	Taxa de mortalidade (%)
Campilobacteriose	EU	214 268	47,7	0,03
	Portugal	328	-	-
Salmonelose	EU	91 034	45,1	0,14
	Portugal	76	-	-
Colite	EU	5 671	36,5	0,36
	Portugal	4	-	-
Listeriose	EU	1 642	91,6	17,8
	Portugal	12	-	-

se reconhece como sendo uma estratégia errada. Atualmente encontra-se implementado o sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que mudou o ónus da segurança alimentar dos testes para o controlo do processo de produção [7]. Os testes microbiológicos continuam, no entanto, a ser uma ferramenta fundamental nos processos de controlo e monitorização, visando dois objetivos principais: estabelecer a ausência de agentes patogénios de forma a garantir a segurança dos alimentos e prevenir ou minimizar possíveis contaminações ao longo da cadeia alimentar; enumerar a carga microbiana total e deste modo avaliar a eficácia de tratamentos de higiene, a qualidade e a vida útil do produto. Os testes microbiológicos podem ser divididos em métodos convencionais e alternativos.

Os métodos convencionais baseiam-se no enriquecimento de culturas seguido de ensaios de confirmação, centrados nas propriedades metabólicas e antigénicas do microrganismo a identificar. As principais vantagens da aplicação deste tipo de métodos residem no facto de serem relativamente baratos, tecnicamente simples e apresentarem elevada especificidade e sensibilidade. As desvantagens advêm do facto de serem morosos, laboriosos, propensos a contaminações cruzadas e incapazes de detetar patogénios em baixo número ou no estado viável não cultivável (isto é, células incapazes de crescer nos meios ricos convencionais) [3].

Nesse sentido e de forma a acompanhar o processo de produção e distribuição alimentar, há a necessidade de implementar métodos alternativos de deteção que sejam rápidos, sensíveis, fiáveis e versáteis, que possam adaptar-se facilmente às necessidades das diferentes linhas de produção/processamento de alimentos. Com estas metodologias procura-se reduzir substancialmente o tempo, o trabalho e custo global do processo de deteção. De alguns anos para cá, muito trabalho tem sido realizado neste sentido, sendo possível encontrar no mercado diversos métodos rápidos alternativos de testes de patogénio, os que globalmente se incluem nas categorias de testes moleculares e de biossensores [3].

Os biossensores são dispositivos analíticos que incorporam elementos biológicos reativos (sondas e/ou anticorpos) na deteção de microrganismos. Estes sistemas são rápidos e permitem a análise de diversos tipos de elementos empregando um pequeno volume de amostra. No entanto, a entrada no mercado deste tipo de sistemas tem sido dificultada pela baixa sensibilidade, custo elevado aliado a um procedimento complexo e de difícil reprodutibilidade. Adicionalmente, à semelhança de outros métodos moleculares, apresentam limitações na deteção em matrizes alimentares complexas [3].

Os métodos moleculares podem ser subdivididos em imunológicos e os baseados em ácidos nucleicos. Os primeiros baseiam-se na ligação específica entre antígeno e anticorpo, sendo que os segundos (ex: PCR e suas variantes e DNA *microarrays*) usam parte de sequências de DNA ou RNA específicas para os microrganismos a identificar, processando-as por amplificação e/ou hibridação. Os métodos moleculares são na generalidade rápidos e robustos. No entanto, enquanto os métodos imunológicos podem apresentar alguma reatividade cruzada com antígenos semelhantes; os métodos



Figura 1 – Kit Probe4Salmonella desenvolvido pela Biomode S. A. para a deteção de *Salmonella* spp.

baseados em ácidos nucleicos estão dependentes de um passo de amplificação enzimática, que pode ser inibido pela presença de contaminantes [3]. Estes últimos também não permitem distinguir células viáveis de não viáveis e podem necessitar de passos adicionais de extração e purificação do DNA.

