Mestrado Integrado em Engenharia Química

Agentes Antimicrobianos Naturais: Vanilina e Fontes de Vanilina

Dissertação de Mestrado

de

Sérgio Filipe Santos Moreira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Frulact



Orientador na FEUP: **Prof. Manuel Simões**

Orientador na Frulact: **Engª. Cândida Miranda**

Co-Orientador na Frulact: **Engª. Rita Fulgêncio**



Departamento de Engenharia Química

Outubro, 2018

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, Prof. Dr. Manuel Simões da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e a Engª Cândia Miranda da Frulact por esta oportunidade, por toda a orientação, acompanhamento disponibilidade e ensinamentos transmitidos.

À Engª Rita Fulgêncio, por todo o apoio, orientação, motivação, conhecimentos transmitidos e acima de tudo por nunca ter duvidado do meu trabalho. Foi um enorme prazer ter partilhado esta experiencia contigo. Um enorme obrigado por tudo.

À Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e ao LEPABE, por fornecer todos os meios necessários para a realização desta dissertação.

À Profª. Drª. Lúcia Simões por toda a ajuda com a parte das soluções stock de esporos e por todo o conhecimento transmitido nesta área e à Drª. Anabela Borges por toda a ajuda na parte da determinação das MIC.

A todas a pessoas do departamento de Inovação e Desenvolvimento da Frulact, pelo ótimo ambiente de trabalho.

Gostaria também de agradecer aos meus colegas do laboratório E-101, à Catarina, à Isabel, à Inês, ao Josué e a Susana, por toda ajuda, pelo ambiente de trabalho fantástico e por animarem todos os dias de trabalho, foi um prazer passar este tempo convosco. A todas as pessoas do laboratório E007 por toda a assistência e momentos de diversão, nomeadamente à Ana Cláudia, à Diana e à Isabel. Às técnicas de laboratório, Carla Ferreira, Paula Pinheiro e Sílvia Faia, por toda ajuda, conhecimentos transmitidos, pelo bom ambiente e gargalhadas partilhadas durante estes meses de trabalho.

À Sofia, ao Eduardo e à Inês, pela amizade de longa data, por toda a motivação e incentivo e, especialmente, por me aturarem ao longo de todos estes anos.

Um dos maiores agradecimentos deste trabalho vai para as fantásticas pessoas que tive o prazer de conhecer ao longo dos últimos cinco anos e que tornaram a minha vida académica inesquecível. Sem vocês, nada disto seria possível, são poucas as palavras para vos agradecer o suficiente. Isto não e meu, é nosso.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer a minha família por sempre me apoiarem, por todos os valores transmitidos, por me mostrarem o caminho certo a seguir e acima de tudo pelo vosso amor incondicional.

"...os que têm juízos mais inteiros que só por puro engenho e por ciência vêm do mundo dos segredos escondidos..." Luís Vaz de Camões

Resumo

Cada vez mais existe um aumento da procura por produtos isentos de constituintes sintéticos, nomeadamente de preservantes como o sorbato de potássio, devido aos possíveis efeitos nocivos que estes podem ter na saúde do consumidor. Como tal, existe um aumento da procura por alternativas naturais (antimicrobianos naturais) que garantam a segurança dos bens alimentares e que apresentem um comportamento semelhante aos agentes antimicrobianos sintéticos. Os compostos fenólicos têm despertado grande interesse pois possuem propriedades antimicrobianas e antifúngicas, podendo ser utilizados como preservantes alimentares uma vez que a grande maioria apresenta o estatuto GRAS (Generaly Recongnized As Safe).

O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da aplicabilidade da vanilina (aldeído fenólico) como substituinte ao sorbato de potássio. Foram testados três extratos diferentes (aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado e extrato de baunilha orgânico) e vanilina natural. Numa primeira fase foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC) de todos os extratos e compostos contra fungos e leveduras isolados na unidade industrial de Tortosendo. O aroma de baunilha em pó, o extrato de baunilha concentrado e o extrato de baunilha orgânico, apresentaram valores de MIC muito elevados (maiores que 3%). A aplicação destes extratos a concentrações superiores a 1% iria causar grandes alterações nas propriedades sensoriais do produto final, como tal foram logo excluídos. Para a vanilina natural o valor da MIC obtido foi de 0,2%, sendo assim este foi o antimicrobiano selecionado, uma vez que possuí uma menor MIC, o que conduzirá a um menor efeito nas propriedades sensoriais.

Selecionado o antimicrobiano, foram realizados os testes em produto. Para tal a vanilina natural foi incorporada em preparados de fruta de morango posteriormente dosificados em iogurte. Tanto o preparado como o iogurte foram monitorizados ao longo de 28 dias de armazenamento a 4°C, quantificando-se bolores, leveduras e mesófilos totais (apenas para o preparado), sendo também avaliado o seu comportamento no controlo de uma hipotética contaminação com *Asperguillus* sp e *Penicilliium* sp. A vanilina mostrou-se eficaz, sendo que os resultados indicam que a mesma possuí um efeito bactéricida, uma vez que foi capaz de inibir o crescimento dos fungos, ao longo do tempo, no preparado. No caso do iogurte os resultados indicam que o seu efeito vai diminuindo ao longo do tempo.

Por fim foram realizadas analises sensórias aos iogurtes dosificados, sendo que 59% do painel de provadores achou que o iogurte com vanilina possuía um sabor muito diferente comparativamente com o padrão (iogurte contendo sorbato de potássio). A preferência do painel recaiu para o iogurte padrão (59%).

Palavras-chave: preservante, antimicrobiano natural, compostos fenólicos, MIC, Vanilina

Abstract

The demand for products free of synthetic constituents is increasing, particularly preservatives such as potassium sorbate, duo to the possible harmful effects they may have on consumer's health. As such, there is an increased demand for natural alternatives (natural antimicrobials) which ensure the safety of foodstuffs and which behave similarly to synthetic antimicrobial agents. The phenolic compounds have aroused great interest because they have antimicrobial and antifungal properties, being able to be used as food preservatives since the great majority presents GRAS (Generaly Recongnized As Safe) status.

