



**Avaliação da capacidade  
antioxidante e  
antimicrobiana de  
infusões de subprodutos  
de couve-flor (*Brassica  
oleracea var. Botrytis*)  
obtidas por Altas  
Pressões Hidrostáticas**

**Mariana de Magalhães Brites Pires  
Pereira**

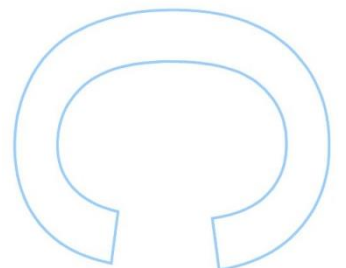
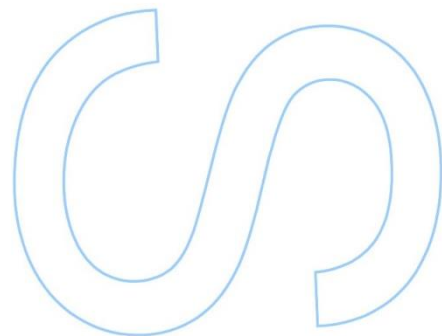
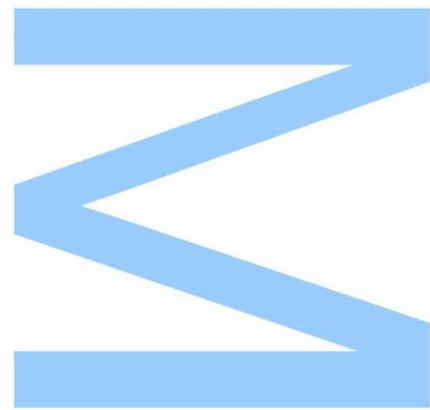
Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição  
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território  
2014/2015

**Orientador**

Doutor Luís Miguel Cunha - Professor Associado da FCUP

**Coorientadora**

Doutora María Dolores Rodrigo Aliaga - Professora de  
investigação IATA-CSIC



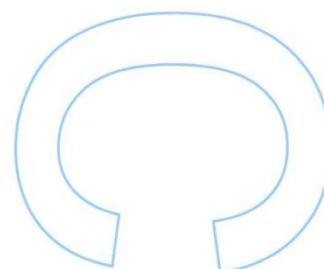
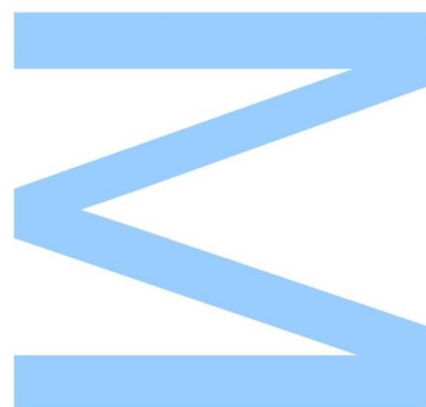
Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (Brassica oleracea var. Botrytis) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_





**Avaliação da capacidade antioxidante e  
antimicrobiana de infusões de  
subprodutos de couve-flor (*Brassica  
oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas  
Pressões Hidrostáticas**

**2015**

## Agradecimentos

Ao organismo Centro Nacional Europass (*Erasmus+ programme*) responsável pela oportunidade de uma experiência enriquecedora com a realização de um período de mobilidade no espírito da União Europeia, assim como à Universidade do Porto e aos coordenadores do Gabinete de Imagem e Relações com o Exterior pelo suporte ao longo de todo o processo.

Ao Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), nomeadamente ao Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), que disponibilizou todos os recursos para que o trabalho em questão pudesse ser concretizado com sucesso.

Ao meu orientador, professor Doutor Luís Miguel Cunha, por toda a paciência e auxílio prestado que me permitiu ter a oportunidade incrível de experienciar um programa Erasmus+ Estágio.

À Doutora Loles Rodrigo, minha coorientadora, pelo acolhimento na sua equipa de investigação, assim como todo o apoio material e pessoal na realização deste projeto.

Ao Doutor Antonio Martinez, pelo acompanhamento durante a estadia no IATA-CSIC, transmitindo uma motivação e força essenciais ao desenvolvimento de todo o projeto.

À Maria Sanz, pela paciência, carinho e sabedoria infinita com que ao longo dos seis meses me transmitiu todo o seu conhecimento, acompanhando o trabalho experimental sempre de forma profissional e bem-disposta. São amizades como esta que tornaram a experiência de mobilidade europeia ainda mais especial.

Aos meus colegas do grupo de investigação, Cátia, , Mar, José Miguel, Alex, Bea, Natália, Sérgio, Sílvia, Clara, Alejandro, Fabian, Surama e Patrícia, pela partilha de emoções e conselhos que ajudaram a suportar, dia após dia, o trabalho contínuo e árduo. *Tengo los mejores recuerdos de toda la estancia en el IATA gracias a vosotros.*

Às minhas colegas de casa, amigas fundamentais na sobrevivência à vida em Valência. *To Sarah, the sweetest and (at the same time) determinate Austrian girl I ever met.* À Filipa e à Marta, pela amizade e apoio que tornaram todas as histórias partilhadas indubitavelmente mais interessantes e divertidas. *Por fin, un agradecimiento muy especial a dos italianas que hiciran parte de mi vida: Jessica y Angela, gracias por los incontables momentos compartidos, entre lágrimas y sonrisas, charlas y silencios, día y noche y siempre a mi lado. No hay palabras que describan la importancia que fue su presencia, llenándome el corazon de cariño, sabiduría y fuerza inmensurable.*

Aos meus amigos espanhóis e de outras nacionalidades, junto dos quais vivi as aventuras e desventuras que fizeram desta viagem uma das experiências mais épicas de sempre.

A todos os meus amigos portugueses, cuja distância física não os impediu de continuarem ao meu lado. São pessoas incríveis a quem devo muito mais do que simples gratidão e sem os quais não teria conseguido realizar esta prova tão importante da minha vida.

À minha família, pela estabilidade e conselhos oferecidos, ajudando a ultrapassar as saudades de casa.

E finalmente, aos meus pais e irmã, que tornaram este sonho possível. O seu amor e apoio incondicionais ajudaram-me a vencer as etapas pelas quais fui passando ao longo de toda esta experiência, que acabou assim por se concretizar numa enorme vitória pessoal e profissional.

## Resumo

As epidemias alimentares de origem bacteriana são uma problemática global, com graves consequências a nível social, ambiental e económico. Desta forma, a exploração de novas tecnologias de extração de compostos bioativos torna-se essencial para o desenvolvimento de novos conservantes alimentares. O presente trabalho apresenta um conjunto de avaliações da capacidade antimicrobiana e antioxidantes de infusões preparadas a partir de subprodutos industriais de couve-flor, por extração de compostos bioativos através de altas pressões hidrostáticas - 200, 300, 400 e 500 MPa - durante 5 minutos. Os efeitos das infusões preparadas foram testados frente a um dos microrganismos com maior impacto no desenvolvimento de intoxicações alimentares a nível mundial, *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium, a temperaturas de incubação distintas: 10 °C e 37 °C. As curvas de crescimento/inativação do patogénico e os respetivos ajustes matemáticos apontam para a existência de uma correlação positiva entre a pressão de extração e o poder bactericida das amostras testadas. Tratamentos de 400 e 500 MPa (5 min) revelam um conteúdo de polifenóis extraídos mais elevado que tratamentos de 200 e 300 MPa (5min) com efeito semelhante de dano e morte em células de *S. Typhimurium*, tanto a 10 °C como a 37 °C. No entanto, não foram observadas diferenças na capacidade antioxidante das amostras preparadas pelos diversos tratamentos. Assim, infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por tratamentos HPP poderão vir a ser usados como técnica suplementar para controlar o crescimento de patogénicos durante a produção e/ou armazenamento de produtos alimentares de origem vegetal.

**Palavras-chave:** Segurança Alimentar, *S. Thyphimurium*, Subprodutos Agroindustriais, Altas Pressões Hidrostáticas, Polifenóis.

## Abstract

The management of organic residues (by-products) that results from processing fruits and vegetables by food and beverage industries is a big issue, with serious social, environmental and economic consequences that concerns populations at a global level. At the same time, bacterial food epidemics still take a strong presence in modern society. Therefore, the development of new technologies to extract bioactive compounds becomes crucial to create more effective food preservatives. The aim of the following thesis is to present an evaluation of the antioxidant and antimicrobial power by bioactive molecules extracted from cauliflower by-products infusion prepared through high hydrostatic pressures – 200, 300, 400 and 500 MPa – for 5 minutes. The pathogenic growth/inactivation curves and respective mathematic adjustments show a positive correlation between the pressure applied and the bactericidal power of the tested samples. Treatments of 400 and 500 MPa (5 minutes) revealed higher polyphenolic content than 200 and 300 MPa (5 minutes), with a similar effect of damage and death on *S. Typhimurium* bacteria, at 10 °C and 37 °C. However, no differences were found on the antioxidant capacity of the different samples prepared by the same method. Thereby, infusions of cauliflower by-products obtained through High Hydrostatic Pressure can be used as a supplementary technique to control food pathogenic growth during the production and/or storage of food and beverage items.

**Key-words:** Food Safety, *S. Typhimurium*, Food by-products, High Hydrostatic Pressure, Polyphenols

## Lista de Quadros e Figuras

Tabela 1 - Principais compostos bioativos extraídos de subprodutos de frutas e respetivas aplicações. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003) .....	28
Tabela 2 - Principais compostos bioativos extraídos de subprodutos de verduras e respetivas aplicações. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003) .....	30
Tabela 3 - Quadro resumo da área plantada e volume de produção de Brassicas em 2011. Adaptado de (FAOSTAT, 2011) .....	34
Tabela 4 - Principais espécies de <i>Brassicac</i> s consumidas a nível global. Adaptado de (Wu et al. 2009) .....	35
Tabela 5 - Cronograma das atividades desenvolvidas ao longo do ano letivo .....	55
Tabela 6 - Estimativa dos parâmetros cinéticos da distribuição de Weibull (b e n) em função da pressão HPP (0, 200, 300, 400 e 500 MPa) da infusão de subproduto de couve-flor a 37 °C. Os resultados representam a média ± desvio-padrão. Os valores da média com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) .....	75
Tabela 7 - Estimativa dos parâmetros cinéticos da distribuição de Weibull (b e n) em função da pressão HPP (0, 200, 300, 400 e 500 MPa) da infusão de subproduto de couve-flor a 37 °C. Os resultados representam a média ± desvio-padrão. Os valores da média com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) .....	75
Tabela 8 - Total de polifenóis nas amostras de infusões obtidas por diferentes tratamentos de altas pressões (200, 300, 40 e 500 MPa – 5min). Os resultados representam a média ± desvio padrão. Os valores da média com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) .....	77
Tabela 9 - Capacidade antioxidante das infusões obtidas por diferentes tratamentos de altas pressões (200, 300, 400 e 500 MPa - 5min). Os valores representam médio ± desvio-padrão. Os valores da média com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) .....	80

Figura 1 - Etapas da Cadeia de Abastecimento Humana que podem gerar desperdício alimentar. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003) .....	17
Figura 2 - Distribuição do desperdício alimentar de hortofrutícolas gerado globalmente e ao longo da CAA. Adaptado de (FAO. et al. 2009).....	17
Figura 3 - Distribuição dos desperdícios alimentares (FW – Food Waste) gerados por diferentes países desenvolvidos e em desenvolvimento. Retirado de (Thi et al. 2015) .....	19
Figura 4 - Distribuição dos desperdícios gerados na União europeia em 2006 pelos 27 países-membros. Adaptado de(FAO. et al. 2009) .....	19
Figura 5 - Exigências das indústrias e consumidores face ao desenvolvimento de novos produtos alimentares. Adaptado de (Lin et al. 2013).....	20
Figura 6 - Estratégia de desenvolvimento e incorporação de ingredientes com origem em subprodutos da indústria agroalimentar . Adaptado de (Lin et al. 2013).....	21
Figura 7 - Conversão de matérias residuais em ingredientes multifuncionais e vice-versa. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003) .....	22
Figura 8- Estrutura geral de um glicosinolato .....	36
Figura 9 – Exemplos de flavonóides: kaempferol (esquerda) e quercitina (direita).....	38
Figura 10 - Exemplos de antocianinas: pelargonidina (esquerda) e cianidina (direita) .....	38
Figura 11 - Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos: ácido sinapínico (esquerda) e ferúlico (direita) .....	39
Figura 12 - Evolução no uso de equipamentos HPP e respetivos produtos alimentares onde é aplicado. Retirado de (Elamin et al. 2015).....	41
Figura 13 - Esquema geral de um sistema de HPP. Adaptado de (Huang et al. 2013) .....	42
Figura 14 - Folhas de chá verde ao microscópio eletrónico sem (A) e com (B) tratamento por HPP .....	43
Figura 15 - Células de E.Coli submetidas a tratamentos HPP .....	50
Figura 16 - Curva de crescimento de S. Typhimurium na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), a temperatura 37°C. ....	64
Figura 17 - Curva de crescimento de S. Typhimurium na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), a temperatura 10°C. ....	66
Figura 18 - Representação do dano celular em S. Typhimurium na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), com respetivo branco, a temperatura 37°C .....	70
Figura 19 - Representação do dano celular em S. Typhimurium na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), com respetivo branco, a temperatura 10 °C .....	74
Figura 20 - Curva de Calibração Padrão para a quantificação de polifenóis das infusões. ....	77
Figura 21 - Curva de Calibração Padrão para a determinação da capacidade antioxidante das infusões. ....	79

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor  
(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

## Lista de Abreviaturas

ATP – Adenosine Triphosphate

BSE - Bovine Spongiform Encephalopathy (encefalopatia espongiforme bovina)

CAA – Cadeia de Abastecimento Alimentar

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CSIC – Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DA – Desperdício Alimentar

DNA – Deoxyribonucleic acid

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EFSA – European Food Safety Authority

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization

GAE – Galic Acid Equivalent (equivalentes de ácido gálico)

HPP – High Hydrostatic Pressure (altas pressões hidrostáticas)

IATA – Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

MPa – Mega Pascal

MSE – Mean Squared Error

NaCl – Cloreto de Sódio

TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity

TSA – Trypticase Soy Agar

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

# Índice

Introdução .....	14
Estado de Arte .....	16
Subprodutos na Indústria Agroalimentar .....	16
<i>Volume de produção</i> .....	18
<i>Desafios multi-tecnológicos</i> .....	20
<i>Medidas Legislativas</i> .....	23
<i>Resíduos da Indústria Hortofrutícola</i> .....	24
Revalorização dos subprodutos .....	25
<i>Práticas tradicionais de gestão de subprodutos</i> .....	25
<i>Incineração</i> .....	25
<i>Compostagem</i> .....	26
<i>Alimentação Animal</i> .....	26
<i>Limitações</i> .....	26
<i>Novas técnicas de gestão de subprodutos</i> .....	27
Tendências do Consumidor .....	31
Compostos bioativos em <i>Brassicáceas</i> .....	34
<i>Estrutura e função de glicosinolatos e isotiocianatos</i> .....	36
<i>Estrutura e função de compostos fenólicos</i> .....	37
<i>Flavonóides</i> .....	38
<i>Antocianinas</i> .....	38
<i>Ácidos hidroxicinâmicos</i> .....	39
<i>Composição fenólica em <i>Brassica oleracea</i></i> .....	39
Tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas .....	40
<i>Funcionamento Geral</i> .....	41
<i>Vantagens do processo HPP</i> .....	42
<i>HPP na extração de compostos bioativos</i> .....	44
<i>Casos práticos</i> .....	47
<i>Alterações morfológicas</i> .....	50
Salmonella – patógeno emergente .....	52
Objetivos .....	54
Materiais e Métodos .....	56
1. Preparação das Infusões .....	56
1.1. Preparação das Amostras .....	56

1.2. Processamento HPP .....	56
2. Organismo em estudo .....	57
3. Avaliação da Capacidade Antimicrobiana .....	57
4. Determinação de células mortas e de células danificadas.....	58
5. Modelagem Matemática .....	60
6. Análise Estatística .....	61
7. Determinação do conteúdo fenólico total.....	61
8. Determinação da Capacidade Antioxidante.....	62
Resultados e Discussão.....	63
1. Avaliação da capacidade antimicrobiana das infusões de subproduto de couve-flor obtidas por tratamentos de HHP frente a <i>S. Typhimurium</i> .....	63
1.1. Efeito das infusões de subproduto de Couve-flor por tratamento HHP no crescimento de <i>S. Typhimurium</i> a 37 °C.....	63
1.2. Efeito das infusões de subproduto de Couve-flor obtidas por tratamentos HHP no crescimento de <i>S. Typhimurium</i> a 10 °C .....	65
2. Determinação de células mortas e de células danificadas de <i>S. Typhimurium</i> incubadas em presença de infusões do subproduto de couve-flor obtidas por tratamento HHP.....	67
2.1. Determinação do dano celular em <i>S. Typhimurium</i> a 37 °C .....	67
2.2. Determinação do dano celular em <i>S. Typhimurium</i> a 10 °C .....	71
3. Modelagem Matemática .....	75
4. Quantificação do conteúdo total de polifenóis nas infusões de subprodutos de Couve-flor obtidas por tratamentos de HPP .....	77
5. Avaliação da capacidade antioxidante nas infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por tratamentos de HPP .....	79
Conclusões.....	81
Referências Bibliográficas .....	81

# Introdução

A sociedade moderna desenvolve-se a um ritmo sem precedentes, pelo que os problemas relacionados com a sua alimentação são um facto que preocupa não só os Governos mundiais mas também toda a indústria agroalimentar que a suporta. O desenvolvimento Industrial envolvente enfrenta novas exigências por parte dos consumidores cujas respostas se querem rápidas e sustentáveis, com o menor custo de produção e rentabilidade máxima.

O crescimento exponencial do número de habitantes no nosso planeta despoletou o desenvolvimento de novos métodos de produção de bens alimentares nas últimas décadas que procuram sustentar as necessidades alimentares em larga escala. No entanto a tecnologia de produção em larga escala levou à sobreexploração dos recursos naturais, com consequências devastadoras para o meio ambiente e para os seres vivos que neles habitam, o que por sua vez afeta a forma como os alimentos chegam às mãos dos indivíduos. Problemas como erosão dos solos, poluição ambiental e perda de biodiversidade levam à destruição de fauna e flora essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas (Munesue et al. 2015).

Nas últimas décadas os indivíduos têm vindo a tomar consciência do seu papel ativo nestas alterações de paradigmas envolventes ao seu meio e as suas preocupações passam atualmente não só pelo impacto que as suas escolhas alimentares possam causar a nível ecológico mas também numa construção saudável da sua dieta diária rigorosamente pautada por parâmetros específicos na qualidade e segurança dos produtos consumidos (Vittersø et al. 2015).

Mas os consumidores não são os únicos agentes preocupados com a evolução das dinâmicas dos mercados de bens alimentares. A indústria agroalimentar enfrenta desafios múltiplos devido à diminuição na disponibilidade de matérias-primas essenciais para a produção dos alimentos que são consumidos a nível global, ao mesmo tempo que pressões internas e externas – como por exemplo custos de produção acrescidos ou políticas internacionais de proteção ambiental compelem as empresas para reduzir a produção de desperdícios e investir em alternativas na reutilização dos materiais normalmente descartados e sem valor evidente (EU 2008, Lin et al. 2013).

A inclusão em dietas para animais, compostagem e incineração fazem parte do conjunto de soluções para reaproveitamento de subprodutos mais usadas até há pouco tempo. No entanto estas apresentam diversas falhas tecnológicas com impactos económicos, sociais e ambientais. Torna-se então urgente investir em novas técnicas que deem resposta ao

problema da escassez de matéria-prima crescente e ao mesmo tempo consigam ajudar na gestão dos respetivos subprodutos (Laufenberg et al. 2003).

Os subprodutos gerados a partir do processamento de hortofrutícolas são normalmente partes não comestíveis de frutas e legumes que apesar de não serem tolerados pelo sistema digestivo humano contêm na sua matriz vegetal múltiplas moléculas bioativas com propriedades protetoras como antioxidantes e antimicrobianos que ao serem extraídos podem ser incorporados como ingredientes inovadores, naturais, saudáveis e multifuncionais (Schieber et al. 2001) .

Os vegetais da família das *Brassicás*, como por exemplo a couve-flor, são largamente conhecidos pelas suas propriedades benéficas para a saúde humana. Glicosinolatos, flavonóides, antocianinas e ácidos hidroxâmicos fazem parte da lista de compostos bioativos que marcam forte presença nos talos e folhas e que podem ser extraídos igualmente das partes comestíveis e não comestíveis destas plantas (Cartea et al. 2011).

Novas técnicas de extração em larga escala têm vindo a ser desenvolvidas por várias indústrias, principalmente ao nível da indústria agroalimentar, no sentido de melhorar a eficácia e sustentabilidade na produção e conservação dos produtos. Neste caso o uso de altas pressões hidrostáticas pode ser usado para retirar compostos de baixo peso molecular das matrizes celulares vegetais derivados de subprodutos de couve-flor com funções antioxidantes e antimicrobianas para posteriormente serem aplicados em conservantes para alimentos, aumentando assim o seu tempo de prateleira (Huang et al. 2013, Huang et al. 2014).

Um dos microrganismos patogénicos transmitidos por alimentos mais importante é a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, uma bactéria oportunista com especial propensão em desenvolver-se em alimentos cujo armazenamento apresenta falhas ao nível da higiene e segurança alimentar, causando frequentemente graves surtos de intoxicações alimentar por todo o mundo (Bell et al. 2008).

Deste modo torna-se imperativo estudar a cinética de crescimento/inativação deste microrganismo quando exposto a compostos extraídos de subprodutos vegetais através de técnicas de extração alternativas, como o HPP, que permitem transformar em novas matérias-primas os subprodutos industriais de hortofrutícolas.

# Estado de Arte

## Subprodutos na Indústria Agroalimentar

A sociedade moderna vive um período de grandes desafios ao nível da gestão dos seus recursos. A Indústria agroalimentar produz grandes quantidades de subprodutos, tanto sólidos como líquidos, resultantes da produção, preparação e consumo dos alimentos. Mas num planeta superpovoado que enfrenta problemas graves de destruição ambiental, a procura por soluções alternativas para obtenção de energia e ingredientes torna-se fundamental para a sustentabilidade do consumo alimentar à escala global.

De acordo com a literatura existem três tipos de definições para o Desperdício Alimentar (DA). A Food and Agriculture Organization (FAO) define DA como o material total comestível e saudável destinado ao consumo humano, com origem em qualquer fase da Cadeia de Abastecimento de Alimentos que acaba por ser descartado, perdido, degradado ou consumido por pragas (FAO. et al. 2009). Em 2010 (Martindale 2010) foi adicionado à definição da FAO os alimentos utilizados intencionalmente em rações para animais, assim como os subprodutos com origem no processamento alimentar que são desviados da cadeia alimentar humana.

De forma a estabelecer uma ideia mais completa e multidisciplinar sobre a criação, manuseamento e oportunidades de revalorização, o DA pode ser classificado de acordo com a sua origem, a fase de produção ou propriedades intrínsecas. De forma geral existem dois tipos de resíduos: vegetais (cereais, raízes, tubérculos, leguminosas, frutas e vegetais) ou animais (carnes, peixes, marisco ou produtos lácteos). Podemos encontrar DA em qualquer tipo de desperdícios gerados por sistemas que lidam com produtos alimentares de origem industrial, agricultura, sanitária ou nos resíduos sólidos urbanos (Lin et al. 2013). Este pode ser evitável, como por exemplo produtos que poderiam ter sido consumidos antes do final da data de validade, ou inevitável resultante do processamento industrial de hortofrutícolas (Thi et al. 2015).

Já numa perspetiva mais abrangente, o DA pode representar a perda de partes comestíveis na Cadeia de Abastecimento de Alimentos humana (CAA) que pode decorrer em qualquer fase da mesma: produção agrícola, manuseamento pós-colheita e armazenamento, processamento, distribuição e consumo (Parfitt et al. 2010). A Figura 1 ilustra as fases da CAA que podem dar origem a desperdícios e perdas alimentares e na Figura 2 estão representados as percentagens relativas dos desperdícios gerados (neste caso são resíduos hortofrutícolas) ao longo da CAA ao nível global.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (Brassica oleracea var. Botrytis) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

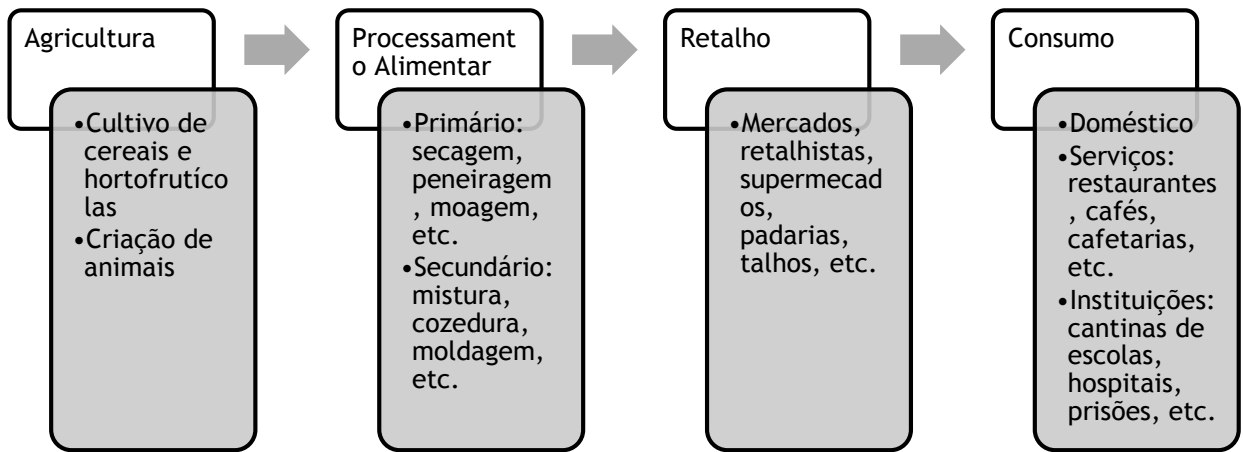


Figura 1 - Etapas da Cadeia de Abastecimento Humana que podem gerar desperdício alimentar. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003)

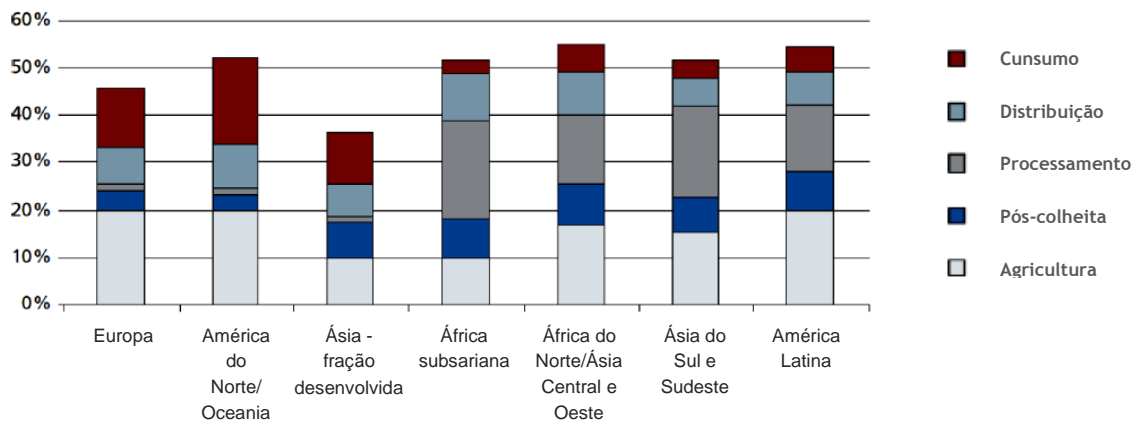


Figura 2 - Distribuição do desperdício alimentar de hortofrutícolas gerado globalmente e ao longo da CAA. Adaptado de (FAO. et al. 2009)

Os desperdícios gerados durante as últimas fases desta cadeia estão sobretudo relacionados com erros humanos na gestão de produção de bens alimentares e são portanto maioritariamente evitáveis. Já os desperdícios associados ao processamento industrial estão sobretudo ligados à natureza da matéria-prima usada para o produto em questão sendo que as partes não comestíveis acabam por ser descartadas e classificadas como resíduos sem valor (Forum 2010).

