

federação das indústrias portuguesas agro-alimentares

3 a biotecnologia

na indústria agro-alimentar



a biotecnologia na indústria agro-alimentar

Manuel Mota*

Professor Catedrático da Universidade do Minho

José Empis*

Professor Associado da Universidade Técnica de Lisboa

José Teixeira

Professor Associado da Universidade do Minho

*Membro do Conselho Científico da FIPA



federação das indústrias portuguesas agro-alimentares

Com o apoio de:



PROGRAMA CO-FINANCIADO
PELO GOVERNO PORTUGUÊS
E COMUNIDADE EUROPEIA | FEDER

ficha técnica

edição: Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares **Telefone:** 01.793 86 79

ISBN: 972-98024-2-4

design: Forma, design

impressão: Textype

O conteúdo do texto bem como a revisão do mesmo são da responsabilidade dos seus autores.

índice

5 preâmbulo

7 A Indústria da Fermentação e o sector Agro-Alimentar

19 A Biotecnologia na produção de aditivos e em processo

7 introdução

9 produção de lacticínios fermentados

11 produção de alimentos fermentados de origem vegetal

13 produtos cárneos e de pescado fermentados

14 produção de pão

14 produção de bebidas fermentadas

19 introdução

19 produção de aditivos alimentares

19 CORANTES

20 EDULCORANTES

20 ÁCIDO ORGÂNICOS

21 HIDROCOLOIDES

21 AGENTES EMULSIONANTES

21 enzimas no processo produtivo de alimentos e aditivos

22 APLICAÇÃO DE HIDROLASES

22 APLICAÇÃO DE PROTEASES

25 APLICAÇÃO DE LIPASES

25 APLICAÇÃO DE GLICANASES

26 OXIDOREDUCTASES

27 ISOMERASES

27 TRANSFERASES

27 o futuro: novas aplicações das biotecnologias às indústrias agro-alimentares

27 AO NÍVEL DOS PRODUTOS

29 AO NÍVEL DOS PROCESSOS

30 AO NÍVEL DAS MATÉRIAS-PRIMAS

31 A Biotecnologia no controlo de qualidade nas indústrias agro-indústrias

32 principais aplicações de técnicas rápidas de controlo de qualidade

32 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

34 TÉCNICAS BIOFÍSICAS

34 TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS

35 TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS NO CONTROLO DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

36 UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOLÓGICOS NA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

37 UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOLÓGICOS NA DETECÇÃO DE PESTICIDAS E DE RESÍDUOS DE DROGAS

37 UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOLÓGICOS NO CONTROLO DOS PRODUTOS ALIMENTARES

38 TÉCNICAS GENÉTICAS

39 Leitura aconselhada

O que se pretende com o presente trabalho, mais do que fornecer uma informação especializada, é proporcionar ao leitor uma panorâmica do papel da biotecnologia na indústria alimentar e dos princípios gerais que regem a obtenção de vários tipos de alimentos e bebidas que da sua aplicação dependem. Por essa razão se trata num primeiro capítulo dos alimentos fermentados e da fermentação, num segundo capítulo são descritas as operações que têm sido levadas a cabo para obtenção e utilização dos agentes transformadores que são as proteínas especializadas denominadas enzimas, e num capítulo final se detalham as aplicações da biotecnologia no controlo de qualidade.

Não cabe nesta obra tratar com detalhe a produção de matérias primas para a indústria alimentar por via biotecnológica, embora sejam mediáticos os diversos aspectos de que se revestem os novos cereais, oleaginosas, frutos e tubérculos que, entre outros, estão disponíveis no mercado mundial e resultam da aplicação das mais modernas tecnologias biológicas. Recorrendo a estas técnicas é alterado o código que os organismos vivos transmitem de geração em geração - código genético - não se fazendo uso de melhoramentos dependentes da reprodução sexuada e das leis de Mendel como se fez durante séculos e se faz ainda. A alteração do código genético é efectuada por intervenção laboratorial directa sobre o portador desse código, uma molécula denominada ácido desoxiribonucleico (DNA na literatura anglosaxónica, ADN na nossa), constituinte dos cromossomas nas células dos organismos superiores e integrando também um organelo denominado ribossoma, por forma a

incutir propriedades e características transmissíveis.

Os organismos resultantes têm já e terão no futuro um impacto fortíssimo na indústria, quer porque a sua produção resulte facilitada ou mais limpa, quer ainda porque apresentem propriedades funcionais especializadas e desejáveis, tendendo portanto progressivamente a substituir aqueles menos especializados que resultaram do lento trabalho de selecção e melhoramento tradicional.

A inocuidade ou como vem sendo habitual dizer-se a segurança de utilização destas novas matérias-primas pode ser averiguada de acordo com o método SAFEST, constante de um documento traduzido pelo Conselho Nacional da Qualidade e que pode portanto ser obtido no Instituto Português da Qualidade.

Baseia-se no princípio de que se deve estimar a inocuidade de um novo alimento com base na semelhança que ele tenha com outro ou outros pré-existentes, analisando as diferenças em pormenor, e portanto na limitação da averiguação de inocuidade às características do alimento ou ingrediente considerado como novo que são diferentes daquelas que existiam em alimentos ou ingredientes previamente utilizados e geralmente reconhecidos como inócuos (GRAS). Deve aplicar-se não só a alimentos provenientes de modificações genéticas mas também aos que no contexto da legislação europeia são considerados novos alimentos (Regulamento 258/97 de 27 de Janeiro), bastando para isso que não tivessem sido utilizados como alimento em nenhum dos Estados-membros.

¹ Método de estimativa da inocuidade de novos alimentos e ingredientes alimentares, CNQ, documento CV-06/N38, Instituto Português da Qualidade, (1996).

Determinadas correntes de opinião têm vindo a apontar riscos de utilização de alimentos transgénicos, sendo os principais a transferência por parte do novo alimento ou ingrediente de características genéticas de resistência a antibióticos e a microrganismos patogénicos do tracto intestinal e as reacções alérgicas que venham a surgir ao novo alimento ou ingrediente.

Quanto às primeiras é importante que se diga que a característica de resistência a antibióticos que pode ser utilizada na intervenção laboratorial de modificação genética, não é transferida acompanhada de um mecanismo promotor, ao contrário do que acontece à característica cuja expressão é desejada e que constitui razão de ser da transformação genética. A transferência de material genético do alimento ou ingrediente modificado, entretanto provavelmente processado e/ou utilizado num primeiro estágio em alimentação animal, por forma a conferir resistência ao antibiótico aos microrganismos potencialmente patogénicos existentes no tracto intestinal é um acontecimento tão improvável que acerca da probabilidade da sua ocorrência se poderá dizer que é quase nula. Certamente, várias ordens de grandeza inferior à probabilidade de intoxicação alimentar mortal por ingestão de uma conserva.

Quanto às segundas é necessário ter consciência de que quando aquilo que se pretende ver expressado no novo genoma é a produção de uma proteína, se averigua inicialmente se esta proteína tem ou não uma história de reacções alérgicas, concluindo-se pela negativa antes de prosseguir.

Resta portanto e é real o risco da ocorrência de alterações poliméricas, que obriga ao despiste das modificações na gama de proteínas produzida pelo novo organismo, e a levar a cabo testes alergológicos. As grandes empresas responsáveis pelo desenvolvimento destes novos produtos têm demonstrado níveis de precaução extremamente elevados, testando exaustivamente as matérias-primas que desenvolvem.

O trabalho de investigação, desenvolvimento, demonstração e aplicação neste domínio tem sido predominantemente feito nos EUA, cujo organismo de controlo e fiscalização, a FDA (Food and Drug Administration), tem vindo a entender não dever pôr demasiados obstáculos ao progresso científico, o qual por sua vez apaixona a opinião pública americana. O resultado, uma vez que a economia dos EUA contém uma larga componente de exportação de matérias-primas e transformados para alimentação está à vista: a Europa multiplica-se em esforços de despiste de alterações genéticas em alimentos - para acorrer a tarefas que a FDA classificou de desnecessárias - e limita a utilização de sementes geneticamente modificadas, introduzindo uma assimetria nas vantagens concorrenciais. As limitações graves de eficácia dos sistemas de controlo, no entanto, não poderão deixar de levar ao reconhecimento eventual da inoperância das restrições actuais.

Introdução

Muitos dos produtos alimentares do nosso quotidiano devem as suas características à actividade de microrganismos.

Vários desses produtos têm uma origem que se perde no tempo e correspondem a uma forma tradicional de prolongar a vida útil dos alimentos. A produção de vinho, por exemplo, é tão antiga, que os gregos acreditavam que o vinho tinha sido inventado pelo Deus Diónisos. Os chineses, por seu turno, têm registos de 2300 AC sobre o fabrico de vinho de arroz. Os povos balcânicos consomem leites fermentados desde tempos imemoriais.

Além de serem mais duráveis, todos os alimentos fermentados adquirem características organolépticas que resultam directa ou indirectamente da actividade de microrganismos fermentativos, os quais, agindo sobre a matéria-prima alimentar, lhe alteram o conteúdo vitamínico, o perfil em aminoácidos, a cor, a textura, o sabor.

Certo é que, apesar do uso de alimentos fermentados se perder na noite dos tempos, o papel dos microrganismos na sua produção só começou a ser reconhecido em época recente.

Por volta dos anos 50 do século XIX, Pasteur foi abordado por produtores de vinhos franceses com problemas de alteração dos vinhos.

Ao comparar ao microscópio amostras de vinho bom com vinho deteriorado, Pasteur descobriu a existência de microrganismos de várias espécies. Certos tipos predominavam nos vinhos de qualidade, enquanto que outros eram muito mais numerosos nos vinhos de baixa

qualidade. Pasteur foi levado a concluir que uma selecção apropriada de microrganismos poderia assegurar a produção de vinhos de qualidade consistentemente elevada.

a indústria da fermentação e o sector agro-alimentar

7

Para o conseguir, destruiu os microrganismos presentes no mosto das uvas aquecendo-o entre 50 e 60°C e, após arrefecimento, reinoculou o mosto com vinho de alta qualidade, que continha naturalmente os micróbios desejáveis. Desta forma, Pasteur chegou a uma série de conclusões fundamentais, nomeadamente:

a) Confirmou resultados anteriores, seus e de outros autores, verificando que as fermentações eram da responsabilidade de microrganismos;

b) Concluiu que havia microrganismos "bons", isto é, desejáveis, produtores de alimentos fermentados de boa qualidade, e microrganismos "maus" que interferiam com as fermentações e deterioravam os alimentos;

c) Demonstrou que era possível controlar, através da temperatura, a infestação por microrganismos deterioradores. Daqui nasceu a pasteurização, operação hoje em dia largamente difundida no sector agro-alimentar.

Mais tarde, Pasteur alargou os seus estudos à cerveja e, em 1857, publicou um trabalho demonstrando que o leite azeda por acção de certos microrganismos.

Estavam assim lançadas as bases para o estudo científico das fermentações. Gerações de microbiologistas passaram a dedicar-se ao estudo da ecologia microbiana dos alimentos e bebidas fermentadas, havendo actualmente milhares de publicações científicas tratando da microbiologia dos queijos, da choucrute, do vinho, da cerveja, etc.

Sabe-se, hoje em dia, que as actividades dos microrganismos estão estreitamente relacionadas com as propriedades intrínsecas das matérias-primas, ou seja, as propriedades físico-químicas dos tecidos animais ou vegetais que as constituem - pH, humidade, potencial redox, perfil nutritivo, estrutura, entre outras. Por exemplo, não é possível desencadear uma fermentação por bactérias lácticas em sumo de laranja porque o pH do sumo corresponde a uma acidez muito superior à tolerável por bactérias lácticas.

Por outro lado, o Homem aprendeu a controlar as propriedades extrínsecas do meio da fermentação - temperatura, salinidade, pressão osmótica, entre outras - que permitem orientar a fermentação seleccionando os microrganismos dominantes a partir de uma população microbiana inicial muito heterogénea.