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) é também uma metodologia que nos últimos anos tem sido desenvolvida para aplicação a testes microbiológicos de controlo alimentar. Esta consiste basicamente no uso de sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência que hibridam com regiões complementares dos ácidos nucleicos de microrganismos, geralmente RNA ribossomal (rRNA). O método assenta em 4 passos, fixação e permeabilização da amostra, hibridação da sonda com a sequência de rRNA alvo, lavagem (que visa a extração de sonda não hibridada) e finalmente, a observação da amostra ao microscópio de fluorescência ou a sua deteção por citometria de fluxo [8]. Nos trabalhos de FISH, no passo de hibridação, é comum usar uma sonda de DNA ou RNA, que atribuem algumas limitações à metodologia, como baixa robustez e passo de hibridação moroso. A utilização de mímicos de ácidos nucleicos, como o ácido péptido nucleico (PNA), permite ultrapassar algumas destas limitações. O PNA é uma poliamina com uma estrutura neutra composta por unidades de glicina N-(2-aminoetil) ao invés de pentoses e grupos fosfato da molécula de DNA. Esta composição confere, comparativamente às sondas de DNA, várias vantagens, nomeadamente a falta de repulsão electrostática e uma superior estabilidade dos duplexos de PNA/DNA, resultando numa maior especificidade. Por fim as sondas de PNA permitem uma maior acessibilidade ao material genético alvo, dado que a hibridação é realizada sob baixa concentração de sal, promovendo a destabilização das estruturas secundárias do rRNA. Isto traduz-se numa etapa de hibridação muito rápida [8].

A técnica de PNA-FISH oferece portanto uma maior especificidade, estabilidade e rapidez que outros métodos moleculares. Para além disso, e ao contrário de outros métodos baseados em ácidos nucleicos, não é afetada pela presença de inibidores e só deteta microrganismos com um conteúdo ribossomal estável, em teoria, viáveis.

As desvantagens desta metodologia podem residir na inexistência de um passo único de fixação e permeabilização, sendo necessário adaptar tento em conta o microrganismo alvo. Adicionalmente, a identificação dos microrganismos tendo por base as sequências de rRNA, pode gerar problemas em encontrar uma sequência que consiga discriminar microrganismos evolutivamente próximos.

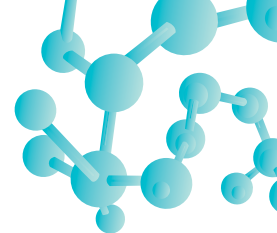
Nesse sentido, os nossos esforços de investigação tem-se focado, desde 2001, na exploração dos mímicos de ácidos nucleicos, nomeadamente as sondas de PNA, e na sua aplicabilidade ao protocolo de FISH. O desenvolvimento, com sucesso, de métodos de PNA-FISH específicos para a deteção de patógenos alimentares, como *Cronobacter*, na origem de graves infeções com elevada taxa de mortalidade em recém-nascidos pelo consumo de fórmula infantil em pó contaminada [9], *Salmonella spp.* [10,11] ou *E. coli* O157:H7 [12]; resultou numa evolução natural para aplicações comerciais (ex.: 2 pedidos de patente internacionais para a aplicação do método de PNA-FISH em *Salmonella spp.*, PCT/IB2011/051337, e *E. coli* O157:H7, PCT/PT2014/000023). Esta tecnologia, e subseqüentes aplicações à área da segurança alimentar, estiveram na base da criação da empresa Biomode S.A.. As aplicações baseadas em PNA-FISH que neste momento se encontram a iniciar o processo de certificação internacional, poderão em breve alargar o leque de soluções moleculares existentes no mercado, contribuindo para um melhor rastreio do processo produtivo e prevenção das infeções alimentares (Figura 1).

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE, através do Programa Operacional do Norte (ON2) e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos projetos PEst-C/EQB/UI0511, NORTE-07-0124-FEDER-000025 - RL2_ Environment&Health e Projeto “DNA mimics” PIC/IC/82815/2007; Bolsa de Doutoramento SFRH/BDE/51910/2012 e Bolsa de Pós-Doutoramento SFRH/BPD/74480/2010.