### *Volume de produção*

Cerca de 1,3 milhões de toneladas de alimentos são perdidos todos os anos, o que representa 1/3 do dos bens alimentares gerados globalmente (Lin et al. 2013). Estima-se que cada país desenvolvido produz em média 107 kg de resíduos *per capita* por ano, sendo que para países em desenvolvimento este valor é bastante inferior. A título de exemplo, o DA médio na Europa e na América do Norte são 95-115 kg/ano enquanto na África e Sul Asiático são 6-11kg (Gustavsson et al. 2011).

Tal como pode ser observado na Figura 3 estes valores demonstram uma grande diferença na produção de DA associada aos padrões de vida da população em análise, sendo que países desenvolvidos oferecem uma qualidade de vida mais elevada, que por sua vez está associada a elevados padrões de qualidade e segurança dos produtos alimentares. Assim, os sistemas económicos e industriais destes países acabam por gerar mais desperdícios de forma a irem de encontro às exigências dos seus consumidores, descartando, por exemplo, toneladas de frutas e legumes que não cumprem os requisitos estéticos mínimos de consumo (Thi et al. 2015).

Já ao nível da União Europeia a produção de resíduos derivados do setor secundário apresenta valores na ordem das 89 mil toneladas por ano, de acordo com os últimos dados recolhidos. Dos países com maior DA industrial encontram-se a Polónia, Holanda e Itália cujos valores de resíduos produzidos foram na ordem das 6 milhões de toneladas em 2006, tal como pode ser observado através do gráfico da Figura 4.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (Brassica oleracea var. Botrytis) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

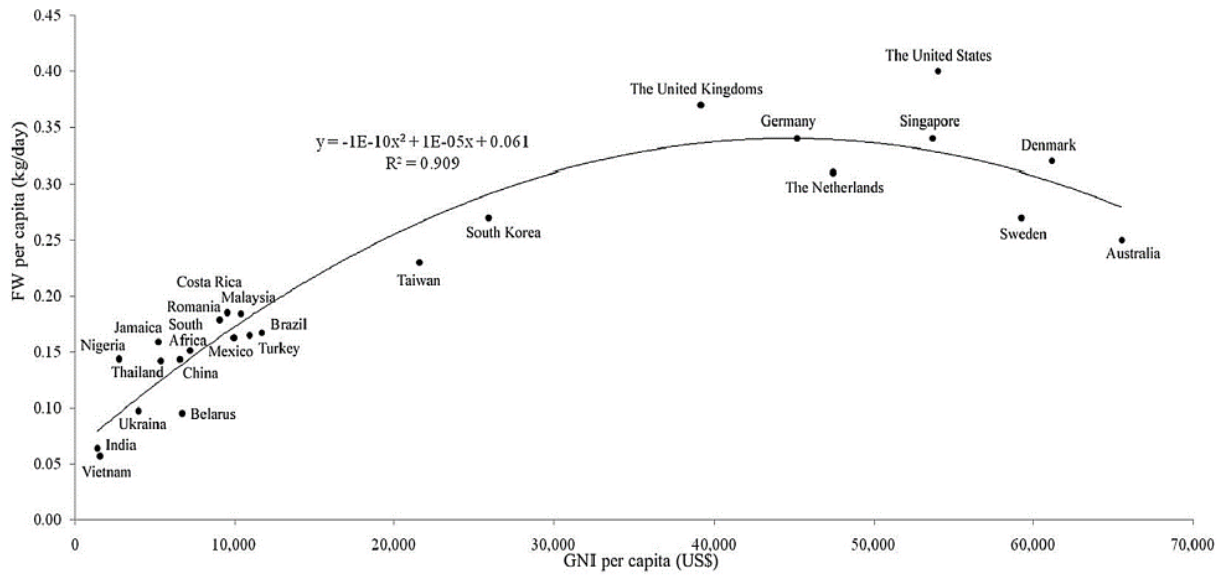


Figura 3 - Distribuição dos desperdícios alimentares (FW – Food Waste) gerados por diferentes países desenvolvidos e em desenvolvimento. Retirado de (Thi et al. 2015)

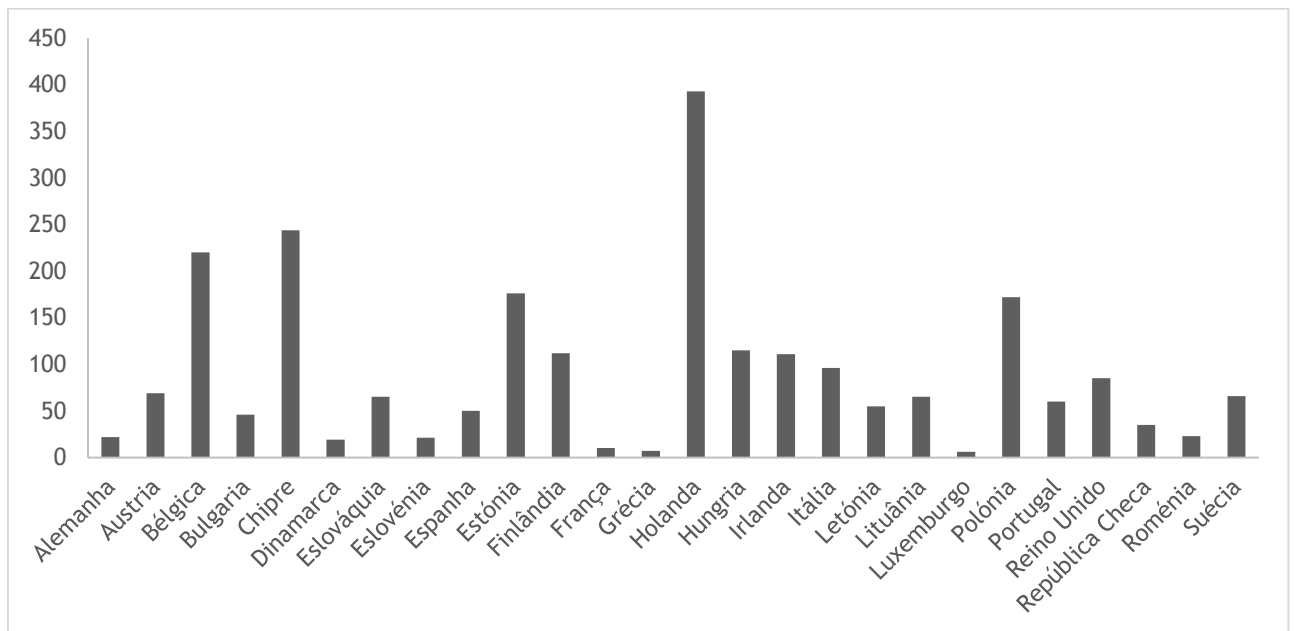


FIGURA 4 - Distribuição dos desperdícios gerados na União europeia em 2006 pelos 27 países-membros. Adaptado de(FAO. et al. 2009)

### Desafios multi-tecnológicos

Apesar dos esforços crescentes dos Governos no sentido de reduzir os desperdícios nas diversas fases da CAA, haverá sempre indústrias cuja produção de resíduos é inevitável, principalmente indústrias que trabalham com produtos hortofrutícolas.

A indústria das bebidas é um dos exemplos máximos de produção de resíduos derivados do processamento de vegetais e frutas – 5 a 9 mil toneladas/ano e 3 a 4,2 mil toneladas/ano de uvas e maçãs, respetivamente) (Lin et al. 2013). Deste modo é importante considerar vias alternativas que vão de encontro às necessidades ambientais, económicas e sociais das indústrias e consumidores (ver Figura 5).

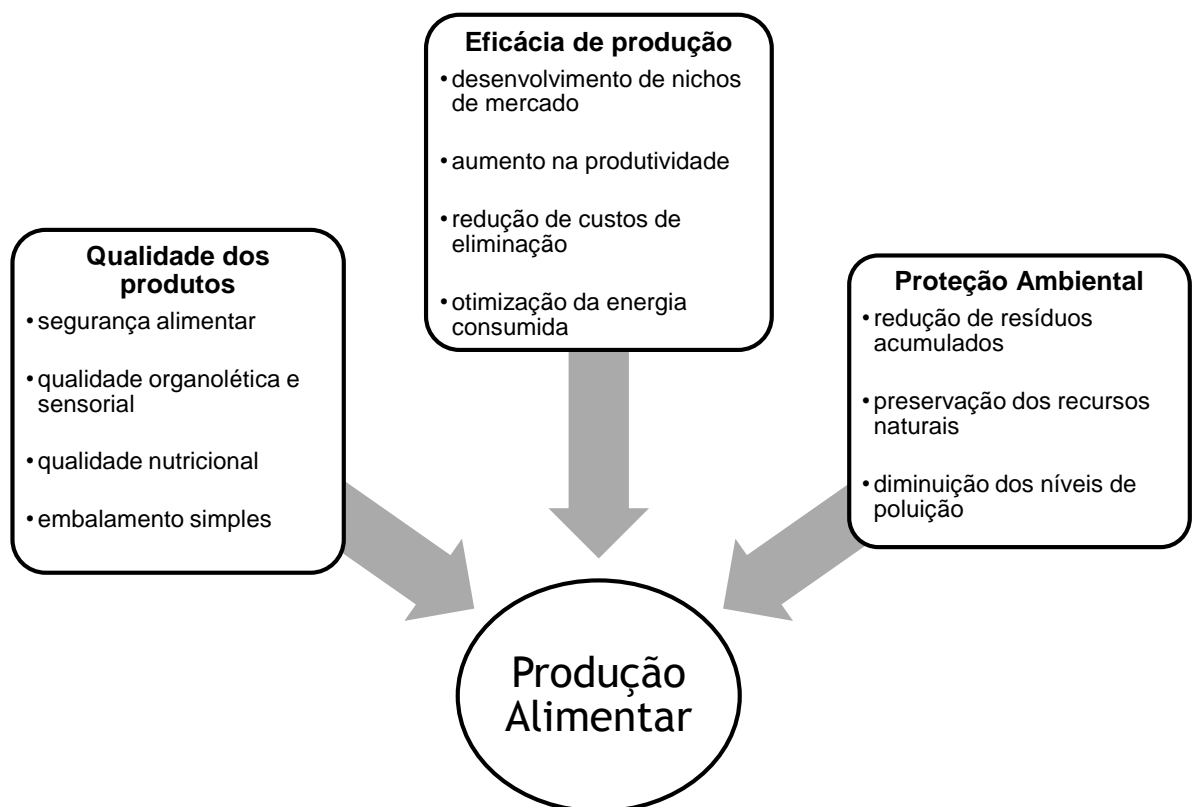


Figura 5 - Exigências das indústrias e consumidores face ao desenvolvimento de novos produtos alimentares. Adaptado de (Lin et al. 2013)

Estas exigências estão concentradas sobretudo no desenvolvimento de tecnologias vantajosas, otimização dos processos para a redução de desperdícios, otimização no uso dos recursos e melhoria na eficácia de produção. Deste modo os desperdícios gerados pelas indústrias podem ter 3 tratamentos diferentes: redução na fonte via modificações na maquinaria, recuperação/reciclagem ou tratamento por desintoxicação, neutralização ou destruição dos componentes indesejáveis. As duas primeiras opções são as que apresentam as estratégias de tratamento de resíduos mais atrativas e promissoras, principalmente no que diz respeito aos problemas ambientais.

O desenvolvimento e incorporação de ingredientes obtidos por extração de compostos bioativos presentes em subprodutos alimentares segue uma estratégia modular, subdividida em várias etapas: caracterização, definição dos objetivos, produção, desenvolvimento de *design*, aplicação e otimização (ver Figuras 6 e 7).

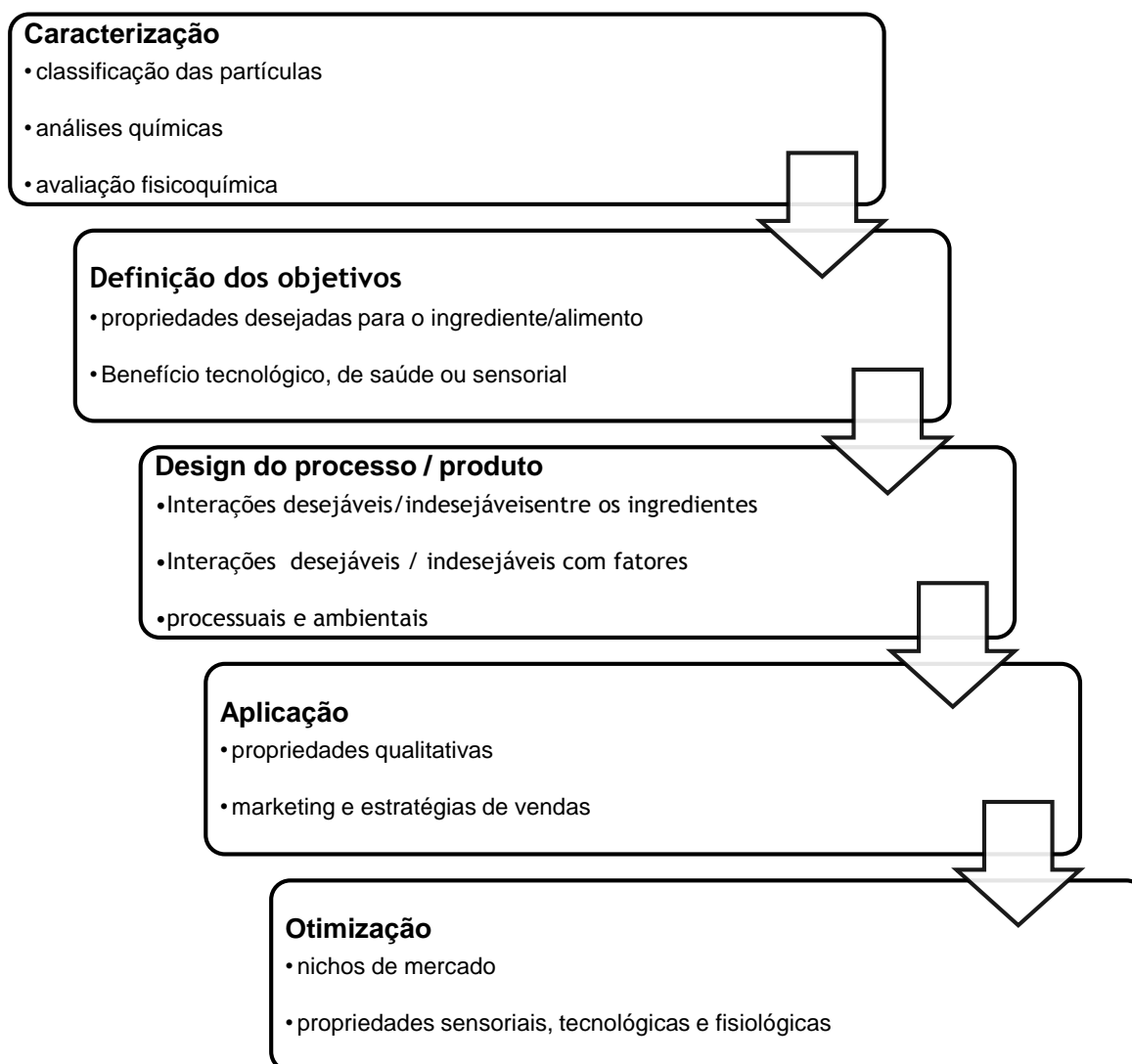


Figura 6 - Estratégia de desenvolvimento e incorporação de ingredientes com origem em subprodutos da indústria agroalimentar . Adaptado de (Lin et al. 2013)



Figura 7 - Conversão de matérias residuais em ingredientes multifuncionais e vice-versa. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003)

Este novo sistema de gestão apresenta uma visão mais abrangente e holística, que ao contrário das estratégias anteriores baseadas em áreas tecnológicas específicas, é definido por um programa de objetivos a curto, médio e longo prazo:

Objetivos a curto prazo – Redução dos riscos e poluição

- Redução dos desperdícios e reciclagem de substâncias com valor, subprodutos e resíduos
- Aumento e ajuste da tecnologia existente para a área particular a aplicar

Objetivos a médio prazo – Aumento da responsabilidade ambiental das empresas associado a vantagens competitivas

- Desenvolvimento e aplicação de processos de produção novos e eficazes
- Revalorização dos subprodutos

Objetivos a longo prazo – Alimentos inovadores que exploram novos nichos de mercado

- Implementação gradual de manufatura que beneficia o meio ambiente
- Desenvolvimento de produtos funcionais

### *Medidas Legislativas*

O aumento da produção de bens alimentares de forma exponencial por parte da indústria agroalimentar acaba por gerar um volume de resíduos também exponencial, dos quais resultam os problemas ambientais, sociais e económicos acima citados. Com vista a reduzir esta tendência marcada, a União Europeia desenvolveu um conjunto de medidas jurídicas que têm como objetivo a monitorização de todo o ciclo de vida dos resíduos, desde o momento inicial em que este é gerado até ao seu processamento final, quer seja ele a eliminação, ou numa perspetiva mais sustentável, a sua reciclagem com posterior revalorização. Existe um conjunto de restrições impostas aos países dos Estados Membros com via a regularizar a quantidade e qualidade dos resíduos gerados a nível industrial, conjunto este que tem por base a Diretiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de novembro de 2008 sobre a gestão de resíduos produzidos ao nível Europeu. Princípios como a prevenção da produção de resíduos, responsabilidade do produtor, estratégia do contaminador-pagador, precaução dos potenciais problemas emergentes e tratamento próximo da fonte regem as respetivas políticas nacionais presentes nos planos de gestão de resíduos de cada um dos países pertencentes à União Europeia (Demirbas 2009).

### *Resíduos da Indústria Hortofrutícola*

Os resíduos hortofrutícolas incluem grãos, frutas e vegetais colhidos como matéria-prima, assim como os respectivos subprodutos processados como cascas, fios, palhas, peles, polpas, pedras, óleos vegetais ou químicos derivados de gorduras vegetais. Os métodos que mais produzem este tipo de resíduos incluem produção não especializada, embalagem, enlatamento, operações de congelamento, fritura e secagem resíduos (Lin et al. 2013). Estes fragmentos são compostos por hidratos de carbono, lípidos, ácidos minerais, compostos inorgânicos (i.e. sílica), fibras alimentares e fitoquímicos como compostos fenólicos, carotenóides e tocoferóis.

Comparativamente aos outros tipos de subprodutos gerados no processamento alimentar, os resíduos vegetais produzidos por este setor são gerados de forma mais concentrada e de difícil tratamento devido a vários problemas bioquímicos associados: biodegradabilidade e diminuição de oxigénio disponível, variação do pH e composição química por alterações no processamento dos alimentos, alta suscetibilidade a contaminações por microrganismos de origem bacteriana e taxas crescentes de acumulação por gestão insuficiente dos resíduos (Laufenberg et al. 2003).

## Revalorização dos subprodutos

### *Práticas tradicionais de gestão de subprodutos*

Até há pouco tempo, os resíduos gerados pela indústria dos hortofrutícolas podiam ter quatro destinos diferentes: depósito em lixeiras, incineração, compostagem ou inclusão em alimentação animal. Associados ao primeiro existem vários problemas legislativos que, tal como foi referido em cima, impedem a sua prática num contexto global de redução de desperdícios alimentares. Além do mais, este tipo de “solução” acarreta perigos severos para o meio ambiente uma vez que expostos ao lixo em decomposição, os recursos naturais envolventes como solos, ar envolvente, recursos aquíferos, etc. acabam por ser contaminados com os microrganismos associados à decomposição natural das matrizes vegetais. Para além do perigo ambiental existe paralelamente um perigo eminente para a saúde humana já que a maioria das lixeiras são mal isoladas e portanto os patogénicos que aí se desenvolvem podem ser transmitidos aos indivíduos através de contacto mínimo com estes desperdícios. Já para não falar dos problemas de odor resultantes da decomposição da matéria orgânica inerente que afetam o meio envolvente onde estas lixeiras se situam. Este é um problema particularmente forte nos países em desenvolvimento, onde faltam estruturas adequadas para tratamento de resíduos deste género (Laufenberg et al. 2003).

### *Incineração*

A incineração de compostos de origem orgânica para produção de energia era também um método de tratamento de resíduos vegetais utilizado até há poucas décadas. No entanto este processo acaba por não ser eficaz a longo prazo uma vez que os resíduos provenientes de Indústrias que processam produtos hortofrutícolas têm uma percentagem demasiado grande de água fazendo destes resíduos matéria com pouca capacidade calorífica (o processo para evaporar a água presente acaba por ser um desperdício energético sem retorno aplicável) (Laufenberg et al. 2003, Lin et al. 2013).

### *Compostagem*

A compostagem é um método utilizado por algumas empresas para reaproveitamento da matéria orgânica presente em desperdícios vegetais numa perspectiva mais ecológica e amiga do ambiente. A sua principal vantagem é a redução da necessidade de fertilização química artificial por parte de companhias agrícolas que usam os produtos derivados da compostagem. No entanto, acaba por ser uma tecnologia limitativa no sentido em que a matéria em decomposição tem de ser altamente monitorizada de modo a controlar as suas propriedades físico-químicas e microbiológicas.

### *Alimentação Animal*

A incorporação de desperdícios de origem vegetal em dietas de animais é também outra técnica de reutilização destes compostos. Apesar das aparentes vantagens económicas deste meio de reciclagem de matéria, já que os produtores de animais acabam por diminuir os gastos associados à utilização de rações artificiais, existem ainda demasiadas barreiras legislativas no que toca ao controlo rigoroso da qualidade destes resíduos em animais criados para o posterior consumo humano. Por sua vez, a introdução em dietas animais formuladas a partir da incorporação destes compostos orgânicos acaba por ser limitativa no sentido em que a sua composição pode apresentar demasiada heterogeneidade bioquímica ao nível da sua composição (lípidos, hidratos de carbono, proteínas, etc.) para poder ser tolerada pelos animais que as consomem. Por exemplo, estudos conduzidos em resíduos de azeitona (Clemente, 1997), maçã (Dhillon et al. 2013) citrinos, (Akbarian et al. 2013) e couveflor (Gasa et al. 1989) mostram que estes são dificilmente digeridos por animais.

### *Limitações*

Apesar de já serem usados há muitas décadas, os métodos acima descritos apresentam várias desvantagens na sua utilização tanto em pequena como em larga escala. Em primeiro lugar todos os resíduos produzidos por determinada Indústria têm que ser transportados desde o local onde são produzidos até ao local onde vão ser tratados/ utilizados. Este facto acarreta custos económicos elevados por parte das empresas que têm de assegurar o seu correto manuseamento e transporte. Segundo, a falta de apoio legislativo na implementação de práticas com menor impacto ambiental leva as Indústrias a optarem pelos métodos tradicionais e mais baratos de gestão residual. Terceiro, apesar da investigação desenvolvida em escala laboratorial no sentido de otimizar novos tipos de processamento dos desperdícios vegetais, ainda faltam conhecimentos técnicos e científicos de modo a

eliminar as barreiras da implementação dos mesmos em larga escala. Finalmente, por muitos esforços que os Governos e as empresas agroalimentares façam no sentido de reutilizar os seus desperdícios vegetais, apenas com aceitação por parte dos consumidores na utilização destes compostos é que os novos métodos de reaproveitamento por extração de micronutrientes bioativos a partir da matéria orgânica industrial desperdiçada poderão ser eficazmente aplicados nos sistemas globais (Laufenberg et al. 2003, Lin et al. 2013).

### *Novas técnicas de gestão de subprodutos*

Conforme referido anteriormente, o conceito de produção sustentável exige o desenvolvimento de novas técnicas de reaproveitamento dos desperdícios materiais gerados a nível Industrial. Neste caso, os resíduos de carácter orgânico oriundos de processamentos diversos de frutas e hortícolas podem ser incorporados no processo de fabricos de novos produtos especializados, de consumo humano ou comerciais, tais como (Laufenberg et al. 2003):

- fibras alimentares para produção de aromas, colorantes, antioxidantes ou antimicrobianos
- pectinas e agentes gelificantes para aplicação em padaria ou bebidas
- bioaromas produzidos por bioconversão
- bioadsorventes autodegradáveis
- membranas de adsorção e filtragem de águas contaminadas

As Tabelas 1 e 2 apresentam um resumo dos principais compostos atualmente extraídos de resíduos de frutas e vegetais com suas respectivas aplicações.