Como definir fermentação?

Doelle (em "Bacterial Metabolism", Academic Press, NY, 1975) define-a como sendo

"um processo pelo qual um substrato orgânico sofre modificações físico-químicas por acção de enzimas elaboradas no decurso do mesmo por microrganismos".

Esta definição sevirá de ponto de partida para o que se explanará a seguir.

A fermentação não é importante apenas para a produção directa de alimentos. De facto, a partir dos anos 60 do século XX, constatou-se um progressivo aumento do uso de aditivos de processamento alimentar obtidos por fermentação.

As enzimas, na sua maioria produzidas por fermentação, estão a assumir uma tão grande importância nas indústrias agro-alimentares, que merecerão um tratamento especial no próximo capítulo.

Produção de laticínios fermentados

Existe uma grande variedade de laticínios fermentados largamente utilizados na alimentação humana desde os tempos mais remotos (ver **QUADRO 1**).

QUADRO 1: Laticínios Fermentados

Nome	Microorganismos	Observações
Leite azedo	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Consumo nos países balcânicos
Leitelho	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Consumido em muitos países
Kefir	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Candida kefir</i>	Consumido no Sudoeste asiático
Kumiss	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. leichmannii</i> , <i>Candida spp.</i>	Produzido com leite de égua; consumido principalmente na Rússia
Queijo	várias culturas lácticas; por vezes fungos filamentosos	Consumo universal
Iogurte	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Consumo universal
Análogo de iogurte	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifementans</i>	Consumo universal

O processo de produção dos leites fermentados inicia-se pela adição ao leite de um inóculo, em geral de bactérias lácticas, também denominado cultura de arranque ("starter culture" em inglês), a leite pasteurizado. Os inóculos eram antigamente formados por uma pequena fracção do leite já fermentado, o que ainda se pratica em fabricos artesanais. Segue-se um período de incubação a temperatura controlada, verificando-se uma série de fenómenos que vão conferir ao produto final as suas características organolépticas: o pH baixa por aparecimento de ácido láctico; a caseína coagula e forma-se um gel ácido; a lactose é quase toda consumida e o que resta é desdobrado em glucose e galactose; aumenta o teor em

vitaminas e aminoácidos livres; aparecem substâncias com sabores e aromas característicos, tal como o diacetilo, com sabor amanteigado.

Há cerca de 15 anos começou a ser comercializado e teve uma expansão fulgurante um leite fermentado fabricado por um inóculo, constituído por *Lacidophilus* e *Bifidobacterium bifementans*, obtendo-se um produto com o aspecto do iogurte.

A diferença fundamental entre a produção de queijo e a produção de leites fermentados encontra-se no tipo de gelificação obtida.

Se tivermos em conta que o leite possui uma estrutura em micelas, no caso dos leites fermentados a fer-

mentação láctica prolongada faz desaparecer essa estrutura. As micelas desagregam-se e as partículas de caseína ficam dispersas e desmineralizadas. O gel assim obtido retém muita água e a sua aptidão aos tratamentos físicos é baixa.

Já no caso dos queijos, quaisquer que sejam as suas características, existe sempre uma percentagem maior ou menor de gel de coalho, obtido não por coagulação ácida, mas por coagulação enzimática da caseína. O preparado enzimático pode ter várias origens - animal (quimosina), vegetal (flor do cardo, folhas de alcachofra ou de figueira), microbiana (renina de *Mucor miehei*).

As enzimas agem sobre as micelas de caseína, rompendo algumas das ligações e permitindo que as partículas de caseína desagregadas se liguem entre si por meio de pontes de fosfato de cálcio. A malha assim obtida constitui o gel de coalho. É uma malha muito mineralizada, com muito cálcio, e as ligações estabelecidas entre as partículas de caseína conferem a esta malha uma grande resistência, permitindo a utilização de tratamentos mecânicos e térmicos, que facilitam a remoção da água.

A produção de queijo atravessa as seguintes fases:

a) Obtenção da coalhada. A coalhada é uma mistura de gel de coalho e de gel ácido. O leite sofre simultaneamente dois tipos de coagulação. Por um lado, dá-se uma coagulação ácida por acção de bactérias lácticas. Estas podem ser originárias da própria flora do leite em natureza, ou provir de culturas de arranque seleccionadas. O preparado enzimático vai coalhar o leite por ruptura parcial das micelas e posterior agregação das mesmas, dando origem a gel de coalho.

As características da pasta obtida - mole, semi-mole ou dura, vão depender sobretudo da proporção gel de coalho/gel láctico obtida. Esta proporção pode ser controlada de diversas formas - quantidade e tipo de enzimas, tempo de maturação do leite antes da adição de enzimas, operações físicas posteriores.

b) As operações físicas constituem a 2ª fase de produção. A sua maior ou menor intensidade e duração também vão influenciar a dureza final da pasta na medida em que, ao removerem mais depressa a água, podem parar a desmineralização do gel, melhorando a sua resistência. Incluem-se nestas operações a lavagem dos grãos da coalhada seguida de salga, a salga simples, o corte, a prensagem, o cozimento, entre outras. Nesta fase faz-se a moldagem e, no caso dos queijos de pasta manchada, procede-se também à inoculação com fungos filamentosos.

c) A fase final da produção de queijo é constituída pela afinação, maturação, ou cura. Os queijos, já moldados, são incubados em câmaras de temperatura controlada, de forma a proporcionarem à flora microbiana neles existente as condições de transformação lenta que darão origem ao produto acabado. Os microrganismos actuam lentamente, ao longo de várias semanas, durante as quais a lactose residual é fermentada, as gorduras e as proteínas são parcialmente hidrolisadas e são libertados os aromas característicos.

O produto final, ou seja, o queijo para consumo, vai depender de um vasto conjunto de factores: tipo de leite utilizado (vaca, ovelha, cabra, búfala, iaque, camela, misturas diversas), tipo de "starter" láctico, tipo e concentração do preparado enzimático (as micelas de caseína são cortadas de maneira diferente pelas diferentes enzimas e dão origem a resíduos peptídicos que, na maturação dão sabores diferentes), tipo e intensidade das diversas operações físicas, inoculação ou não com fungos, duração e natureza da afinação. Esta é a razão pela qual existem no mundo milhares de variedades de queijos.

Produção de alimentos fermentados de origem vegetal

Os vegetais fermentados mais difundidos são a "choucroute", os "pickles" e as azeitonas (ver **QUADRO 2**). No essencial a fermentação é muito semelhante para todos os casos, requerendo no entanto operações de preparação e acabamento diferentes.

Destacam-se 4 etapas:

a) **Iniciação.** Trata-se de criar condições extrínsecas que proporcionem o aparecimento de uma flora láctica dominante. Estas condições são essencialmente a elevada salinidade - qualquer uma das fermentações vegetais ocorre na presença de um teor de sal da ordem dos 25g/Kg de matéria-prima. Suportam estas condições algumas leveduras e bactérias halotolerantes não nocivas.

b) **Fermentação primária.** Nesta etapa predominam as bactérias lácticas e as leveduras. Como a acidez ainda não é muito elevada, encontram-se nesta fase bactérias dos géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

c) **Fermentação secundária.** As bactérias lácticas mais sensíveis à acidez - *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* - desaparecem. Dominam os lactobacilos ácido-resistentes - *L. plantarum* é o mais vulgar - e as leveduras fermentativas, que se encarregam de fermentar os açúcares residuais libertando álcoois que conferem sabor.

d) **Pós-fermentação.** É uma fase que pode ocorrer quando fungos filamentosos ácido-resistentes e leveduras oxidativas crescem na superfície das tinas de fermentação.

QUADRO 2: Vegetais Fermentados

Nome	Microorganismos	Observações
Azeitonas	<i>Lactobacillus mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Consumo universal
Choucroute	<i>Lactobacillus mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Consumo muito difundido na Europa
Molho de soja	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i> , <i>L. delbrueckii</i>	Consumo universal
Pickles	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Consumo universal
Tempé	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Queijo de soja, muito difundido no Sudoeste Asiático

Na categoria dos produtos vegetais fermentados encontramos também os vegetais orientais fermentados, nos quais intervêm microrganismos completamente diferentes.

Referir-nos-emos, a título de exemplo, a 2 dos produtos de maior consumo: o **tempé** e o **molho de soja**.

O **tempé** - também conhecido por queijo de soja - tem como matéria-prima os grãos de soja. Estes são primeiramente demolhados, descascados e as sementes são divididas ao meio. Seguidamente fervem-se por 20 minutos, escorrem-se e espalham-se por tabuleiros onde são inoculados com o fungo filamentoso *Rhizopus oligosporus*. Esta mistura é depois acondicionada em embalagens arejadas diversas, que vão desde sacos de plástico perfurados até folhas de bananeira.

As embalagens são em seguida incubadas a 32°C durante um dia de forma a haver uma boa multiplicação do fungo sem que haja esporulação. Após este prazo o tempé apresenta-se com um aspecto e consistência semelhantes às do queijo fresco.

Outro produto oriental de grande consumo é o **molho de soja**. O seu fabrico envolve 2 etapas. Primeiro, uma matéria-prima rica em amido - farelo de trigo, grãos de soja, arroz - é autoclavada e humedecida. A seguir o material é inoculado com o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, e incubado cerca de 3 dias a 25-30°C. É a produção de **koji**. As várias enzimas provenientes do koji vão decompor farinhas de várias origens - trigo, soja, arroz - libertando largas quantidades de açúcares fermentescíveis, péptidos, aminoácidos e ácidos gordos. Para seleccionar a flora conveniente, a qual é predominantemente

láctica, coloca-se esta massa semi-fermentada em salmoura (cerca de 20% de sal) onde permanece entre 3 meses e 1 ano. A sucessão de microrganismos é grande. Numa primeira fase dominam *L.delbrueckii*, que acidifica o meio com ácido láctico, e *Bacillus subtilis*, que degrada proteínas. Seguidamente *Pediococcus halophilus* aumenta a acidez do meio cedendo o lugar a leveduras halotolerantes, *Hansenula spp.* e *Saccharomyces rouxii*, que produzem álcoois superiores a partir de aminoácidos. É comum a presença da bactéria *Corynebacterium glutamicum*. Actualmente, o molho de soja é um produto conhecido e utilizado em toda a parte.

Produtos Carneos e de Pescado Fermentados

Os mais importantes produtos de carne fermentados são os enchidos, sendo sem dúvida os mais conhecidos os famosos **salames**, de origem italiana. Há também as salsichas fermentadas semi-secas, de consumo mais restrito a nível mundial (ver **QUADRO 3**).

QUADRO 3: Carne e Pescado Fermentados

Nome	Microorganismos	Observações
Presuntos curados	<i>Aspergillus, Penicillium spp.</i>	Sul dos EUA
Salames, salsichas fermentadas	Várias bactérias lácticas	Difundidos mundialmente
Peixe curado "maatjes"	Bactérias lácticas, enzimas endógenos	Holanda, Norte da Europa
Anchovas	Flora láctica dominante, leveduras halotolerantes	Difusão mundial
Molhos de peixe	Flora láctica e leveduras	Sudeste asiático

Inicia-se a manufactura dos salames misturando a carne moída, os sais de cura (nitrito ou nitrato e sal), especiarias e uma pequena quantidade de açúcar para induzir o arranque mais rápido da flora láctica. A mistura é colocada em tachos, em câmaras refrigeradas (3-4°C), durante 2-3 dias, ao longo dos quais se desenvolve a flora láctica. Após se ter procedido ao ensacamento em tripa, os salames são armazenados a 20°C em ambiente húmido (75-80% de HR) durante uma semana.