Referências

- [1] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. FAO food outlook, biannual report on global food markets November 2013, FAO Publishing
- [2] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. FAO statistical yearbook 2014, Near East and North Africa Food and Agriculture, FAO Publishing
- [3] Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö. G., Soyer, Y. e Alpas, H. 2014. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control*, 40:359-367
- [4] EFSA, European Food Safety Authority. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. Parma, Itália: EFSA Journal, 12:3547
- [5] WHO, World Health Organization. 2011. A public health review of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreak in Germany 9
- [6] EFSA, European Food Safety Authority. Portugal - 2012 Report on trends and sources of zoonoses. Parma, Itália
- [7] FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2003. Hazard Characterization for Pathogens in Food and Water: Guidelines. Microbiological Risk Assessment Series No. 3. Roma, Italia
- [8] Cerqueira, L., Azevedo, N. F., Almeida, C., Tatiana, J., Keevil, C. W. and Vieira, M. J. 2008. DNA Mimics for the Rapid Identification of Microorganisms by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). *International Journal of Molecular Sciences*, 9:1944-1960
- [9] Almeida, C., Azevedo, N. F., Iversen, C., Fanning, S., Keevil, C. W. e Vieira, M. J. 2009. Development and Application of a Novel Peptide Nucleic Acid Probe for the Specific Detection of *Cronobacter* Genomosppecies (*Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:2925-2930
- [10] Almeida, C., Azevedo, N. F., Fernandes, R. M., Keevil, C. W. e Vieira, M. J. 2010. Fluorescence *In Situ* Hybridization Method Using a Peptide Nucleic Acid Probe for Identification of *Salmonella spp.* in a Broad Spectrum of Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:4476-4485
- [11] Almeida, C., Cerqueira, L., Azevedo, N. F. e Vieira, M. J. 2013. Detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 161:16-22
- [12] Almeida, C., Sousa, J. M., Rocha, R., Cerqueira, L., Fanning, S. Azevedo, N. F. e Vieira, M. J. 2013. Detection of *Escherichia coli* O157 by Peptide Nucleic Acid Fluorescence *In Situ* Hybridization (PNA-FISH) and Comparison to a Standard Culture Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 79:6293-6300



Aquecimento Óhmico: uma ferramenta ao serviço da biotecnologia

Ricardo N. Pereira, Rui. M. Rodrigues, José A. Teixeira e António A. Vicente

Centre for Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4700-035 Braga, Portugal

E-mail: avicente@deb.uminho.pt

Uma tecnologia emergente

Atualmente, o aquecimento óhmico (OH) encontra-se no leque restrito das tecnologias consideradas emergentes no processamento alimentar. Sendo também designado por aquecimento por efeito de Joule, é o processo no qual a corrente elétrica passa num material (semi-)condutivo com o objetivo de o aquecer. A resistência que o produto oferece à passagem da corrente elétrica permite a geração interna de energia, dissipada sob a forma de calor, que faz com que esta tecnologia não esteja dependente de fenómenos de transferência de calor a partir de uma fonte externa [1]. A sua aplicabilidade em alimentos ficou sobretudo conhecida no século XX, com a pasteurização elétrica do leite. No entanto, a falta de conhecimento de princípios fundamentais e tecnológicos, assim como elevados custos operacionais, limitaram o seu desenvolvimento e aplicação. Atualmente, um sistema de OH pode facilmente ser integrado em linhas de processamento existentes, sendo constituído por uma tubagem oca que numa parte do seu percurso possui um par de elétrodos colocados em posições opostas ou em anéis integrados, que tem a função de aplicar o campo elétrico ao alimento que entre eles passa, de uma forma uniforme. Alguns dos marcos fundamentais para a disseminação da tecnologia de OH foram a utilização de materiais inertes adequados para construção dos elétrodos, a evolução de sistemas de alimentação elétrica de alta frequência (da ordem dos kHz), essenciais para minimizar corrosão e migração de matérias dos elétrodos para o alimento, e o desenvolvimento de ferramentas de controlo e automação do processo.