The objective of this work was to evaluate the applicability of vanillin (phenolic aldehyde) as a substituent to potassium sorbate. Three different extracts were tested (vanilla powder flavor, concentrated vanilla extract and organic vanilla extract) and natural vanillin. In a first phase was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of all extracts and compounds against fungi and yeasts isolated in the industrial unit of Tortosendo. Vanilla powder, concentrated vanilla extract and organic vanilla extract had very high MIC values (greater than 3%). Application of these extracts at concentrations greater than 1% would cause major changes in the sensory properties of the final product and thus were soon excluded. Regarding the natural vanillin, the obtained MIC value was 0.2%, therefore it was the antimicrobial selected, with the lowest MIC, which will lead to a lower effect on the sensory properties.

Once the antimicrobial was selected, the product tests were performed. For this the natural vanillin was incorporated into strawberry fruit preparations later dosed into yogurt. Both the preparation and the yogurt were monitored during 28 days of storage at 4°C, quantifying molds, yeasts and total mesophiles (only for the preparation), and their behaviour in the control of a hypothetical contamination with *Asperguillus* sp and *Penicilium* sp. Vanillin was shown to be effective, with the results indicating that it had a bactericidal effect, since it was able to inhibit the growth of fungi over time for the preparations. In the case of yogurt the results indicate that its effect decreases over time.

Finally, sensory analysis of the dosed yogurts was done, with 59% of the panel of tasters finding that yogurt with vanillin had a very different taste compared to the standard (yogurt containing potassium sorbate). Panel preference fell to standard yogurt (59%).

Keywords: preservative, natural antimicrobial, phenolic compounds, MIC, vanillin.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Assinar e datar

Índice

1 Introdução 11

1.1 **Enquadramento e Apresentação do Projeto 11**

1.2 **Apresentação da Empresa 11**

1.3 **Contributos do Trabalho 12**

1.4 **Organização da Tese 12**

2 Contexto e Estado da Arte 13

2.1 **Necessidade de Conservação dos Alimentos 13**

2.2 **Fungos 14**

2.3 **Leveduras 15**

2.4 **Sorbato de Potássio (E202) 16**

2.5 **Demanda por Produtos Naturais 17**

2.5.1 "Clean Label" 18

2.6 **Preservantes Naturais Provenientes de Plantas 18**

2.7 **Vanilina 20**

3 Materiais e Métodos 23

3.1 **Manutenção das Culturas de Microrganismos 23**

3.2 **Agentes Antimicrobianos 23**

3.3 **Solução Stock de Esporos 23**

3.4 **Determinação da concentração mínima inibitória para Fungos Filamentosos 24**

3.5 **Determinação da concentração mínima inibitória para Leveduras 25**

3.6 **Preparado de Fruta de Morango 25**

3.7 **Quantificação de Fungos Filamentosos e Leveduras 25**

3.8 **Quantificação de Mesófilos Totais 26**

3.9 **Análise Sensorial 26**

3.10 **Análise económica 26**

3.11 **Análise Estatística 26**

4 Resultados e Discussão 27

4.1 Otimização do método de determinação da concentração mínima inibitória para fungos filamentosos 27

4.2 Determinação da concentração mínima inibitória para fungos filamentosos 29

4.2.1 Determinação concentração mínima inibitória a pH 7 29

4.2.2 Determinação da concentração mínima inibitória a pH 4,5 31

4.2.3 Determinação da concentração mínima inibitória de sorbato de potássio, vanilina e vanilina natural. 32

4.3 Determinação da concentração mínima inibitória para leveduras 34

4.4 Avaliação dos agentes antimicrobianos em preparados de fruta 34

4.4.1 Monitorização dos preparados de fruta ao longo de 28 dias. 36

4.4.2 Monitorização dos iogurtes o longo de 28 dias 38

4.5 Avaliação sensorial do iogurte dosificado com preparado de morango 38

4.6 Análise Económica 41

5 Conclusões 42

6 Avaliação do trabalho realizado 43

6.1 Objetivos Realizados 43

6.2 Limitações e Trabalho Futuro 43

6.3 Apreciação Final 43

7 Referências 45

Anexo 1 Otimização método de determinação da MIC para fungos filamentosos. 49

A1.1 Influência do tempo de incubação e concentração da suspensão de esporos no crescimento do fungo *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis em meio* NB suplementado com 1,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de triptona. 49

A1.2 Influência do tempo de incubação e concentração da suspensão de esporos no crescimento do fungo *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis em meio* MHB 50

A1.3 Influencia da temperatura ao longo de 48h no crescimento do fungo *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis* em meio NB suplementado com 1,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de triptona (suspensão 10^6 esporos/mL) 51

A1.4 Influência da concentração de DMSO no crescimento de *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis*, ao longo de 48h em meio NB suplementado com 1,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de triptona (suspensão 10^6 esporos/mL) 52

Anexo 2 Gráficos da determinação da MIC para fungos filamentosos. 53

Anexo 3 Gráficos da determinação da MIC para leveduras. 70

Anexo 4 Questionário Análise Sensorial 73

Lista de Figuras

Figura 2. 1. Fungo filamentoso Aspergillus sp *14*

Figura 2. 2. Molécula sorbato de potássio *16*

Figura 2. 3. Molécula Vanilina *20*

Figura 4. 1. Crescimento do fungo Cryptococcus sp (concentração suspensão 106) em placas de PDA a 37ºC (placa da esquerda) e 25ºC (placa da direita) *28*

Figura 4. 2. Crescimento do fungo Mucor piriformis (concentração suspensão 106) em placas de PDA a 37ºC (placa da esquerda) e 25ºC (placa da direita) *28*

Figura 4. 3. Perceção por parte dos provadores da acidez, doçura e adstringência do iogurte contendo vanilina natural em comparação com o iogurte contendo sorbato de potássio (padrão) *39*