Passa-se em seguida à defumação se se quiserem obter variedades fumadas (30°C). Caso contrário, passa-se directamente à cura em câmara fria (7-13°C e 70%HR) onde existe uma permanente renovação do ar, perdendo o salame 20-40% de humidade ao longo de cerca de 3 meses. A flora láctica desempenha no proces-

so um papel fundamental: liberta ácido láctico baixando o pH, desenvolve sabores, liberta bacteriocinas inibidoras de outras bactérias, reduz o nitrato a nitrito.

Como produtos de pescado fermentados salientaremos os **maatjes** e produtos similares utilizados na Holanda e no Norte da Europa, as **anchovas**, muito apreciadas e difundidas internacionalmente, e o molho de peixe oriental, o **nuoc-mam**.

O **nuoc-mam** é um molho de peixe muito popular no Sudeste Asiático. Os peixes não eviscerados são misturados com sal na proporção de 3:1, respectivamente, e deixados a fermentar dentro de tinas fechadas pelo menos durante 6 meses. As enzimas do tracto digestivo dos peixes provocam a liquefacção de praticamente todo o material sólido. O líquido obtido atravessa uma

sucessão de etapas fermentativas da responsabilidade sobretudo de espécies de *Bacillus* e de bactérias lácticas do género *Micrococcus*. Após 6 meses o líquido é recolhido e filtrado, deixando-o a maturar durante mais 3 meses.

A produção de **anchovas** pouco se afasta da produção de molhos de peixe. As condições são no entanto modificadas de forma a favorecerem a multiplicação láctica e a impedirem a completa liquefacção do pescado.

Assim, ao sal adiciona-se salitre, açúcar (para induzir a fermentação láctica) e especiarias. As anchovas, lavadas, mas não escamadas nem evisceradas, são dispostas dentro de recipientes às camadas alternadas com a mistura salina (200g/Kg de pescado). A fermentação láctica dura 60 dias, sendo interrompida antes de se dar a liquefacção dos tecidos. Passa-se por fim a uma série de operações de acabamento.

No fabrico dos **maatjes**, que são semi-conservas de arenque em salmoura, é sobretudo importante a contribuição dos enzimas pancreáticos conseguida através de um esmagamento desse órgão quando se processa a evisceração do arenque jovem na altura da primavera.

Produção de Pão

O pão é provavelmente o primeiro e mais antigo alimento fermentado. Desde a antiguidade que se reconhecia a importância dos grãos de cereais e nozes na alimentação, e a indispensabilidade das operações de moagem, adição de água e tratamento térmico para melhorar a sua digestibilidade. A intervenção de fermentos, embo-

ra não identificados com microrganismos, data também da antiguidade, e foram isoladas estirpes de leveduras a partir de achados arqueológicos egípcios. Na civilização egípcia, o uso do trigo era considerado um privilégio de algumas classes apenas, e outros cereais eram utilizados, moidos, amassados com água e secos ao sol ou em fornos.

A estabilidade da superestrutura alveolar do pão, conseguida com uma relação massa/volume diminuta, é consequência da natureza especial de determinadas proteínas denominadas gluteninas cuja concentração e qualidade é máxima no trigo, mas o crescimento das cavidades internas é consequência das actividades metabólicas de leveduras *Sacharomyces* que, dispersas durante a amasagem, consomem amido contribuindo para a sua dextrinização e vão deixando que se acumulem produtos finais do seu metabolismo

Quando se dá a sua morte térmica durante o cozimento, o gás carbónico e o etanol formados expandem, conferindo a estrutura alveolar referida. Por outro lado as α -amilases das leveduras continuam a dextrinizar o amido, adoçando a massa e permitindo formação da característica crosta do pão.

Produção de Bebidas Fermentadas

A maior parte das bebidas fermentadas é sujeita à acção preponderante de leveduras do tipo *Sacharomyces*, sendo o produto básico da fermentação o álcool.

No entanto há casos em que é uma bactéria - *Zymomonas mobilis* - o microrganismo responsável pela fermentação alcoólica (ver **QUADRO 4**).

QUADRO 4: Bebidas Fermentadas

Nome	Matéria-prima	Microorganismos	Observações
Araque	Arroz	Bactérias e leveduras	Extremo Oriente
Cerveja	Malte de cevada e outros cererais	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Difusão mundial
Chicara	Milho mastigado	Leveduras	Consumo localizado (América do Sul)
Cidra	Maçãs, mistura de maçãs e peras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Europa e América do Norte
Ginger-beer	Solução de açúcar e especiarias (gengibre, etc.)	<i>Saccharomyces pyriformis</i> , <i>Lactobacillus vermiformis</i>	Muito apreciada em Inglaterra
Hidromel	Mel	<i>Saccharomyces rouxii</i>	Difusão reduzida
Kuva	Feijão germinado	Leveduras	América do Sul
Mescal	Suco de Cacto (<i>Pachycerius spp.</i>)	Leveduras	América Central
Pombe	Milho germinado	Leveduras	África
Pulque	Suco de agave (<i>Agave americana</i>)	Leveduras, <i>Zymomonas mobilis</i>	América Central
Saké	Arroz	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces sake</i>	Japão
Vinagre	Vinho, cidra, etc.	<i>Acetobacter spp.</i>	Difusão mundial
Vinho comum	Sumo de uva	Leveduras, <i>Leuconostoc oenos</i>	Difusão mundial
Vinho de palma	Leite de coco*	<i>Acetobacter spp.</i> , Bactérias lácticas, Leveduras	Vários países africanos, Equador

* também se usam as inflorescências das palmas do coqueiro (*Cocos nucifera*).

Saliente-se ainda que não é raro verificarem-se fermentações lácticas secundárias que podem melhorar o sabor do produto final, como, por exemplo, se verifica com a fermentação malo-láctica dos vinhos.

Na produção de bebidas fermentadas, há fundamentalmente dois casos a considerar:

i) a matéria-prima é rica em açúcares fermentescíveis (uvas, maçãs e mel). Neste caso, podem ser imediatamente utilizadas leveduras de fermentação alcoólica, obtendo-se os conhecidos produtos **vinho**, **cidra** e **hidromel**;

ii) a matéria-prima é rica em produtos amiláceos - caso dos cereais e das leguminosas - sendo então neces-

sário fazer intervir previamente um processo de transformação enzimática do amido em açúcares - etapa de sacarificação - só podendo proceder-se à fermentação alcoólica numa fase posterior. É o que se passa com a **cerveja** e o **saké**, ou com outros produtos mais tradicionais e de consumo mais localizado, como a **chicara** sul-americana. Na chicara o processo de sacarificação é no mínimo curioso: são as enzimas diastásicas da saliva que sacarificam o amido dos grãos de milho ao serem lentamente mastigados pelas anciãs das tribos índias.

A grande vantagem da cerveja e do saké sobre os vinhos de frutos (uvas, maçãs, peras ou produtos regionais tais como os vinhos de maracujá, de pêssego, ou de bagas silvestres), é a possibilidade de uma produção insensível à sazonalidade pela longa duração das matérias-primas amiláceas. Isso permite um aprovisionamento constante, por um lado, e uma produção permanente, por outro, o que não só reduz os "stocks", como amortiza mais rapidamente os equipamentos.

Na cerveja, a origem do preparado enzimático de sacarificação é o malte. O malte é uma matéria-prima resultante da germinação de um cereal, em geral cevada dística. Na fase de germinação é controlada a temperatura e a humidade, de forma a garantir a obtenção de um grão germinado com o máximo possível de enzimas. Sabe-se que esse máximo se atinge quando as radículas atingem 2/3 a 3/4 do comprimento total dos grãos. Nesse momento, a germinação é paralisada por secagem.

A temperatura de secagem irá influenciar a cor e o corpo da cerveja, pois, se for elevada, favorece, por um lado, reacções de escurecimento, e, por outro, inactiva

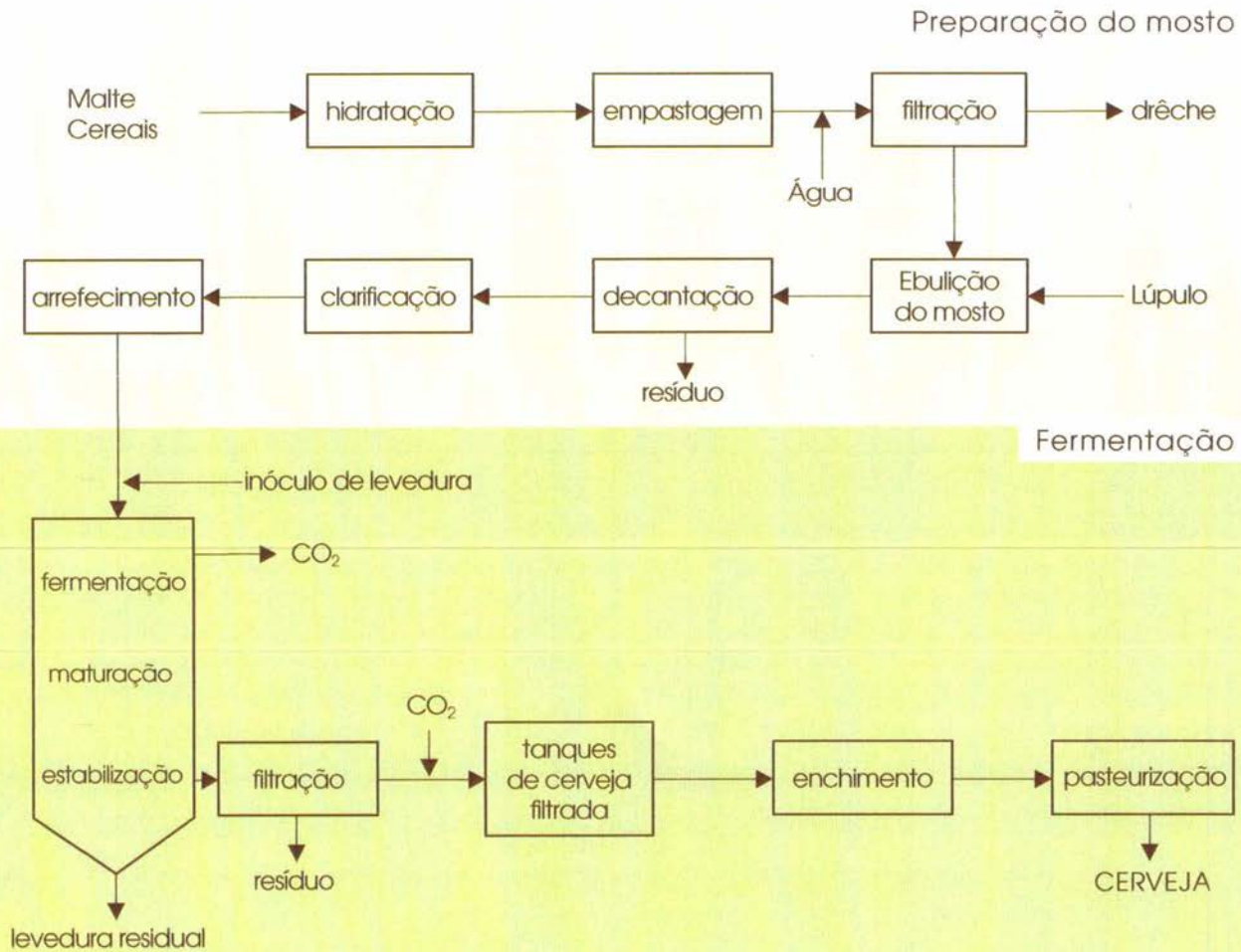
certas enzimas em favor de outras mais resistentes. Após a secagem, o malte é limpo das radículas por crivagem e pode ser conservado para aplicação posterior.