Tabela 1 -Principais compostos bioativos extraídos de subprodutos de frutas e respetivas aplicações. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003)

<b>Resíduos de Frutas</b>	<b>Compostos bioativos</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<i>Maçã</i>	- Pectinas, aldeídos voláteis, etanóis – polifenóis (peles): catequinas, hidroxicinamatos, floretinas glicosídeos, quercetinas glicosídeos e procianidinas	Agentes antioxidantes, propriedades antimicrobianas em dentífricos, agentes gelificantes, aromas de maçã, dieta animal	(Joshi et al. 1996) (Carson et al. 1994) (Almosnino et al. 1991) (Lu et al. 1997, Monteiro et al. 1998) (Foo et al. 1999, Lu et al. 2000) (Lommen et al. 2000) (Yanagida et al. 2000, Schieber et al. 2001) (Christen, Bramorski, Revah, & Soccol, 2000) (Stredansky et al. 2000), (Gasa et al. 1989)
<i>Pêssego</i>	Persipanos (sementes), proteínas, amigdalinas, pectinas	Substitutos de massapão, óleos de amêndoa amarga, potenciadores proteicos, agentes gelificantes, agentes farmacêuticos (inibidores de crescimento)	(Tuncel et al. 1995, Tuncel et al. 1998) (Gandhi et al. 1997) (Pagan et al. 1999, Pagan et al. 2001) (Torre et al. 1995)
<i>Cítricos</i>	- pectina, D-limoneno, etanol, limonóides - flavonoides (peles e sementes): hesperidinas, narirutinas, naringinas e eriocitrinas	Agentes antioxidantes, agentes espessantes em bebidas, agentes estabilizadores e gelificantes, biodiesel, substratos para bioconversão, aromas cítricos, fungicidas em plantações de citrinos, dieta animal	(Braddock 1995, Sreenath et al. 1995) (Grohmann et al. 1994) (Ozaki et al. 1999) (Coll et al. 1998) (Bocco et al. 1998, Manthey et al. 2001), (Chkhikvishvili et al. 1995) (Attri et al. 1996), (Akbarian et al. 2013),
<i>Manga</i>	- Pectinas, etanol, fosfolípidos, monoterpenos - Compostos fenólicos: ácido gálico e elágico,	Estabilizadores de biscoitos, agentes antioxidantes, espessantes e antimicrobianos	(Arogba, 1999) (Larrauri et al. 1996, Larrauri et al. 1997, Puravankara et al.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (Brassica oleracea var. Botrytis) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

	galhetanos e galhotaninos		2000) (John et al. 1999)
<i>Ananás</i>	sacarose, amido, hemicelulose, etanol, bromelaína (enzimas proteolíticas)	biodiesel, substratos para bioconversão, agentes antimicrobianos	(Wrolstad et al. , Tran et al. 1995, Wen et al. 1999, Nigam 2000)
<i>Banana</i>	Amidos, proteínas, etanol, $\alpha$ -amilase, hemicelulases, celulases - Antocianinas: delphinidinas, cianidinas, pelargonidinas, peonidinas, petunidinas e malvidinas - Carotenoides: xantofilas esterificadas com miristato, laurato, palmitato ou caprato	Removedor de manchas em tratamento de águas, agentes antioxidante, colorantes, suplementos nutricionais	(Namasivayam et al. 1992, Krishna et al. 1996, Subagio et al. 1996, Krishna 1999, Medeiros et al. 2000, Pazmino-Duran et al. 2001, Souza et al. 2012)
<i>Guava</i>	Pectinas metoxiladas, ácidos gordos (óleo de sementes), fibras solúveis e insolúveis	Agentes antioxidantes e antimicrobianos	(Jimenez-Escrig et al. 2001)
<i>Papaia</i>	Pectinas, ácidos gordos polinsaturados, proteínas e fibras	Suavizante de carnes, agentes estabilizantes e aromas naturais	(Koubala et al. 2014)
<i>Maracujá</i>	Pectinas, ácido linoleico	Agentes gelificantes e espessantes	(Chau et al. 2004)
<i>Kiwi</i>	Fibras alimentares, ácidos fenólicos, monómeros de flavenóis, dímeros e oligaros e glicosídeos flavonóides	Agentes antioxidantes, agentes espessantes e gelificantes, suplementos nutricionais	(Martincabrejas et al. 1995, Sun-Waterhouse et al. 2009)

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (Brassica oleracea var. Botrytis) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

Tabela 2 - Principais compostos bioativos extraídos de subprodutos de verduras e respetivas aplicações. Adaptado de (Laufenberg et al. 2003)

<b>Verdura</b>	<b>Compostos Bioativos</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<i>Tomate</i>	- Proteínas, ácido linoleico, vitamina B12 - Carotenoides: licopenos e $\beta$ -carotenos	Agentes antioxidantes, suplementos nutricionais, corantes alimentares, rações para animais	(Carvalho et al. 1994, Knoblich et al. 2005, Del Valle et al. 2006, Altan et al. 2008)
<i>Cenoura</i>	- pectinas, ácido urónico, açúcares neutrais - Carotenoides: $\alpha$ -carotenos e $\beta$ -carotenos	Estabilizante de conservas, bebidas energéticas, colorante alimentar, suplemento nutricional	(Yoon et al. 2005, Chantaro et al. 2008, Upadhyay et al. 2010, Koubala et al. 2014)
<i>Cebola</i>	Glicosídeos de quercitina, flavonoides, fructanos e fruto-oligossacarídeos	Agente antioxidante, produção de energia, agente aromático	(Odozi et al. 1985, Hertog et al. 1992, Jaime et al. 2001)
<i>Batata</i>	Ácido fenólico, ácido gálico e ácido caféico	Agentes antioxidantes e antimicrobianos	(Yalcin et al. 2011)

## Tendências do Consumidor

As novas técnicas de revalorização dos subprodutos apenas conseguirão atingir o seu potencial benéfico por excelência se o próprio consumidor aceitar a incorporação desta nova tecnologia no seu dia-a-dia. A teoria de gestão de transição assim como outras teorias de modernização ecológica defendem que os problemas ambientais não podem ser solucionados apenas com medidas ao acaso. O combate às falhas de implementação de sistemas ambientais sustentáveis requer uma reestrutura na própria matriz social, com a transição de valores de cada indivíduo resultantes de uma coevolução dos desenvolvimentos económicos, culturais, tecnológicos, ecológicos e institucionais, a todas as escalas possíveis (Rotmans et al. 2009). As dinâmicas destas transições consistem num intercâmbio de mudanças a múltiplos níveis, incluindo a própria mentalidade de cada pessoa e/ou sociedade (Grin 2012). Deste modo é importante compreender as principais tendências atuais e futuras dos consumidores para que a adaptação destes às novas tecnologias mais sustentáveis seja o mais eficaz possível.

A perceção que cada indivíduo tem sobre a qualidade e segurança alimentar dos produtos que consome é uma forte problemática para o sector agroalimentar, fazendo com que empresas de todo o mundo invistam milhões de euros todos os dias em novas formulações para os ingredientes dos respetivos produtos. À medida que a população humana vai aumentando, crescem também os problemas relacionados com a produção em massa de comida e bebida levando os consumidores a tentar procurar escolhas alimentares alternativas.

Atualmente a população humana ronda os 7.2 milhões de pessoas, número ao qual são adicionados todos os dias são 250 mil. Num planeta onde a quantidade de recursos naturais que podem ser usados é limitada, o aumento exponencial da população humana tem levado a uma sobrecarga na exploração dos sistemas biológicos e sociais que provoca graves problemas a nível da degradação ambiental, como poluição dos recursos aquíferos e marítimos, erosão e diminuição da fertilidade dos solos, perda de diversidade na flora e fauna local, alterações climáticas e subida do nível médio da água dos mares, etc.

Para tentar solucionar alguns destes problemas, foram desenvolvidas novos processos ao nível da produção agricultura e animal de forma a gerar grandes quantidades dos produtos desejados ao mínimo preço, tornando a produção em massa no método mais utilizado para a obtenção de bens alimentícios. Infelizmente o recurso abusivo a métodos de agricultura intensiva desenvolvidos nos anos 40 durante na Revolução Verde teve consequências devastadoras para a Biosfera. Sabe-se hoje que técnicas como pesticidas e fertilizantes azotados produzidos sinteticamente, projetos de irrigação intensiva, etc. provocam um

aumento do *stress* dos sistemas biológicos e sociais e levam à destruição do meio ambiente e dos seres vivos que os rodeiam (Munesue et al. 2015).

A alimentação dos povos é representada por fatores sociais, culturais, económicos, ambientais e nutricionais que se interrelacionam entre si criando um sistema vivo e mutável conforme as condições presentes. Na verdade, questões como a perda de biodiversidade, a erosão dos solos, o degelo dos polos, etc. estão relacionadas com os padrões de produção, distribuição e consumo dos bens alimentares, tornando alimentos de baixo preço económico em produtos demasiado caros para o meio ambiente e para a própria saúde de quem os consome (Reisch et al. 2013).

Todos estes efeitos não deixam de passar despercebidos aos consumidores, que através dos meios de comunicação social têm acesso à informação desenvolvida por investigadores que se ocupam a estudar estas temáticas.

Assim, os consumidores que há alguns anos atrás dirigiam a sua atenção essencialmente para o preço dos alimentos que compravam começam a manifestar novas preocupações face a estas questões eminentes. Das novas exigências fazem parte a preocupação dos alimentos e bebidas ingeridas sobre a saúde, proteção ambiental, bem-estar animal, suporte da economia local e estilo de vida saudável. Todos estes fatores levam a um aumento do interesse público em atingir um “consumo sustentável”. Este é um termo recente que procura agregar um conjunto de conceitos sobre a redução do *stress* ambiental ao mesmo tempo que procura ir de encontro às necessidades básicas humanas (Vittersø et al. 2015).

Alguns críticos defendem que a produção de bens alimentares através de tecnologias “amigas do ambiente”, confeccionados com ingredientes simples e naturais e comercializados nos mercados nacionais e internacionais de forma sustentável possa ser apenas uma miragem económica resultante da exploração moderna de um novo nicho de mercado. Mas as evidências adquiridas ao longo dos últimos anos tendem a contrariar esta linha de pensamento.

Vários desenvolvimentos no sistema alimentar humano são descritos como fatores que podem estar associados a uma mudança de comportamento reflexiva dos consumidores. Em primeiro lugar, foi observado nos últimos anos uma diferenciação dos mercados que faz com que os retalhistas possam oferecer uma gama cada vez maior de produtos alimentares de diferentes qualidades. Os alimentos deixaram de ser simplesmente um meio para satisfazer uma necessidade básica chamada fome, mas transformaram-se numa fonte de prazer e uma forma de marcar um *status* social. Em segundo lugar, vários escândalos alimentares permanecem ainda na memória de muitos indivíduos, particularmente durante os anos 90, com surtos de BSE e salmoneloses, bem como desenvolvimentos controversos

em questões ligadas à agricultura, como a expansão da utilização de Organismos Geneticamente Modificados ou a crescente preocupação com o bem-estar animal. As fraudes de produtos ao longo da cadeia alimentar são também um motivo de preocupação para as autoridades reguladoras da segurança alimentar, nacionais e internacionais. A confiança do consumidor na Agroindústria, autoridades de segurança alimentar e outros agentes nos sistemas alimentares convencionais tem sido abalada em muitos países e os consumidores preocupam-se em conhecer o processo de fabrico dos alimentos que ingerem. Em terceiro lugar, os consumidores preocupam-se cada vez mais em procurar produtos alternativos, cujos ingredientes sejam “frescos” e “naturais”, conceitos associados ao aumento de saúde, paralelamente a uma procura por redes de produção de bens alimentares com cadeias de fornecimento mais curtas e transparentes. Todos estes aspetos alteram progressivamente o foco na investigação nos sistemas de produção de alimentos para dar um ênfase cada vez maior à forma como os alimentos são consumidos. Tem havido um interesse crescente no potencial poder do consumidor enquanto elemento-chave que promove mudanças na forma de produção e acondicionamento dos produtos alimentares ao longo da CAA de modo a torná-la mais ecológica (Goodman 2003, Vittersø et al. 2011, Kirwan et al. 2013, Vittersø et al. 2015).

## Compostos bioativos em *Brassicacae*

Os vegetais crucíferos são uma das melhores fontes de antioxidantes e antimicrobianos naturais devido ao seu elevado conteúdo em glucosinatos, isotiocianatos, carotenóides, tocoferóis e ácido ascórbico. Devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, os compostos fenólicos e glucosinatos podem ser usados em produtos alimentares como conservantes naturais, preservando as suas características organolépticas e nutricionais por um maior período de tempo (Barry-Ryan 2015).

A família *Brassicaceae* (= *Cruciferae*) consiste em 350 géneros e cerca de 3500 espécies, incluindo os géneros *Camelina*, *Crambe*, *Sinapis*, *Thlaspi* e *Brassica*. O género *Brassica* é um dos mais importantes dentro do grupo *Brassicaceae* que inclui culturas como *Brassica oleracea* L., *Brassica napus* L. e *Brassica rapa*, algumas das plantas com maior impacto na economia e alimentação global, com um mercado particularmente forte na China, Japão, Índia e países europeus (ver Tabela 3). Na Tabela 4 estão representadas algumas das espécies mais consumidas a nível global.

Tabela 3 - Quadro resumo da área plantada e volume de produção de Brassicacae em 2011. Adaptado de (FAOSTAT, 2011)

	Área plantada (hectares)	Produção (toneladas)
<b>Mundo</b>	1 204 257	21 266 789
<b>África</b>	17 438	396 150
<b>América</b>	152 706	942 355
<b>Ásia</b>	916 075	17 820 111
<b>Europa</b>	113 986	1 999 673
<b>Espanha</b>	6 400	138 700
<b>Portugal</b>	3 700	48 400

Estas espécies podem ter diversos usos como óleos, forragem, condimentos, plantações para alimentação conforme a parte de interesse: talos, gomos, inflorescências, folhas, raízes ou sementes. Uma das espécies vegetais principais é a *B. oleracea*, que inclui formas como couve, repolho, brócolo, couve-de-bruxelas, entre outros. *B. rapa* inclui vegetais como nabo, couve chinesa, e *pak-choi* juntamente com outros tipos de forragem e sementes. O grupo das *B. napus* inclui não só sementes para óleos, como por exemplo a colza, mas também folhas de nabo usadas essencialmente em forragens. Já no grupo das mostardas destacam-se as espécies *B. carinata*, *B. nigra* e *B. juncea* usadas para fabricar condimentos, embora as folhas de *B. juncea* possam ser também consumidas como vegetais frescos ou processados, produtos largamente comercializados nos mercados de países asiáticos (Cartea et al. 2011). A couve-flor e os brócolos são vegetais pertencentes à subespécie *Brassica Oleacea* com um grande impacto a nível global e uma variedade de aplicações como ingrediente em saladas, sopas, purés etc. Na tabela 4 estão descritos os valores de área plantada e volume de produção em 2012 (FAOSTAT 2012)

Tabela 4 - Principais espécies de *Brassicaceae* consumidas a nível global. Adaptado de (Wu et al. 2009)

<b>Género espécie (subespécie)</b>	<b>Vegetal</b>
<i>Armoracia lapathifolia</i>	Rábano
<i>Brassica camoestrís (rapífera)</i>	Nabo branco
<i>Brassica camoestrís (oleífera)</i>	Colza
<i>Brassica napus (napobrassica)</i>	Nabo
<i>Brassica oleracea (capitata)</i>	Couve roxa/branca
<i>Brassica oleracea (sabauda)</i>	Couve Savoy
<i>Brassica oleracea (gemmífera)</i>	Couve-de-bruxelas
<i>Brassica oleracea (cauliflora)</i>	Couve-flor
<i>Brassica oleracea (cymosa)</i>	Brócolos
<i>Brassica oleracea (laciniata)</i>	Couve-de-folhas
<i>Brassica pekinensis</i>	Couve chinesa
<i>Lepidium sativum</i>	Agrião verde
<i>Nasturtium officinale</i>	Agrião
<i>Raphanus sativus</i>	Rabanete
<i>Sinapis alba</i>	Mostarda Branca
<i>Carica papaya</i>	Papaia

Existem fortes evidências epidemiológicas de que as moléculas bioativas incluídas nas *Brassicaceae* acima descritas podem ajudar a proteger o corpo humano contra o envelhecimento e doenças crónicas associadas. Assim, o consumo de plantas *Brassica* está normalmente associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças crónicas,

incluindo doença cardiovascular e cancro (Beecher 1994, Fahey et al. 1999, Wu et al. 2009), que por sua vez está associado à abundância de fitoquímicos promotores de saúde como vitaminas, carotenoides, fibras, açúcares solúveis, minerais, glicosinatos e compostos fenólicos (Podsędek 2007)

### *Estrutura e função de glicosinatos e isotiocianatos*

Os glicosinatos são um grupo de compostos sulfurados cuja estrutura normalmente apresenta um grupo  $\beta$ -D-tioglicose, uma parte de oxímeros sulfonados e uma cadeia lateral variável derivada de diversos aminoácidos (ver Figura 8). Mais de 100 glucosinatos foram já identificados sendo que a sua classificação pode ser distribuída por 4 subtipos: alifáticos saturados, alifáticos insaturados, aromáticos e indolilos (Wu et al. 2009). Estes compostos podem ser encontrados no reino vegetal, com uma forte presença em hortícolas da família das Brassicas, que tipicamente contém 0,5-28  $\mu\text{mol}$  de glucosinatos alifáticos e aromáticos/grama de peso seco e 0,7-8 glucosinatos indolílicos/grama de peso seco (Wu et al. 2009).

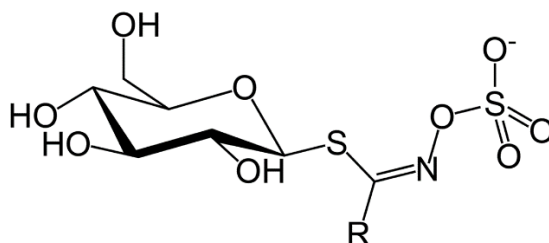


Figura 8- Estrutura geral de um glicosinolato

Os isotiocianatos são moléculas de baixo peso molecular que consistem em compostos alifáticos e aromáticos resultantes da ação da enzima endógena mirosinase no glicosinatos, que ocorre aquando do rompimento de tecidos vegetais (Wilson et al. 2013). A mirosinase está normalmente expressa na superfície externa da parede celular das plantas enquanto os glucosinatos estão normalmente localizados no citoplasma das células vegetais e desta forma inacessíveis à enzima. Quando os tecidos são rompidos por

mastigação, aquecimento, ou ataques de insetos, a mirosinase interage com os glucosinatos libertados, dando origem aos respetivos produtos hidrolisados. A maioria dos isotiocianatos absorvidos por mamíferos a partir da ingestão de vegetais é formada pela ação da mirosinase produzida por bactérias do trato gastrointestinal.

Estes compostos têm demonstrado efeitos inibitórios na atividade de vários fungos e patogénicos alimentares incluindo espécies de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Serratia*, *Staphylococcus* e *Listeria* (Davidson et al. 2007, Mari et al. 2008). As bactérias Gram-negativo são normalmente mais sensíveis a este grupo de moléculas do que as bactérias Gram-positivo, devido à sua interação com sulfidril-enzimas que estão envolvidas em funções celulares vitais e com estruturas que protegem danos celulares (Luciano et al. 2009).

#### *Estrutura e função de compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos são um dos fitoquímicos com capacidade antioxidante mais importante (De Nicola et al. 2010). Estes são uma classe de compostos químicos referentes a um grupo diverso de moléculas (mais de 8000) largamente presentes no reino vegetal e conhecidas por conterem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo. Os compostos fenólicos aparecem em plantas como metabolitos secundários são originados pela via do ácido xiquímico a partir de hidratos de carbono ou pela via do acetato-polimalato (acetil CoA e malonil CoA).

O espectro dos compostos fenólicos pode ir desde moléculas simples de baixo peso molecular com anéis aromáticos simples até taninos complexos e outros polifenóis derivados (Ferreira et al. 2005). Normalmente encontram-se conjugados com açúcares e ácidos orgânicos podem classificados de acordo com o número e rearranjo dos seus átomos de carbono em flavonoides como flavonoles, flavonas, flavan-3-óis, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas, etc. e não flavonóides como ácidos fenólicos, hidroxicinamatos, stilbenos, entre outros (RiceEvans et al. 1996). O grupo de polifenóis mais importante presente nas espécies de *Brassica* são os flavonóides, principalmente flavonóis e antocianinas assim como ácidos hidroxicinâmicos.

### Flavonóides

Os flavonóides são o grupo de compostos polifenólicos com presença mais forte no reino vegetal. Esta classe de moléculas é essencialmente constituída por um esqueleto de 15 átomos de carbono distribuídos por dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico, ou seja C6-C3-C6. A sua concentração é predominante na epiderme de folhas e frutas. Enquanto metabolitos secundários, os flavonóides fazem parte de diversos processos biológicos importantes para a sobrevivência das plantas que os sintetizam, processos como proteção contra os raios ultra-violeta, pigmentação e resistência a pragas (Boudet 2007). Os flavonóides como o kaempferol e a quercitina (ver Figura 9) são a classe de flavonóides mais importante nas espécies de *Brassica* e estão normalmente estruturados como O-glicosídeos, frequentemente conjugados na 3ª posição do anel de carbono embora as substituições possam também ocorrer nas posições 5, 7, 4', 3', e 5'. A glucose é um dos principais açúcares conjugados nos vegetais *Brassica*, frequentemente suscetíveis a acetilação por ácidos hidroxicinâmicos.

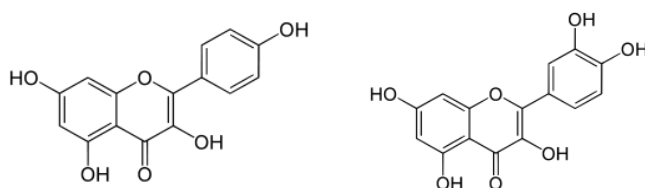


Figura 9 – Exemplos de flavonóides: kaempferol (esquerda) e quercitina (direita)

### Antocianinas

As antocianinas, um dos pigmentos vegetais mais conhecidos pelo seu uso em corantes alimentares, fazem também parte do grupo dos flavonóides com propriedades antioxidantes e outras qualidades benéficas. As antocianinas são formas conjugadas das antocianidinas presentes em frutos e flores, onde desempenham funções de proteção contra o excesso de luz e atração de insetos polinizadores (Agati et al. 2013). A estrutura química das antocianinas determinam a estabilidade, intensidade de cor ou a potencial atividade biológica. As antocianinas mais comuns em culturas de *Brassica* são a pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (ver Figura 10) (Tatsuzawa et al. 2006, Scalzo et al. 2008, Moreno et al. 2010).

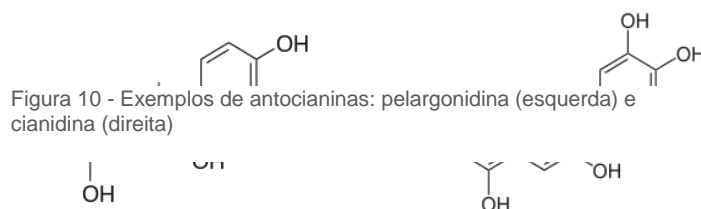


Figura 10 - Exemplos de antocianinas: pelargonidina (esquerda) e cianidina (direita)

### Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos são um tipo de polifenóis não-flavonoides, caracterizados pela sua estrutura C6-C3, que marcam forte presença pelas suas funções de defesa estrutural e química em plantas. Estes ácidos podem ser encontrados livremente ou associados a componentes de polímeros vegetais (parede celular). Os derivados de ácidos hidroxicinâmicos mais comuns em vegetais Brassica são os ácidos sinapínico e ferúlico (ver Figura 11), frequentemente conjugados com outros açúcares ou outros ácidos hidroxicinâmicos.

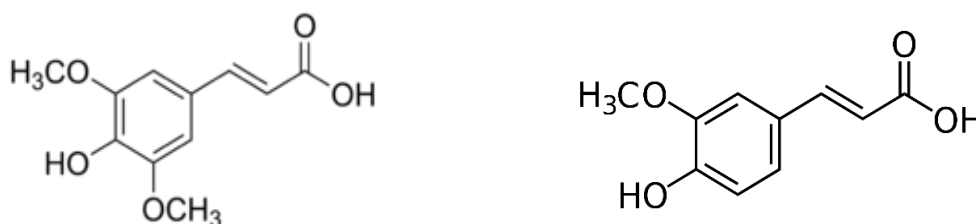


Figura 11 - Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos: ácido sinapínico (esquerda) e ferúlico (direita)

### Composição fenólica em *Brassica oleracea*

Vários estudos reportam a presença de compostos fenólicos em diferentes culturas de *B. oleracea*, compostos estes que se encontram distribuídos conforme o tipo e a parte da planta que os sintetiza. Folhas internas e externas de diferentes espécies de couve apresentam concentrações distintas de compostos fenólicos como quercetina, kaempferol e derivados de ácidos fenólicos. No entanto as folhas contém quantidades superiores de compostos fenólicos que caules e inflorescências (Ferrerres et al. 2005, Sousa et al. 2005, Ferreres et al. 2006, Sousa et al. 2007).

Vários estudos foram realizados no sentido de identificar os compostos fenólicos de plantas desta espécie. Foram descobertos 22 compostos derivados de kaempferol e ácidos ferúlicos e sinápicos (Llorach et al. 2003) sendo que os flavonóis glicosídeos com maior presença em brócolos foram a quercitina e o kaempferol 3-O-sulfurosido-7-O-glicosido e outros glicosídeos menores como isoquercitrinas e 3-O-diglucosídeos de kaempferol. Por outro lado, culturas de couve branca e negra, couve-flor e couve tronchuda apresentam conteúdos elevados de compostos fenólicos como kaempferol e 3-O-sulfurosido-7-O-glicosídeos e as suas respetivas combinações com ácidos hidroxicinâmicos, principalmente quercetina 3-O-(cafeoil/sinapoil)-sulfurosido-7-O-glicosídeos de quercitina (Gratacós-Cubarsí et al. 2010).

As antocianinas também estão presentes nas Brassicas, bastante visíveis enquanto pigmentos coloridos na couve roxa ou na couve-flor. As principais antocianinas identificadas foram 3-O-(sinapoil)(feruloil)diglicosídeo-5-O-glicosídeo de cianidina e 3-O-(sinapoil)(sinapoil)diglicosídeo-5-O-glicosídeo de cianidina cinâmicos. Uma das

particularidades especiais das antocianinas de vegetais Brassica são a sua conjugação rara com uma ou mais moléculas de ácidos cinâmicos. As formas esterificadas com *p*-coumaril e feruloil de cianidino-3-soforoside-5-glucosídeos têm uma presença predominante na couve-flor, enquanto na couve-roxa predominam os ésteres ramificados (Scalzo et al. 2008). Foram encontrados valores significativos de ácidos hidroxicinâmicos em diversos hortícolas da espécie *B.oleracea* (incluindo couve-flor) sendo os ácidos hidroxicinamoil gentiobiosídeos e hidroxicinamoilquinicos os de maior concentração (Vallejo et al. 2004).

## Tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas

A tecnologia de altas pressões teve origem no final do século XX como técnica emergente não-térmica que conseguia alcançar o mesmo nível de segurança alimentar que a pasteurização por calor além de ir de encontro às exigências do consumidor relativamente à preservação do sabor fresco em produtos minimamente processados.

As alterações químicas em alimentos sujeitos à tecnologia de HPP são mínimas pois a pressão normalmente aplicada durante os tratamentos através da tecnologia HPP – de 100 MPa a 700 MPa afetam apenas ligações moleculares mais fracas como por exemplo pontes de hidrogénio e portanto as ligações covalentes permanecem inalteradas (Mújica-Paz et al. 2011). Deste modo, a aplicação de altas pressões pode inativar patogénicos e enzimas e modificar as suas estruturas com efeitos colaterais inferiores a outros tratamentos térmicos nas características físicas – sabor, cheiro, cor, textura, etc. - dos produtos alimentares, uma vez que as estruturas de alto peso molecular como proteínas, hidratos de carbono podem ser alterados, enquanto componentes de baixo peso molecular ligados às propriedades organoléticas e nutricionais como compostos voláteis, pigmentos, vitaminas componentes parecem não ser afetados quando submetidos a esta tecnologia (Rastogi et al. 2007).

A técnica de HPP é reconhecida pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos como processo ecologicamente sustentável, aprovando o seu uso em produtos para consumo humano (Barbosa-Cánovas et al. 2008). As suas aplicações mais importantes são a extração de componentes químicos de extratos vegetais ou a conservação de produtos alimentares por inativação microbiológica e aumento da capacidade antioxidante. Na Figura 12 podemos encontrar os dados referentes ao crescimento no uso da tecnologia HPP nas últimas décadas.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

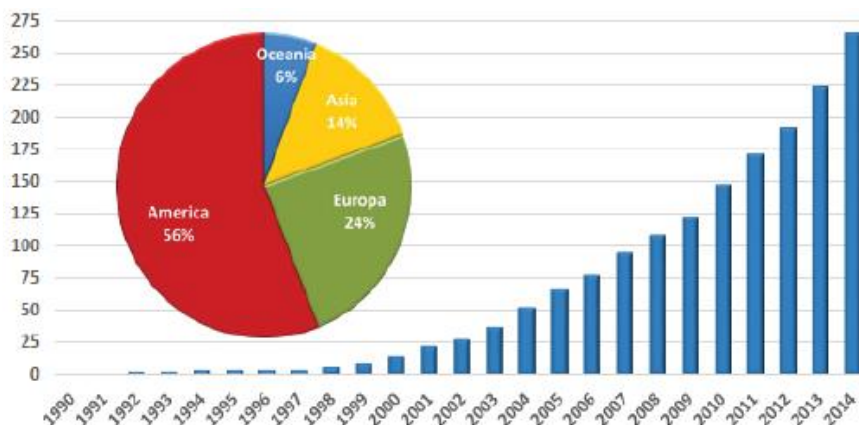


Figura 12 - Evolução no uso de equipamentos HPP e respectivos produtos alimentares onde é aplicado. Retirado de (Elamin et al. 2015)

### *Funcionamento Geral*

Um sistema de HPP típico é mostrado na Figura 13 que consiste numa câmara cilíndrica pressurizada de aço altamente resistente, um sistema gerador de pressão no qual um mecanismo bombeador funciona com uma bomba hidráulica, um sistema múltiplo de pressão e finalmente um sistema controlador de temperatura. Após a preparação das amostras às quais se quer retirar os respetivos compostos bioativos, estes são colocados na câmara pressurizada previamente preenchida com um fluido pressurizante. Esta câmara, juntamente com as válvulas associadas é fechada e pressão aumenta por substituição o ar da câmara pelo líquido pressurizante até atingir a pressão desejada. Assim que essa pressão é alcançada, as válvulas supracitadas fecham o circuito o que permite ao equipamento manter essa pressão durante o período de tempo necessário sem aumento adicional de energia. Enquanto a amostra é submetida ao tratamento a temperatura vai sendo monitorizada permanentemente dentro da câmara através de termómetros imersos no líquido de pressurização. Uma vez terminado o tratamento a câmara é descomprimida e as amostras retiradas para fora.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

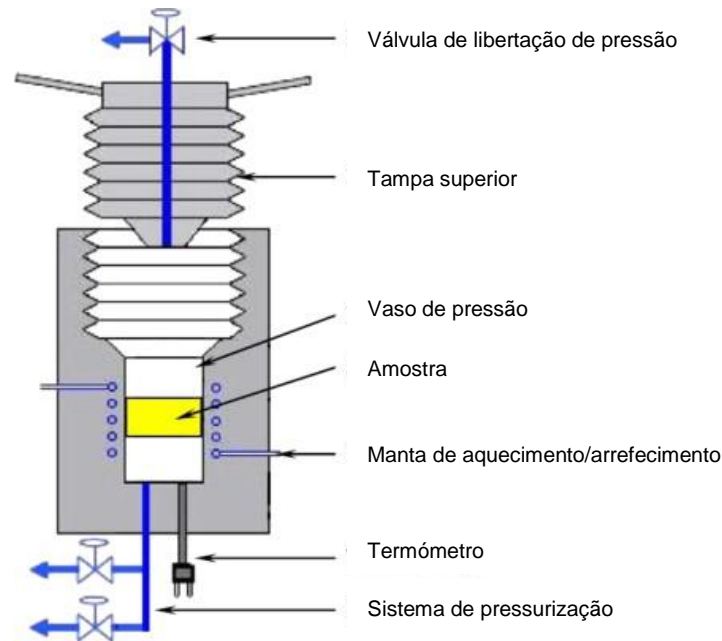


Figura 13 - Esquema geral de um sistema de HPP. Adaptado de (Huang et al. 2013)

### *Vantagens do processo HPP*

O HPP, ao contrário de outros métodos convencionais, provoca a compressão instantânea e uniforme do material sobre o qual é aplicado, alterando as suas condições de superfície, rearranjos moleculares e propriedades físicas. Uma vez que a pressão é transmitida é independente do binómio tempo/massa, os tratamentos são realizados por curtos períodos de tempo. Quando aplicado a técnicas de extração promove o equilíbrio das reações químicas, acelera a penetração do solvente, diminui o tempo de dissolução dos compostos ativos e aumenta a sua taxa de difusão e extração, aumentando assim a própria eficácia do processo. Dado que o HPP usa um meio líquido facilmente compressível, as operações de extração podem ser realizadas usando equipamentos relativamente simples, de fácil operação e com melhores e mais rápidos protocolos de extração (Huang et al. 2013). Além do mais, o efeito de HPP é independente da geometria/tamanho dos produtos e amostras, ou seja a escalonagem das investigações realizadas em laboratório para modelos aplicados à escala indústrias é relativamente simples e segura. Estas características são também importantes quando se verificam necessidades de alterações e/ou renovações dos equipamentos industriais para unidades maiores ou quando novas condições de mercado exigem mudanças na geometria ou no tamanho do produto alimentar, uma vez que nenhuma destas alterações requiere novas determinações de pressão ou condições externas (tempo, temperatura, pH, etc.) para poder ser eficazmente aplicada (Mújica-Paz et al. 2011).

Muitos componentes dos tecidos vegetais são termosensíveis e acabam por ser danificados ou destruídos quando expostos a altas temperaturas.

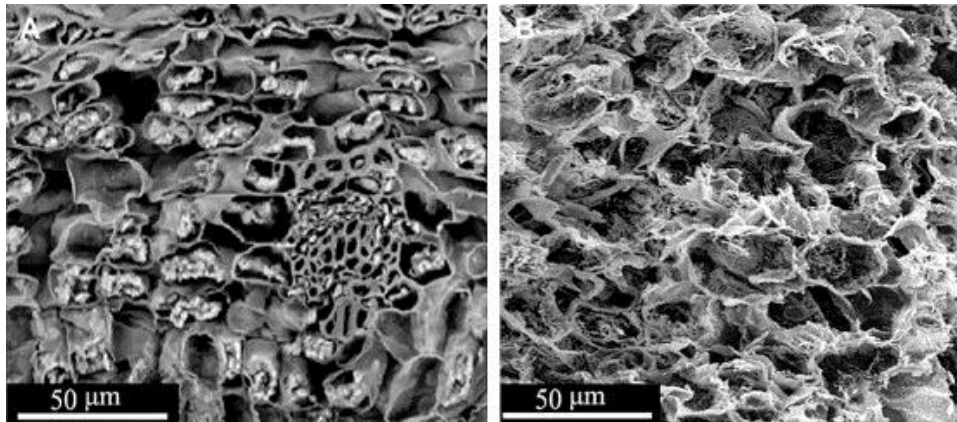


Figura 14 - Folhas de chá verde ao microscópio eletrônico sem (A) e com (B) tratamento por HPP

Em comparação com os métodos de extração tradicionais que usam calor e agitação para aumentar a solubilidade e eficácia de transferência de massa dos compostos desejados, o HPP funciona a temperatura ambiente, resultando numa preservação das estruturas naturais dos nutrientes e substâncias bioativas. A Figura 14 mostra imagens de micrografia obtidas por microscopia de varrimento eletrónica de folhas de chá verde sem tratamento (A) e as mesmas folhas com tratamento HPP (B), respetivamente. Na amostra controlo observam-se paredes celulares num estado ordenado e intacto enquanto que as células vegetais expostas a altas pressões hidrostáticas apresentam-se altamente quebradas e porosas com formas soltas e distorcidas. Deste modo, o solvente usado para extração pode facilmente entrar nas células através das fendas criadas pelo tratamento para rapidamente entrar em contacto com as substâncias sólidas e transferir os compostos importantes para o exterior das células vegetais (Jun et al. 2011).

No processamento HPP a pressão é aplicada de forma uniforme e instantânea ao material da amostra e pode ser transmitida em todas as direções dentro de um relativo curto período de tempo. Quanto ao consumo de energia, é necessário apenas uma pequena quantidade para comprimir uma matriz sólida ou líquida a 500 MPa, em comparação com o processo de aquecimento até 100°C (Pereira et al. 2010). O custo médio de uma aplicação de HPP é aproximadamente 0.05 a 0.5€ por litro ou quilograma, dependendo das condições de processamento. De acordo com a literatura a energia consumida pelo HPP é cerca de 80% da energia consumida pela tradicional extração de aquecimento por refluxo (Toepfl et al. 2006).

Além do mais, as altas pressões provocam moldagem e corrugação das paredes celulares, o que resulta em alterações na microestrutura que por sua vez afetam propriedades de textura devido à perda de turgor celular e integridade celular. Estudos anteriores indicam

que as alterações ao nível da permeabilidade celular são a principal causa da degradação da textura em diversas frutas (Bermúdez-Aguirre et al. 2011).

Os tratamentos HPP são implementados num contexto de ambiente fechado e portanto não ocorre volatilização dos solventes, reduzindo o seu potencial perigo ao nível da poluição ambiental. Até há data não existem dados que mostrem nenhum efeito negativo para a saúde humana no consumo dos produtos submetidos a esta técnica, sendo portanto segura para extração de compostos bioativos de matrizes naturais (Pereira et al. 2010).

### *HPP na extração de compostos bioativos*

A extração é uma técnica usada para obter componentes de uma mistura sólida ou solução e desempenha uma função indispensável na preparação de amostras, investigação científica e análise de qualidade de compostos bioativos. Nos últimos anos as técnicas de extração têm sido desenvolvidas no sentido de diminuir tempos operacionais, redução do consumo de solventes orgânicos, e aumento da eficácia de extração, com o objetivo de reduzir custos económicos e ambientais. Atualmente podem ser encontradas várias alternativas incluindo extração ultrassónica, extração de fluidos supercrítico, extração por micro-ondas e extração por altas pressões hidrostáticas. Uma vez que estes métodos gastam demasiado tempo e têm pouca eficiência a maioria destes métodos requerem algum grau de aquecimento, o que pode facilmente ter consequências negativas para ingredientes termo-sensíveis, perdendo a sua atividade biológica ou transformação/ degradação noutras substâncias. Para tirar o máximo de partido da amplitude diversa de materiais bioativos, os compostos de interesse devem ser separados da sua matriz natural por extração e recuperação antes de serem purificados e usados. Os métodos de extração usados tradicionalmente como extração por Soxhlet, extração por agitação, extração liquido-sólido, etc. são processos que têm tempos de processamento ou reação demasiado largos, necessitam de grandes quantidades de amostras e solventes orgânicos. Mais ainda, o aquecimento prolongado reduz a atividade dos compostos desejados, a sua concentração após extração é baixa e apresenta elevados custos para o meio ambiente e para a saúde humana (Mustafa et al. 2011)

Enquanto método de extração, a tecnologia HPP começou a ser explorada em 2004 concluindo-se que diminuía efetivamente o tempo de extração ao mesmo tempo que aumentava a eficiência do processo. Neste processo a mistura do material vegetal e do solvente era tratada sob altas pressões isostáticas hidráulicas durante um certo período de

tempo, após o qual era rapidamente libertado e a mistura resultante é separada e filtrada (Huang et al. 2013).

A maioria dos produtos naturais como frutas e hortícolas são ricos em fontes de diversos micronutrientes e fitoquímicos biologicamente ativos (Wang et al. 2015). A aplicação da tecnologia HPP em extratos frescos de plantas pode, portanto, ser extremamente útil para obtenção destes compostos e poder usá-los no desenvolvimento de produtos mais saudáveis e naturais para o consumidor. A técnica de HPP já foi usada para extrair com sucesso vários compostos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes como flavonóides de lúpulo e mosto de cerveja (Santos et al. 2013) licopenos de polpa de tomate (Xi 2006), antocianinas de peles de uvas (Corrales et al. 2008), pectinas de cascas de laranja (Guo et al. 2012), ginsenosídeos de *ginseng* (Shin et al. 2010) e polifenóis de folhas de chá verde (Xi et al. 2009). Nestes estudos foi demonstrada a eficácia no poder extrativo, no aumento da qualidade e concentração dos compostos ativos obtidos em comparação com outras técnicas tradicionalmente usadas. A técnica de HPP aumenta a velocidade de transferência de massa alterando a concentração do gradiente e difusividade por danificação da membrana celular e aumentando a sua permeabilidade, aumentando deste modo a penetração dos solventes de extração nas células. Tudo isto resulta na diminuição do tempo de processamento, redução de custos e melhoramento na segurança do processamento (Jun et al. 2011).

Uma vez que os tratamentos por altas pressões resultam na disrupção dos tecidos vegetais, parede celular, membranas e organelos, torna-se mais fácil a transferência de massa do solvente para o material vegetal e dos constituintes solúveis para o solvente.

Tal como foi descrito anteriormente, o processamento por HPP consiste em 3 etapas principais: aumento da pressão, estabilização/tratamento e despressurização. Durante a primeira fase a pressão aumenta desde valores atmosféricos até ao valor desejado num curto espaço de tempo. Este diferencial de pressões provocado de forma brusca dentro e fora das células causa deformação celular e destruição da sua parede, o que permite ao solvente penetrar mais depressa através das membranas destruídas. E neste ponto podem acontecer duas situações distintas: por um lado, se a pressão não for suficientemente alta, o volume do material não será comprimido ao ponto de exceder o limite de deformação celular, pelo que o solvente de extração entra rapidamente no tecido vegetal através dos microcanais da parede celular e por causa do diferencial de pressões acima descrito as células são preenchidas pelo solvente num curto espaço de tempo, durante o qual os compostos ativos se dissolvem por contacto direto. Por outro lado a pressão aplicada por ser demasiado forte provocando quebras na parede celular e diminuindo, conseqüentemente, a resistência à transferência de massa dos biocompostos ativos que

acabam por sair das células vegetais e se dissolvem no meio de extração. Durante a fase de estabilização ocorre uma mudança rápida na pressão o que resulta na alteração do volume do material da amostra e um aumento na difusividade entre o gradiente de concentração e o solvente de extração. A pressão aplicada é mantida pelo período de tempo necessário para equilibrar a pressão dentro e fora das células vegetais, período durante o qual o solvente de extração penetra rapidamente nas células e entra em contacto com o conteúdo celular, dissolvendo os compostos ativos num curto espaço de tempo. O volume de compostos extraídos pode ser aumentada através do prolongamento do tempo de aplicação da pressão ou por aumento desta. A matriz dos tecidos vegetais tem normalmente uma estrutura ordenada, completa e compacta com organelos celulares distribuídos pelo seu interior.

Na fase final do tratamento a pressão é libertada em poucos segundos sendo que a pressão dentro das células diminui rapidamente desde a pressão aplicada até à pressão atmosférica alterando ligações não covalentes como pontes de hidrogénio, ligações iónicas e interações hidrofóbicas ou de Van der Waals que mantêm as estruturas tridimensionais das moléculas orgânicas. Isto resulta na expansão das membranas das células contra as quais o fluido pressurizante choca violentamente (i.e. parede celular, membrana citoplasmática, membrana celular, membrana nuclear, membranas vacuolares e dos microtúbulos, causando a sua deformação significativa e subsequente dano, em paralelo com o aumento da permeabilidade e diminuição da resistência à difusão e permeabilidade. Se a deformação exceder um certo limite, a morfologia celular será afetada ao ponto das estruturas celulares se tornarem soltas, porosas e partidas, onde os compostos ativos entram totalmente em contacto com o solvente de extração e o solvente dissolvido com os constituintes ativos se difunde para fora da célula rapidamente. Se a deformação da parede celular não exceder este limite, o efeito da diferença de pressão tão elevada resulta num efluxo do solvente juntamente com os compostos químicos bioativos dissolvidos, atingindo assim a sua extração. Geralmente, quanto mais curto for o período de despressurização, maior é a força de impacto quanto o fluido intracelular se difunde no sentido inverso, o que resulta na formação de mais poros e brechas formados nas células e mais fragmentos de organelos são produzidos, aumentando a área de superfície do material tratado e reduzindo a resistência de difusão dos compostos ativos. Além disso, o contacto com os solventes de extração com os solventes de extração é aumentado, o que permite uma maior eficácia de extração.

Assim, a eficácia no processo de extração por altas pressões hidrostáticas depende de vários parâmetros, entre os quais: a magnitude da pressão aplicada, o período de tempo de

tratamento, o tipo de solvente de extração, a velocidade de extração sólido-líquido e a concentração do solvente de extração (Mustafa et al. 2011).

### *Casos práticos*

Recentemente têm sido desenvolvidos trabalhos com recurso às altas pressões como tratamento alternativo para o aumento da extração de ingredientes naturais da matriz de alimentos, ervas medicinais e subprodutos com origem nos desperdícios vegetais das Indústrias Agroalimentar.

Relativamente ao uso do HPP em frutas e hortícolas foram já realizados trabalhos em extração de carotenóides de sumo de laranja e puré de tomate mais eficazmente comparado com amostras não submetidas a este tratamento (de Ancos et al. 2002, Sánchez-Moreno et al. 2004). O tratamento HPP pode afetar as membranas das células vegetais (Smelt 1998) e causar a disrupção de cromoplastos, organelos que contêm a maioria dos carotenoides presentes nas células, provocando uma maior libertação destes compostos, juntamente com um efeito de desnaturação de proteínas ligantes a carotenoides (Sánchez-Moreno et al. 2009). Outro estudo verificou que a aplicação de tratamento de HPP com 400 MPa a 40°C durante 1 minuto aumentou em 15,46% a concentração total de flavanonas extraídas de sumo de laranja em comparação com o mesmo sumo não tratado (Plaza et al. 2011).

Os purés de frutas têm sido usados na elaboração de uma infinidade de produtos alimentares, incluindo compotas, conservas, sumos concentrados, etc. que regra geral contém diversas moléculas promotoras de saúde. Tratamentos de altas pressões (400 MPa e 600 MPa) aplicados a purés de bagas têm maior efeito na extração de fenóis, antocianinas e ácido ascórbico, em comparação com tratamentos térmicos (Prasad et al. 2009). Em purés de amora foi verificado um aumento da extração de antocianinas que conseqüentemente demonstraram um maior poder antioxidante destas amostras, em comparação com o mesmo tipo de matriz vegetal fresca ou tratada termicamente. Outro trabalho reporta também um aumento na extração de pigmentos coloridos de componentes alimentares através das altas pressões (Patras et al. 2009). Verifica-se também um aumento de 12% na extração de compostos fenólicos totais em cebolas submetidas a 400 MPa tanto sob condições de temperatura altas como baixas.

O tratamento por HPP pode ser usado não só em hortofrutícolas frescos mas também nos resíduos gerados do seu processamento pela Indústria Agroalimentar. São apresentados em seguida alguns exemplos de trabalhos realizados na extração de compostos bioativos destas matrizes vegetais. Tratamentos por HPP mostram uma maior eficiência na extração

de corilagina, lignina e polissacarídeos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anti carcinogénicas do pericarpo de fruta Longan (Prasad et al. 2009, Prasad et al. 2010). Um outro estudo foi realizado com peles de uvas com 600 MPa a 70°C de onde foram extraídos 11,21 mg/g de peso seco de vários polifenóis, incluindo antocianinas, numa eficácia 50% superior a outras técnicas de extração. Foi também verificado um aumento da atividade antioxidante com compostos extraídos através deste método (Corrales et al. 2008). Já para a extração de pectinas, um polissacarídeo com funções diversas a nível alimentar e farmacêutico, foi conduzido um estudo que verificou um aumento da eficácia de extração destas moléculas aplicando a tecnologia HPP em peles de lima, sendo que ao estarem sujeitas a pressões na ordem dos 200 MPa durante 30 minutos a uma temperatura de 50°C não se verificam alterações nas cadeias poliméricas e tornando o HPP um processo adequado para a produção enzimática de pectinas enquanto potencial processo eficaz e sustentável (Naghshineh et al. 2013). Em cascas de laranja foi também aplicada essa tecnologia, sendo que as propriedades físico-químicas, reológicas e gelificantes das pectinas extraídas foram quase inalteradas, em comparação com métodos tradicionais de extração por micro-ondas (Guo et al. 2012). Para subprodutos resultantes do processamento de amendoins foram também aplicados tratamentos de altas pressões de modo a aumentar a extração de proteínas hidrolisadas com efeitos antioxidantes (Dong et al. 2011).

### *HPP na potenciação da capacidade antioxidante*

As frutas e hortícolas incluídos em produtos alimentares processados são naturalmente ricas em moléculas de baixo peso molecular, como compostos fenólicos, com propriedades antioxidantes. Como foi referido anteriormente, o tratamento por HPP influencia a eficácia da libertação deste tipo de compostos para fora das células onde estão armazenados, provocando uma maior exposição da matriz celular aos mesmos. Deste modo a aplicação de altas pressões pode ser usada como técnica adicional para aumentar a capacidade antioxidante naturalmente existente em produtos alimentares que tenham uma composição essencialmente vegetal e conseqüentemente preservar as suas características por um maior período de tempo.

Usados em curtos períodos de tempo os tratamentos por HPP provaram aumentar o valor da Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox (TEAC) em sumo de cenoura a pressões na ordem dos 800 MPa, sendo que este efeito é mais visível quando aplicados a temperaturas abaixo dos 40°C (Indrawati et al. 2004). Também o sumo de maçã tratado por HPP a 600 MPa por 30 minutos apresentou um ligeiro aumento na capacidade antioxidante (Fernández García et al. 2000). Já em puré de tomate a atividade antioxidante era aumentada aquando da combinação na aplicação de 400 MPa com a adição de pequenas concentrações de cloreto de sódio (Sánchez-Moreno et al. 2004)

### Alterações morfológicas

A membrana celular das bactérias é um dos principais objetivos nos tratamentos por altas pressões. O aumento da pressão no ambiente celular causa alterações na permeabilidade das membranas, ao qual se segue a perda de integridade celular e por fim a morte celular. A composição das membranas proteicas de *Salmonella Typhimurium* tratadas por HPP mostram agregação citoplasmática indicando uma extensa desnaturação proteica (Mohamed et al. 2012). As células de *E. coli* quando são submetidas a tratamentos de 200 e 500 MPa apresentam um aumento de volume total, as membranas e paredes células com fendas e distorções, espaços vazios parciais no citoplasma e fluídos celulares vertidos para fora das células. Estas alterações, observáveis através da Figura 15, são atribuídas à desnaturação de proteínas ligantes à membrana celular e/ou à transição de fase da camada bilipídica desta. (Pilavtepe-Celik et al. 2008, Yang et al. 2012). Células de *Vibrio parahaemolyticus* tratadas a 300 MPa e observadas ao microscópio eletrónico apresentam um aumento progressivo do número de picos e inchaços com o aumento de pressão exercido por HPP, com subsequente esmagamento e quebra destas células (Wang et al. 2013). Também os esporos bacterianos podem ser afetados por esta tecnologia, como por exemplo o tratamento de *Bacillus subtilis* submetidos a 400 MPa a 55°C gera depressões e rupturas na superfície dos esporos, causando o derrame parcial do conteúdo celular para o meio exterior (Furukawa et al. 2003).

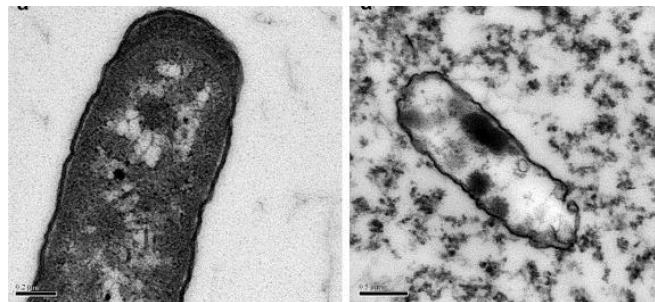


Figura 15 - Células de *E.Coli* submetidas a tratamentos HPP

As membranas celulares têm como principal função manter a morfologia celular com equilíbrio ou mitigação das diferenças entre as pressões internas/externas e controlo da entrada e saída de compostos. Deste modo a sua destruição quando são sujeitas a tratamentos de altas pressões provoca igualmente sérias perturbações ao nível da absorção e nutrição do microrganismo, assim como altera o ritmo de eliminação dos resíduos celulares acumulados durante o funcionamento do seu metabolismo intrínseco, que por sua vez também é modificado (Torres et al. 2005). Estudos realizados anteriormente mostram que

as altas pressões inibem a síntese de ATP, uma molécula crucial na produção de energia ao nível celular, por destruição de proteínas enzimáticas sintetizadoras que estão posicionadas na própria membrana das mitocôndrias. Esta desnaturação leva também a uma interrupção no fluxo de prótons de hidrogénio, reduzindo o pH quase instantaneamente (Tholozan et al. 2000).