Figura 4. 4. Perceção por parte dos provadores da diferença do sabor do iogurte contendo vanilina natural em comparação com o iogurte contendo sorbato de potássio (padrão) *39*

Figura 4. 5.Preferência por parte dos provadores *40*

Figura A1. 2. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37ºC (suspensão 10^6 esporos/mL) *49*

Figura A1. 1.Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 24h e 48h a 37ºC (suspensão 10^5 esporos/mL) *49*

Figura A1. 3. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37ºC (suspensão 10^6 esporos/mL) *49*

Figura A1. 4. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37º (suspensão 10^5 esporos/mL) *49*

Figura A1. 5. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 24h e 48h a 37ºC (suspensão 10^5 esporos/mL) em meio MHB *50*

Figura A1. 6Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 24h e 48h a 37ºC (suspensão 10^6 esporos/mL) em meio MHB *50*

Figura A1. 7.Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37ºC (suspensão 10^5 esporos/mL) em meio MHB *50*

Figura A1. 8 Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37ºC (suspensão 10^6 esporos/mL) em meio MHB *50*

Figura A1. 9. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 48h a 25ºC (suspensão 10^6 esporos/mL) *51*

Figura A1. 10. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 48h a 25ºC (suspensão 106 esporos/mL) *51*

Figura A1. 11. Influência da concentração de DMSO no crescimento de Cryptococcus sp ao longo de 48h a 25ºC (suspensão 10^6 esporos/mL) *52*

Figura A1. 12. Influência da concentração de DMSO no crescimento de Mucor piriformis ao longo de 48h a 25ºC (suspensão 10^6 esporos/mL) *52*

Figura A2. 1. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp *53*

Figura A2. 2. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Penicillium sp *53*

Figura A2. 3. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Penicillium sp *53*

Figura A2. 4. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cladosporium sp *54*

Figura A2. 5.Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp *54*

Figura A2. 6. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp *54*

Figura A2. 7. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo 6 ..... *55*

Figura A2. 8. Efeito da vanilina no crescimento do fungo 6 ..... *55*

Figura A2. 9. feito da vanilina natural no crescimento do fungo 6 ..... *55*

Figura A2. 10.Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Aspergillus sp *56*

Figura A2. 11.Efeito da vanilina no crescimento do fungo Aspergillus sp *56*

Figura A2. 12.Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Aspergillus sp *56*

Figura A2. 13. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Aspergillus sp (A. chevalieri, A. amstelodami, A heterocaryoticus) *57*

Figura A2. 14. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Aspergillus sp (A. chevalieri, A. amstelodami, A heterocaryoticus *57*

Figura A2. 15. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Aspergillus sp (A. chevalieri, A. amstelodami, A heterocaryoticus *57*

Figura A2. 16. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cryptococcus sp *58*

Figura A2. 17. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cryptococcus sp *58*

Figura A2. 18. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cryptococcus sp *58*

Figura A2. 19.Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cryptococcus sp *59*

Figura A2. 20. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Epicoccum nigrum *59*

Figura A2. 21. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cryptococcus sp *59*

Figura A2. 22. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo 10 ..... *60*

Figura A2. 23. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo 10 ..... *60*

Figura A2. 24. Efeito da vanilina no crescimento do fungo 10 ..... *60*

Figura A2. 25. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cadophora fatigiata *61*

Figura A2. 26. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cadophora fatigiata 61

Figura A2. 27. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cadophora fatigiata 61

Figura A2. 28. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Penicillium sp 62

Figura A2. 29.Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp 62

Figura A2. 30. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Penicillium sp 62

Figura A2. 31. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp 63

Figura A2. 32. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Penicillium sp 63

Figura A2. 33.Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp 63

Figura A2. 34. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cladosporium sp 64

Figura A2. 35. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp 64

Figura A2. 36. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp 64

Figura A2. 37. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Lecytophora sp 65

Figura A2. 38. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp 65

Figura A2. 39.Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp 65

Figura A2. 40. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Mucor piriformis 66

Figura A2. 41. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Mucor piriformis 66

Figura A2. 42. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Mucor piriformis 66

Figura A2. 43. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Phoma glomerata 67

Figura A2. 44. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Phoma glomerata 67

Figura A2. 45. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Phoma glomerata 67

Figura A2. 46. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cladosporium sp 68

Figura A2. 47. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp 68

Figura A2. 48. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp 68

Figura A2. 49. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo 30 69

Figura A2. 50. Efeito da vanilina no crescimento do fungo 30 69

Figura A2. 51. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo 30 69

Figura A3. 1.Efeito do sorbato de potássio no crescimento da levedura 13 70

Figura A3. 2. Efeito da vanilina no crescimento da levedura 13 70

Figura A3. 3. Efeito da vanilina natura no crescimento da levedura 13 70

Figura A3. 4. Efeito do sorbato de potássio no crescimento da levedura Pichia anomala 71

Figura A3. 5. Efeito da vanilina no crescimento da levedura Pichia anomala *71*

Figura A3. 6. Efeito da vanilina natural no crescimento da levedura Pichia anomala *71*

Figura A3. 7. Efeito do sorbato de potássio no crescimento da levedura Candida Santamarie *72*

Figura A3. 8. Efeito da vanilina no crescimento da levedura Candida Santamarie *72*

Figura A3. 9. Efeito da vanilina natural no crescimento da levedura Candida Santamarie *72*

Figura A4. 1. Questionário utilizado na análise sensorial *73*

Lista de Tabelas

Tabela 3. 1. Agentes antimicrobianos testados e respetivo estado físico, solvente e fornecedor (os fornecedores representados pelas letras V, W, X, Y e Z não estão especificados por motivos de confidencialidade. A vanilina é proveniente da Sigma-Aldrich, França, os fornecedores dos restantes agentes antimicrobianos não podem ser mencionados por motivos de confidencialidade. 23

Tabela 4. 1. Valores obtidos para a D.O. no tempo 0 e após um período de incubação de 18h. Os antimicrobianos sorbato de potássio (S), vanilina (V), vanilina natural (VN), aroma de baunilha em pó (A), extrato de baunilha concentrado (C) e extrato de baunilha orgânico (O) estão representados. DMSO (D) 27