Note-se que em África é corrente o consumo de cerveja de milho, o qual é germinado segundo um processo muito semelhante ao descrito para o malte. Os grãos de malte começam por ser moidos. Adiciona-se-lhes em seguida água e complementos amiláceos de várias origens, que podem ir desde sêmeas de arroz a sêmeas de trigo, a milho. Aumenta-se a temperatura para promover a gelificação do amido e facilitar a conversão do amido em açúcar - a sacarificação - pelas enzimas do malte. Após a sacarificação do amido, o mosto obtido é fervido com lúpulo a 100°C e sofre uma série de operações de limpeza e clarificação, até que, após arrefecimento até cerca de 10°C, é inoculado com leveduras seleccionadas, em geral variedades de *Saccharomyces carlsbergensis*. A fermentação dura cerca de 1 semana.

Passa-se então para uma etapa de maturação da cerveja, durante a qual vários aromas potencialmente desagradáveis são absorvidos pelas leveduras em repouso a baixa temperatura. Esta operação dura de 3 semanas até vários meses. Seguem-se as operações de acabamento (filtração, pasteurização, carbonatação, embalagem, etc.) (ver **FIGURA 1**).

O caso do saké é muito semelhante. A fonte de enzimas é o koji, que, neste caso, é preparado sobre arroz autoclavado. O koji obtido é adicionado a um caldo de arroz que, após sacarificação, é fermentado pela levedura *Saccharomyces sake*, altamente tolerante a elevados teores alcoólicos, o que permite obter uma

FIGURA 1 Esquema do fabrico da cerveja



bebida fortemente alcoolizada (12-15°GL) ao fim de cerca de um mês de fermentação.

Antes de dar por encerrado o tema dos alimentos fermentados, convém salientar que em produtos de uso tão comum como o chá, o café e o cacau, intervêm fermentações como etapas essenciais do seu processamento.

Introdução

A intervenção da biotecnologia tradicional na preparação de alimentos era exclusivamente no domínio do processo, e isto no tocante aos diversos produtos fermentados consumidos por esse mundo fora. A noção de aditivo provém da de ingrediente, da qual se distingue provavelmente apenas por argumentos de quantidade ou concentração, e ambas têm a sua raiz no desejo de tornar apropriáveis determinados processos cuja componente tecnológica caíra no domínio comum.

Produção de aditivos alimentares CORANTES

Num primeiro grupo de corantes, pode salientar-se a importância crescente das fontes naturais de carotenóides. Destas, a que tendencialmente apresentará mais importância será sem dúvida o licopeno, por enquanto obtido a partir de tomate e em especial de variedades com elevado teor em licopeno e provenientes tanto de selecção como de manipulação genética. Dentre as alternativas biotecnológicas aos actuais corantes de síntese, deve-se salientar o β -caroteno obtido a partir de estirpes da microalga *Dunaliella salina*, produzida quer em bioreactores a céu aberto baseados no facto de que aos valores elevados de salinidade a que se opera há poucos predadores, ou em bioreactores de ambiente totalmente controlado. Como corante mas também provitamina A, é este o carotenóide sem dúvida mais importante. Também se podem obter por processos biotecnológicos a cantaxantina e a astaxantina e seus ésteres, por exemplo utilizando estirpes da microalga *Chlorella* ou mais habitual-

mente *Haematococcus*. Outra alternativa é a utilização da biomassa obtida de quantidades industriais de esqueletos

a biotecnologia na produção de aditivos e em processo

externos de marisco, fazendo a sua extracção e purificação. Estes carotenóides, quer os de origem sintética quer os outros, são utilizados em aquacultura como corantes (camarão, truta salmonada, salmão) uma vez que quando produzidos em cativeiro não há outros aditivos naturais conducentes à cor final correcta (ver QUADRO 5) dos peixes.

Um outro corante vermelho, mas hidrossolúvel, é o ácido carmínico, principal componente da conchinilha, extracto obtido de culturas de *Dactylopius coccus* Costa. Grande parte dos corantes hidrossolúveis, não sintéticos, de tons carregados, são antocianinas que, tal como o extracto de baga de sabugueiro (*Sambucus sambucus*), são utilizados para corar sumos, geleias e compotas. Os corantes amarelos são geralmente de síntese, excepção feita de alguns carotenóides como a luteína/zeaxantina tão instrumentais na coloração da gema de ovo, e de que existem versões dispersáveis em fase aquosa, e ainda extractos de folhas de *Carthamus tinctorius* L., o também denominado açafraão mexicano, de fraco sabor. Colorações azuis não são conotadas com alimentos, mas sim com fármacos ou mesmo com produtos tóxicos, na Europa. Podem no entanto ser úteis na composição de cor verde, em conjunto com amarelos. Para além das antocianinas há que citar a ficocianina, uma proteína de

QUADRO 5 Exemplos de aditivos alimentares obtidos por fermentação

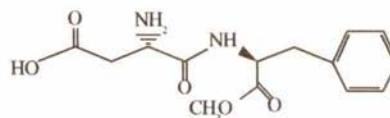
Nome	Microorganismos	Observações
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Também se extrai de resíduos de citrinos
Ácido láctico	<i>L. delbrueckii</i>	Também utilizado na produção de plásticos
Ácido acético	<i>Acetobacter aceti</i>	Também obtido artesanalmente com <i>A. xylinans</i>
Ácido glutâmico (aminoácido)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	É o saborizante mais utilizado no mundo
L-lisina (aminoácido)	<i>Brevibacterium flavum</i>	Aditivo de rações animais
L-triptofano (aminoácido)	<i>B. flavum</i>	Aditivo de rações
Riboflavina	<i>Ashbya gossypit</i>	Vitamina B2
L-sorbose	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Precursor de Vitamina C
Cianocobalamina	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Vitamina B12
Carotenos	<i>Blakeslea Trispora, Dunaliella salina</i>	Precursor de Vitamina A, corante
Astaxantina	<i>Phaffia rhodozyma, Haematococcus dp.</i>	Corante

cor azul intensa que quando pura apresenta fluorescência rósea, e é proveniente de cianobactérias tais como *Spirulina* ou *Nostoc*. O seu uso tem sido mais intenso no Japão.

EDULCORANTES

Também os edulcorantes podem ter origem ou conotação biotecnológica. Assim o mais popular edulcorante de fraco poder calórico, o aspartame (ver FIGURA 2), foi descoberto por acaso por um químico que levou a mão suja à boca, uma atitude habitualmente pouco recomendável que neste caso terá valido milhões. O aspartame - éster metílico da L-aspartil-L-fenilalanina - é cerca de 180 vezes mais doce do que o açúcar e de igual valor calórico e pode ser produzido por catálise enzimática, utilizando uma protease estável a alta temperatura.

FIGURA 2 Fórmula química do aspartame



ÁCIDOS ORGÂNICOS

O ácido cítrico é provavelmente o mais multifacetado dos ácidos orgânicos, pois actua quer como acidificante quer como quelante, o que significa que não só reduz o número de microrganismos viáveis por efeito de abaixamento do pH e da diminuição da actividade de iões de metais de transição que lhes sejam eventualmente necessários como também atrasa as reacções químicas destes iões metálicos nomeadamente as de iniciação de

processos de oxidação de lipídios. Conservante por acidificação e sinergista antioxidante, o ácido cítrico pode ser obtido por síntese ou extraído de citrinos, por exemplo, mas habitualmente é produzido biotecnologicamente por culturas de *Aspergillus niger*.

O meio de cultura típico das fermentações líquidas, mais comuns nos países ocidentais, tem como base o melão diluído, desmineralizado (os metais pesados mesmo em traços baixam muito o rendimento) e complementado. Este meio é inoculado com esporos de *Aspergillus niger*. Quando se usam as fermentações semi-sólidas, mais comuns no Extremo Oriente, usa-se farelo de trigo complementado com nutrientes.

A fermentação dura 4-5 dias a 30°C, mantendo-se o pH a 5,5. O rendimento é bastante elevado, pois cerca de 80% dos açúcares são transformados em ácido cítrico. Este é extraído do caldo de cultura através de uma série de etapas que culminam com a obtenção de cristais puros do ácido. Também se pode obter a partir de culturas de *Candida guilliermondii* ou de *Candida lipolytica*.

De forma semelhante, embora com outros microrganismos intervenientes, se obtêm outros ácidos orgânicos. Assim, o ácido acético produz-se com o auxílio da bactéria *Acetobacter acetii*, o ácido láctico com *Lactobacillus delbrueckii*, o fumárico com o fungo *Rhizopus delemar* e o málico com o fungo *Aspergillus flavus*.

HIDROCOLOIDES

A aplicação de conhecimentos biotecnológicos é de grande importância na produção de hidrocolóides. O agar – agente espessante, gelificante estabilizante e tex-

turizante – produzido, por simples processos de recolha e purificação, a partir da macroalga *Rhodophyceae* constitui um excelente exemplo. Também os carragenanos são obtidos de outras algas vermelhas, e utilizados na indústria alimentar em função das suas propriedades específicas, como agentes texturizantes e espessantes em queijo, farinhas e produtos de pastelaria, compotas e geleias, e ainda em goma de mascar.

AGENTES EMULSIONANTES

Um exemplo final de utilização de conhecimentos de biotecnologia na produção de ingredientes alimentares é a síntese enzimática de β -monoésteres de glicerol e ácidos gordos, tão úteis como agentes emulsionantes. A utilização de uma lipase específica 1,3 actuando em solvente alcoólico sobre um óleo, permite obter o β -acilglicerol separando-o dos ácidos gordos lisados a partir das posições 1 e 3. O produto pode ser utilizado como tal (terá, por exemplo se se partir de óleo de peixe, resultado um enriquecimento forte em ácido gordo w3 que estava predominantemente ligado no óleo naquela posição) ou como matéria prima para esterificação enzimática com lipase(s) de especificidade bem definida na produção de triacilgliceróis de composição determinada.

Enzimas no Processo Produtivo de Alimentos e Aditivos

A indústria alimentar já utiliza enzimas há mais de sessenta anos. O advento de uma cada vez maior variedade de enzimas a preços que se vão tornando cada vez mais competitivos à medida que aumenta o número de fornece-

dores e a gama de enzimas, a melhoria da actividade e especificidade das preparações disponíveis, a possibilidade de reutilização através de reactores de enzimas imobilizadas e o progresso tecnológico que resulta de trabalhos de investigação e desenvolvimento conjugam-se com a actividade legislativa e normalizativa para aumentar o leque de aplicações e de enzimas utilizáveis na indústria alimentar.

O desenvolvimento de aplicações de tecnologias enzimáticas na indústria alimentar, quer a nível de produção quer a nível de análise e controlo, é, pois, um domínio em rápida mutação (ver **FIGURA 3**). O texto deste capítulo consiste assim num conjunto de exemplos que têm ou tiveram aplicação prática, ou cuja aplicação se previa quando estas linha foram escritas.

As enzimas mais utilizadas na indústria alimentar são as hidrolases (E.C.3), seguindo-se lhes em importância embora a alguma distância as oxidoreductases (E.C.1), as isomerases (E.C.5) e finalmente as transferases (E.C.2). Neste trabalho, serão apresentados exemplos de aplicação de cada uma destas categorias de enzima, independentemente do domínio ou ramo específico da indústria alimentar mencionado.

A utilização de enzimas imobilizadas limita-se a alimentos e ingredientes líquidos, sendo a aplicação de enzimas em alimentos ou ingredientes sólidos normalmente feita assegurando-se que a enzima utilizada se pode separar eficientemente do alimento ou ingrediente após transformação, ou então que é inactivada no decurso dos acontecimentos que antecedem o consumo desse alimento ou ingrediente. Essa inactivação, embora não seja uma condição essencial, destina-se a minimizar as hipóte-

ses de intolerância ou reacção alérgica que a ingestão de qualquer proteína pode potencialmente causar em determinados consumidores, à semelhança com o que acontece, por exemplo, com a intolerância de algumas pessoas às gluteninas do trigo, ou a proteínas de determinadas leguminosas.