## Salmonella – patógeno emergente

Conforme referido anteriormente, a *Salmonella spp.* é um dos microrganismos sensíveis à exposição de compostos fenólicos antimicrobianos, que podem ser extraídos através de metodologias inovadoras como HPP (Demirdoven et al. 2015).

Este é um agente etiológico muito importante no que se refere à transmissão de doenças por contaminação alimentar. De facto, uma das questões mais urgentes de saúde pública descritas na bibliografia de problemas epidemiológicos atuais é a transmissão desta bactéria ao Homem por alimentos de origem animal através da cadeia alimentar, com consequente infeção humana (Angulo et al. 2000, Helms et al. 2005). As infeções provocadas por este microrganismo são geralmente denominadas salmoneloses e podem ser dadas como situações ligeiras ou agudas com gastroenterites manifestadas por diarreia, febre entéricas e dores abdominais (Hohmann 2001). Em casos mais graves o microrganismo pode migrar para a corrente sanguínea e/ou sistema linfático em casos de bactericemia ou septicemia, resultando em efemeridades graves como osteomielite, inflamação cardíaca ou desordens neuronais (Labbé et al. 2001)

Desde a sua descoberta, em 1885, a *Salmonella spp.* tem sido associada a vários surtos de infeções alimentares em diferentes países (Bell et al. 2008) e o número de surtos de salmonelose humana reportados não aparenta redução significativa ao longo dos anos, apesar dos esforços feitos para a diminuição de doenças transmitidas via produtos alimentares (Rabsch et al. 2001). Estima-se que cerca de 1,4 milhões de infeções humanas por *Salmonella spp.* aconteçam todos os anos por ingestão de alimentos contaminados. De facto, cerca de metade dos casos de infeção de origem bacteriana nos Estados Unidos é provocado por este patógeno (Gould et al. 2013) com 30 a 40 mil casos de salmonelose humana a serem detetados todos os anos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ao nível da União Europeia registaram-se em 2004, 193 mil novos casos de salmonelose humana, estando estes valores associados ao elevado consumo de produtos com origem avícola (EFSA, 2011). Foram registados também surtos de *S. Typhimurium* DT104 associados ao consumo de produtos lácteos, salsichas de porco, galinhas e cidra de maçã, representando cerca de 38% dos casos de salmonelose reportados em 2000 pelo Canadá (Dore et al. 2004). Um dos incidentes mais recordados de salmonelose ocorreu em 2006 quando 31 indivíduos ficaram doentes devido a uma contaminação de uma fábrica de chocolate Cadbury(R) resultando num prejuízo de 20 mil dólares para esta empresa (Vanhamme et al. 2012). Um dos mais assustadores surtos de infeções alimentares dos Estados Unidos

aconteceu quando 529 indivíduos adoecerem em 8 dias devido à contaminação de produtos feitos à base de amendoins com *S. Typhimurium*, o que levou á perda de 1 bilião de dólares no mercado deste produto. Em 2010, o consumo de ovos contaminados resultou num surto de *S. enteritidis* com mais de 1800 casos registados e uma perda de 500 milhões de ovos. (Medus et al. 2009, Cavallaro et al. 2011).

As bactérias *Salmonella spp.* são bacilos Gram-negativos, em forma de bacilo, na sua maioria móveis (contém flagelos peritríquios), não esporulado e não capsulado. Este grupo de bactérias é extremamente heterogéneo e a identificação dos antigénios de superfície levou ao reconhecimento atual de quase 2400 serotipos dentro das duas principais espécies: *S. Enterica* e *S. bongori*. A nível epidemiológico a salmonelose é transmitida ao ser humano apenas por algumas subespécies de *Salmonella* não tifóide (Velge et al. 2005, Bell et al. 2008) sendo que os serotipos associados mais frequentemente às infeções humanas são a *S. enteritidis* e *S. Typhimurium*. Regra geral são necessárias cerca de  $10^6$  a  $10^9$  unidades formadoras de colónias (ufc) para o alimento contaminado poder provocar danos num indivíduo saudável, embora pessoas com sistemas imunitários mais frágeis como crianças, idosos e doentes imunodeprimidos possam manifestar sintomas por ingestão de *Salmonella* com concentrações inferiores (Humphrey 2004).

Assim, para além do desenvolvimento de programas de segurança alimentar na monitorização para o manuseamento dentro da produção e processamento dos produtos alimentares suscetíveis à contaminação por este patogénico, é necessário um controlo sobre o desenvolvimento de contaminações alimentares por *Salmonella* através da aplicação direta de métodos de inativação microbiana como as altas pressões hidrostáticas, ou através da formulação de ingredientes extraídos a partir de fontes seguras, naturais e sustentáveis (como o caso dos subprodutos com origem na Indústria Agroalimentar), que possam ser incluídos em produtos alimentares de forma a criar condições de crescimento controlado deste patogénico e prevenir os seus efeitos nefastos para as populações humanas (Bell et al. 2008, Anany et al. 2015)

## Objetivos

O objetivo principal do estudo apresentado consiste essencialmente na avaliação da capacidade antimicrobiana, antioxidante e conteúdo total de polifenóis de infusões de subprodutos de couve-flor obtidas mediante aplicação de tratamentos por altas pressões hidrostáticas (HPP) contra o patógeno alimentar *S. Typhimurium*.

Pretende-se então avaliar a sensibilidade da *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, em compostos bioativos, nomeadamente agentes antimicrobianos naturais, presentes em infusões obtidas a partir de subproduto de couve-flor (folhas e talos) mediante o tratamento de HPP. O plano de trabalho consiste então em três tarefas principais desenvolvidas ao longo do ano letivo 2014/2015 (ver tabela 1):

### 1. Determinação da Capacidade Antimicrobiana

Esta tarefa serve essencialmente para avaliar a sensibilidade de *S. Typhimurium* após exposição a infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por tratamentos de HPP nas mesmas condições que a tarefa anterior, através de curvas de crescimento/ inativação por redução logarítmica de ufc/mL/tempo, incubadas a diferentes temperaturas: 10 °C e 37 °C.

### 2. Determinação do conteúdo total de polifenóis

Com esta tarefa pretende-se avaliar a eficácia de extração da tecnologia de Altas Pressões Hidrostáticas (HPP) de compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em amostras de subprodutos de couve-flor, por quantificação do conteúdo de compostos fenólicos totais nas infusões obtidas mediante a aplicação de diferentes pressões— 200 MPa, 300 MPa, 400 MPa e 500 MPa durante 5 minutos.

### 3. Determinação da Capacidade Antioxidante

O objetivo desta tarefa é estudar as propriedades antioxidantes das amostras supracitadas igualmente obtidas por aplicação de tratamentos por HPP a pressões de 200 MPa, 300 MPa, 400 MPa e 500MPa durante 5 minutos.

Em seguida (Tabela 5) é apresentado o cronograma do desenvolvimento destas tarefas experimentais ao longo do período de trabalho.



# Materiais e Métodos

## 1. Preparação das Infusões

### 1.1. Preparação das Amostras

Para realizar o conjunto de experiências em questão, usaram-se subprodutos de couve-flor (folhas, talos e caules) previamente secos e cortados em flocos. As amostras foram embaladas em sacos de 5 Kg pela empresa TRASA® e enviadas para o IATA (CSIC), onde se mantiveram armazenadas em local fresco e seco até ao momento de preparação das amostras.

Na preparação das amostras foram pesadas 50 gramas do subproduto de couve-flor às quais se adicionaram 500 mL de água peptonada (Scharlau Chemie SA®), Barcelona, Espanha). A mistura resultante foi vertida em sacos especiais para tratamentos em aparelhos de HPP, seguidos pelos respetivos tratamentos.

### 1.2. Processamento HPP

O aparelho usado para a extração de compostos com capacidade antimicrobiana e antioxidante a partir do subproduto de couve-flor pertence ao conjunto de máquinas de altas pressões hidrostáticas cujo modelo é EPSI NV (Temse, Bélgica).

Após a preparação anteriormente descrita, as amostras seladas em sacos de tratamento HPP foram colocadas na câmara, previamente preenchida pelo fluido pressurizante - água e etilglicol 70% (v/v). Após o seu encerramento as amostras foram submetidas a diferentes pressões (200, 300, 400 e 500 MPa, respetivamente) durante um período de 5 minutos a temperatura ambiente.

De forma a quantificar o conteúdo de polifenóis e avaliar as propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos subprodutos de couve-flor foram testadas infusões a partir das amostras tratadas por altas pressões hidrostáticas, após uma centrifugação (4000 rpm durante 15 minutos) e duas filtrações com papéis Whatman: primeiro 11µm e logo a seguir 2.5µm. Para assegurar a esterilização adequada destas infusões, procedeu-se a uma última filtração com filtros PVDF de 0.45 µm através de filtração por seringa.

## 2. Organismo em estudo

As amostras de subprodutos de couve-flor foram testadas usando o microrganismo *S. Typhimurium* (CECT 443), adquirido da *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)*, a partir de uma cultura previamente pura e liofilizada. Para o armazenamento do patogénico seguiu-se o protocolo desenhado por outros autores (Saucedo-Reyes et al. 2009). Assim, para a realização deste trabalho foram feitos cerca de 50 viais para preparação de um *stock* em glicerol de culturas puras de *S. Typhimurium* de concentração aproximada de  $7,6 \times 10^9$  unidades formadoras de colónias (UFC/mL) posteriormente armazenados em crio-tubos a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . De forma a ajustar a concentração celular média das amostras nos crio-tubos foram realizadas diluições com água peptona tamponada (Scharlau Chemie SA®, Barcelona, Espanha) após contagem de células viáveis em placas através de um sistema contador automático de colónias, modelo BioC140 (Beijing, China).

## 3. Avaliação da Capacidade Antimicrobiana

Os estudos da capacidade antimicrobiana foram realizados a partir de uma cultura de *S. Typhimurium* de uma concentração de  $7,6 \times 10^9$  ufc/mL armazenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , como descrito anteriormente. Assim, a preparação das amostras e o desenho das curvas de crescimento/inativação começaram pela diluição de uma alíquota de 2 mL destas culturas em 18 mL de água peptonada tamponada 0.1 % estéril, cuja concentração final era aproximadamente  $10^8$  ufc/mL. Posteriormente adicionou-se 1 mL desta cultura a 20mL de cada uma das infusões de couve-flor previamente tratadas com distintas altas pressões (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min) e por fim as respetivas misturas foram incubadas a duas temperaturas de crescimento diferentes:  $10\text{ }^\circ\text{C}$  e  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . O início das curvas de crescimento/inativação foi marcado pela utilização no tempo zero de amostras de *S. Typhimurium* cuja concentração era aproximadamente 7-8 ciclos de log de ufc/mL. O acompanhamento da evolução destas curvas foi diferente conforme a temperatura de incubação das amostras. Assim, para as incubações de  $10\text{ }^\circ\text{C}$  as amostras mantiveram-se numa estufa com temperatura controlada durante 4 dias (120 horas) enquanto as amostras incubadas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  foram monitorizadas apenas por 8 horas.

Em intervalos de tempo regulares foi pipetada das amostras previamente submetidas aos diversos tratamentos HPP, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do preparado inoculado para ser misturada com 900  $\mu\text{L}$  de água peptona tamponada 0.1 % estéril, numa amplitude de diluições que variavam desde  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ . Para as diluições de  $10^0$  e  $10^{-1}$  foi aplicada a

técnica de sementeira por incorporação, ou seja, do inoculado foram pipetadas diretamente nas placas volumes de 1 mL e 100 µL, respetivamente. Com base nestas diluições fez-se um duplicado com duas séries “A” e “B”, sendo que as placas onde estas diluições estiveram incubadas a 37 °C durante 24 horas, foram preenchidas com o meio de cultura *trypticase soy agar* (TSA; Scharlab SL, Espanha). Seguidamente procedeu-se à contagem de ufc/mL num limite de detenção do método de contagem entre 30-300 ufc em placa. Dentro da escala de tempo em que se realizou o trabalho foi possível repetir quatro vezes cada uma das curvas das amostras submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa). No final, as curvas de crescimento/inativação resultantes elaboraram-se a partir da média dos valores resultantes das múltiplas contagens e corrigidas pelo respetivo fator de diluição, sendo que também foram calculados os desvios-padrão associados a estes valores utilizando o programa Microsoft Office Excel. Para determinar a cinética de crescimento calculou-se o log N (N = recontagem de ufc em placa) em função do tempo de incubação. Os resultados foram expressos em redução logarítmica de viabilidade celular (log ufc/mL).

#### 4. Determinação de células mortas e de células danificadas

Para verificar o efeito danificador/fatal em células de *S. Typhimirium* durante a sua incubação em presença de infusões de subprodutos de couve-flor, obtidas mediante a aplicação de tratamentos de HPP de intensidades diferentes, foram tidos em conta diversas variáveis tais como a contagem comparativa em placas com meios de cultura diferentes. Para tal foi usado um meio seletivo (TSA com 3 % NaCl) com vista a determinar o número de células intactas (vivas não danificadas) e outro meio, neste caso não seletivo (TSA), para detetar células viáveis (ou seja, vivas danificadas e não danificadas) das amostras com as respetivas concentrações de microrganismo preparadas anteriormente. Assim, nos diferentes tempos supracitados foram adicionadas a alíquotas 100 µL de amostra num volume de 900 µL de água peptona tamponada 0,1 % estéril (Scharlau Chemie SA®, Barcelona, Espanha) com posterior diluição em concentrações decrescentes de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ . Para as diluições de  $10^0$  e  $10^{-1}$  foi usada a técnica de sementeira por incorporação, com respetiva pipetagem direta de volumes de 1 mL e 100 µL nas placas. Com base nestas diluições preparadas foram realizadas sementeiras em placas de Petri, através da sua incorporação em *trypticase soy agar* (TSA), com ou sem 3 % (w/v) de cloreto de sódio (NaCl) (Wuytack et al. 2003).

A *S. Typhimirium* é um microrganismo sensível a fatores de *stress* existentes no seu meio de crescimento, nomeadamente a concentrações de sal superiores ao seu máximo osmótico, com um efeito limitante mais proeminente em células já danificadas. Desta forma, ao serem

expostas a um meio com uma concentração de cloreto de sódio de 3%, as células intactas continuam a crescer, embora a um ritmo mais lento devido a atrasos na divisão celular provocados pelo NaCl (Jovanovich et al. 1988). No entanto as células que já tinham sido danificadas por agentes antimicrobianos presentes nas infusões de subprodutos de couve-flor preparadas anteriormente acabaram por se tornar demasiado frágeis pelo que não se conseguem reproduzir neste meio. Assim, o número de células danificadas foi calculado por diferença entre a contagem de bactérias presentes nas placas com TSA e TSA com sal, ou seja:

$$N_{danificadas} = N_{viáveis} - N_{intactas}$$

Desta forma foi calculada a percentagem de danificação subletal nas células de *S. Typhimurium* após exposição das amostras aos tratamentos em estudo. A perda de tolerância do microrganismo no meio seletivo usado é devido às lesões provocadas na membrana citoplasmática que consequentemente perde a sua estrutura e funcionalidade (Lund et al. 2000).

Tal como referido anteriormente, as amostras foram incubadas ao mesmo tempo, em meio TSA e TSA-sal a 37 °C durante 24 horas. Após este período procedeu-se à contagem de ufc/mL sendo que o limite de deteção do método de contagem desenvolveu-se numa amplitude entre 30-300 ufc em placa. O número de células danificadas ou mortas foi calculado usando a equação:

$$N_{total} = \left[ 1 - \frac{N_{TSA-sal}}{N_{TSA}} \right] \times 100$$

Onde  $N_{total}$  é o número total de células danificadas ou mortas;  $N_{TSA-sal}$  é o número de células contadas em placas cuja amostra foi incorporada em meio seletivo TSA com cloreto de sódio a 3% e  $N_{TSA}$  o número de células contadas em placas incubadas com meio TSA simples.

Finalmente todos os dados foram tratados com programa Microsoft Office Excel®, onde foram também representados através de histogramas de colunas, o número de células mortas, danificadas e intactas.

Em todos os estudos efetuados através de curvas de crescimento/inativação das amostras de subprodutos de couve-flor inoculadas com o patogénico *S. Typhimurium* foram avaliados três parâmetros: o tempo demorado a atingir os efeitos desejáveis, a temperatura em que as amostras estiveram incubadas durante a monitorização do desenvolvimento progressivo do seu crescimento/inativação e a pressão a que foram sujeitas as supracitadas amostras durante o tratamento de 5 minutos no equipamento de HPP, ou seja 200, 300, 400 e 500 MPa.

## 5. Modelagem Matemática

Dos valores obtidos com a contagem de ufc/mL das amostras incubadas com os diferentes tratamentos, foram traçadas curvas de crescimento/inativação por logaritmização dos resultados correspondentes. Às curvas anteriormente analisadas no programa Microsoft Office Excel® foi efetuada nova análise estatística por regressão não linear com o programa Statgraphics® Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., EUA) por ajuste dos pontos resultantes ao modelo de Weibull, que matematicamente se expressa como (Rodrigo et al. 2003):

$$\text{LOG } S = - [(t \times b)^n]$$

onde:  $t$  = tempo (horas);  $S$  = fração de células sobreviventes, ou seja, coeficiente entre  $N_t$  e  $N_0$ , sendo  $N_t$  = concentração celular a um determinado tempo  $t$  (ufc/mL) e  $N_0$  = concentração celular inicial (ufc/mL);  $b$  = fator de escala e  $n$  = fator de forma.

Deste modo, a expressão matemática acima apresentada descreve um modelo que ajusta de forma simples e robusta diferentes tipos de curvas, sejam elas curvas convexas ( $n > 1$ ), côncavas ( $n < 1$ ) ou exponenciais ( $n = 1$ ). O valor representado por  $b$ , ou seja o fator de escala, relaciona-se diretamente com a velocidade de inativação das células em estudo.

Embora a função matemática que melhor descreve a curva de sobrevivência/inativação ideal possa ser comparada e escolhida através da avaliação de parâmetros distintos, este trabalho tomou como base o coeficiente de correlação, isto é o  $R^2$  ajustado e o erro quadrático médio (MSE). Todas as curvas forma ajustadas no sentido de obter valores o mais próximos de 1 e 0 para o  $R^2$  e para o MSE, respetivamente.

## 6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o programa STATGRAPHICS Centurion XV (versão 15.1.03; STATGRAPHICS, Warrenton VA). As análises incluem cálculos de médias e desvios padrão para as amostras em estudo, assim como análises ANOVA para testar diferenças significativas entre as infusões preparadas conforme as condições de altas pressões hidrostáticas a que foram sujeitas. A validade dos ajustes do modelo realizada foi determinada usando o coeficiente de regressão ajustado ( $R^2$ ) e o erro médio da raiz quadrada (RMSE).

## 7. Determinação do conteúdo fenólico total

O conteúdo total de compostos fenólicos foi quantificado por espectrofotometria, de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu Singleton (1985).

Primeiramente desenhou-se uma reta de calibração padrão através da preparação de alíquotas de ácido gálico com diferentes concentrações (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 1000 ppm) aos quais foram adicionados 3 mL de carbonato sódico (2% (w/v)) (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA) e 100  $\mu$ L de reativo Folin-Ciocalteu (1:1 (v/v)) (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA). Para medir o conteúdo total nas amostras de couve-flor foi aplicada a mesma metodologia mas substituindo o ácido gálico pelas infusões preparadas e diluídas a 1:10 e 1:20. Em seguida todas as amostras (as da reta padrão e as de couve-flor) foram agitadas por vortex durante 1 minuto e deixadas a repousar em ambiente escuro durante 60 minutos. Finalmente, foram lidas as respetivas absorvâncias a 750 nm usando um espectrofotómetro Lan Optical Model PG1800 (Labolan, Espanha) com os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (GAE)/L. A quantificação do conteúdo fenólico foi calculado computacionalmente através da interpolação dos valores correspondentes na reta de calibração padrão usando o programa Microsoft Office Excel®.

## 8. Determinação da Capacidade Antioxidante

Para a determinação da capacidade antioxidante das infusões de subproduto de couve-flor preparadas mediante a aplicação dos diferentes tratamentos de HPP foi usado o método DPPH, com determinação da cinética de reação por espectrofotometria (Sánchez-Moreno et al. 1998).

Para tal foi preparada uma reta de calibração padrão com reativo Trolox (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA) a concentrações crescentes de 0.3, 0.5, 1, 2 e 3 mM a partir de uma solução madre de 20 mM que por sua vez foi preparada por mistura de 0.025 g do reativo Trolox com 5 mL de metanol.

Por sua vez, das infusões de subprodutos de couve-flor preparadas anteriormente foram retirados 10 mL e homogeneizadas com 20 mL de metanol (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA) durante 1 minuto por vórtex. Em seguida realizou-se uma centrifugação desta mistura a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Do sobrenadante resultante foram retiradas alíquotas de 0.030 mL em duplicado, às quais se adicionaram 3 mL de uma solução de radical DPPH previamente preparado por mistura de 0.0030 gramas de radical DPPH com 100 mL de metanol.

Após mistura rápida, foram medidas as absorvâncias das amostras a 517 nm durante 150 segundos e calculados no programa computacional Microsoft Excel com recurso à seguinte fórmula matemática:

$$\%DPPH = \frac{A_{ti} - A_{tf}}{A_{ti}}$$

Os resultados finais foram expressos em equivalentes de Trolox/mL de amostra.

## Resultados e Discussão

### 1. Avaliação da capacidade antimicrobiana das infusões de subproduto de couve-flor obtidas por tratamentos de HHP frente a *S. Typhimurium*.

#### 1.1. Efeito das infusões de subproduto de Couve-flor por tratamento HHP no crescimento de *S. Typhimurium* a 37 °C.

O gráfico da Figura 16 mostra o efeito antimicrobiano das amostras de subproduto de couve-flor previamente tratadas por HHP (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 minutos), por inativação ou atraso do crescimento do microrganismo *S. Typhimurium* durante a sua incubação a 37 °C.

Como se pode verificar pelo gráfico da Figura 17, a curva de crescimento/inativação da amostra de *S. Typhimurium* sem qualquer contacto com as infusões de subprodutos de couve-flor, ou seja, apenas diluída em água peptona tamponada (Branco), mostram que o patogénico sofre um ligeiro crescimento passando de uma população inicial de *S. Typhimurium* de aproximadamente 7,7 ciclos logarítmicos para os 8 ciclos logarítmicos, mantendo-se neste valor desde a hora 0 até à hora 2. Ou seja, durante as 2 primeiras horas de incubação o *S. Typhimurium* permanece em fase lag e não experimenta alterações significativas na sua velocidade de proliferação. Depois desse período, o microrganismo começa a crescer, alcançando os 9 ciclos logarítmicos na hora 8. Isto corrobora as pesquisas anteriormente realizadas que indicam um período máximo de 2 horas para os alimentos mais suscetíveis de deterioração por contaminação de patogénicos poderem ser guardados à temperatura ambiente; decorrido esse tempo o risco de intoxicação alimentar aumenta drasticamente, com possíveis consequências perigosas para os consumidores.

Quanto ao efeito amostras de subprodutos de couve-flor tratadas com HPP verifica-se uma inibição do crescimento em todas as curvas, sendo claramente visíveis as consequências bactericidas na população microbiológica em estudo durante um período de 8 horas. Ou seja, os resultados mostram uma diminuição na contagem de unidades formadoras de colónias de *S. Typhimurium* de aproximadamente 4,5 ciclos logarítmicos para as amostras tratadas a 300 MPa – 5 min, 5 ciclos logarítmicos para as amostras tratadas a 200 e 400 MPa e finalmente 5,5 ciclos logarítmicos para amostras tratadas a 500 MPa. Em extratos de uvas submetidos a tratamentos HPP de 200 MPa, 400 MPa e 550 MPa não são encontradas diferenças significativas no total de células viáveis de bactérias frequentemente encontradas nesta fruta, pertencentes às famílias *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* (Morata et al. 2015).

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor  
(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas



Figura 16 - Curva de crescimento de *S. Typhimurium* na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), a temperatura 37°C.

## 1.2. Efeito das infusões de subproduto de Couve-flor obtidas por tratamentos HHP no crescimento de *S. Typhimurium* a 10 °C

Para uma temperatura de 10 °C (Figura 17) podemos verificar comportamentos distintos, conforme a curva em análise. Para a amostra “Branco” verifica-se uma expansão do período de tempo em que o microrganismo se mantém em fase lag, em comparação com o mesmo tipo de amostra a 37 °C (Figura 17). Assim, a população de *S. Typhimurium* em estudo não experimenta alterações na sua velocidade de crescimento nos dois primeiros dias de monitorização, ou seja da hora 0 à hora 48. A partir desse momento começa o respetivo crescimento exponencial. Estes resultados vão de encontro a outros trabalhos realizados anteriormente que reportam consequências de atraso nos sistemas metabólicos, enzimáticos e de reprodução, permitindo um alargamento do tempo de prateleira dos produtos alimentares deste género, em condições de refrigeração, o que torna o seu consumo mais cómodo e prático (McDonald et al. 1999, Swinnen et al. 2004).