Aplicação industrial

São várias as vantagens desta tecnologia, sendo que a que tem despertado bastante mais interesse sob o ponto de vista de utilização industrial é a de reduzir a exposição do produto alimentar ao calor de forma dramática, diminuindo assim o tempo necessário para obter a temperatura-alvo de determinado tratamento térmico. Além disso, o OH tem ainda como vantagens:

- Ausência de superfícies quentes, com redução do sobreprocessamento do produto e do sujamento da superfície dos equipamentos;
- Elevada eficiência de aquecimento quer em termos de rapidez (princípio HTST, *high-temperature short-time*) quer em termos da uniformidade de temperatura do pro-

duto nos estados líquido e sólido, minimizando a perda de propriedades organolépticas e nutricionais;

- Ideal para o processamento de produtos viscosos, uma vez que permite um aquecimento uniforme não estando limitado aos fenómenos de condução e convecção;
- Elevada eficiência energética (superior a 90%);
- Tecnologia considerada amiga do ambiente, com baixo impacto ambiental;
- Baixo stress mecânico induzido no alimento, ideal para alimentos sensíveis (p.ex. pedaços de fruta) cuja integridade se pretenda preservar;
- Processo de base simples com baixos custos de manutenção.

Durante os últimos 15 anos o seu uso comercial é já uma realidade não só na União Europeia, mas também em países como Estados Unidos e Japão, uma vez que é evidente a sua menor agressividade face a processos convencionais. Em particular, ganhou terreno no processamento de carnes, frutas, vegetais e alimentos altamente fluidos como leite e sumos, tendo no entanto vindo a ser aplicado numa gama muito mais alargada de processos, como por exemplo: processamento asséptico para refeições prontas a comer de valor acrescentado, armazenadas à temperatura ambiente; esterilização UHT (ultra-high-temperature) de alimentos contendo partículas sólidas (até 2.5 cm); pasteurização de alimentos para enchimento a quente e enchimento asséptico; pré-aquecimento de produtos e, genericamente, processamento térmico de alimentos termo-sensíveis e de valor acrescentado. A tabela 1 identifica algumas unidades comerciais usadas à escala e industrial para o processamento de diversos produtos alimentares.

A nível nacional existem já unidades em funcionamento, bem como projetos de investigação e aplicação a nível piloto e industrial. Exemplo disto é o projeto NOVELTEC - Desenvolvimento de Novas Tecnologias de Suporte à Criação de Produtos Inovadores que reúne um total de 13 parceiros, estando 8 deles diretamente envolvidos no desenvolvimento e aplicação de aquecimento óhmico na indústria alimentar.

Um efeito elétrico - eletroporação

Durante as últimas décadas, e em resultado dos importantes avanços tecnológicos e consequente incremento da investi-

Tabela 1 - Exemplos de linhas de processamento da tecnologia de aquecimento ôhmico (OH).

País	Ano	Produto Alimentar	Fabricante	Energia (kW)
E.U.A.	1997	Ovo líquido e sumos	Ratzek	10
Grécia	1998	Fatias de pêssego	Emmepiemme	158
França	1999	Leite, ovos, sumos e purés de fruta	Alfa-Laval	44
França	2001	Couve-flor	APV Baker	10
México	2002	Processamento de morangos	Emmepiemme	250
França	2003	Carne	Emmepiemme	50
Itália	2004	Tomate pelado e em pedaços	Emmepiemme	480
Itália	2005	Vegetais	Emmepiemme	60
Irlanda	2009	Carne	C-Tech	3.5
Portugal	2012	Sumos, polpas de fruta e leite	Alfa-Laval	60
Portugal	2012	Sumos, polpas de fruta e ovo líquido	Emmepiemme	30

Fonte: adaptado de Leadley, C. (2008) [9]

gação fundamental relacionada com o processamento elétrico têm sido colocadas diversas questões ao nível dos efeitos de algumas variáveis elétricas, como a frequência e a intensidade do campo elétrico, que assumem um papel preponderante na validação da tecnologia. Haverá um eventual efeito elétrico, adicional ao efeito térmico, sobre enzimas ou até mesmo microrganismos? Quais são as possíveis interações entre os campos elétricos e a funcionalidade tecnológica de algumas biomacromoléculas de base alimentar?