Tabela 4. 2. Valores de D.O. no instante inicial e após 48h de incubação para os fungos Cryptococcus sp e Mucor piriformis, na presença dos antimicrobianos sorbato de potássio, vanilina, vanilina natural (concentrações de 1%, 2% e 3%), aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado e extrato de baunilha orgânico (concentrações1%, 3% e 5%)..... 30

Tabela 4. 3. Valores de D.O. no instante inicial e após 48h de incubação para os fungos Cryptococcus sp e Mucor piriformis, na presença dos antimicrobianos sorbato de potássio, vanilina, vanilina natural, aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado e extrato de baunilha orgânico (concentrações 1%) 31

Tabela 4. 4. Valores de MIC do sorbato de potássio, vanilina e vanilina natural para fungos filamentosos, respetivamente identificados com o seu respetivo número interno na empresa..... 32

Tabela 4. 5. Valores da MIC do sorbato de potássio, vanilina e vanilina natural para leveduras 34

Tabela 4. 6. Resultados da quantificação de fungos filamentosos (FF), leveduras e mesófilos totais para os preparados contendo sorbato de potássio e vanilina natural (contaminados e não contaminados) ao longo de 28 dias de armazenamento a 4°C..... 36

Tabela 4. 7. Resultados da quantificação de fungos filamentosos (FF) e leveduras para os iogurtes dosificados com preparados de morango contendo sorbato de potássio e vanilina natural (contaminados e não contaminados) ao longo de 28 dias de armazenamento a 4°C 38

Notação e Glossário

a_w	Atividade da água
BPW	Buffered Peptone Water
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
DRBC	Ágar Dicloran Rosa Bengala Clortetraciclina
LPS	Lipopolissacarído
GRAS	Generaly Recognized as Safe
MIC	Concentração minima inibitória
NaCl	Cloreto de sódio
NB	Nutrient Broth
PCA	Plate Count Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
pKa	Constante de dissociação
ppm	Partes por milhão
M	Molar
MHB	Muller Hinton Broth
mM	Milimolar
NI	Não identificado
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

Os produtos alimentares são suscetíveis à contaminação por parte de microrganismos que para além de causar a sua detioração, dando origem à rejeição dos mesmos por parte dos consumidores e levando a perdas económicas, podem transmitir doenças e infeções devido à patogenicidade dos microrganismos (Lucera, Costa et al. 2012, Negi 2012). De tal modo é necessário utilizar métodos de preservação, nomeadamente a pasteurização e a adição de preservantes, para garantir a segurança dos consumidores e evitar o prejuízo para a indústria. (Negi 2012)

Atualmente, por parte dos consumidores, tem aumentado a demanda por produtos naturais e com o mínimo de processamento possível. Esta exigência por parte dos consumidores baseia-se em dois principais fatores: cada vez mais a sociedade tem adotado estilos de vida mais saudáveis preocupando-se cada vez mais com o seu bem-estar; têm surgido estudos que relacionam os compostos sintéticos, nomeadamente os preservantes, com diversos problemas de saúde, nomeadamente urticaria, dermatites e em casos mais graves cancro. (Gurib-Fakim 2006, Negi 2012, Lee and Paik 2016).

Como forma de responder as exigências por parte dos consumidores, a indústria alimentar tem manifestado um grande interesse em compostos antimicrobianos naturais, que se comportem de forma semelhante aos sintéticos. Cada vez existem mais esforços para identificar e avaliar a sua aplicabilidade como substitutos aos agentes antimicrobianos sintéticos (Gurib-Fakim 2006). No caso particular deste trabalho, o objetivo principal foi a avaliação da aplicabilidade da vanilina e fontes de vanilina (aldeído fenólico, principal constituinte da baunilha) como alternativa a um dos preservantes mais utilizados, o sorbato de potássio, em preparados de fruta. Para tal foi necessário determinar a concentração mínima inibitória destes agentes, avaliar o seu comportamento em preparados de fruta dosificados em iogurtes e aferir o efeito dos mesmos nas propriedades sensoriais do produto final.

1.2 Apresentação da Empresa

A FRULACT é um grupo é empresarial agroalimentar fundado em 1987, a sua primeira unidade industrial foi inaugurada em 1992 na Maia. Atualmente possuí oito unidades industrias, três em Portugal (Maia, Ferro e Tortosendo) e as restantes em Marrocos, França, Canadá e África do Sul. Faz parte do top cinco mundial de industrias nesta área e está posicionada como a empresa mais inovadora no setor industrial de produtos alimentares nomeadamente produtos à base de fruta, gelados, sobremesas, bebidas e alternativas à base de plantas. Ao longo dos

anos tem vindo a receber diversos prémios, sendo que o mais recente foi o prémio de Inovação na categoria de grandes empresas do Millenium BCP.

Uma das preocupações da FRULACT é a sua evolução permitindo sempre ir de encontro as expectativas dos clientes e surpreender com propostas novas, posicionando-se um passo à frente dos seus concorrentes. No seguimento desta vontade de evoluir e inovar em 2012 é inaugurado o FRUTECH-Centro de Investigação Desenvolvimento & Inovação na Maia, com o objetivo de fornecer recursos técnicos e humanos para apoiar a estratégia de crescimento do grupo. Desta unidade fazem parte profissionais com uma mentalidade orientada para o cliente de modo a desenvolver produtos à medida para diversas aplicações.

Para além de todas as preocupações em garantir a qualidade dos produtos e a eficiência dos processos, a FRULACT tem uma enorme preocupação ambiental, definindo, nomeadamente, metas ambiciosas para a redução das emissões de CO_2 e da pegada de carbono (Frulact 2018)

1.3 Contributos do Trabalho

A maior parte do trabalho descrito neste relatório foi realizado por mim, contando sempre com ajuda e orientação fundamental da Engª Rita Fulgêncio.