APLICAÇÃO DE HIDROLASES

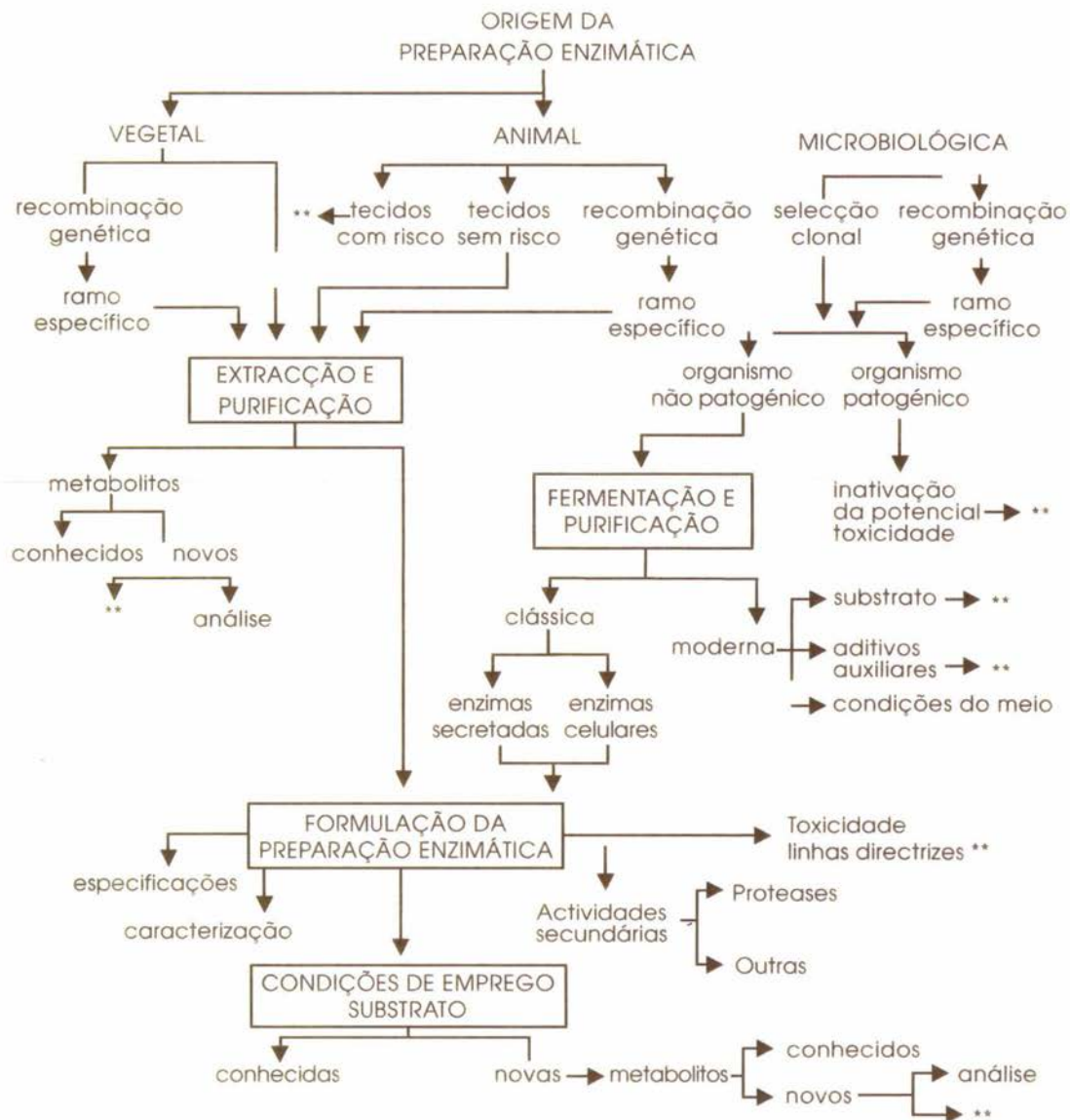
O uso de proteases na produção de concentrados peptídicos a partir de proteínas vegetais e na tenderização de carne, da papaina no fabrico de cerveja e de proteases vegetais na coagulação de leite e na afinção de queijos, vai de par com o uso de lipases na produção de gorduras isentas de ácidos gordos para margarinaria. As lipases podem também ser utilizadas na produção de substitutos de manteiga de cacau. Igualmente importante é o uso de amilases, hemicelulases, celulases, pectinases e outras enzimas capazes de hidrolisar oligo - e polissacáridos na produção de ingredientes alimentares capazes de utilização como espessantes ou bases funcionais e também na de misturas de açucars utilizáveis como edulcorantes de ponto de cristalização baixo e/ou hábito microcristalino, tão úteis para gelados e doces semi-frios.

APLICAÇÃO DE PROTEASES

A primeira patente mencionando a adição de uma enzima exógena não essencial ao processo na produção de um alimento data de 1911 e diz respeito à papaina que, adicionada à cerveja, diminui ou anula a turvação a frio.

A papaina é também utilizada como agente de textura para carne. Tal é efectuado injectando o extracto

FIGURA 3 Critérios para a avaliação de novas preparações enzimáticas



** necessidade de demonstrar a inocuidade

enzimático no animal pouco antes de proceder ao abate. Ao valor do pH do sangue as enzimas são inactivas e por via vascular são distribuídas pelos músculos. Quando o pH diminui devido à respiração anaeróbia que acompanha a transformação do músculo em carne e resulta na acumulação de lactato, as enzimas sofrem activação, o que lhes permite, mediante regime térmico apropriado, levar a cabo a proteólise durante a confecção antes de sofrer inactivação térmica. Apesar de indolor e não stressante, o processo de distribuição vascularizada tem como consequência acumulação de enzima no baço e fígado, impossibilitando a utilização destes órgãos que liquidificam por aquecimento.

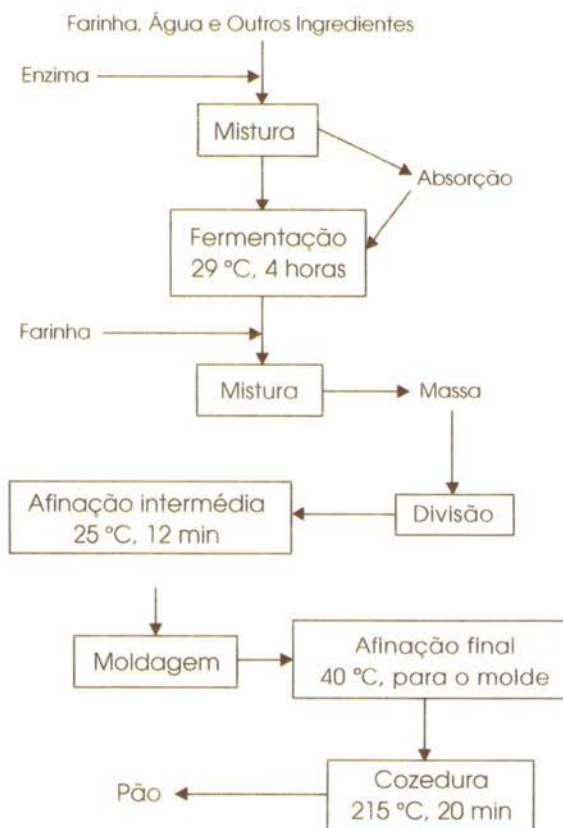
A bromelaína, enzima que se pode obter do ananás ou dos seus caules e folhas, tem actuação e utilização semelhante à da papaína mas é menos estável e a ficina, obtida de seiva de figo, e também semelhante à papaína, é utilizada na preparação de coalhos de leite em alguns países. A utilização de proteases na produção de coalho de leite para produção de queijo já foi abordada no capítulo anterior.

Outra aplicação é a utilização de preparações enzimáticas com actividade proteolítica de largo espectro para liquidificar isolados proteicos ou extrair péptidos de proteoglicanas, obtendo-se misturas de péptidos, tal como quando se hidrolisam proteínas com ácido. É necessário evitar os sabores amargos devidos à exposição de resíduos hidrofóbicos à superfície dos péptidos, mas a "proteína vegetal hidrolisada" pode não ter tanto sal como a que resulta da hidrólise de isolados com ácido clorídrico seguida de neutralização.

São também utilizadas proteases, tanto de fungos como bacterianas neutras, quer para controlo da força da

massa de panificação quer para melhorar o escurecimento da crosta e as propriedades que limitam o seu trabalho mecânico (ver [Figura 4](#)).

FIGURA 4 Processo de fabrico de pão



APLICAÇÃO DE LIPASES

Para além da afinação acelerada de queijo já mencionada, a utilidade das lipases no domínio da produção de alimentos ou ingredientes provém da catálise de reacções de interesterificação, alcoólise e transesterificação.

A utilização de lipases permite modificar as propriedades reológicas de óleos vegetais ou de peixes melhorando, por exemplo, as suas características como componente de uma margarina de barrar. Outra aplicação é a produção dos designados CBE - "cocoa butter equivalent"- ou CBS. A sua utilização na confecção de chocolates, como substituto até 5% da manteiga de cacau, é permitida em alguns países da UE.

Finalmente pode mencionar-se a obtenção de emulsionantes não iónicos tais como os mono, di- e tri-ésteres de sacarose e sorbitol, e os MDG se se utilizar glicerol como poliol.

Existem hoje em dia muitas preparações comerciais de lipases, geralmente obtidas a partir de fungos ou bactérias, com actividades específicas. Deve mencionar-se ainda a utilização habitual de fosfolipase pancreática A para a transformação de lecitina em liolecitina, outro emulsionante com propriedades distintas.

APLICAÇÃO DE GLICANASES

As glicanases constituem um conjunto largo de enzimas que actua hidrolisando oligo e polissacáridos. Em primeiro lugar poderão mencionar-se as endoglucanases utilizadas na liquefacção do amido (amilase do *B. licheniformis*) para obter a altas temperaturas dextrinas com valores de DE (dextrose equivalente, número de unidades de monosacárido)

de 8 a 15 que podem ser em seguida sacarificadas com glucoamilase por processos continuos cujo produto principal é glucose. Uma alternativa é a utilização de α -amilase de *Aspergillus oryzae* ou de β -amilase na obtenção de xaropes de malte a partir de amido. A pululanase e a isoamilase são utilizadas para lisar as ramificações nas cadeias de amido, potenciando o efeito das outras amilases e removendo as dextrinas limite. A utilização de amiloglucosidase para reduzir a quantidade de dextrinas na cerveja é habitual.

Em panificação e pastelaria também podem ser utilizadas as enzimas mencionadas no parágrafo anterior, sendo habitual suplementar-se em α -amilase as farinhas de trigo em função das necessidades da panificação a que serão submetidas, e com consequências favoráveis na duração do produto final, uma vez que aparentemente a sua utilização retarda a retrogradação, embora possa ter efeitos negativos sobre a consistência. A utilização de glucoamilase termoestável poderá vir a tornar-se mais comum, porquanto é capaz de continuar a reduzir o conteúdo de dextrinas mesmo quando a β -glucosidase já foi inactivada.

Uma aplicação curiosa e pontual da acção da invertase, que converte a sacarose numa mistura de glucose e frutose com valor edulcorante superior e ponto de fusão bem inferior, é na produção de bombons recheados, em que é daquela transformação enzimática que resultam os recheios pastosos de bombons cujo exterior é cristalino ou constituído por chocolate. A invertase adicionada à sacarose assegura a reacção de inversão que origina a consistência pastosa do recheio que não logra cristalizar.