Alguns estudos comprovam a existência de efeitos não-térmicos associados ao OH e a presença inerente de campo elétricos moderados, na ordem dos 1 – 1000 V/cm, também conhecidos como MEF (Moderate Electric Fields). Em concreto, a aplicação dos MEF pode induzir efeitos ao nível das estruturas celulares, promovendo por exemplo a inativação de microrganismos contaminantes à temperatura ambiente [2, 3], devido à eventual formação de poros nas membranas celulares - fenómeno também conhecido por eletroporação. Neste sentido, e no âmbito de operações como pasteurização ou esterilização, a aplicação de MEF faz com que seja necessário um tempo inferior de operação a uma determinada temperatura para garantir os níveis necessários de inativação microbiana, acrescentando evidentes benefícios na qualidade nutricional e organolética do produto final. Outras potencialidades do fenómeno de eletroporação promovido pela aplicação dos MEF residem na permeabilização e rutura de tecidos vegetais em processos biotecnológicos, facilitando por exemplo a extração de compostos celulares de interesse e promovendo a difusão de solutos [4, 5].

As proteínas do soro leite, um caso de estudo

Devido ao seu elevado valor nutricional e funcional, as proteínas do soro podem ser usadas como ingredientes numa grande variedade de aplicações na indústria alimentar. O OH, quando comparado com o aquecimento indireto (dito convencional), determina alterações de comportamento ao nível termodinâmico assim com uma menor taxa de desnatura-

ção das proteínas do soro (até um diferencial 30%), no intervalo de temperaturas entre situado entre os 75 e 90 °C [6], que é normalmente utilizado nos processos de pasteurização alimentar. Recentemente, foi igualmente reportado [7] que o processamento térmico quando acoplado com a aplicação de MEF reúne o potencial necessário para controlar à nano-escala o tamanho das partículas de proteína através de alterações no equilíbrio entre forças atrativas e repulsivas durante o processo de agregação e gelificação das proteínas desnaturadas. Os géis de proteína desempenham um papel importante nas propriedades texturais de alimentos (por exemplo, substituindo as gorduras), uma vez que dão uma sensação agradável na boca, e permitem a retenção de água e outros ingredientes numa matriz. A utilização de MEF encerra em si um grande potencial para o desenvolvimento de hidrogéis GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) com diferentes características mecânicas, microestruturais e, consequentemente, texturais (ver Figura 1). A tecnologia MEF foi igualmente utilizada para a produção de filmes edíveis de proteínas de soro [8]. A aplicação de MEF promoveu ainda alterações ao nível molecular, afetando a distribuição das estruturas secundárias das proteínas na matriz dos filmes. Os resultados demonstram que os filmes produzidos por MEF podem apresentar um decréscimo até 10% nos valores de permeabilidade ao vapor de água, em comparação com os filmes edíveis produzidos a partir de métodos convencionais. Tendo em conta estes resultados, a utilização de MEF pode estender-se à produção de filmes ou revestimentos edíveis que, nos últimos anos, têm sido considerados uma das tecnologias com maior potencial para aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, assegurando a sua segurança microbiológica e protegendo-os da influência de fatores externos.

Conclusões

A tecnologia de OH abre um novo paradigma no processamento térmico e não-térmico. Para além de nos últimos anos ter consolidado a sua associação ao processamento de alimentos de elevado padrão qualidade, surge agora como