1.4 Organização da Tese

Este relatório está divido em seis secções:

Secção 1 – Introdução: enquadramento e apresentação do projeto, apresentação da empresa e contributos do trabalho

Secção 2: - Contexto e estado de arte: necessidade de conservação dos alimentos, fungos, leveduras, sorbato de potássio, demanda por produtos naturais, preservantes naturais e vanilina

Secção 3 – Materiais e Métodos: são apresentados todos os materiais, reagentes, e métodos utilizados na realização de todos os ensaios.

Secção 4 – Resultados e discussão: apresentação de todos os resultados obtidos e discussão dos mesmos.

Secção 5 – Conclusão: apresentadas de forma sucinta e clara todas as conclusões obtidas com este trabalho.

Secção 6 – Avaliação do trabalho realizado: avaliação sucinta dos objetivos cumpridos, limitações e propostas de trabalho futuro e por fim uma autoapreciação sobre todo o trabalho realizado.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Necessidade de Conservação dos Alimentos

Grande parte dos produtos alimentares são perecíveis durante a sua preparação, distribuição e armazenamento, uma vez que estão sujeitos a contaminação por parte de fungos e bactérias (Lucera, Costa et al. 2012).

Alguns microrganismos podem causar alterações desejadas nos alimentos, contudo a maioria deles originam reações indesejáveis que conduzem à alteração de diversas propriedades como o sabor, odor, cor, textura e propriedades sensoriais. Em casos mais graves, certos microrganismos podem produzir toxinas e causar doenças que serão transmitidas pelos alimentos contaminados (Lucera, Costa et al. 2012, Negi 2012). Existem casos documentados de mortes devido a diarreia que estão relacionados com o consumo de alimentos contaminados com microrganismos e casos em que a exposição crónica provoca o desenvolvimento de cancro (Regnier, Combrinck et al. 2012, Zeng, He et al. 2012). A contaminação microbiana influencia não só a saúde, como também causa perdas económicas uma vez que os alimentos não podem ser comercializados (Zeng, He et al. 2012). Os microrganismos patogénicos mais comuns de contaminar os produtos alimentares são bactérias, nomeadamente, *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157, *Salmonella*, contudo os alimentos também podem sofrer contaminação por parte de fungos filamentosos e leveduras. A sobrevivência destes microrganismos é condicionada por fatores como o pH, presença de oxigénio, temperatura, humidade relativa e tempo de armazenamento (Lucera, Costa et al. 2012).

A segurança e gestão dos alimentos durante o seu processamento, transporte e armazenamento são dois importantes aspetos a ter em conta em qualquer tipo de bem alimentar. De tal forma são necessários preservantes para garantir a estabilidade, qualidade e estender o tempo de vida dos produtos alimentares (Regnier, Combrinck et al. 2012).

De forma a garantir a preservação dos alimentos várias técnicas são utilizadas, como por exemplo, congelação, redução da atividade da água, fermentação, pasteurização, restrição de nutrientes e a incorporação de conservantes sintéticos (agentes acidificantes e sais) etc. Contudo estas técnicas não podem ser aplicadas a todo o tipo de alimentos e causam, em certos casos, alteração das propriedades organoléticas, reduzindo a aceitação por parte do consumidor (Negi 2012). Os agentes antimicrobianos (preservantes sintéticos) podem ser incluídos na formulação, depositados em uma camada superficial ou incorporados nas embalagens (Lucera, Costa et al. 2012).

2.2 Fungos

Os fungos são organismos eucariotas com uma parede celular rica em glucanos e quitina. São organismos que absorvem matéria orgânica e usam-na como fonte de carbono e energia (organo-quimioheterotróficos). O seu tamanho varia de espécie para espécie, podendo ser formados apenas por uma única célula, ou serem constituídos por micélio com dimensões consideráveis. O maior grupo de fungos é conhecido como fungos filamentosos, caracterizado pelo crescimento de hifas que possibilita a reprodução sexuada ou reprodução assexuada originando esporos (Lima and Santos 2017). Os esporos constituem basicamente uma célula envolvida em uma parece celular que apenas germina quando encontra condições ambientais favoráveis. A reprodução assexuada permite uma taxa de formação de esporos mais elevada comparativamente à reprodução sexuada que é um processo mais demorado. Contudo, este tipo de reprodução permite a introdução de variações genética na população. Uma vez formados os esporos, eles são mantidos em "sacos" ou bolsas frutíferas, mantidas em cima dos filamentos fúngicos, podem conter milhares de esporos. A sua dispersão dá-se através de água ou vento, permitindo a sua proliferação no meio ambiente, de tal modo que, todos os dias estamos expostos a milhares de esporos, contudo, nem todos eles são patogénicos (Sephton-Clark and Voelz 2018).



Figura 2. 1. Fungo filamentoso Aspergillus sp

Relativamente à sua taxonomia, os fungos constituem o reino Eumycota que se divide em cinco sub-reinos, o reino Dikarya (reino dos cogumelos e leveduras), Glomeromycota, Microsporidia, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota (fungos anaeróbios) e Chytridiomycota (Lima and Santos 2017).

Os fungos filamentosos, Figura 2. 1, apesar de poderem ser benéficos em certos alimentos fermentados uma vez que contribuem para as caraterísticas desejadas, na sua grande maioria constituem uma ameaça à segurança alimentar (Rodríguez, Rodríguez et al. 2015) Os fungos têm a capacidade de crescer em todo o tipo de alimentos (cereais, carne, leite, fruta, vegetais, etc). Eles causam a deterioração dos alimentos libertando toxinas, originando alteração as propriedades sensoriais, descoloração, apodrecimento, podendo causar doença ou reações alérgicas.

A alteração das propriedades sensoriais está ligada à produção de exo enzimas durante o crescimento do fungo. Uma vez presentes nos alimentos, mesmo com a destruição do micélio

elas continuam a sua atividade. Os fungos podem produzir inúmeras enzimas nomeadamente, lípases, proteases, hidratos de carbono entre outras. Estas enzimas originam reações que promovem, por exemplo, a desintegração dos alimentos. No caso de morangos pasteurizados, caso ocorra uma contaminação posterior à pasteurização, eles podem ser transformados em polpa de morango devidos à ação destas enzimas (Filtenborg, Frisvad et al. 1996).