Mas é na produção de bebidas que a utilização de glicanases encontra formas mais diversificadas. A adição de enzimas pectinolíticas a mostos brancos acelera a clarificação do vinho obtido, é indispensável em vinho tinto corrente obtido por termovinificação, e pode ter utilidade para “vintages”. Podem também ser adicionadas pectinases para melhorar a libertação dos princípios terpenicos presentes em vinhos de castas bem definidas. Na produção de cidra a intervenção de enzimas é da maior importância, conduzindo à clarificação do produto final (no processo apelidado de defecação). A produção de sumo de maçã para a indústria e para consumo depende por completo de processos enzimáticos. Torna-se necessária a utilização de poligalacturonase e de pectina metilesterase para obter o sumo clarificado, bem como na produção do concentrado comercializado internacionalmente. A utilização de celulase e hemicelulase em conjunto com as enzimas pectinolíticas na altura da maceração dos frutos traz vantagens importantes. A utilização de amilase e/ou amiloglicosidase é por vezes necessária. Durante a produção do sumo ocorrem também processos enzimáticos endógenos que conduzem à alteração de sabor e aroma e também ao escurecimento. Pode também mencionar-se a utilização de naringinase e em particular de uma ramnosidase obtida de *Penicillium* para adoçar sumo de laranja, convertendo a naringina em prunina e ramnose. A naringina é por sua vez convertida em naringenina e glucose pela β -glucosidase existente também nestes extractos.

Utilizações menos convencionais são a da inulinase que conduz à obtenção de frutose a partir do seu

polímero inulina proveniente de espécies cultivadas em diversos países como por exemplo as endívias, e ainda as das celulases e hemicelulases. Estas últimas enzimas têm vindo a ser cada vez mais utilizadas, em particular na confecção de alimentos para animais. De facto a sua utilização nas formulações permite usar uma maior quantidade dos β -glucanos naturalmente existentes nos cereais, permitindo a sua digestão pelos animais.

OXOREDUCTASES

A mais importante aplicação deste tipo de enzimas a produtos alimentares é certamente como antioxidante. Estão neste caso misturas de catalase e de glucose oxidase que funcionam como modificadoras da atmosfera em produtos alimentares. Uma aplicação semelhante é a da adição de glucose oxidase e de um pouco de glucose ao leite para assegurar a acção bacteriolítica da lactoperoxidase endógena, assegurando-se desse modo a extensão da conservação de leite destinado a queijaria. Do mesmo modo pode esta enzima, imobilizada em conjunto com β -galactosidase, servir para gerar em contínuo pequenas concentrações de peróxido de hidrogénio, conduzindo a uma efectiva pasteurização a frio.

A glucose oxidase pode também ser útil quando se torne indispensável assegurar a remoção de açúcares redutores como a glucose, para evitar o escurecimento de Maillard na produção de ovo em pó. A lipoxigenase é usada no branqueamento de farinhas, oxidando os lípidos e carotenóides presentes e intervindo em conjunto com a ascorbato oxidase na melhoria das qualidades mecânicas das massas de panificação, aumentando-lhes a fluidez.

ISOMERASES

A glucose isomerase imobilizada é utilizada nos Estados Unidos para tratar xaropes de glucose produzindo misturas frutose/glucose. Esta tecnologia repousa na obtenção de edulcorantes alimentares por hidrólise do amido, geralmente de milho, em alternativa à da utilização exclusiva da beterraba e cana sacarina. Transformar glucose em frutose tem uma primeira vantagem do ponto de vista edulcorante pois a segunda é mais doce que a primeira. A mistura final, que pode aproximar-se em composição da que se obtém por inversão da sacarose, corresponde entre outros aos requisitos de uma minimização da tendência de cristalização em concentração razoavelmente elevada e a baixa temperatura. Estes requisitos são ditados pela sua utilização na confecção de gelados, sorvetes e semi-frios, não podendo correr-se o risco de se formarem cristais às baixas temperaturas de processo. O volume de transformação anual de xaropes de glucose é de tal forma importante que esta aplicação singular confere às isomerases importância apreciável em tecnologia de alimentos.

TRANSFERASES

As aplicações das transferases em indústria alimentar estão ainda numa fase inicial, mas o crescimento deste tipo de aplicação será dos mais importantes, à medida que se tornam mais conhecidas e evidentes as subtis funcionalidades dos oligo- e polissacáridos. Caberá aqui mencionar apenas o isolamento e a possibilidade de aplicação de uma glicosil transferase termoestável do *Thermonaerobacter*, a qual pode ser utilizada na formação

de ciclodextrinas e é activa até aos 95°C, permitindo também a sua utilização em processos de liquidificação de amido a pH baixo, com assinaláveis vantagens do ponto de vista do processo. Um campo que está actualmente em franco desenvolvimento é a obtenção, por meio de transferases, de gluco-, fructo- e galactooligosacáridos com largas potencialidades de utilização na indústria alimentar.

Também se deve referir a utilização de fosfoquinase para obter a gelificação de caseínas e outras proteínas em presença de iões cálcio, e a de transaminase para obtenção de gel a partir de soluções proteicas.

Finalmente pode referir-se a utilização potencial de enzimas ramificantes sobre o amido.

O futuro: novas aplicações das biotecnologias às Indústrias Agro-Alimentares

Existe um enorme potencial a explorar a vários níveis, usando os novos horizontes abertos pela Biotecnologia, combinando o saber proveniente de diversas áreas, nomeadamente da Engenharia Bioquímica, da Engenharia Metabólica, da Biocatálise Aplicada, da Biologia Molecular. Tendo em atenção os avanços já efectuados à escala laboratorial, existe um conjunto de domínios nos quais as perspectivas de desenvolvimento já se encontram claramente identificadas e que exploraremos a seguir.

AO NÍVEL DOS PRODUTOS

Ao nível dos produtos, as substâncias naturais existentes em pequena quantidade poderão ser obtidas por

meios biotecnológicos em muito maior quantidade e a menor custo, o que permitirá melhorar o desempenho da indústria agro-alimentar. Estão neste caso, por exemplo, a obtenção de enzimas de coalho para produção de queijo, de edulcorantes como a taumatina, de lipases para produção de aromas para queijo (ver **QUADRO 6**).

A produção de novos aditivos por fermentação tem vindo a aumentar, todos os anos, paulatina mas seguramente. Este aumento deve-se fundamentalmente a 3 razões. Por um lado, as objecções à utilização em processamento alimentar de aditivos químicos sintéticos são cada vez maiores. Por outro lado, certos aditivos de origem natural são difíceis de obter por limitações de produção, pela sua sazonalidade e pelas condições necessárias à sua produção natural. Finalmente, a produção em fermentador permite a multiplicação muito rápida de microrganismos com elevados rendimentos.

A investigação de meios de cultura de baixo custo para produção de aditivos de alto valor acrescentado encontra-se especialmente activa e terá certamente largo impacto económico. Além disso, a produção de aditivos por microrganismos geneticamente modificados

terá certamente grande potencial, tendo em conta as já drásticas condições de assepsia e controlo em que se desenrolam actualmente este tipo de fermentações.

Um caso típico é o da produção de taumatina. As taumatinas - existem 5 formas diferentes - são proteínas com um poder edulcorante que pode ser até 100 000 vezes superior ao da sacarose. Além de serem produtos naturais, que actualmente se extraem da planta *Thaumatococcus danielli benth*, as taumatinas I e II não são tóxicas e estão já aprovadas para consumo humano e animal.

Infelizmente, as fontes naturais de taumatina são muito limitadas. Em primeiro lugar, o habitat natural das plantas produtoras circunscreve-se às zonas florestais do Gana, Nigéria e Costa do Marfim. Além disso, a sua transferência para outras zonas do planeta tem-se revelado ineficaz devido à estreita dependência, para a sua propagação, de insectos polinizadores específicos. Finalmente, continua a saber-se muito pouco sobre as práticas de cultivo e manejo de uma planta silvestre até há pouco considerada de pouca utilidade.

Surgiu por isso a ideia de fazer exprimir o gene da taumatina II - que é uma proteína de 207 aminoácidos - num

QUADRO 6: Exemplos de produtos em desenvolvimento por meio de Biotecnologia

Produto	Origem Natural	Uso	Situação Actual
Quimosina	Vitelas	Queijo	Produção microbiana em curso; já em uso nos EUA
Taumatina	Planta rara	Edulcorante	Produção microbiana em curso; já em uso em vários países
Lipases	Vários microrganismos	Aromas de queijo	Produção por biologia molecular; uso em fase de licenciamento
α -galactosidase	Plantas	Modificação de gomas naturais	Produção por leveduras já demonstrada
Diacetilo	<i>Streptococcus</i>	Aroma	Produção por biologia molecular em fase avançada

microrganismo, havendo tentativas de clonagem em bactérias e leveduras desde 1982, com sucesso moderado.

Em 1995, no entanto, apareceu algo de mais promissor. Um grupo de investigadores espanhóis patenteou a produção de taumatina II por meio de uma estirpe recombinante do fungo *Aspergillus niger*, var. *awamori* (Uriach et al., Eur. Pat. Application 0684312A2 1995). Embora na patente se indique que o rendimento obtido em taumatina é da ordem dos mg/litro, os autores da patente apontam para a perspectiva desses rendimentos subirem para os gramas/litro, desde que se utilizem fermentadores e se combinem os actuais conhecimentos em Engenharia Metabólica e em Engenharia Bioquímica.

No mesmo sentido apontam as investigações em curso para a produção do corante toruleno pela levedura *Rhodotorula rubra*, ou de licopeno pela bactéria filamentosa *Streptomyces chrestomyces*. Encontra-se também já demonstrada em laboratório a possibilidade de se produzirem aromas por transformação directa de álcoois em aldeídos em fermentador gás-sólido usando enzimas denominadas álcool oxidases.

AO NÍVEL DOS PROCESSOS

Ao nível dos processos, a construção de estirpes microbianas com novas potencialidades ou a obtenção de enzimas para melhoramento de processos fermentativos tradicionais é um dos campos mais activos da investigação.

A Biologia Molecular, assim como técnicas mais clássicas da Biologia Celular, têm vindo a desenvolver novas estirpes de microrganismos que, uma vez convenientemente ensaiadas, em condições rigorosamente contro-

ladas, quanto à sua inocuidade e estabilidade, poderão vir a contribuir com grandes avanços nas fermentações tradicionais (ver **QUADRO 7**).

Encontram-se neste caso as leveduras com factores "killer", que são capazes de eliminar a concorrência de outras leveduras selvagens durante as vinificações. Outros exemplos incluem leveduras com capacidade de fermentação malo-láctica e leveduras produtoras de aromas. Para a indústria cervejeira seria interessantíssima a utilização de leveduras amilolíticas, isto é, capazes de efectuarem a sacarificação sem ser necessário recorrer à maltagem prévia. Também no domínio da cerveja seria interessante a utilização de leveduras capazes de reduzirem o teor de acetilo logo no fim da fermentação primária, reduzindo substancialmente a etapa da maturação. Foi construída uma estirpe de levedura de cerveja produtora de α -acetolactato descarboxilase que rapidamente reduziu os níveis de diacetilo de cerveja verde, tendo-se conseguido diminuir o seu tempo de maturação de 5 semanas para uma.

No que respeita às fermentações lácticas, refira-se o caso da obtenção de estirpes resistentes às infecções víricas, das estirpes sobre-produtoras de bacteriocinas que protegem os produtos fermentados das contaminações com bactérias patogénicas, das estirpes capazes de produzir grandes quantidades de diacetilo realçando o sabor amanteigado.

Continua também a desenvolver-se investigação em torno de produtos de pescado fermentado obtidos a partir de espécies de baixo valor comercial, sendo de referir o aparecimento no mercado de pastas de peixe fermentado.