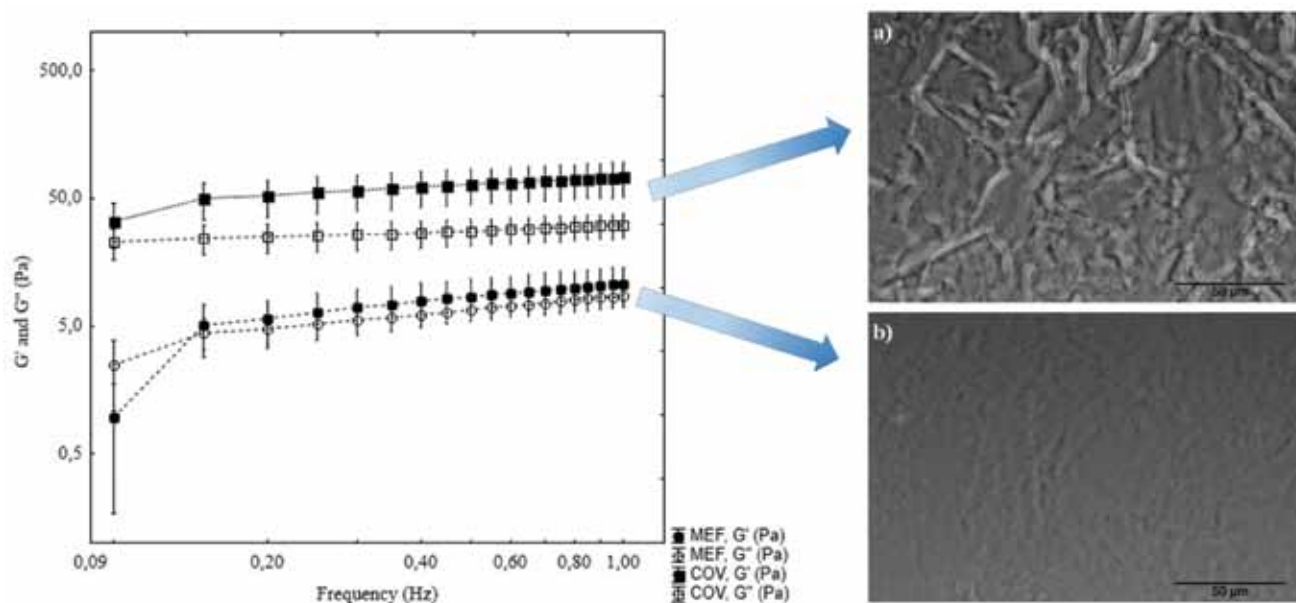


Figura 1 – Comportamento viscoelástico e micrografias de contraste de fase (ampliação de 40x) de géis de isolado de proteína do soro produzidos por: a) aquecimento convencional (COV); b) aplicação de campos elétricos moderados (MEF).

uma ferramenta promissora ao serviço de biotecnologia com efeitos já comprovados quer ao nível de estruturas celulares assim como na alteração funcional de macromoléculas de elevada importância nutricional, como são as proteínas do soro do leite. Estes resultados abrem novas perspetivas para a utilização do OH não só na área da tecnologia alimentar, mas também para aplicações nas áreas de bioprocessos e farmacêutica. O principal desafio coloca-se na necessidade de uma investigação fundamental e multidisciplinar que promova um melhor entendimento acerca de como os campos elétricos podem interagir ao nível molecular com os diversos produtos-alvo de interesse.

Agradecimentos

Ricardo N. Pereira agradece à FCT através bolsa de pós-doutoramento (com a referência SFRH/BPD/81887/2011) e do Projeto Estratégico PEst-OE/EQB/LA0023/2013. Agradece-se ao Projeto “BioEnv - Biotechnology and Bioengineering for a sustainable world”, REF. NORTE-07-0124-FEDER-000048, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (ON.2 – O Novo Norte), ao abrigo do Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN), através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Referências

- [1] Knirsch, M. C., et al., *Ohmic heating – a review*. Trends in Food Science & Technology, 2010. 21(9): p. 436-441
- [2] Machado, L. F., et al., *Moderate electric fields can inactivate Escherichia coli at room temperature*. Journal of Food Engineering, 2010. 96(4): p. 520-527
- [3] Cho, H. Y., A. E. Yousef, and S. K. Sastry, *Kinetics of inactivation of Bacillus subtilis spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating*. Biotechnol Bioeng, 1999. 62(3): p. 368-72
- [4] Kulshrestha, S. A. and S. K. Sastry, *Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010. 11(1): p. 78-83
- [5] Sensoy, I. and S. K. Sastry, *Extraction Using Moderate Electric Fields*. Journal of Food Science, 2004. 69(1): p. FEP7-FEP13
- [6] Pereira, R. N., J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, *Exploring the Denaturation of Whey Proteins upon Application of Moderate Electric Fields: A Kinetic and Thermodynamic Study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. 59(21): p. 11589-11597
- [7] Rodrigues, R. M., et al., *Influence of moderate electric fields on gelation of whey protein isolate*. Food Hydrocolloids, 2015. 43(0): p. 329-339
- [8] Pereira, R. N., et al., *Effects of Electric Fields on Protein Unfolding and Aggregation: Influence on Edible Films Formation*. Biomacromolecules, 2010. 11(11): p. 2912-2918
- [9] Leadley, C., *Novel Commercial Preservation Methods*, in *Biodeterioration and Preservation*, G. S. Tucker, Editor 2008, Blackwell Publishing: Oxford. p. 211-244

MICROBIOTEC15



Congress of Microbiology
and Biotechnology

10/12 DECEMBER 2015
ÉVORA

From 10-12 December 2015, the University of Évora will host the 6th joint congress of Microbiology and Biotechnology: Microbiotec15, organized by the Portuguese Society of Microbiology and the Portuguese Society of Biotechnology.