Por sua vez, todas as amostras sujeitas aos diferentes tratamentos HPP (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min) têm um efeito bactericida em *S. Typhimurium* uma vez que se observa a redução da população do microrganismo de 4 ciclos logarítmicos durante as primeiras 116 horas. Trabalhos realizados anteriormente mostram igualmente a eficácia antimicrobiana de subprodutos de couve-flor expostos a *Listeria monocytogenes* (Sanz-Puig et al. 2015)

Ou seja, podemos concluir que as infusões de subprodutos de couve-flor obtidas utilizando a técnica de extração por altas pressões hidrostáticas podem ser usadas para funções antimicrobianas em *S. Typhimurium* a temperatura de refrigeração.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor  
(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

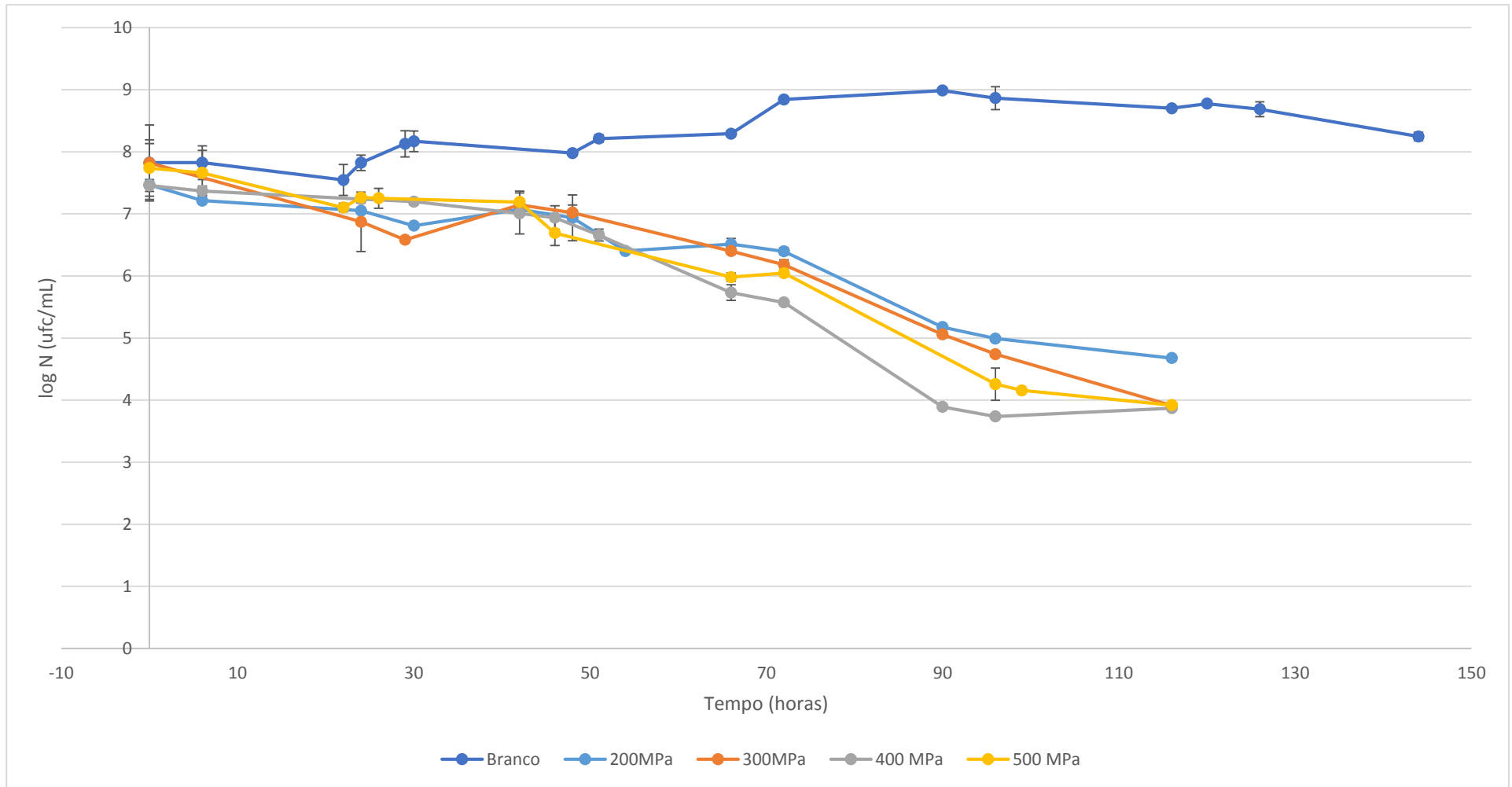


Figura 17 - Curva de crescimento de *S. Typhimurium* na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), a temperatura 10°C.

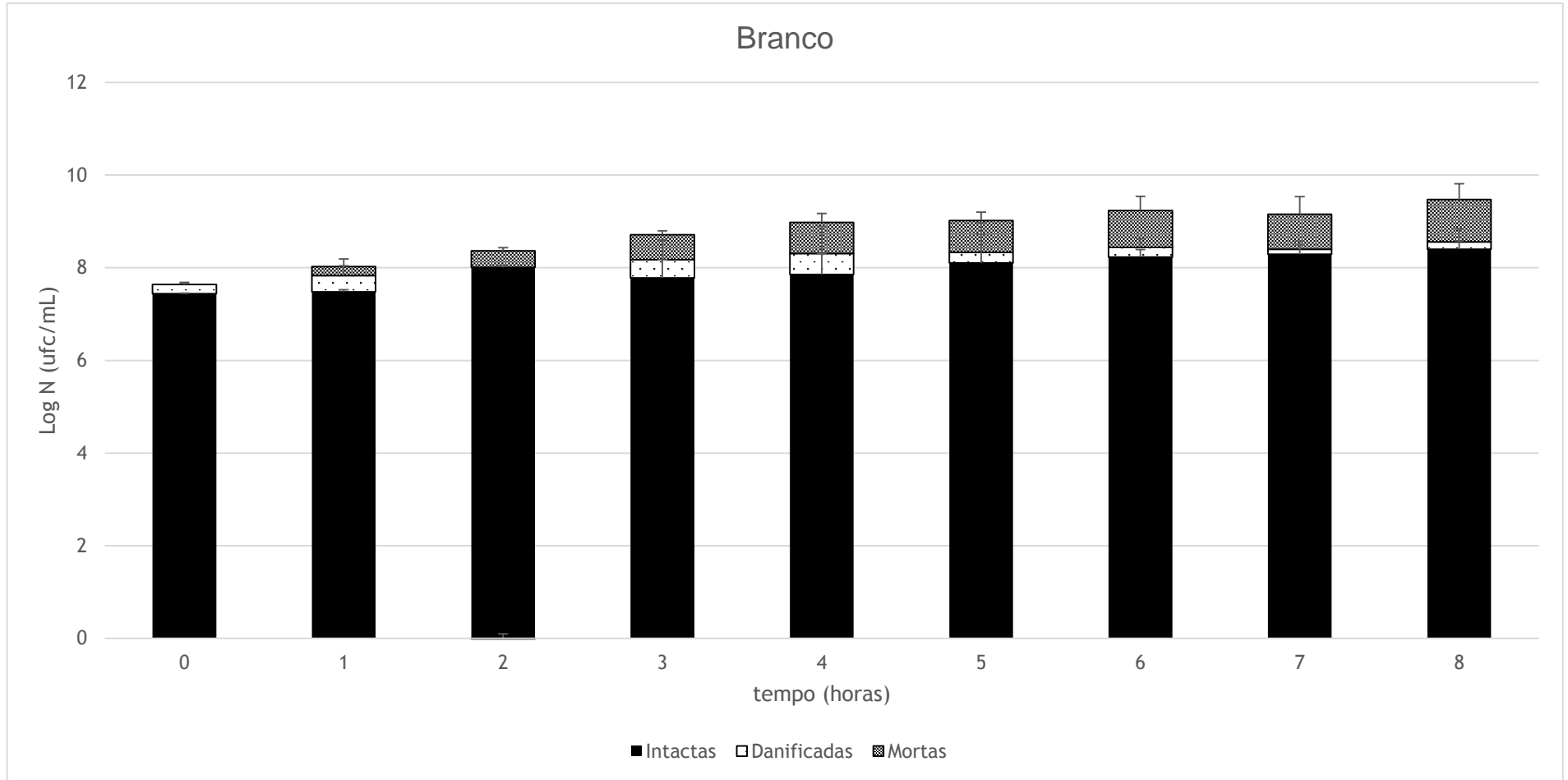
## 2. Determinação de células mortas e de células danificadas de *S. Typhimurium* incubadas em presença de infusões do subproduto de couve-flor obtidas por tratamento HHP

Com vista a determinar o efeito dos tratamentos de HPP a várias pressões na extração de compostos antimicrobianos em subprodutos de couve-flor foram calculadas as células intactas, danificadas e mortas de *S. Typhimurium*, exposta a cada uma das infusões obtidas durante a sua incubação a 10 e 37 °C, mediante a sua inoculação em placas em dois meios diferentes: TSA e TSA-Sal.

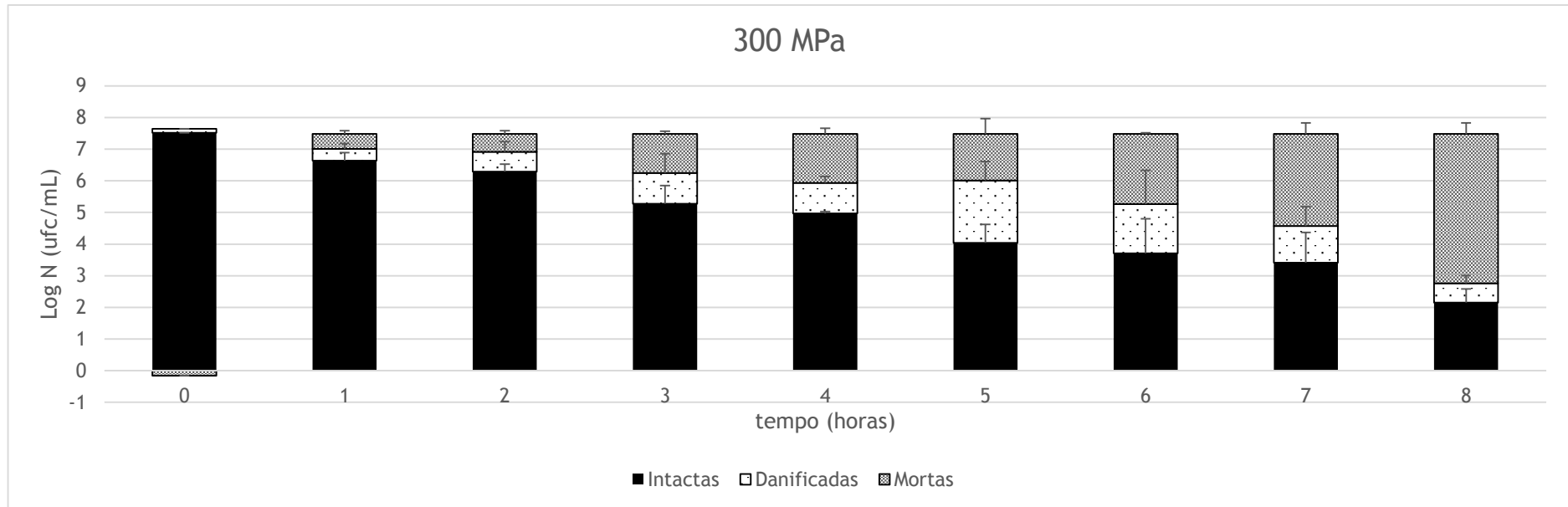
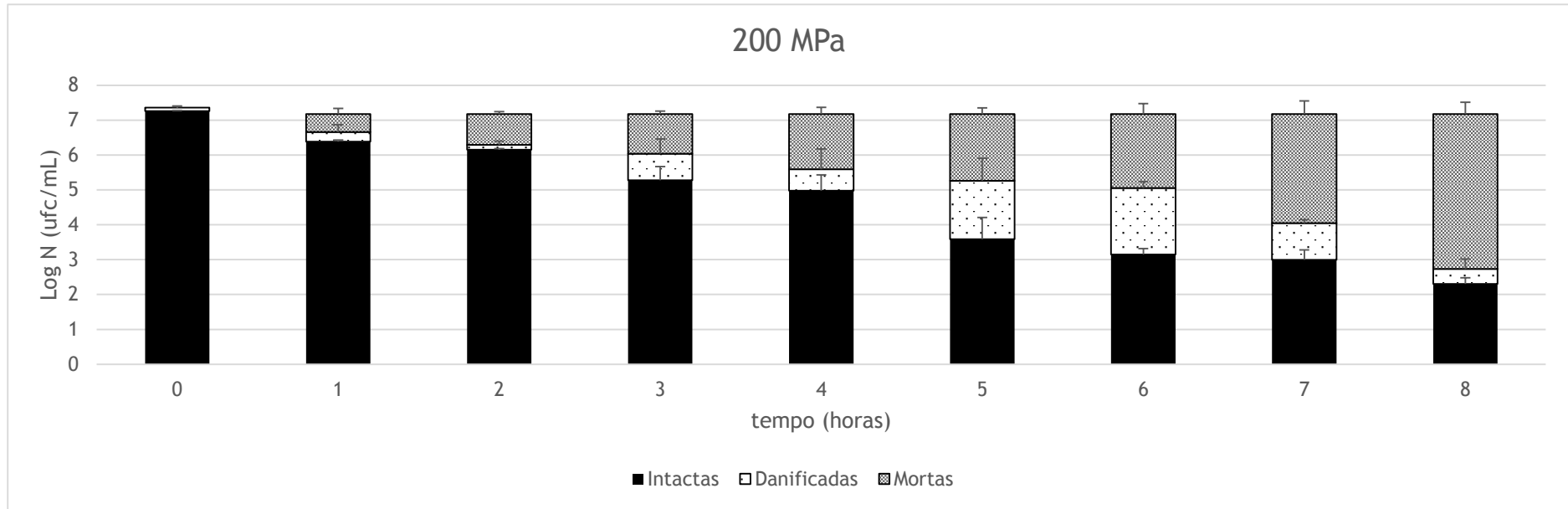
### 2.1. Determinação do dano celular em *S. Typhimurium* a 37 °C

Os gráficos da Figura 18 representam os ciclos logarítmicos (ufc/mL) de células intactas, danificadas e mortas da população de *S. Typhimurium* durante a sua incubação em presença das infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por aplicação de diferentes tratamentos de HPP a 200 MPa (3a), 300 MPa (3b), 400 MPa (3c), 500 MPa (3d) e Branco (3e), respetivamente, durante 5 minutos a uma temperatura de crescimento de 37 °C. Em todos os casos podemos observar uma diminuição do número de células de *S. Typhimurium* intactas em paralelo a um aumento de células mortas, ao longo de um período de incubação de 8 horas. Durante este tempo de incubação, as células danificadas vão-se convertendo em células mortas. Comparando os quatro gráficos representados em seguida não se observam diferenças entre as amostras submetidas aos diferentes tratamentos. De facto, analisando os gráficos obtidos podemos observar inicialmente cerca de 7,5 ciclos logarítmicos de células de *S. Typhimurium* intactas, sendo que após 8 horas de incubação apenas se verificam aproximadamente 2,5 ciclos logarítmicos de células intactas e quase 3 ciclos de células mortas.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (Brassica oleracea var. Botrytis) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas



Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor  
(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas



Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor  
(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

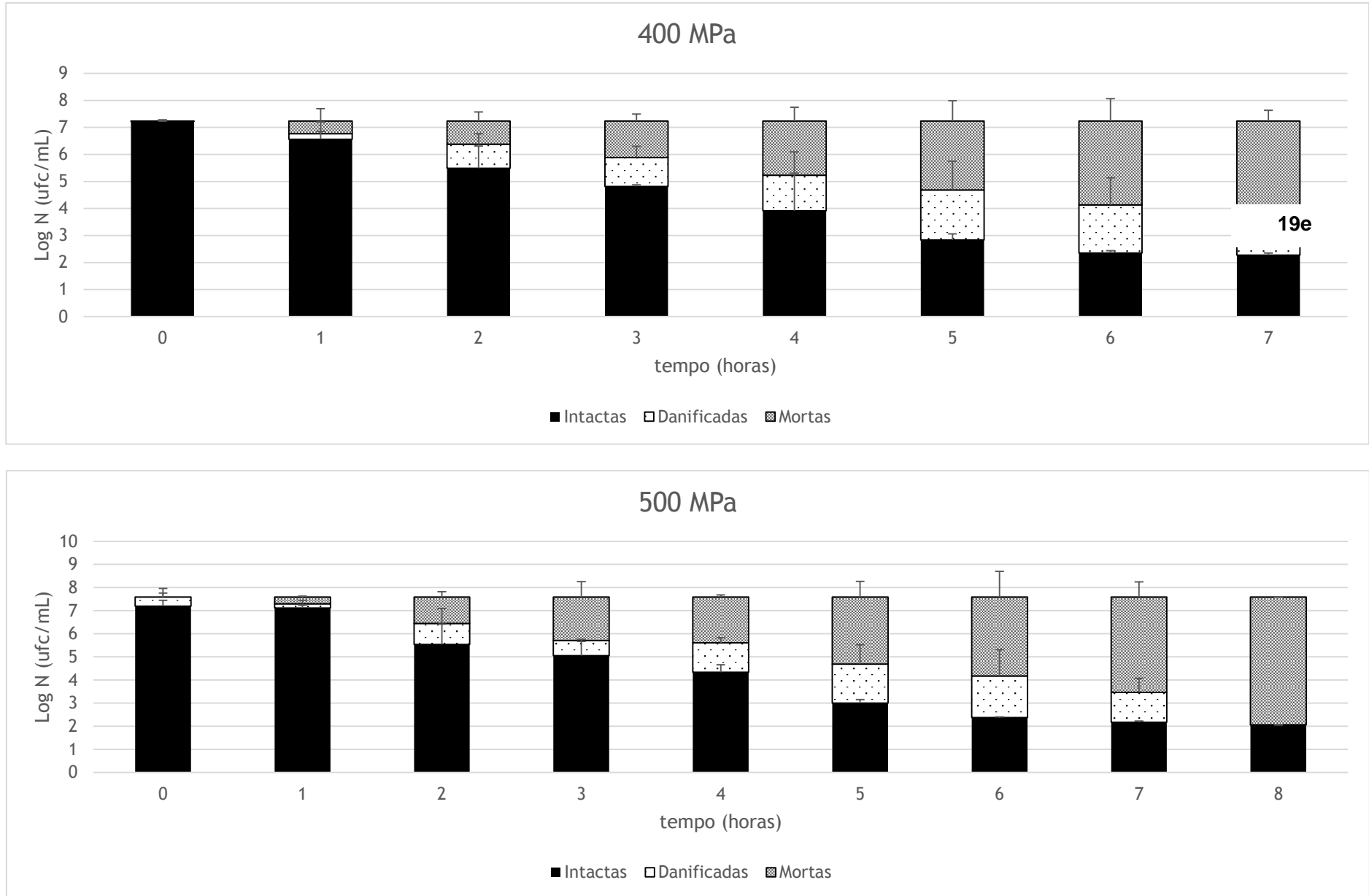
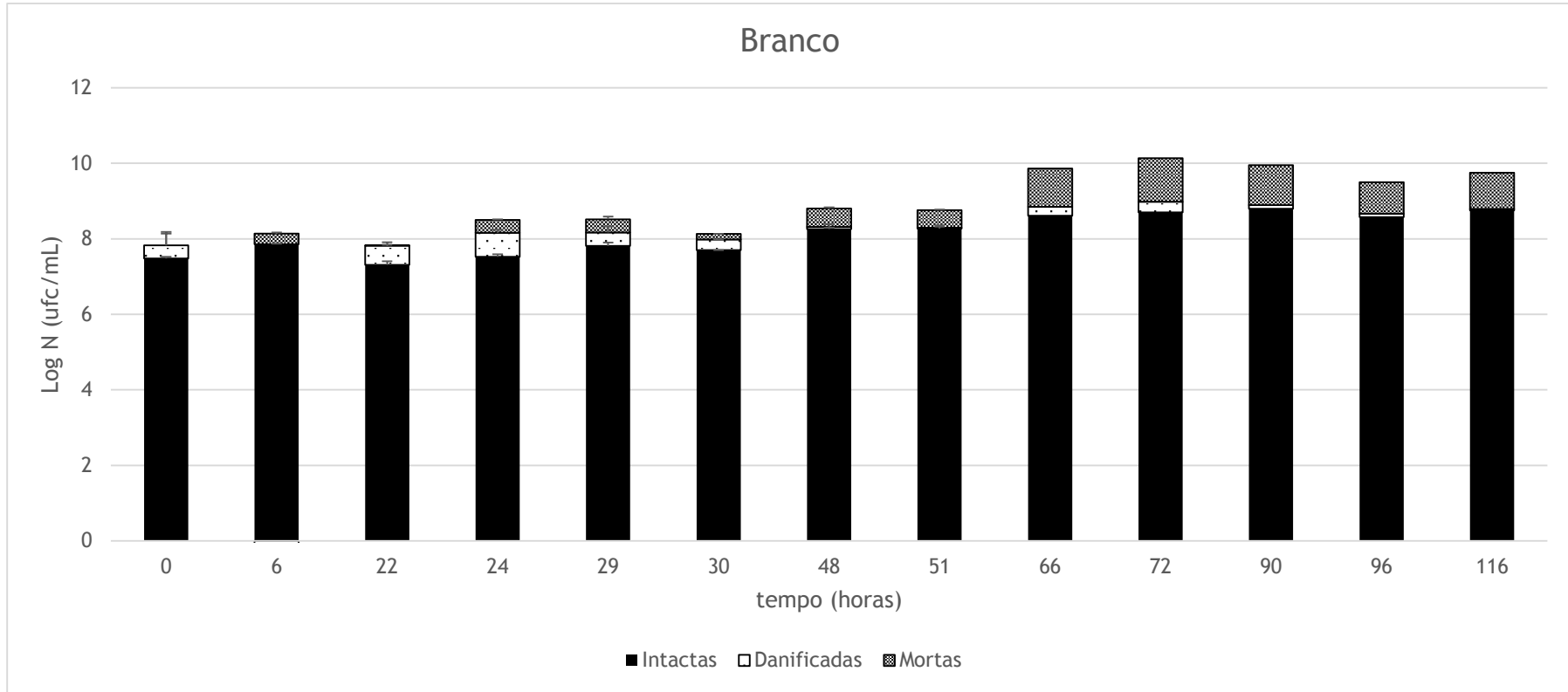


Figura 18 - Representação do dano celular em *S. Typhimurium* na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), com respetivo branco, a temperatura 37°C

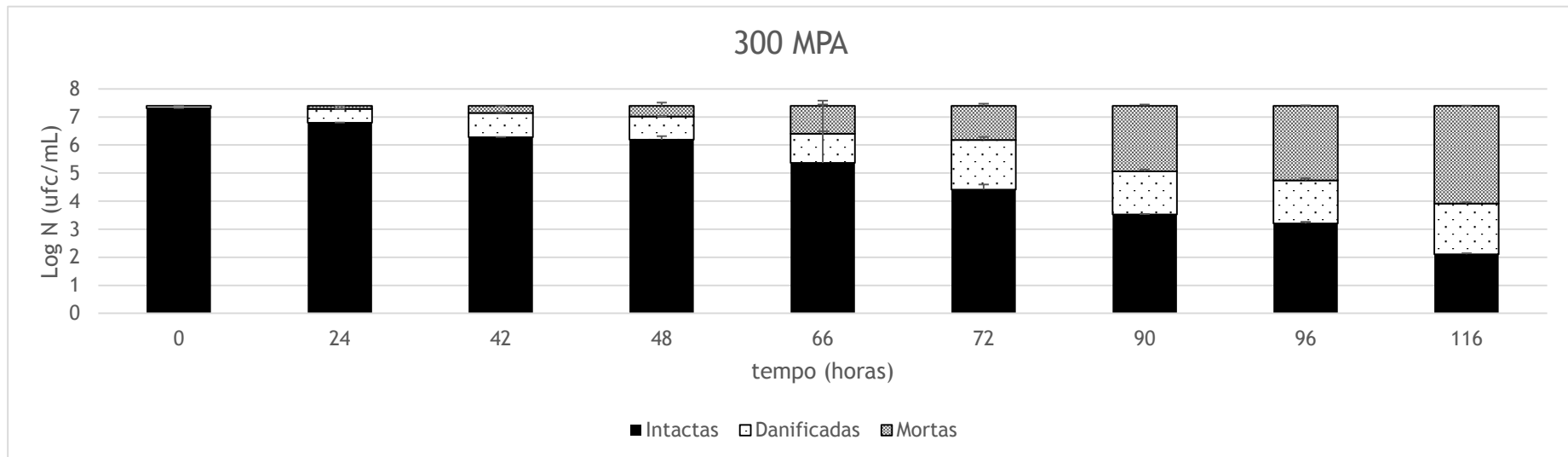
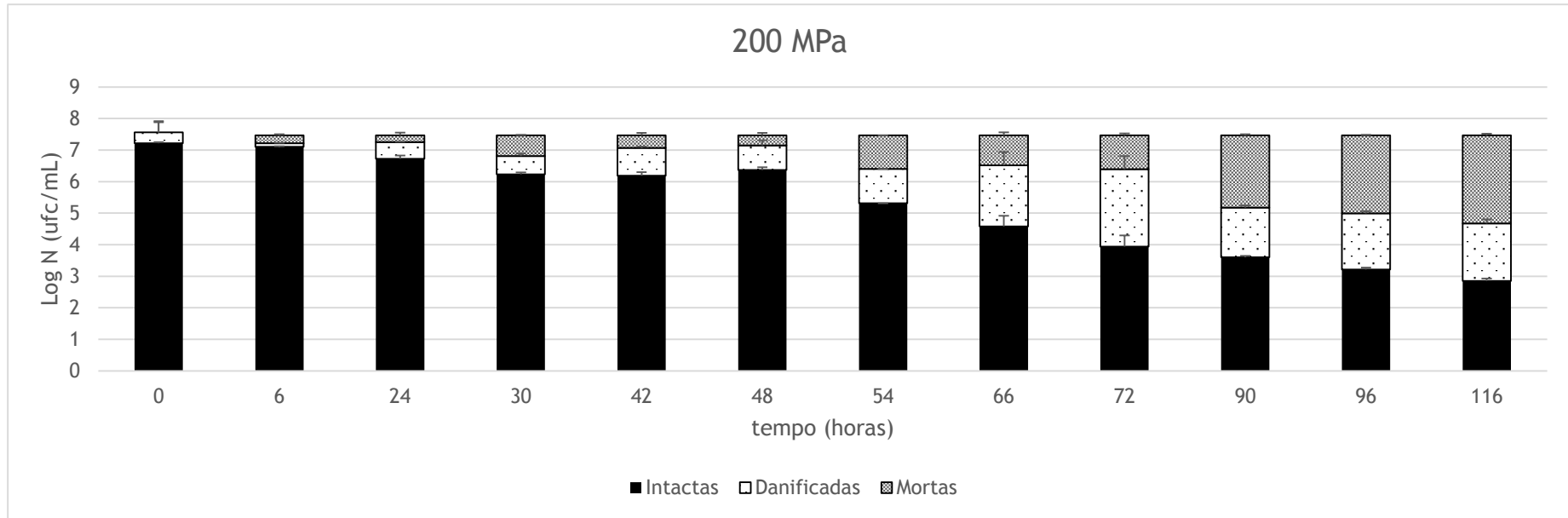
## 2.2. Determinação do dano celular em *S. Typhimurium* a 10 °C

O gráfico com a determinação de células intactas, mortas e danificadas de *S. Typhimurium* para uma temperatura de incubação de 10 °C está representado na Figura 19, durante a sua incubação em presença de infusões de subproduto de couve-flor obtidas por tratamento HHP a 200 MPa (20a), 300 MPa (20b), 400 MPa (20c) e 500 MPa (20d). Tal como foi observado para uma temperatura de incubação de 37 °C, há uma diminuição da população de *S. Typhimurium* relativamente ao número de células intactas que, ao longo de 116 horas, se vão transformando em células mortas, sendo que estas últimas também resultam da conversão de bactérias intactas em danificadas após um longo período de tempo. Numa análise mais pormenorizada pode-se observar nas quatro amostras tratadas distintamente uma população de microrganismos inicial numa média de 7,5 ciclos logarítmicos, enquanto no final das 116 horas restam pouco mais de 3 ciclos logarítmicos de células intactas e 4 ciclos logarítmicos de células danificadas. Estes dados confirmam mais uma vez o efeito bactericida dos subprodutos de couve-flor contra o patogénico alimentar em estudo, inclusive a baixas temperaturas. No entanto, tal como foi descrito para as curvas de 37 °C, não existem diferenças significativas entre os tratamentos aos quais a amostra foi submetida.

Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (Brassica oleracea var. Botrytis) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas



Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor  
(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas



Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor  
(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas

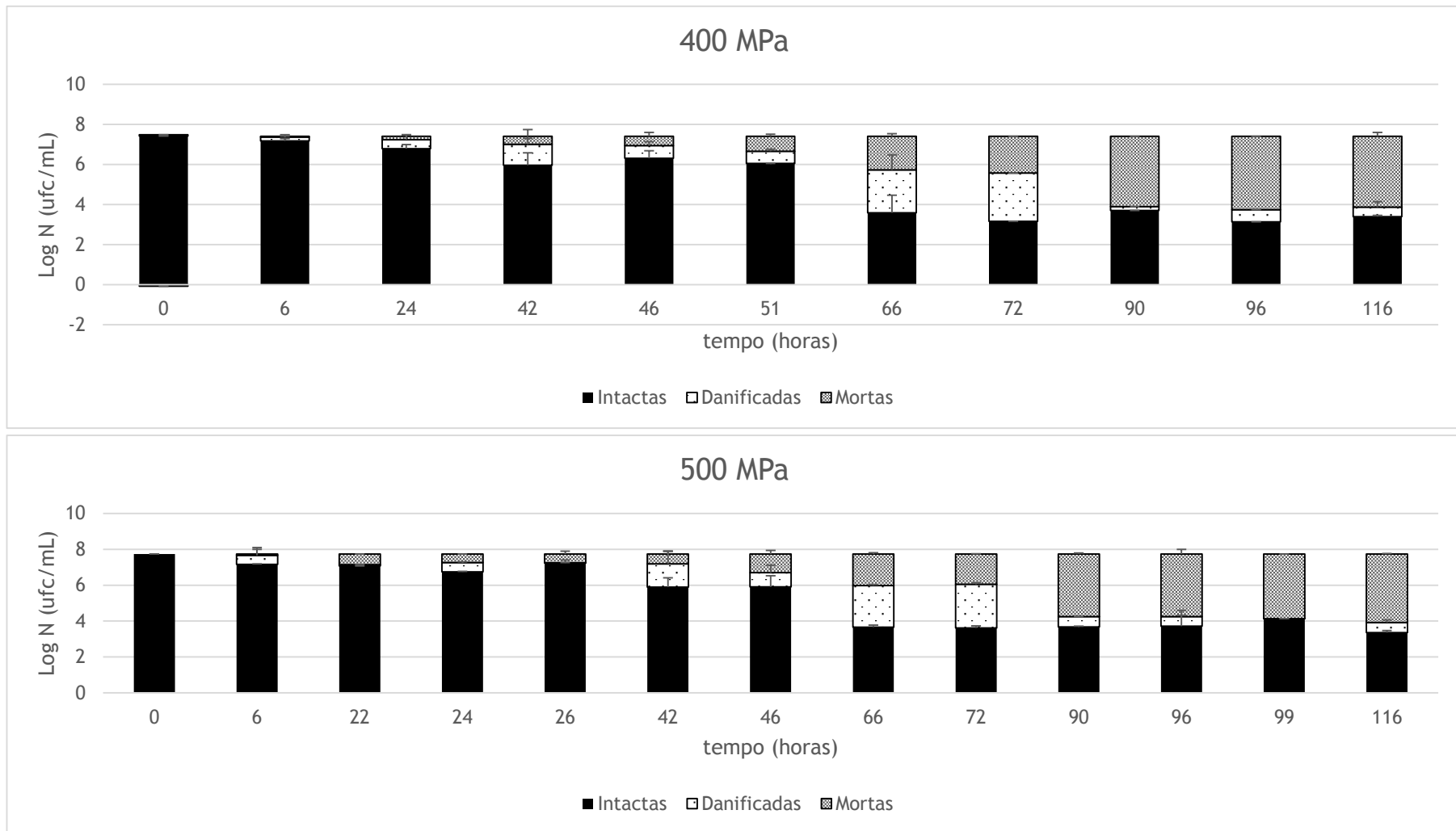


Figura 19 - Representação do dano celular em *S. Typhimurium* na presença de amostras de subprodutos de couve-flor submetidas a diferentes tratamentos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min), com respetivo branco, a temperatura 10 °C

### 3. Modelagem Matemática

Nas tabelas 6 e 7 são apresentados os valores dos ajustes das curvas do efeito dos tratamentos HPP nas amostras de subproduto de couve-flor frente ao patógeno *S. Typhimurium*.

Tabela 6 - Estimativa dos parâmetros cinéticos da distribuição de Weibull (b e n) em função da pressão HPP (0, 200, 300, 400 e 500 MPa) da infusão de subproduto de couve-flor a 37 °C. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio-padrão. Os valores da média com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Temperatura (°C)	Tratamento (MPa)	<i>b</i>	<i>n</i>	R <sup>2</sup> ajustado	MSE
37	Branco	- 0,27 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,07	0,961	0,010
	200	0,13 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,20	0,984	3,161
	300	0,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	1,71 $\pm$ 0,07	0,973	0,150
	400	0,35 <sup>b</sup> $\pm$ 0,10	1,24 $\pm$ 0,10	0,996	0,085
	500	0,31 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01	1,28 $\pm$ 0,08	0,983	0,186

Tabela 7 - Estimativa dos parâmetros cinéticos da distribuição de Weibull (b e n) em função da pressão HPP (0, 200, 300, 400 e 500 MPa) da infusão de subproduto de couve-flor a 37 °C. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio-padrão. Os valores da média com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Temp. (°C)	Trat. (MPa)	<i>b</i>	<i>n</i>	R <sup>2</sup> ajustado	MSE
10	Branco	-8,59x10 <sup>-2</sup> $\pm$ 1,0x10 <sup>-3</sup>	0,506 $\pm$ 0,03	0,959	0,081
	200	1,0x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup> $\pm$ 1,0x10 <sup>-4</sup>	1,60 $\pm$ 0,04	0,942	0,121
	300	1,0x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup> $\pm$ 4,0x10 <sup>-5</sup>	1,69 $\pm$ 0,01	0,996	0,030
	400	2,0x10 <sup>-3</sup> <sup>b</sup> $\pm$ 4,0x10 <sup>-4</sup>	1,54 $\pm$ 0,02	0,981	0,205
	500	2,0x10 <sup>-3</sup> <sup>b</sup> $\pm$ 2,0x10 <sup>-5</sup>	1,56 $\pm$ 0,01	0,910	0,414

Tomando em consideração estes valores, observa-se que incubações nas duas temperaturas de crescimento, 37 °C e 10 °C, os valores de  $b$  apresentam diferenças significativas entre dois grupos à medida que aumenta a pressão, ou seja a velocidade de inativação do patogénico é maior em infusões obtidas a 400 e 500 MPa do que a 200 e 300 MPa. Vários estudos anteriores usam igualmente o modelo de Weibull para determinar a velocidade de crescimento/ inativação de patogénicos em alimentos contaminados (Rodrigo et al. 2003, Chen et al. 2004, Moody et al. 2014).

Regra geral, até ser atingida o seu valor de funcionalidade ideal, quanto maior é a temperatura de crescimento do microrganismo, mais elevados são os valores de  $b$ , o que significa que a sua temperatura ótima de crescimento (37 °C) o patogénico morre mais depressa que a temperatura de refrigeração (10 °C). Tais observações vão de encontro aos resultados das curvas anteriormente apresentadas, uma vez que o período de tempo em que a população do microrganismo desapareceu foi largamente superior quando incubado a uma temperatura de refrigeração de 10 °C – cerca de 4 dias - em comparação com uma temperatura superior (37°C) – cerca de 8 horas.

Resumindo, as infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por diferentes tratamentos de altas pressões hidrostáticas apresentam propriedades bactericidas para *S. Typhimurium*. A temperaturas de refrigeração o tratamento por HPP continua a exercer um efeito positivo na potenciação das propriedades antimicrobianas destas amostras. Mais ainda, a pressão a que as amostras são submetidas parece ter uma correlação com a eficácia da sua capacidade em causar dano letal e subletal nas bactérias. As infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por HPP podem surgir como método adicional no controlo do crescimento de patogénicos alimentares.

#### 4. Quantificação do conteúdo total de polifenóis nas infusões de subprodutos de Couve-flor obtidas por tratamentos de HPP

Usando como técnica de determinação do total de polifenóis o método de Folin-Ciocalcetau, descrito anteriormente no enquadramento teórico, foi desenhada uma curva de calibração padrão de Ácido Gálico (Figura 20) para a deteção de polifenóis totais presentes nas amostras de couve-flor tratadas com HPP. A partir da curva padrão de Ácido Gálico calculou-se a respetiva equação calculada por estimativa para a quantificação de polifenóis total presentes nas diferentes amostras.

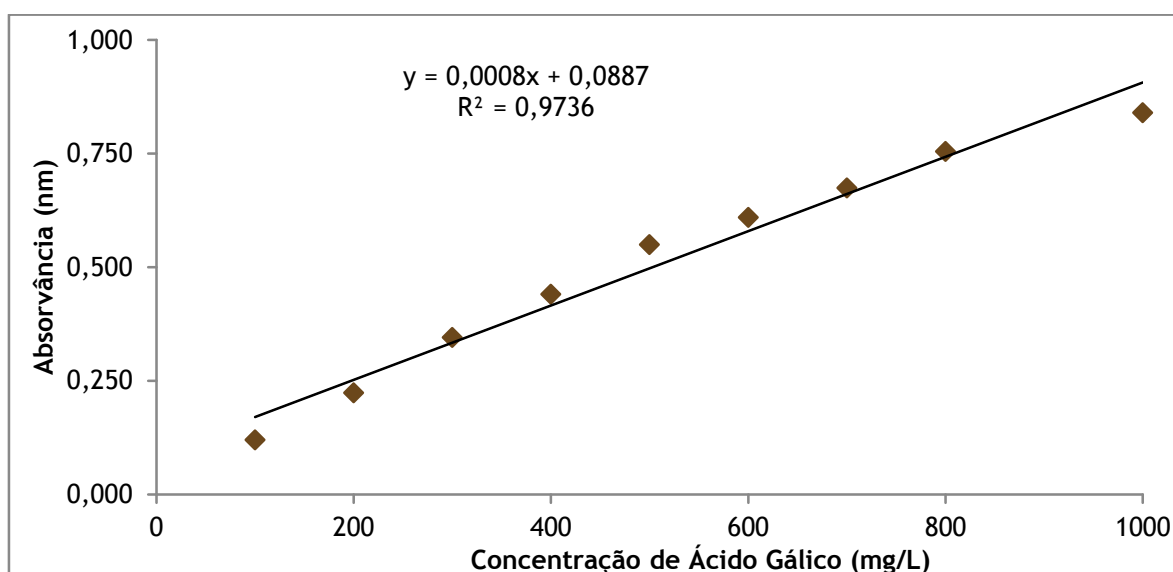


Figura 20 - Curva de Calibração Padrão para a quantificação de polifenóis das infusões.

Posteriormente procedeu-se à quantificação do conteúdo total de polifenóis em cada uma das infusões através da curva de calibração obtida, sendo os resultados expressos em mg de ácido gálico/L presentes nas infusões de subproduto de couve-flor submetidas a tratamento HPP (Tabela 8).

Tabela 8 - Total de polifenóis nas amostras de infusões obtidas por diferentes tratamentos de altas pressões (200, 300, 40 e 500 MPa – 5min). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão. Os valores da média com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

<b>Tratamento (MPa)</b>	<b>Conteúdo de Polifenóis Total (mg ácido gálico / L)</b>
200	2244,77 <sup>a</sup> $\pm$ 77,81
300	2319,35 <sup>a</sup> $\pm$ 318,51
400	2938,01 <sup>b</sup> $\pm$ 36,68
500	2933,73 <sup>b</sup> $\pm$ 292,00

Analisando os valores obtidos, o conteúdo em polifenóis é diferente entre as infusões de subproduto de couve-flor sujeitas aos distintos tratamentos por HPP, com um composição polifenólica total significativamente superior para os tratamentos de 400 e 500 MPa do que para os tratamentos 200 e 300 MPa.

De acordo com os resultados observados existem fortes evidências para se pensar que os polifenóis presentes são um dos conjuntos de compostos bioativos que pode conferir às infusões as respectivas propriedades antimicrobianas. Outros autores descrevem também uma relação direta entre a atividade antibacteriana e a composição fenólica de várias plantas (Kahkonen et al. 1999, Rauha et al. 2000).

É também possível verificar que à medida que se aumenta a magnitude das pressões exercidas nas infusões, maior será o poder extrativo de compostos polifenólicos presentes nas respectivas amostras. Trabalhos realizados no mesmo âmbito apontam para uma correlação semelhante em infusões resultantes extratos de purés de amora e morango e mel *hanuka* (Akhmazillah et al. 2013).

## 5. Avaliação da capacidade antioxidante nas infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por tratamentos de HPP

Na Figura 21 está representada a curva de calibração padrão com o reativo Trolox juntamente com a respetiva equação resultante dos valores obtidos para cada uma das concentrações.

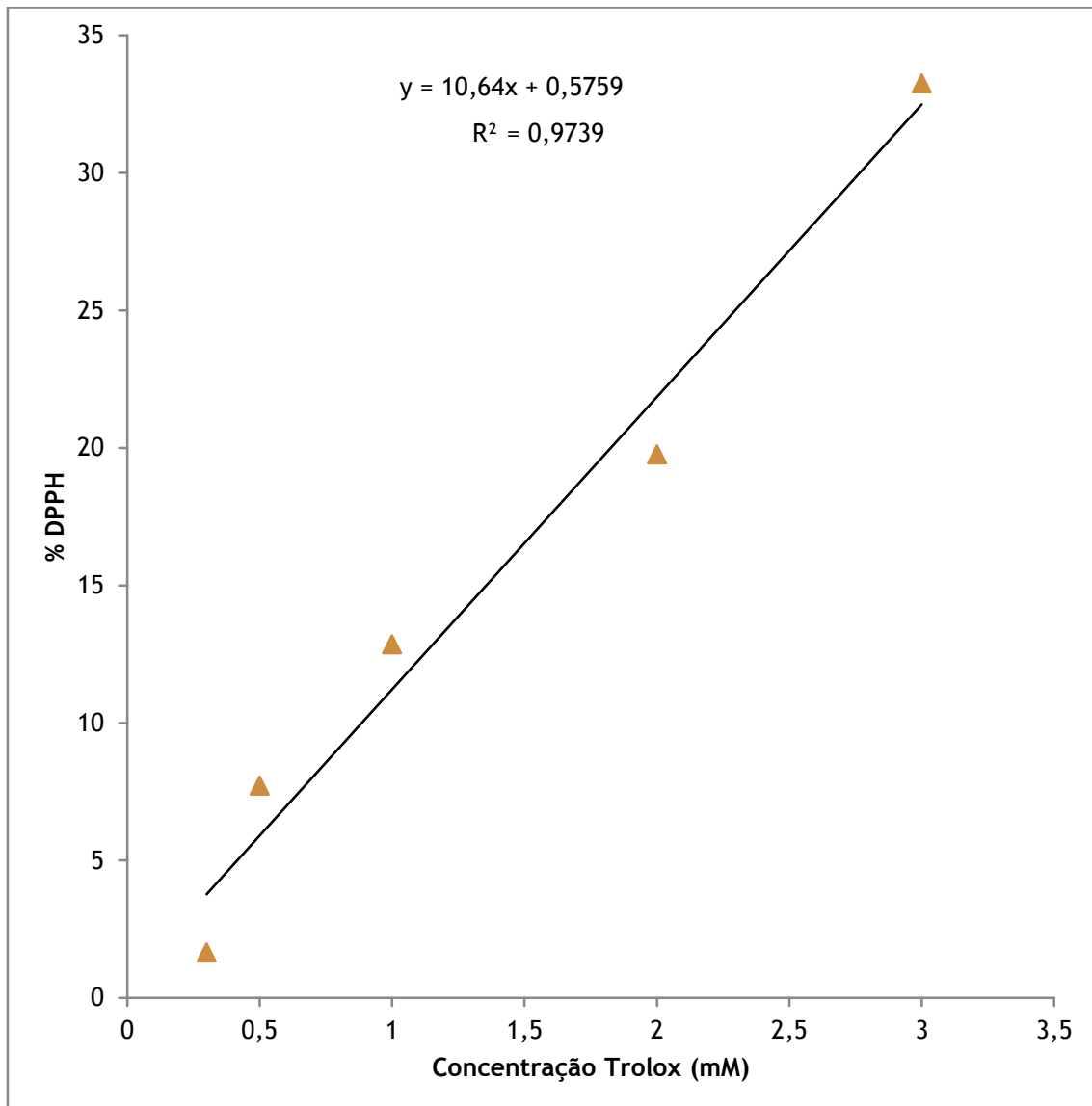


Figura 21 - Curva de Calibração Padrão para a determinação da capacidade antioxidante das infusões.

Em seguida realizaram-se os testes espectrofotométricos de forma a determinar a capacidade antioxidante de cada amostra, por extrapolação dos valores obtidos na curva de calibração aplicada. Os resultados são expressos em Equivalentes de Trolox / mL de amostra (Tabela 9).

Tabela 9 - Capacidade antioxidante das infusões obtidas por diferentes tratamentos de altas pressões (200, 300, 400 e 500 MPa - 5min). Os valores representam médio  $\pm$  desvio-padrão. Os valores da média com diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

<b>Tratamento (MPa)</b>	<b>Equivalentes de Trolox /mL de amostra</b>
200	99,06 <sup>a</sup> $\pm$ 4,89
300	108,05 <sup>a</sup> $\pm$ 4,74
400	86,42 <sup>a</sup> $\pm$ 4,74
500	91,40 <sup>a</sup> $\pm$ 4,59

A capacidade antioxidante está diretamente relacionada com a quantidade de compostos fenólicos presentes nos tecidos vegetais (Kahkonen et al. 1999). No entanto, apesar de no ponto anterior terem sido descritas diferenças significativas no conteúdo total de polifenóis conforme a pressão a que eram extraídos, não se verifica a mesma correspondência para a capacidade antioxidante destas infusões. Tal poderá ser explicado pela diversidade inerente ao perfil fenólico de cada amostra que confere um caráter antioxidante semelhante, independentemente da quantidade de polifenóis extraído das infusões sujeitas aos tratamentos de HPP distintos (200, 300, 400 e 500 MPa – 5 min). Outra hipótese que poderá explicar os resultados obtidos será a presença de compostos antioxidantes não fenólicos, como por exemplo vitamina C, bastante abundante em subprodutos da couveflor (Stojceska et al. 2008).

## Conclusões

Todas as infusões de subprodutos de couve-flor obtidas por aplicação de diferentes tratamentos de HPP são caracterizadas por uma considerável capacidade bactericida frente a *S. Typhimurium*, provocando danos e morte nas células microbianas.

A pressão ao qual a infusão é submetida influencia diretamente o conteúdo total de compostos bioativos, sendo que pressões superiores apresentam uma maior capacidade de extração de compostos bioativos. Ou seja, pressões exercidas em amostras de subprodutos de couve-flor na ordem dos 400 e 500 MPa, durante 5 minutos, extraem uma quantidade maior de polifenóis total do que pressões na ordem dos 200 e 300 MPa em igual período de tempo.

Estes resultados distintos são igualmente detetados na capacidade antimicrobiana das infusões resultantes, pois observam-se diferenças significativas nos valores de  $b$  da equação de Weibull obtidos para a inativação de *S. Typhimurium* durante a sua exposição às infusões de subprodutos de couve-flor obtidas mediante a aplicação de diferentes tratamentos de HPP. Deste modo pode-se constatar que a inativação do microrganismo apresenta maior velocidade quando maior a pressão a que a infusão preparada é sujeita. Ou seja, tratamentos de 400 e 500 MPa (5 minutos) induzem uma morte mais rápida do patogénico do que tratamentos de 200 e 300 MPa (5 minutos).

A temperatura de incubação é um fator que influencia o crescimento/inativação de *S. Typhimurium*, sendo que as amostras inoculadas com infusões de couve-flor e mantidas a temperaturas de refrigeração morrem mais lentamente do que mantidas a temperaturas mais altas.

Não foram observadas diferenças significativas na capacidade antioxidante das infusões obtidas por tratamentos de HPP de pressão crescente (200, 300, 400 e 500 MPa – 5min)

## Referências Bibliográficas

- Agati, G., C. Brunetti, M. Di Ferdinando, F. Ferrini, S. Pollastri and M. Tattini (2013). "Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past." *Plant Physiology and Biochemistry* **72**(0): 35-45.
- Akbarian, A., A. Golian, A. Gilani, H. Kermanshahi, S. Zhaleh, A. Akhavan, S. De Smet and J. Michiels (2013). "Effect of feeding citrus peel extracts on growth performance, serum components, and intestinal morphology of broilers exposed to high ambient temperature during the finisher phase." *Livestock Science* **157**(2-3): 490-497.
- Akhmazillah, M. F. N., M. M. Farid and F. V. M. Silva (2013). "High pressure processing (HPP) of honey for the improvement of nutritional value." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **20**(0): 59-63.
- Almosnino, A. M. and J. M. Belin (1991). "Apple pomace - an enzyme-system for producing aroma compounds from polyunsaturated fatty-acids " *Biotechnology Letters* **13**(12): 893-898.
- Altan, A., K. L. McCarthy and M. Maskan (2008). "Evaluation of snack foods from barley-tomato pomace blends by extrusion processing." *Journal of Food Engineering* **84**(2): 231-242.
- Anany, H., L. Y. Brovko, T. El Arabi and M. W. Griffiths (2015). 5 - Bacteriophages as antimicrobials in food products: Applications against particular pathogens. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. T. M. Taylor. Oxford, Woodhead Publishing: 89-116.
- Angulo, F. J., K. R. Johnson, R. V. Tauxe and M. L. Cohen (2000). "Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal Salmonella: implications for the use of fluoroquinolones in food animals." *Microb Drug Resist* **6**(1): 77-83.
- Attri, B. L. and S. B. Maini (1996). "Pectin from galgal (Citrus pseudolimon Tan) peel." *Bioresource Technology* **55**(1): 89-91.
- Barbosa-Cánovas, G. V. and P. Juliano (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. *Food engineering: Integrated approaches*, Springer: 9-46.
- Barry-Ryan, C. (2015). 10 - Physical and chemical methods for food preservation using natural antimicrobials. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. T. M. Taylor. Oxford, Woodhead Publishing: 211-228.
- Beecher, C. W. (1994). "Cancer preventive properties of varieties of Brassica oleracea: a review." *Am J Clin Nutr* **59**(5 Suppl): 1166s-1170s.
- Bell, C. and A. Kyriakides (2008). *Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods*, John Wiley & Sons.
- Bermúdez-Aguirre, D. and G. Barbosa-Cánovas (2011). "An Update on High Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications." *Food Engineering Reviews* **3**(1): 44-61.
- Bocco, A., M. E. Cuvelier, H. Richard and C. Berset (1998). "Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(6): 2123-2129.
- Boudet, A. M. (2007). "Evolution and current status of research in phenolic compounds." *Phytochemistry* **68**(22-24): 2722-2735.
- Braddock, R. J. (1995). "By-products of citrus fruit." *Food Technology* **49**(9): 74-&.
- Carson, K. J., J. L. Collins and M. P. Penfield (1994). "Unrefined, dried apple pomace as a potential food ingredient." *Journal of Food Science* **59**(6): 1213-1215.
- Cartea, M. E., M. Francisco, P. Soengas and P. Velasco (2011). "Phenolic compounds in Brassica vegetables." *Molecules* **16**(1): 251-280.
- Carvalho, F., J. C. Roseiro and M. T. A. Collaco (1994). "Biological conversion of tomato pomace by pure and mixed fungal cultures." *Process Biochemistry* **29**(7): 601-605.
- Cavallaro, E., K. Date, C. Medus, S. Meyer, B. Miller, C. Kim, S. Nowicki, S. Cosgrove, D. Sweat and Q. Phan (2011). "Salmonella Typhimurium infections associated with peanut products." *New England Journal of Medicine* **365**(7): 601-610.
- Chantaro, P., S. Devahastin and N. Chiewchan (2008). "Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels." *Lwt-Food Science and Technology* **41**(10): 1987-1994.
- Chau, C. F. and Y. L. Huang (2004). "Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source." *Food Chemistry* **85**(2): 189-194.