QUADRO 7: Novas estirpes microbianas para processos fermentativos tradicionais

Microorganismo	Processo	Enzima	Utilização
<i>S. carlbergensis</i>	Produção de cerveja	Glucanase	Degradação de glucanos - melhora da filtrabilidade
<i>S. carlbergensis</i>	Produção de cerveja	α -acetolactato descarboxilase	Impedir formação de diacetilo diminuição do tempo de maturação
<i>S. cerevisiae</i>	Produção de vinho	Enzima malo-láctica	Redução de acidez
Bactérias Lácticas	Queijo, pão, cacau, produtos cárneos, vegetais, etc	Várias	Acelerar processos, melhorar aromas
Bactérias Lácticas	Aromas	α -acetolactato descarboxilase ausente	Aumentar produção de diacetilo

Também as enzimas aplicadas às indústrias alimentares têm vindo a beneficiar com os avanços em Biologia Molecular, podendo referir-se, entre outras, as seguintes consequências previsíveis desta aplicação: **i)** a sobreprodução de enzimas; **b)** a inserção em microrganismos de genes responsáveis por enzimas de interesse naturalmente produzidas por plantas ou animais superiores; **c)** a modificação genética de enzimas já existentes no sentido de alargar o pH de funcionamento, a termoestabilidade, ou outras propriedades.

AO NÍVEL DAS MATÉRIAS-PRIMAS

As técnicas de ADN recombinante, vulgo de engenharia genética, têm também vindo a proporcionar a obtenção de variedades vegetais com características específicas. Encontram-se neste caso: **i)** as variedades de tomate de maturação retardada, com uma vida de prateleira prolongada; **ii)** as variedades de batata mais ricas em amilose ou amilopectina, tornando-as mais aptas para a indústria de puré de batata, ou, inversamente, para a de batatas congeladas pré-fritas; **iii)** os cereais e as

oleaginosas modificadas, que incorporam informação genética que os protege contra o ataque de insectos e outras pragas, aumentando as produções.

Em estado avançado de investigação encontra-se a obtenção de citrinos transgénicos sem limonina, a substância que confere amargor aos sumos de citrinos. E cada dia que passa são anunciados novos vegetais e frutos, possuindo propriedades industrialmente interessantes.

Embora se continue hoje a debater na Europa a vantagem da utilização da hormona BST (do inglês "Bovine Somatotrophin"), o certo é que nos EUA, a BST, produzida por um microrganismo geneticamente modificado, é largamente utilizada. A BST aumenta o rendimento de produção de leite e diminui a proporção gordura/proteína na carne de vaca.

A Biotecnologia Animal tem conhecido enormes avanços nos últimos tempos, como se demonstra pelo recente aparecimento da primeira ovelha clonada. Não será, pois, de admirar, que nos apareçam neste domínio, tal como aconteceu com a Biotecnologia Vegetal, algumas surpresas interessantes, e com vastas potencialidades de aplicação.

O principal objectivo das Indústrias Alimentares é produzir produtos inócuos com duração aceitável e que satisfaçam as exigências impostas pelo consumidor e pelos organismos reguladores. Neste contexto, a avaliação da qualidade dos alimentos constitui uma parte integrante da moderna indústria alimentar, sendo motivo de interesse para o produtor dos alimentos, para o processador e para as autoridades que regulam a indústria.

Os principais critérios para avaliar a qualidade de um alimento são: propriedades físicas, químicas e biológicas que determinam a qualidade sensorial; a presença de microrganismos, substâncias alergénicas e outras substâncias tóxicas que afectam a saúde pública; adulteração e descrição fraudulenta; e composição nutritiva.

Todavia, muitos dos métodos tradicionais utilizados para verificar a qualidade dos alimentos não satisfazem minimamente as necessidades da Indústria Alimentar, na maior parte dos casos devido quer ao elevado tempo de resposta quer ao custo. Por exemplo, a realização de um teste para a detecção de *Salmonella* exige, no mínimo, três a quatro dias para a obtenção de um resultado negativo e mais três dias para confirmação caso o teste presuntivo seja positivo. Naturalmente, este elevado tempo de execução dos ensaios significa que o material tem que ser armazenado até autorização do departamento de controlo de qualidade, com evidentes custos. Em muitas situações, pode até ocorrer que o tempo de prateleira do produto seja inferior ao tempo de resposta do teste a efectuar e, como tal, o produto não possa ser comercializado.

Mais recentemente, as várias entidades envolvidas no Controlo de Qualidade dos Alimentos - Indústria, Governo e Comunidade Científica - reconheceram o sis-

a biotecnologia no controlo de qualidade nas indústrias agro-alimentares

31

tema HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points) como o principal elemento dos programas de segurança/controlo de qualidade. Este sistema baseia-se no seguinte princípio: a segurança/qualidade de um alimento só pode ser garantida quando todas as componentes do processo, incluindo a produção de matérias-primas e manipulação pelos consumidores, são tidas em consideração, isto é, para assegurar a qualidade de um alimento o controlo deve ser feito em todas as fases do processo.

Neste conceito, assume fundamental importância o desenvolvimento de **Técnicas Rápidas para o Controlo de Qualidade**, sendo a **Biotecnologia** uma das áreas que pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento de metodologias novas, mais rápidas e eficazes para assegurar a qualidades dos alimentos.

Uma vez que a maior parte dos problemas associados ao controlo de qualidade nas indústrias alimentares são de origem microbiana, a aplicação de **Técnicas Rápidas de Controlo de Qualidade** tem-se centrado na detecção, contagem e identificação de microrganismos, enterotoxinas e micotoxinas. Todavia, têm sido desenvolvidas outras aplicações, nomeadamente, detecção de resíduos de pesticidas, antibióticos, hormonas e proteínas. A utilização de técnicas imunológicas para a detecção

de proteínas específicas em alimentos pode ser usada, com vantagens, na detecção de proteínas associadas à ocorrência de alergias alimentares, detecção de proteínas tóxicas contaminantes (toxina botulínica), detecção da adulteração de alimentos (inclusão de carne de frango em carne de vaca) e na verificação de vários aspectos regulamentares.

A selecção de um método rápido para controlo de qualidade passa pela consideração dos seguintes factores:

precisão - o método deve ser o mais sensível possível e o limite de detecção o mais baixo possível. Em muitos casos, o nível de exigência é de uma célula por 25 gramas de alimento.

velocidade de resposta - é opinião corrente que um teste é considerado rápido se for possível obter uma resposta 4 horas após a recolha da amostra.

custo - este factor envolve o investimento inicial na aquisição do equipamento e os subsequentes custos por teste, incluindo custos de reagentes e técnicos. Normalmente, para grande número de análises são desejáveis unidades automáticas enquanto que devem ser usados sistemas simples para amostras em pequeno número.

Outros factores a ter em conta são: aceitabilidade, simplicidade, necessidade de pessoal preparado, estabilidade e custo dos reagentes, reputação da companhia, assistência técnica e espaço necessário.

A crescente exigência dos consumidores no que diz respeito à garantia de inocuidade dos produtos alimentares tem vindo a catalisar o desenvolvimento de metodologias cada vez mais precisas, mais rápidas e mais fiáveis, muitas das quais biotecnológicas.

Principais aplicações de técnicas rápidas de controlo de qualidade

Seguidamente, será efectuada uma apresentação breve das principais técnicas de controlo de qualidade que envolvem a utilização da Biotecnologia, indicando-se as suas aplicações mais relevantes.

De acordo com a principal metodologia utilizada, as técnicas disponíveis, podem ser classificadas em:

técnicas bioquímicas

técnicas biofísicas

técnicas imunológicas

técnicas genéticas

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

A técnica de controlo de qualidade que melhor satisfaz os requisitos de análise em tempo real é a determinação do ATP por Bioluminescência. Uma vez que a quantidade de ATP - trifosfato de adenosina - existente numa célula se mantém aproximadamente constante, a luz produzida durante uma reacção enzimática que converte a energia química associada ao consumo de ATP em luz está directamente relacionada com o número de células metabolicamente activas presentes na amostra.

A determinação do ATP por Bioluminescência nas Indústrias Alimentares pode ser usada quer para a monitorização das condições higiénicas quer para analisar a qualidade do produto.

A monitorização da higiene por este método tem sido usada numa grande variedade de situações incluindo indústrias cervejeiras, de lacticínios e de sumos de frutas. Deve no entanto ser referido que este sistema não tem

aplicabilidade em unidades processuais que usam sistemas de limpeza a seco - moagens - em que os resíduos alimentares nunca são completamente eliminados e, como tal, obtêm-se sempre níveis elevados de ATP.

O desenvolvimento de luminómetros portáteis e sistemas miniaturizados bem como a possibilidade de ligação ao computador permitem prever que o mercado europeu, no ano 2000, de kits para a monitorização da higiene seja de 18.500 milhões de dólares.

A Bioluminescência por ATP também é utilizada para determinar a carga microbiana de um grande número de produtos alimentares. Neste tipo de sistemas, uma vez que o ATP pode estar presente nas células somáticas, o ATP de origem microbiana tem que ser separado antes da análise, recorrendo normalmente à lise selectiva das células somáticas.

Existem sistemas que fazem uso da Bioluminescência para detectar a carga microbiana em leite, cervejas, bebidas e sumos de frutas, carne de bovinos e carne de aviário, sendo o limite inferior de detecção da ordem das 10^4 ufc/ml ou 10^2 ufc/cm² para tempos de resposta da ordem dos 10-15 minutos. São necessários tempos mais elevados para a cerveja e para sumos, uma vez que tem que ser realizado um passo de filtração para eliminar os níveis elevados de ATP não microbiano.

As técnicas até agora descritas permitem somente quantificar a carga microbiana total não dando nenhuma identificação relativamente a tipos específicos de bactérias, nomeadamente patogénicas. Recorrendo a técnicas de manipulação genética é já possível a utilização da Bioluminescência para a identificação de *E. coli* e *Samonella*.

A medição da actividade da catalase - enzima presente em vários alimentos - é outra técnica que faz uso da determinação da actividade enzimática para quantificar o número de microrganismos presentes numa amostra. Esta técnica permite detectar 10^4 células bacterianas por grama de amostra em minutos. Algumas aplicações são a detecção de contaminações em matérias-primas e produtos acabados, controlo do branqueamento de vegetais e qualidade do leite e detecção de mastites subclínicas em vacas leiteiras.

A hidrólise do MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo) produz o composto 4-metilumbeliferona altamente fluorescente sob luz ultravioleta de elevado comprimento de onda. Este fenómeno permite a detecção das estirpes de *E.coli*, *Salmonella*, *Yersinia* e *Shigella* em diversas matrizes alimentares.

A análise fotométrica de alterações bioquímicas é uma técnica baseada na quantidade de luz transmitida, resultante de reacções bioquímicas, através de uma suspensão de células microbianas que pode ser usada para a identificação de microrganismos. Neste sistema, os dados fotométricos são comparados com uma biblioteca fotométrica permitindo a identificação dos microrganismos.

Outras técnicas colorimétricas baseiam-se na mudança de cor de corantes relacionadas com alterações bioquímicas causadas pelos microrganismos. O corante a utilizar depende da aplicação pretendida e podem ser usados corantes que produzam cor como consequência de, por exemplo, alterações do pH e do potencial de oxidação/redução. Nestes sistemas o limite inferior de detecção é da ordem de 10^6 a 10^7 microrganismos/ml.

TÉCNICAS BIOFÍSICAS

Um outro conjunto de técnicas baseia-se na medição da actividade metabólica dos microrganismos, incluindo determinação de impedância/condutância, reacção com corantes e produção de subprodutos tais como calor, toxinas e ácidos.

Ao crescer, os microrganismos quebram moléculas de elevado peso molecular em moléculas bastante mais pequenas e carregadas, alterando a resistência/impedância do meio à passagem da corrente eléctrica. Como resultado da actividade metabólica dos microrganismos, a impedância diminui ao passo que a capacitância e condutividade aumentam. Nestes sistemas, determina-se o tempo ao fim do qual se verifica uma brusca alteração no sinal eléctrico, correspondente à obtenção de concentrações celulares características (10^6 a 10^7 células/ml para bactérias e 10^4 a 10^5 células por ml para leveduras). Quanto mais rápido for o tempo de detecção maior será a concentração inicial de microrganismos.