Fungos dos generos *Penicilium*, *Aspergillus* e *Fusarium* são conhecidos por produzirem compostos voláteis como disulfeto de dimetilo, geosmina e metilsoborneol que afetam a qualidade dos alimentos mesmo presentes em pequenas quantidades. Contudo, o principal problema dos fungos é a produção de micotoxinas. As micotoxinas são metabolitos secundários que mesmo em pequenas quantidades são bastante tóxicas para os seres humanos. Como são extremamente resistentes a tratamentos térmicos e químicos, uma vez presentes nas matérias primas, mesmo com o processamento, irão estar presentes no produto final. Elas podem estar na origem de diferentes tipos de cancro, afetar o sistema imunológico e como têm atividade antibiótica, a longo prazo, podem dar origem a bactérias resistentes à maioria dos antibióticos geralmente utilizados (Filtenborg, Frisvad et al. 1996). Como tal, na indústria alimentar, são necessários métodos que possibilitem a deteção de fungos bem como de micotoxinas, de modo a que, caso ocorra alguma contaminação, seja possível atuar de forma que não se comprometa a saúde humana bem como minimizar perdas económicas devido aos produtos contaminados (Rodríguez, Rodríguez et al. 2015)

2.3 Leveduras

Como referido no sub-capítulo 2.2., as leveduras constituem um tipo de fungo unicelular que fazem parte do reino Eumycota e do sub-reino Dikarya, que se reproduzem assexuadamente por mitose ou sexuadamente originando esporos (Wang, Begerow et al. 2015).

A contaminação por parte de leveduras causa a detioração dos alimentos, apesar de estarem raramente relacionadas com a perda de vidas humanas ou infeções visto que leveduras patogénicas, como por exemplo *Candida albicans,* não estão associadas a produtos alimentares. Atualmente existem evidências de um aumento de infeções humanas causadas por algumas leveduras como *Candida krusei, Rhodotorula* spp, emboras estas infeções não estejam relacionadas com o consumo de alimentos contaminados, este tipo de leveduras podem desenvolver-se em alimentos. Não será expectável que seres humanos saudáveis contraiam infeções devido a alimentos contaminados com este tipo de leveduras. Contundo para indivíduos com o sistema imunitário fragilizado o risco de infeção torna-se bastante mais elevado, causa a rejeição do produto por parte do consumidor resultando em perdas económicas, gastos na limpeza da planta industrial e má reputação para a empresa. O crescimento e proliferação das leveduras depende da temperatura, a_w, pH e a presença de

agentes antimicrobianos. O stress provocado por estes fatores limita a sobrevivência das leveduras, contudo o limite exato para a prevenção do seu crescimento é de difícil determinação. A maioria das leveduras apresenta uma maior taxa de crescimento para a gama de pH compreendida entre 4,5 e 7,0, são tolerantes a baixas a_w, e a sua temperatura ótima de crescimento situa-se entre 20°C e 40°C, de tal modo que o tratamento térmico de pasteurização é bastante eficaz na inativação destes microrganismos (Howell 2016).

2.4 Sorbato de Potássio (E202)

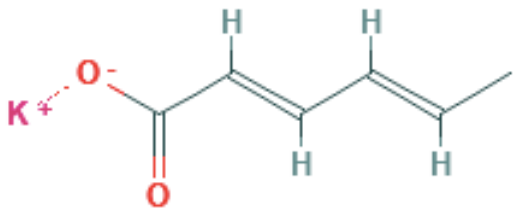


Figura 2. 2. Molécula sorbato de potássio

Os sorbatos são amplamente usados em todo o mundo como preservantes alimentares. Sendo que as suas formas mais comuns são o ácido sórbico e o sorbato de potássio, muitas vezes usados em conjugação. Possuem o estatuto GRAS e são eficazes na inibição de fungos e leveduras em produtos lácteos, frutas, vegetais, produtos açucarados e de confeitaria, bem como certos tipos de carne e de peixe. São geralmente aplicados diretamente na formulação do produto, podendo também ser usados como revestimento das embalagens, pulverizados nos alimentos ou utilizado em pó. São usualmente aplicados em produtos alimentares a uma concentração entre 0,05% e 0,3% sem que afetem as propriedades sensórias dos alimentos (Davidson, Sofos et al. 2005).

O sorbato de potássio, Figura 2. 2, é amplamente utilizado devido a sua estabilidade, à sua alta solubilidade em água (58,20% a 20°C), possuir um sabor neutro e apresentar um grande espetro de ação antimicrobiana (Davidson, Sofos et al. 2005).

A sua ação antimicrobiana sofre a influência de vários fatores, nomeadamente da composição, processamento, pH, a_w, temperatura, quantidade de inóculo e aditivos. À medida que a temperatura de armazenamento diminuí indicando que este composto é mais apropriado para alimentos refrigerados. A influência do pH é de extrema importância uma vez que à medida que o pH aumenta a atividade antimicrobiana diminuí. O aumento da atividade antimicrobiana para pH mais baixos está relacionado com o aumento da quantidade ácido não dissociada, visto que esta e forma de ação mais eficaz. Apresenta uma atividade ótima para valores de pH próximos da sua constante de dissociação (pK_a=4,76) (Davidson, Sofos et al. 2005)

Segundo o decreto lei do Conselho Europeu nº95/2/EC de 20 de fevereiro de 1995 a concentração máxima permitida é de 1000 mg/kg quer de ácido sórbico ou sorbato de potássio para preparados a base de fruta e vegetais. Ao nível da rotulagem, segundo o Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho nº 1169/2011 de 25 de outubro de 2011 os conservantes

devem ser identificados como conservante, seguida da sua denominação específica ou número E, no caso do sorbato de potássio E202 (Davidson, Sofos et al. 2005).