Topics to be discussed will include Industrial and Food Microbiology and Biotechnology; Environmental Microbiology and Biotechnology; Health Microbiology and Biotechnology; Molecular Microbiology and Microbial Physiology; Bioprocess Engineering; Cellular Microbiology and Pathogenesis; Genomics and Systems Biology and Emergent technologies.

During the 3 days the programme will provide a unique opportunity for debate, discussion and the exchange of ideas and information to explore the new challenges of biotechnology and microbiology research.

You are cordially invited to participate!

ABSTRACT TOPICS

- 1- Agricultural Microbiology and Biotechnology
- 2- Biodegradation and Biotechnology in Cultural Heritage
- 3- Bionanotechnology
- 4- Bioprocess engineering
- 5- Cell culture, Stem Cell and Tissue Engineering
- 6- Cellular Microbiology and Pathogenesis
- 7- Clinical Microbiology
- 8- Drug Resistance Targets and Biotechnology
- 9- Environmental Microbiology and Biotechnology

- 10- Epidemiology
- 11- Food Microbiology & Biotechnology
- 12- Genomics and Systems Biology
- 13- Health Biotechnology
- 14- Industrial Microbiology & Biotechnology
- 15- Microbial Ecology
- 16- Microbial Physiology
- 17- Molecular Microbiology
- 18- Pharmaceutical Biotechnology
- 19- Renewables, biofuels and bioenergy

DATES, MEETING REGISTRATION & ABSTRACT SUBMISSION

Important dates

Early Registration: July 31th, 2015

Abstract submission: September 15th, 2015

Notification of acceptance of abstracts: October 15th, 2015

Congress dates: December 10 - 12th, 2015

on line registration and on line abstract submission in

<http://www.microbiotec15.uevora.pt>

Ficha Técnica

Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia
Publicação Quadrimestral . Série 2 - Número 6
Abril 2015

Propriedade

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Direcção

Presidente - José António Teixeira
Vice-Presidente - Maria Raquel Aires Barros
Secretário Geral - Eugénio Campos Ferreira
Tesoureiro - Manuel Coimbra da Silva
Vogal - Timothy Alun Hogg

Editores

José António Teixeira
Maria Raquel Aires Barros
Lígia O. Martins
Jorge H. Leitão

Paginação e Design

fid'algo - printgraphicdesign

Execução gráfica

fid'algo - printgraphicdesign
Tiragem - 1000 exemplares
Depósito Legal - 187836/02
ISSN - 1645-5878

Sócios Colectivos da SPBT

Amersham Bioscience Europe GmbH
Instituto Piaget

FIPA – Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares
APIM – Associação Portuguesa da Indústria de Moagem e Massas
PROENOL – Indústria Biotecnológica, Lda.
PACI – Material Científico e Industrial, S.A.
VWR International – Material de Laboratório, S.A.
Laboratórios BIAL – Portela & Companhia, S.A.
INETI – Instituto de Engenharia e Tecnologia Industrial
CIPAN – Companhia Produtora de Antibióticos, S.A.
IZASA Portugal Distribuições Técnicas, Lda.
PIONEER HI-BRED Sementes de Portugal, S.A.
Escola Superior de Biotecnologia
RAR – Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A.
Bayer Cropscience (Portugal) – Produtos para a Agricultura, Lda.
IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica



Imagem de capa - Roda de aromas

Da página 24, "Cápsulas de café expresso: modulação das propriedades sensoriais às expectativas e comodidade do consumidor"
Guido R. Lopes, Andreia S. Ferreira, Mariana Pinto, Cláudia P. Passos, Elisabete Coelho, Carla Rodrigues, Marco Miranda, Sílvia M. Rocha, Manuel A. Coimbra



**Sociedade Portuguesa
de Biotecnologia**

Universidade do Minho
Departamento de Engenharia Biológica
4700-057 Braga
PORTUGAL

www.spbt.pt