Os microrganismos, ao crescer, produzem calor. Embora produzido em pequenas quantidades, o calor resultante da actividade metabólica pode ser medido usando microcalorímetros. Para quantificar a carga microbiana por calorimetria, é necessário a obtenção de um termograma que correlacione a quantidade de calor libertado com o número de células. Por comparação dos termogramas de amostras contaminadas com o termograma padrão pode ser determinado o número de microrganismos presentes na amostra.

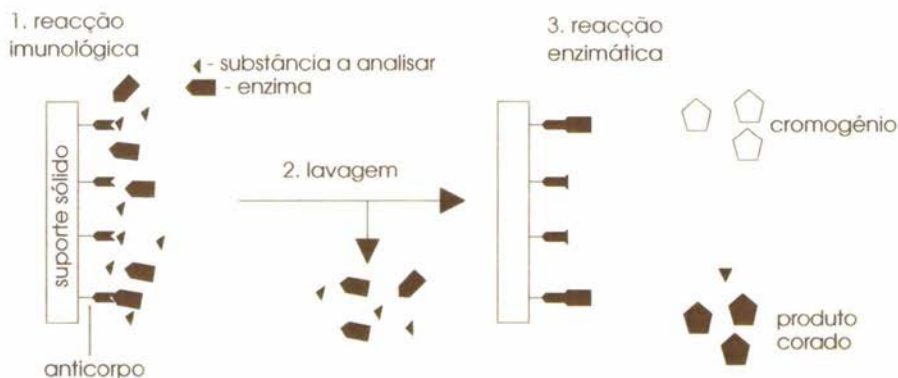
TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS

Os ensaios imunológicos são técnicas que utilizam as reacções imunológicas para detectar a presença de uma substância (ver FIGURA 5). São ensaios altamente específicos e bastante sensíveis o que os torna extremamente atraentes como técnica rápida de controlo de qualidade, uma vez que é possível a detecção de quantidades vestigiais dum dado composto com exigências mínimas de purificação e/ou concentração da amostra. Além destas vantagens, têm elevada reprodutibilidade e podem ser usados em variadas condições.

A base de todos os ensaios imunológicos é a interacção entre um anticorpo e o correspondente antigene e a detecção dessa interacção utilizando enzimas ou compostos marcados radioactivamente.

A maior parte dos ensaios imunológicos contém os seguintes componentes: um antigene (analito para ser determinado), um anticorpo que se liga ao analito, um método para separar o material ligado do não ligado, um indicador no anticorpo ou no analito que permita a sua detecção e padrões do analito. Os testes imunológicos podem ser qualitativos ou quantitativos, dependendo dos objectivos a atingir.

FIGURA 5: Esquema de uma reacção enzimático-imunológica



TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS NO CONTROLO DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

Nos ensaios imunológicos mais utilizados nas indústrias alimentares um antígeno livre compete com um antígeno marcado enzimaticamente para um conjunto limitado de anticorpos ligados a uma fase sólida, ocorrendo a reacção, após a qual é efectuada uma lavagem para remover reagentes não ligados. É adicionado um substrato corado sendo a cor resultante inversamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra. Este tipo de ensaio é conhecido por ELISA.

Também podem ser utilizados ensaios ELISA nos quais ambos os anticorpos estão em excesso, podendo ter a mesma especificidade ou direccionados para diferentes lugares antigénicos do organismo. A amostra é misturada com a fase sólida contendo um anticorpo e os organis-

mos presentes ligam-se à superfície sólida. A fase sólida é lavada e o anticorpo marcado adicionado. O anticorpo marcado liga-se aos microrganismos presentes e ocorre a formação de cor que, neste caso é proporcional à quantidade de antígeno.

Existe, actualmente, uma grande variedade de ensaios enzimático/imunológicos disponíveis comercialmente e aplicáveis a todos os alimentos. Estes ensaios permitem a detecção rápida de microrganismos patogénicos - espécies de *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 - e toxinas - toxina de *Staphylococcus aureus* e toxina de *Bacillus cereus*. O tempo de resposta destes ensaios depende do tipo de microrganismo estando compreendido entre 20 e 52 horas. Este tempo, que pode ser considerado elevado, resulta da necessidade de haver um período de enriquecimento prévio da amostra.

Além dos ensaios enzimáticos imunológicos, existem ensaios baseados noutras técnicas de detecção:

nos ensaios de imuno-difusão forma-se um precipitado visível quando ocorre a interacção antigene/anticorpo. Existe comercialmente um ensaio, baseado neste método, para a detecção de *Salmonella* e aprovado para todos os alimentos.

os ensaios de aglutinação realizam-se quando ocorre a formação de uma estrutura em malha entre um antigene e o anticorpo. O aglutinado obtido é visível a olho nu. Os ensaios de aglutinação podem ser usados para a detecção de toxinas produzidas por *Staphylococcus* e *Clostridium*.

os ensaios imunofluorescentes usam compostos fluorescentes ligados aos anticorpos. Quando os anticorpos marcados reagem com os seus antigenes específicos, o complexo fluorescente resultante é detectado. Sistemas deste tipo permitem a detecção rápida de *Salmonella*, *Listeria*, enterotoxina de *Staphylococcus*, *E. coli* O157 e *Listeria monocytogenes*.

Tal como nos ensaios enzimático imunológicos o factor condicionante no tempo de resposta destas técnicas é o periodo de enriquecimento.

UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOLÓGICOS NA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos produzidos por bolores que frequentemente contaminam produtos agrícolas tais como milho, trigo e amendoins após a colheita e durante o armazenamento. Estes compostos, que apresentam uma grande diversidade de estruturas químicas, podem dar origem a sintomas que podem ir desde a simples gastroenterite até cancro. Para se ter uma ideia da importância das micotoxinas, a FAO estima que 25% das culturas a nível mundial são afectadas pelas micotoxinas, sendo as aflatoxinas devido ao seu elevado potencial carcinogénico as mais importantes.

Os métodos tradicionais para a análise de micotoxinas têm custos elevados e são extremamente morosos.

FIGURA 6: Representação esquemática de um ensaio de hibridização de DNA



A utilização de ensaios rádio imunológicos (RIA) e ensaios ELISA constitui uma importante alternativa às técnicas tradicionais existindo disponíveis comercialmente vários sistemas para a detecção rápida de micotoxinas usando técnicas imunológicas.

Os ensaios imunológicos disponíveis, ELISA na maior parte dos casos, podem ser qualitativos (sim ou não) ou quantitativos e são de execução extremamente rápida, variando o tempo de análise entre os 10 e 20 minutos na grande maioria das situações. Para aflatoxinas, os limites de detecção são de 5-20 p.p.b em milho e cereais e de 0.5 p.p.b em leite.

UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOLÓGICOS NA DETECÇÃO DE PESTICIDAS E RESÍDUOS DE DROGAS

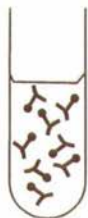
Nos últimos 5 anos, verificou-se um aumento significativo da utilização de ensaios imunológicos para a análise de resíduos de drogas e pesticidas em produtos alimentares, encontrando-se já alguns sistemas dispo-

níveis comercialmente. Estes ensaios podem ser aplicados a qualquer tipo de alimento sendo os limites de detecção muito baixos (alguns p.p.b).

UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOLÓGICOS NO CONTROLO DOS PRODUTOS ALIMENTARES

Também podem ser usados ensaios imunológicos para proteínas alimentares específicas para detectar adulteração de alimentos, tais como a substituição de carne de vaca por carne de frango, inclusão de proteínas vegetais em produtos cárneos, substituição de fígados de ganso por fígados de pato em "foie-gras", substituição de leite de cabra ou ovelha por leite de vaca. Os ensaios ELISA e de imunodifusão são os mais utilizados para este fim, sendo possível a detecção de contaminações da ordem de 1%.

Também são utilizados sistemas ELISA para controlar o processamento térmico de alimentos, através da quantificação de componentes cuja concentração pode variar



Adicionar sondas marcadas de DNA de cadeia simples à amostra



As sondas de DNA hibridizam com as partes complementares das cadeias



Lavar o excesso de sondas; verificar a presença de sondas marcadas; sondas ligadas ao suporte indicam uma reação positiva

durante o processamento e a detecção de proteínas com actividade alergénica em alimentos. Existe comercializado um processo ELISA que permite a detecção de quantidades vestigiais de glúten em vários alimentos, o que é fundamental para indivíduos com doença celíaca.

O potencial de utilização destas técnicas na detecção de proteínas alimentares é enorme, sendo possível, por exemplo, a detecção de proteínas transferidas por via biotecnológica de uma espécie para outra.

TÉCNICAS GENÉTICAS

A hibridização do ADN pode ser utilizada para detectar rapidamente e com exactidão bactérias em alimentos. Nesta técnica são utilizadas sondas de ADN - pequenas cadeias simples marcadas de ADN com um padrão sequencial de bases exactamente complementar ao do ADN do microrganismo alvo. Quando as sondas de ADN são introduzidas em amostras contendo o ADN alvo hibridizam, isto é, formam uma cadeia em hélice dupla de ADN (ver FIGURA 6).

A grande maioria das sondas existentes são marcadas com isótopos, embora tal como nos testes imunológicos, a sua detecção possa ser feita enzimaticamente. Existem sondas construídas para os patogénicos mais importantes, nomeadamente, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio sp.* e *Yersinia sp.*

Como nos ensaios imunológicos acima descritos, a utilização de sondas de ADN para a identificação de microrganismos requer um passo prévio de enriquecimento devido à sensibilidade do método, que é da ordem dos 10^5

microrganismos/ml. Este passo faz com que o tempo de resposta do ensaio seja da ordem das 46-53 horas.

Esta limitação pode ser ultrapassada recorrendo à reacção de polimerase em cadeia (PCR). Nesta técnica, a utilização de polimerase de ADN, termicamente estável, permite a obtenção extremamente rápida de milhares de cópias de pequenos fragmentos da hélice dupla do ADN alvo, reduzindo enormemente quer o tempo de análise quer os limites de detecção dos métodos que usam a hibridização do ADN.

A utilização de sondas genómicas pode também ser efectuada recorrendo a híbridos ADN/ARN e ARN/ARN.

B. A. MORRIS AND M. N. CLIFFORD Eds

Immunoassays in Food Analysis

Elsevier Applied Science Publishers, Londres, 1985

P. L. ROGERS AND G. H. FLEET Eds

Biotechnology in the Food Industry

Gordon and Breach Science Publishers, New York, 1989

Rapid Techniques for Quality Assurance

Food Technology - Special Report, October, 51-60, 1993

Rapid Microbiological Testing Kits and Instruments

Food Technology - Special Report, July, 63-71, 1995

Immunoassay Applications to Food Analysis - Overview

Food Technology, February, 101-132, 1995

M. KARWOSKY

Automated Direct and Indirect Methods in Food Microbiology: a literature review

Food Re. Int., 12(2), 155-174, 1996

W. E. HILL, A. R. DATTA, P. FENG, K. L. LAMPEL AND W. L. PAYNE

Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes

in FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th Ed., AOAC International Eds, Arlington, 383-417, 1992

P. FENG

Rapid Methods for Detecting Food Born Pathogens

in FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th Ed., AOAC International Eds, Arlington, 427-437, 1992

LINDSAY, RC & WILLIS, BJ

Biotechnology Challenges for the Flavor and Food Industry

Elsevier Applied Science, 1989

TAKEOKA, GR, TERANISHI, R, WILLIAMS, PJ & KOBAYASHI, A

Biotechnology for Improved Foods and Flavor

ACS Symposium Series 637 1996

FOX, PF

Food Enzymology

Elsevier Applied Science, 1991

POTTER, NN & HOTCHKISS, JH

Food Science

Chapman & Hall, 5th Ed., 1995

leitura aconselhada