O sorbato de potássio tem uma ação bacteriostática, impede a proliferação dos microrganismos, mas não origina a sua morte (Chevalier, Chaabani et al. 2018). É eficaz contra leveduras, como por exemplo, *Candida*, *Crypstococcus*, *Picha* e contra fungos, de entre os quais, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Penincillium*. De uma forma geral, o sorbato inibe microrganismos Gram-negativos, Gram-positivos, catálase-negativos, catálase-positivos, aeróbicos, anaeróbicos e mesófilos, bem como bactérias patogénicas (Davidson, Sofos et al. 2005).

Relativamente ao seu mecanismo de ação este ainda não está bem definido. Os dados atuais indicam que o sorbato inibe o crescimento e multiplicação celular, germinação dos esporos e crescimento dos fungos, contudo o seu mecanismo de ação ainda não está completamente definido. Adicionalmente, há evidencias de que o sorbato interfere com a membrana dos esporos, aumentando a sua fluidez. Existem inúmeros mecanismos propostos para a inibição por parte do sorbato das funções metabólicas, baseando-se em vários fatores como o tipo de microrganismos, tipo de substrato, condições ambientais e o tipo de produto alimentar. Em determinadas condições o sorbato altera a morfologia e integridade das células, inibindo a atividade metabólica devido a inibição de enzimas, e das funções de transporte, causando a diminuição da absorção de carbono de várias fontes (glucose, piruvato, etc.). Por outro lado, o sorbato pode interferir no transporte de eletrões levando a inanição celular (Davidson, Sofos et al. 2005).

2.5 Demanda por Produtos Naturais

Desde o início dos tempos, a civilização humana utiliza produtos naturais para o tratamento, cura ou prevenção de doenças. Durante milhares de anos os produtos naturas foram os principais recursos terapêuticos à disponibilidade do Homem. Nos últimos anos a população em geral tem vindo a demonstrar uma maior preocupação com o seu bem-estar físico e mental, adotando estilos de vida mais saudáveis e consequentemente uma dieta mais saudável (Gurib-Fakim 2006). De tal forma o consumidor tem vindo a exigir alimentos menos processados e livres de compostos sintéticos (Negi 2012). Tal alteração tem levado a comunidade científica a procurar e identificar substâncias naturais, potencialmente benéficas para o homem e a avaliar a sua aplicabilidade na indústria alimentar (Gurib-Fakim 2006).

Para evitar a deterioração e garantir a segurança dos alimentos, a indústria alimentar tem utilizado conservantes sintéticos como por exemplo nitratos/nitritos, sulfitos, benzoato de sódio, sorbato de potássio, ácido sórbico etc. Contudo, existem estudos que relacionam estes agentes antimicrobianos com diversos problemas de saúde, os nitratos/nitritos estão

relacionados com leucemia, doenças ao nível do colo e cancro no estomago; o sorbato e o ácido sórbio, embora em casos raros, estão ligados a urticaria e dermatites e há suspeitas de que os benzoatos poderão originar alergias, erupções cutâneas e asma. (Lee and Paik 2016). Existem também estudos que associam a ingestão destes preservantes ao aumento da hiperatividade e défice de atenção em crianças. Devido a estes fatores, cada vez mais os consumidores procuram alimentos isentos de preservantes sintéticos de modo a reduzir os efeitos destes na sua saúde (Regnier, Combrinck et al. 2012).

2.5.1 "Clean Label"

Não existe uma definição concreta para o conceito de "Clean Label", contudo este termo está relacionado com produtos livres de ingredientes artificiais e sintéticos. O termo "Clean Label" é muitas vezes usado apenas para fins comercias, em muitos dos casos, apenas se mostra o que os produtos não contêm, como por exemplo "sem sabores artificias", não sendo dito de forma objetiva o que foi utilizado na substituição deste tipo de ingredientes. Como tal é necessário que a definição seja formada, para que não hajam interpretações erradas deste conceito (CleanLabel 2018).

Contudo, existem ingredientes que são considerados como "unclean", ou seja, os produtos que os contenham, não podem ser considerados como "Clean Label", como por exemplo, preservantes sintéticos, corantes, potenciadores de sabor artificiais, aditivos, ingredientes geneticamente modificados e todas as substâncias que não sejam de origem natural ou que o consumidor relacione com artificial (CleanLabel 2018).

Nos últimos anos, devido ao *boom* dos produtos orgânicos e naturais, e ao facto de cada vez mais o consumidor estar mais informado acerca dos ingredientes incluídos em cada produto e de como eles afetam a sua saúde, o termo *"Clean Label"* torna-se cada vez mais importante na indústria. Com tal, a indústria alimentar tem tentado eliminar dos seus produtos os ingredientes considerados como *"unclean"* e introduzir o máximo possível de ingredientes naturais de forma a poderem ser divulgados como produtos livres de constituintes artificiais, indo assim de encontro as exigências dos consumidores (CleanLabel 2018).

2.6 Preservantes Naturais Provenientes de Plantas

Devido ao facto dos consumidores exigirem cada vez mais produtos livres de compostos sintéticos, os preservantes naturais têm despertado um grande interesse na área alimentar bem como na comunidade cientifica, que tem vindo a procurar e identificar alternativas naturais a esses compostos (Gurib-Fakim 2006).

Os metabolitos produzidos por qualquer ser vivo, incluindo as plantas, podem ser divididos em duas categorias, os primários e os secundários. Os metabolitos primários são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento (aminoácidos, proteínas...), já os metabolitos secundários são caracterizados como compostos que permitem a sobrevivência da planta protegendo-a de vários microrganismos e predadores. A maior parte dos compostos bioativos são produzidos como metabolitos secundários, como é o caso dos óleos essenciais, compostos fenólicos e derivados. Este tipo de compostos apresentam um grande interesse na área alimentar, uma vez que podem ser usados como aditivos funcionais devido as suas propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, anti alergénicas e podem ser usados na preservação de alimentos uma vez que possuem também propriedades antioxidantes, antifúngicas e antimicrobianas (Antolak and Kregiel 2017).