- Chen, H. and D. G. Hoover (2004). "Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**(3): 269-276.
- Chkhikvishvili, I. D. and N. N. Gogiya (1995). "Flavonoids of mandarin fruit wastes and their fungistatic effect on the fungus *Phoma tracheiphila*." *Applied Biochemistry and Microbiology* **31**(3): 292-296.
- Coll, M. D., L. Coll, J. Laencina and F. A. Tomas-Barberan (1998). "Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons." *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* **206**(6): 404-407.
- Corrales, M., S. Toepfl, P. Butz, D. Knorr and B. Tauscher (2008). "Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**(1): 85-91.
- Davidson, P. M. and T. M. Taylor (2007). "Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds."
- de Ancos, B., S. Sgroppo, L. Plaza and M. P. Cano (2002). "Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**(8): 790-796.
- De Nicola, G. R., E. Pagnotta, M. Bagatta, P. Rollin and R. Iori (2010). "Brassicaceae sprouts as a source of compounds beneficial to health." *Journal of Biotechnology* **150**, Supplement(0): 300.
- Del Valle, M., M. Camara and M. E. Torija (2006). "Chemical characterization of tomato pomace." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**(8): 1232-1236.
- Demirbas, A. (2009). "Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review." *Applied Energy* **86**: S108-S117.
- Demirdoven, A., S. Karabiyikli, K. Tokatli and N. Oncul (2015). "Inhibitory effects of red cabbage and sour cherry pomace anthocyanin extracts on food borne pathogens and their antioxidant properties." *Lwt-Food Science and Technology* **63**(1): 8-13.
- Dhillon, G. S., S. Kaur and S. K. Brar (2013). "Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27**: 789-805.
- Dong, X., M. Zhao, J. Shi, B. Yang, J. Li, D. Luo, G. Jiang and Y. Jiang (2011). "Effects of combined high-pressure homogenization and enzymatic treatment on extraction yield, hydrolysis and function properties of peanut proteins." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **12**(4): 478-483.
- Dore, K., J. Buxton, B. Henry, F. Pollari, D. Middleton, M. Fyfe, R. Ahmed, P. Michel, A. King, C. Tinga and J. B. Wilson (2004). "Risk factors for *Salmonella typhimurium* DT104 and non-DT104 infection: a Canadian multi-provincial case-control study." *Epidemiol Infect* **132**(3): 485-493.
- EU (2008). Directive of European Parliament and Counsel relative to residues. E. Union. Brussels. **312**.
- Fahey, J. and K. Stephenson (1999). "Cancer chemoprotective effects of cruciferous vegetables." *HortScience* **34**: 1159-1163.
- FAO. and OAA. (2009). Food losses and waste: FAO Yearbook 2009, Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO.
- FAOSTAT. (2012). "FaoStat Database." Retrieved 2nd July, 2015, from <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Fernández García, A., P. Butz and B. Tauscher (2000). "Does the antioxidant potential of high pressure treated apple juice change during storage?" *International Journal of High Pressure Research* **19**(1-6): 153-160.
- Ferreira, D., G. G. Gross, H. Kolodziej and T. Yoshida (2005). "Tannins and related polyphenols: Fascinating natural products with diverse implications for biological systems, ecology, industrial applications and health protection." *Phytochemistry* **66**(18): 2124-2126.
- Ferreres, F., C. Sousa, V. Vrchovská, P. Valentão, J. Pereira, R. Seabra and P. Andrade (2006). "Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves." *European Food Research and Technology* **222**(1-2): 88-98.
- Ferreres, F., P. Valentão, R. Llorach, C. Pinheiro, L. Cardoso, J. A. Pereira, C. Sousa, R. M. Seabra and P. B. Andrade (2005). "Phenolic compounds in external leaves of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC)." *J Agric Food Chem* **53**(8): 2901-2907.

- Foo, L. Y. and Y. R. Lu (1999). "Isolation and identification of procyanidins in apple pomace." *Food Chemistry* **64**(4): 511-518.
- Forum, W. E. (2010). "Driving Sustainable Consumption, Value Chain Waste." Retrieved 25 January 2015.
- Furukawa, S., M. Shimoda and I. Hayakawa (2003). "Mechanism of the inactivation of bacterial spores by reciprocal pressurization treatment." *Journal of Applied Microbiology* **94**(5): 836-841.
- Gandhi, V. M., M. J. Mulky, B. Mukerji, V. J. Iyer and K. M. Cherian (1997). "Safety evaluation of wild apricot oil." *Food and Chemical Toxicology* **35**(6): 583-587.
- Gasa, J., C. Castrillo, M. D. Baucells and J. A. Guada (1989). "By-products from the canning industry as feedstuff for ruminants: Digestibility and its prediction from chemical composition and laboratory bioassays." *Animal Feed Science and Technology* **25**(1): 67-77.
- Goodman, D. (2003). "The quality 'turn' and alternative food practices: reflections and agenda." *Journal of Rural Studies* **19**(1): 1-7.
- Gould, L. H., K. A. Walsh, A. R. Vieira, K. Herman, I. T. Williams, A. J. Hall and D. Cole (2013). "Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1998-2008." *MMWR Surveill Summ* **62**(2): 1-34.
- Gratacós-Cubarsí, M., A. Ribas-Agustí, J. A. García-Regueiro and M. Castellari (2010). "Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*." *Food Chemistry* **121**(1): 257-263.
- Grin, J. (2012). "Changing Government, Kitchens, Supermarkets, Firms and Farms." *Food Practices in Transition. Changing Food Consumption, Retails and Production in the Age of Reflexive Modernity*. Routledge: 35-59.
- Grohmann, K. and R. J. Bothast (1994). Pectin-rich residues generated by processing of citrus-fruits, apples, and sugar-beets - enzymatic-hydrolysis and biological conversion to value-added products. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. M. E. Himmel, J. O. Baker and R. P. Overend. Washington, Amer Chemical Soc. **566**: 372-390.
- Guo, X., D. Han, H. Xi, L. Rao, X. Liao, X. Hu and J. Wu (2012). "Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison." *Carbohydrate Polymers* **88**(2): 441-448.
- Gustavsson, J., C. Cederberg, U. Sonesson, R. Van Otterdijk and A. Meybeck (2011). "Global food losses and food waste." *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom*.
- Helms, M., S. Ethelberg and K. Molbak (2005). "International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001." *Emerg Infect Dis* **11**(6): 859-867.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman and M. B. Katan (1992). "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**(12): 2379-2383.
- Hohmann, E. L. (2001). "Nontyphoidal salmonellosis." *Clin Infect Dis* **32**(2): 263-269.
- Huang, H.-W., C.-P. Hsu, B. B. Yang and C.-Y. Wang (2013). "Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology." *Trends in Food Science & Technology* **33**(1): 54-62.
- Huang, H.-W., H.-M. Lung, B. B. Yang and C.-Y. Wang (2014). "Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing." *Food Control* **40**(0): 250-259.
- Humphrey, T. (2004). "Salmonella, stress responses and food safety." *Nature Reviews Microbiology* **2**(6): 504-509.
- Indrawati, A. Van Loey and M. Hendrickx (2004). "Pressure and temperature stability of water-soluble antioxidants in orange and carrot juice: a kinetic study." *European Food Research and Technology* **219**(2): 161-166.
- Jaime, L., F. Martinez, M. A. Martin-Cabrejas, E. Molla, F. J. Lopez-Andreu, K. W. Waldron and R. M. Esteban (2001). "Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**(2): 177-182.
- Jimenez-Escrig, A., M. Rincon, R. Pulido and F. Saura-Calixto (2001). "Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(11): 5489-5493.
- John, K. S., L. J. M. Rao, S. G. Bhat and U. Rao (1999). "Characterization of aroma components of sap from different Indian mango varieties." *Phytochemistry* **52**(5): 891-894.

- Joshi, V. K. and D. K. Sandhu (1996). "Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace." *Bioresource Technology* **56**(2-3): 251-255.
- Jovanovich, S. B., M. Martinell, M. T. Record and R. R. Burgess (1988). "Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *Journal of Bacteriology* **170**(2): 534-539.
- Jun, X., S. Deji, L. Ye and Z. Rui (2011). "Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves." *Food Control* **22**(8): 1473-1476.
- Kahkonen, M. P., A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala and M. Heinonen (1999). "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(10): 3954-3962.
- Kirwan, J., B. Ilbery, D. Maye and J. Carey (2013). "Grassroots social innovations and food localisation: An investigation of the Local Food programme in England." *Global Environmental Change* **23**(5): 830-837.
- Knoblich, M., B. Anderson and D. Latshaw (2005). "Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**(7): 1166-1170.
- Koubala, B. B., S. Christiaens, G. Kansci, A. M. Van Loey and M. E. Hendrickx (2014). "Isolation and structural characterisation of papaya peel pectin." *Food Research International* **55**: 215-221.
- Krishna, C. (1999). "Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes." *Bioresource Technology* **69**(3): 231-239.
- Krishna, C. and M. Chandrasekaran (1996). "Banana waste as substrate for alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid state fermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**(2): 106-111.
- Labbé, R. G. and S. García (2001). "Guide to foodborne pathogens."
- Larrauri, J. A., P. Ruperez, B. Borroto and F. SauraCalixto (1996). "Mango peels as a new tropical fibre: Preparation and characterization." *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **29**(8): 729-733.
- Larrauri, J. A., P. Ruperez and F. SauraCalixto (1997). "Mango peel fibres with antioxidant activity." *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* **205**(1): 39-42.
- Laufenberg, G., B. Kunz and M. Nystroem (2003). "Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementation." *Bioresource Technology* **87**(2): 167-198.
- Laufenberg, G., B. Kunz and M. Nystroem (2003). "Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations." *Bioresource Technology* **87**(2): 167-198.
- Lin, C. S. K., L. A. Pfaltzgraff, L. Herrero-Davila, E. B. Mubofu, S. Abderrahim, J. H. Clark, A. A. Koutinas, N. Kopsahelis, K. Stamatelatou, F. Dickson, S. Thankappan, Z. Mohamed, R. Brocklesby and R. Luque (2013). "Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective." *Energy & Environmental Science* **6**(2): 426-464.
- Llorach, R., A. Gil-Izquierdo, F. Ferreres and F. A. Tomas-Barberan (2003). "HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(13): 3895-3899.
- Lommen, A., M. Godejohann, D. P. Venema, P. C. H. Hollman and M. Spraul (2000). "Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel." *Analytical Chemistry* **72**(8): 1793-1797.
- Lu, Y. R. and L. Y. Foo (1997). "Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace." *Food Chemistry* **59**(2): 187-194.
- Lu, Y. R. and L. Y. Foo (2000). "Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace." *Food Chemistry* **68**(1): 81-85.
- Luciano, F. B. and R. A. Holley (2009). "Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157: H7." *International journal of food microbiology* **131**(2): 240-245.

- Lund, B., T. C. Baird-Parker and G. W. Gould (2000). *Microbiological Safety and Quality of Food*, Springer.
- Manthey, J. A., N. Guthrie and K. Grohmann (2001). "Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation." *Current Medicinal Chemistry* **8**(2): 135-153.
- Mari, M., O. Leoni, R. Bernardi, F. Neri and S. Palmieri (2008). "Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates." *Postharvest Biology and Technology* **47**(1): 61-67.
- Martincabrejas, M. A., R. M. Esteban, F. J. Lopezandreu, K. Waldron and R. R. Selvendran (1995). "Dietary fiber content of pear and kiwi pomaces." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**(3): 662-666.
- Martindale, W. (2010). "Waste: uncovering the global food scandal."
- McDonald, K. and D. W. Sun (1999). "Predictive food microbiology for the meat industry: a review." *International Journal of Food Microbiology* **52**(1-2): 1-27.
- Medeiros, R. G., M. Soffner, J. A. Thome, A. O. G. Cacaís, R. S. Estelles, B. C. Salles, H. M. Ferreira, S. A. L. Neto, F. G. Silva and E. X. F. Filho (2000). "The production of hemicellulases by aerobic fungi on medium containing residues of banana plant as substrate." *Biotechnology Progress* **16**(3): 522-524.
- Medus, C., S. Meyer, K. Smith, S. Jawahir, B. Miller, K. Viger, M. Forstner, E. Brandt, S. Nowicki and E. Salehi (2009). "Multistate outbreak of Salmonella infections associated with peanut butter and peanut butter-containing products-United States, 2008-2009." *Morbidity and mortality weekly report* **58**(4): 85-90.
- Mohamed, H. M., B. H. Diono and A. E. Yousef (2012). "Structural changes in listeria monocytogenes treated with gamma radiation, pulsed electric field and ultra-high pressure." *Journal of Food Safety* **32**(1): 66-73.
- Monteiro, A. and T. Lunn (1998). Trends and perspectives of vegetable Brassica breeding world-wide. WCHR-World Conference on Horticultural Research 495.
- Moody, A., G. Marx, B. G. Swanson and D. Bermúdez-Aguirre (2014). "A comprehensive study on the inactivation of Escherichia coli under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound." *Food Control* **37**: 305-314.
- Morata, A., I. Loira, R. Vejarano, M. A. Banuelos, P. D. Sanz, L. Otero and J. A. Suarez-Lepe (2015). "Grape Processing by High Hydrostatic Pressure: Effect on Microbial Populations, Phenol Extraction and Wine Quality." *Food and Bioprocess Technology* **8**(2): 277-286.
- Moreno, D. A., S. Pérez-Balibrea, F. Ferreres, Á. Gil-Izquierdo and C. García-Viguera (2010). "Acylated anthocyanins in broccoli sprouts." *Food Chemistry* **123**(2): 358-363.
- Mújica-Paz, H., A. Valdez-Fragoso, C. T. Samson, J. Welti-Chanes and A. Torres (2011). "High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods." *Food and Bioprocess Technology* **4**(6): 969-985.
- Munesue, Y., T. Masui and T. Fushima (2015). "The effects of reducing food losses and food waste on global food insecurity, natural resources, and greenhouse gas emissions." *Environmental Economics and Policy Studies* **17**(1): 43-77.
- Mustafa, A. and C. Turner (2011). "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review." *Analytica Chimica Acta* **703**(1): 8-18.
- Naghshineh, M., K. Olsen and C. A. Georgiou (2013). "Sustainable production of pectin from lime peel by high hydrostatic pressure treatment." *Food Chemistry* **136**(2): 472-478.
- Namasivayam, C. and N. Kanchana (1992). "Waste banana pith as adsorbent for color removal from wastewaters." *Chemosphere* **25**(11): 1691-1705.
- Nigam, J. N. (2000). "Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells." *Journal of Biotechnology* **80**(2): 189-193.
- Odozi, T. and R. Emelike (1985). "The sorption of heavy-metals with corncob hydroxylate red onion skin resins." *Journal of Applied Polymer Science* **30**(6): 2715-2719.
- Ozaki, Y., M. Miyake, N. Inaba, S. Ayano, Y. Ifuku and S. Hasegawa (1999). "Limonoid glucosides of Satsuma mandarin and its processing products." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **217**: U44-U44.
- Pagan, J. and A. Ibarz (1999). "Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace." *Journal of Food Engineering* **39**(2): 193-201.

- Pagan, J., A. Ibarz, M. Llorca and L. Coll (1999). "Quality of industrial pectin extracted from peach pomace at different pH and temperatures." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**(7): 1038-1042.
- Pagan, J., A. Ibarz, M. Llorca, A. Pagan and G. V. Barbosa-Canovas (2001). "Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace." *Food Research International* **34**(7): 605-612.
- Parfitt, J., M. Barthel and S. MacNaughton (2010). "Food waste within food supply chains: Quantification and potential for change to 2050." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**(1554): 3065-3081.
- Patras, A., N. Brunton, S. Da Pieve, F. Butler and G. Downey (2009). "Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purées." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**(1): 16-22.
- Pazmino-Duran, E. A., M. M. Giusti, R. E. Wrolstad and M. B. A. Gloria (2001). "Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants." *Food Chemistry* **73**(3): 327-332.
- Pereira, R. N. and A. A. Vicente (2010). "Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing." *Food Research International* **43**(7): 1936-1943.
- Pilavtepe-Celik, M., M. O. Balaban, H. Alpas and A. E. Yousef (2008). "Image analysis based quantification of bacterial volume change with high hydrostatic pressure." *J Food Sci* **73**(9): M423-429.
- Plaza, L., C. Sánchez-Moreno, B. De Ancos, P. Elez-Martínez, O. Martín-Belloso and M. P. Cano (2011). "Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization." *LWT-Food Science and Technology* **44**(4): 834-839.
- Podszędek, A. (2007). "Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review." *LWT - Food Science and Technology* **40**(1): 1-11.
- Prasad, K. N., B. Yang, J. Shi, C. Yu, M. Zhao, S. Xue and Y. Jiang (2010). "Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressure-assisted extraction." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**(2): 471-477.
- Prasad, K. N., B. Yang, M. Zhao, X. Wei, Y. Jiang and F. Chen (2009). "High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp." *Separation and Purification Technology* **70**(1): 41-45.
- Prasad, N. K., B. Yang, M. Zhao, B. S. Wang, F. Chen and Y. Jiang (2009). "Effects of high-pressure treatment on the extraction yield, phenolic content and antioxidant activity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp." *International journal of food science & technology* **44**(5): 960-966.
- Puravankara, D., V. Boghra and R. S. Sharma (2000). "Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(4): 522-526.
- Rabsch, W., H. Tschape and A. J. Baumler (2001). "Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems." *Microbes Infect* **3**(3): 237-247.
- Rastogi, N. K., K. S. Raghavarao, V. M. Balasubramaniam, K. Niranjan and D. Knorr (2007). "Opportunities and challenges in high pressure processing of foods." *Crit Rev Food Sci Nutr* **47**(1): 69-112.
- Rauha, J. P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela and P. Vuorela (2000). "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds." *International Journal of Food Microbiology* **56**(1): 3-12.
- Reisch, L., U. Eberle and S. Lorek (2013). "Sustainable food consumption: an overview of contemporary issues and policies." *Sustainability: Science, Practice, & Policy* **9**(2): 7-25.
- RiceEvans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radical Biology and Medicine* **20**(7): 933-956.
- Rodrigo, D., G. V. Barbosa-Canovas, A. Martinez and M. Rodrigo (2003). "Weibull distribution function based on an empirical mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields." *J Food Prot* **66**(6): 1007-1012.
- Rotmans, J. and D. Loorbach (2009). "Complexity and Transition Management." *Journal of Industrial Ecology* **13**(2): 184-196.

- Sánchez-Moreno, C., B. de Ancos, L. Plaza, P. Elez-Martínez and M. P. Cano (2009). "Nutritional Approaches and Health-Related Properties of Plant Foods Processed by High Pressure and Pulsed Electric Fields." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **49**(6): 552-576.
- Sánchez-Moreno, C., J. A. Larrauri and F. Saura-Calixto (1998). "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**(2): 270-276.
- Sánchez-Moreno, C., L. Plaza, B. de Ancos and M. P. Cano (2004). "Effect of combined treatments of high-pressure and natural additives on carotenoid extractability and antioxidant activity of tomato puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.)." *European Food Research and Technology* **219**(2): 151-160.
- Santos, M. C., Â. C. Salvador, F. M. Domingues, J. M. Cruz and J. A. Saraiva (2013). "Use of High Hydrostatic Pressure to Increase the Content of Xanthohumol in Beer Wort." *Food and Bioprocess Technology* **6**(9): 2478-2485.
- Sanz-Puig, M., M. C. Pina-Pérez, D. Rodrigo and A. Martínez-López (2015). "Antimicrobial activity of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) by-product against *Listeria monocytogenes*." *Food Control* **50**(0): 435-440.
- Saucedo-Reyes, D., A. Marco-Celdran, M. C. Pina-Perez, D. Rodrigo and A. Martinez-Lopez (2009). "Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**(2): 135-141.
- Scalzo, R. L., A. Genna, F. Branca, M. Chedin and H. Chassaigne (2008). "Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) and cabbage (*B. oleracea* L. var. *capitata*) and its stability in relation to thermal treatments." *Food Chemistry* **107**(1): 136-144.
- Schieber, A., P. Keller and R. Carle (2001). "Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* **910**(2): 265-273.
- Schieber, A., F. C. Stintzing and R. Carle (2001). "By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments." *Trends in Food Science & Technology* **12**(11): 401-413.
- Shin, J.-S., S.-C. Ahn, S.-W. Choi, D.-U. Lee, B.-Y. Kim and M.-Y. Baik (2010). "Ultra high pressure extraction (UHPE) of ginsenosides from Korean *Panax ginseng* powder." *Food Science and Biotechnology* **19**(3): 743-748.
- Singleton, V. L. (1985). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences*(48): 18-18.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). "Recent advances in the microbiology of high pressure processing." *Trends in Food Science & Technology* **9**(4): 152-158.
- Sousa, C., G. Lopes, D. M. Pereira, M. Taveira, P. Valentao, R. M. Seabra, J. A. Pereira, P. Baptista, F. Ferreres and P. B. Andrade (2007). "Screening of antioxidant compounds during sprouting of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC." *Comb Chem High Throughput Screen* **10**(5): 377-386.
- Sousa, C., P. Valentao, J. Rangel, G. Lopes, J. A. Pereira, F. Ferreres, R. M. Seabra and P. B. Andrade (2005). "Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic compounds of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. *costata* DC)." *J Agric Food Chem* **53**(23): 9128-9132.
- Souza, O., M. A. Schulz, G. A. A. Fischer, T. M. Wagner and N. Sellin (2012). "Alternative energy from biomass: Bioethanol from banana pulp and peels." *Revista Brasileira De Engenharia Agricola E Ambiental* **16**(8): 915-921.
- Sreenath, H. K., P. G. Crandall and R. A. Baker (1995). "Utilization of citrus by-products and wastes as beverage clouding agents." *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**(2): 190-194.
- Stojceska, V., P. Ainsworth, A. Plunkett, E. İbanoğlu and Ş. İbanoğlu (2008). "Cauliflower by-products as a new source of dietary fibre, antioxidants and proteins in cereal based ready-to-eat expanded snacks." *Journal of Food Engineering* **87**(4): 554-563.
- Stredansky, M., E. Conti, S. Stredanska and F. Zanetti (2000). "gamma-Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace." *Bioresource Technology* **73**(1): 41-45.
- Subagio, A., N. Morita and S. Sawada (1996). "Carotenoids and their fatty-acid esters in banana peel." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **42**(6): 553-566.
- Sun-Waterhouse, D., I. Wen, R. Wibisono, L. D. Melton and S. Wadhwa (2009). "Evaluation of the extraction efficiency for polyphenol extracts from by-products of green kiwifruit juicing." *International Journal of Food Science and Technology* **44**(12): 2644-2652.

- Swinnen, I. A. M., K. Bernaerts, E. J. J. Dens, A. H. Geeraerd and J. F. Van Impe (2004). "Predictive modelling of the microbial lag phase: a review." *International Journal of Food Microbiology* **94**(2): 137-159.
- Tatsuzawa, F., N. Saito, K. Shinoda, A. Shigihara and T. Honda (2006). "Acylated cyanidin 3-sambubioside-5-glucosides in three garden plants of the Cruciferae." *Phytochemistry* **67**(12): 1287-1295.
- Thi, N. B. D., G. Kumar and C.-Y. Lin (2015). "An overview of food waste management in developing countries: Current status and future perspective." *Journal of Environmental Management* **157**(0): 220-229.
- Tholozan, J., M. Ritz, F. Jugiau, M. Federighi and J. Tissier (2000). "Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*." *Journal of Applied Microbiology* **88**(2): 202-212.
- Toepfl, S., A. Mathys, V. Heinz and D. Knorr (2006). "Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing." *Food Reviews International* **22**(4): 405-423.
- Torre, M., A. R. Rodriguez and F. Sauracalixto (1995). "Interactions of Fe(II), Ca(II) and Fe(III) with high dietary fiber materials - a physicochemical approach." *Food Chemistry* **54**(1): 23-31.
- Torres, J. A. and G. Velazquez (2005). "Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods." *Journal of Food Engineering* **67**(1-2): 95-112.
- Tran, C. T. and D. A. Mitchell (1995). "Pineapple waste - a novel substrate for citric acid production by solid-state fermentation." *Biotechnology Letters* **17**(10): 1107-1110.
- Tuncel, G., M. J. R. Nout and L. Brimer (1995). "The effects of grinding, soaking and cooking on the degradation of amygdalin of bitter apricot seeds." *Food Chemistry* **53**(4): 447-451.
- Tuncel, G., M. J. R. Nout and L. Brimer (1998). "Degradation of cyanogenic glycosides of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size." *Food Chemistry* **63**(1): 65-69.
- Upadhyay, A., H. K. Sharma and B. C. Sarkar (2010). "Optimization of carrot pomace powder incorporation on extruded product quality by response surface methodology." *Journal of Food Quality* **33**(3): 350-369.
- Vallejo, F., F. A. Tomás-Barberán and F. Ferreres (2004). "Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1054**(1-2): 181-193.
- Vanhamme, P. J., P. M. K. Hingley and P. A. Lindgreen (2012). *The Crisis of Food Brands: Sustaining Safe, Innovative and Competitive Food Supply*, Ashgate Publishing Limited.
- Velge, P., A. Cloeckaert and P. Barrow (2005). "Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes." *Vet Res* **36**(3): 267-288.
- Vittersø, G. and A. M. Jervell (2011). "Direct markets as multiple consumption spaces: The case of two Norwegian collective marketing initiatives." *International Journal of Sociology of Agriculture and Food* **18**(1): 54-69.
- Vittersø, G. and T. Tangeland (2015). "The role of consumers in transitions towards sustainable food consumption. The case of organic food in Norway." *Journal of Cleaner Production* **92**(0): 91-99.
- Wang, C.-Y., H.-W. Huang, C.-P. Hsu, Y.-T. Shyu and B. B. Yang (2013). "Inactivation and morphological damage of *Vibrio parahaemolyticus* treated with high hydrostatic pressure." *Food Control* **32**(2): 348-353.
- Wang, C. Y., H. W. Huang, C. P. Hsu and B. B. Yang (2015). "Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology." *Crit Rev Food Sci Nutr*: 0.
- Wen, L., R. E. Wrolstad and V. L. Hsu (1999). "Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) juice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(3): 850-853.
- Wilson, A. E., M. Bergaentzlé, F. Bindler, E. Marchioni, A. Lintz and S. Ennahar (2013). "In vitro efficacies of various isothiocyanates from cruciferous vegetables as antimicrobial agents against foodborne pathogens and spoilage bacteria." *Food Control* **30**(1): 318-324.

- Wrolstad, R. E. and L. Wen Antibrowning and antioxidant composition for food comprises sinapyl compound, e.g. S-sinapyl-L-cysteine, isolated from natural source, e.g. pineapple juice, UNIV OREGON HEALTH SCI (UYOR-Non-standard).
- Wu, X., Q.-h. Zhou and K. Xu (2009). "Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs?" *Acta Pharmacologica Sinica* **30**(5): 501-512.
- Wuytack, E. Y., L. D. T. Phuong, A. Aertsen, K. M. F. Reyns, D. Marquenie, B. De Ketelaere, B. Masschalck, B. M. I. Van Opstal, A. M. J. Diels and C. W. Michiels (2003). "Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments." *Journal of Food Protection* **66**(1): 31-37.
- Xi, J. (2006). "Effect of High Pressure Processing on the Extraction of Lycopene in Tomato Paste Waste." *Chemical Engineering & Technology* **29**(6): 736-739.
- Xi, J., D. Shen, S. Zhao, B. Lu, Y. Li and R. Zhang (2009). "Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction." *Int J Pharm* **382**(1-2): 139-143.
- Yalcin, H., S. Karaman and I. Ozturk (2011). "Evaluation of antioxidant efficiency of potato and orange peels and apple pomace extracts in sunflower oil." *Italian Journal of Food Science* **23**(1): 55-61.
- Yanagida, A., T. Kanda, M. Tanabe, F. Matsudaira and J. G. O. Cordeiro (2000). "Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(11): 5666-5671.
- Yang, B., Y. Shi, X. Xia, M. Xi, X. Wang, B. Ji and J. Meng (2012). "Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure." *Food Control* **28**(2): 273-278.
- Yoon, K. Y., M. Cha, S. R. Shin and K. S. Kim (2005). "Enzymatic production of a soluble-fibre hydrolyzate from carrot pomace and its sugar composition." *Food Chemistry* **92**(1): 151-157.