Os compostos fenólicos podem ser quimicamente definidos como substâncias que contenham um ou mais anéis aromáticos e um ou mais substituintes hidroxilo incluindo derivados funcionais (ésteres, ésteres metílicos e glicosídeos), sendo divididos em vários grupos e subgrupos (Hossen, Ali et al. 2017). Podem ser classificados tendo em conta a sua origem, função biológica e estrutura química sendo que de uma forma geral é possível dividir os compostos fenólicos em flavonoides e não flavonoides.

Os flavonoides têm uma estrutura química geral C6-C3-C6, em que as das unidades C6 são de natureza fenólica e é através da variação do padrão de hidroxilação da unidade C3 que estes são divididos em diferentes subgrupos (antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonóis e flavanóis) (Tsao 2010). Estes compostos podem ser encontrados nas plantas sob a forma de pigmentos. Flavonas, flavonóis, flavanonas e flavanóis, são os mais presentes em plantas, na maioria dos casos, eles estão presentes como glicosideos em vacúolos de flores, folhas, hastes ou raízes (Iwashina 2000). O grupo mais difundido de todos é o grupo dos flavonóis, estes tipos de compostos encontram-se em frutos (cereja, mirtilos, maça), vegetais (brócolo, tomate), bebidas (vinho tinto) ervas e especiarias (cominho). O grupo das flavonas é o que aparecem em um menor número de vegetais como por exemplo salsa, aipo, tomilho, chá e legumes (Antolak and Kregiel 2017). Os compostos fenólicos não flavonoides podem ser divididos em três subgrupos. O grupo principal é o dos ácidos fenólicos, o grupo dos estilbenos e o grupo das lignanas. Os compostos fenólicos têm vindo a receber grande atenção devido ao seu abrangente espetro de ação antimicrobiana (Daglia 2012). Contudo, o uso deste tipo de compostos em alimentos, devido à sua dose necessária, pode ter influência no seu sabor, aroma ou cor (Delves-Broughton 2012).

Os óleos essenciais são compostos líquidos aromáticos e voláteis (Hyldgaard, Mygind et al. 2012) derivados de várias partes da planta como as folhas, bolbos, sementes etc. e são compostos maioritariamente por compostos fenólicos (saponinas, flavonoides, terpenos, etc)

que atuam contra bactérias, leveduras e fungos (Juneja, Dwivedi et al. 2012, Regnier, Combrinck et al. 2012). Para a obtenção de óleos essências podem usar-se diversos tipos de extração como por exemplo a destilação a vapor, extração supercrítica, prensagem, extração por solventes líquidos ou voláteis. O solvente usado deve ser escolhido criteriosamente de forma a que a extração seja o mais eficiente possível pois desta forma haverá uma ampla gama de componentes presente no extrato final (Delves-Broughton 2012). Apesar de serem reconhecidos como GRAS, é necessária uma grande dose para que óleos essenciais exercerem as suas propriedades antimicrobianas nos alimentos o que irá afetar as caraterísticas organoléticas.

A atividade antimicrobiana depende da conformação estrutural dos compostos ativos e da sua concentração. O seu modo de ação baseia-se na interação entre os seus componentes e a membrana celular, a acumulação dos componentes dos óleos essenciais (nomeadamente os compostos fenólicos) nas estruturas lipídicas das membranas celulares vai resultar em danos, rompendo a bi-camanda fosfolipídica, causando a interrupção dos sistemas enzimáticos, podendo também causar uma possível alteração nos modelos genómicos (Juneja, Dwivedi et al. 2012, Regnier, Combrinck et al. 2012). Existem muito poucos estudos acerca do modo de ação dos constituintes dos óleos essenciais contra fungos e leveduras, contudo em relação as bactérias, sabe-se que às bactérias Gram-positivas são mais vulneráveis a ação dos constituintes do que as Gram-negativas Isto está relacionado com o facto de que as bactérias gram-negativas possuem uma parede celular composta por lipopolissacarídeos (LPS) que cria um barreira a macromoléculas e a compostos hidrofóbicos como é o caso dos constituintes dos óleos essenciais (Hyldgaard, Mygind et al. 2012).

2.7 Vanilina

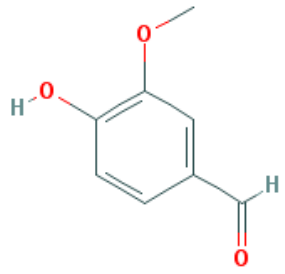


Figura 2. 3. Molécula Vanilina

A vanilina, (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeido), Figura 2. 3, é o principal fitoquímico presente nos grãos de baunilha, é um aldeído fenólico, podendo ser sintético ou natural (Rupasinghe, Boulter-Bitzer et al. 2006). A vanilina natural é obtida a partir da orquídea tropical e geralmente a sua extração é realizada por meio de um solvente alcoólico, ou por um processo de extração supercrítica com CO_2 (López-Malo, Alzamora et al. 1995, López-Malo, Alzamora et al. 1998, Penney, Henderson et al. 2004) .

A vanilina possuí o estatuto GRAS sendo amplamente usada na indústria alimentar como agente aromatizante em gelados, bolachas, chocolate, bebidas, sobremesas, entre outros (Rupasinghe, Boulter-Bitzer et al. 2006).

O seu modo de ação baseia-se na capacidade de afetar a integridade da membrana citoplasmática dando origem a perda do gradiente de eletrões e a inibição da atividade respiratória, sendo que também interfere no crescimento dos microrganismos estendendo o período da fase de arranque. Existem vários estudos que demonstram a sua eficácia na inibição do crescimento de fungos, leveduras e bactérias Gram-positivas não lácteas, possuindo uma ação bacteriostática (López-Malo, Alzamora et al. 1995, López-Malo, Alzamora et al. 1998, Rupasinghe, Boulter-Bitzer et al. 2006). A sua ação é dependente, de entre outros fatores, do pH e a_w, a sua ação antimicrobiana e favorecida por uma ligeira diminuição da a_w (a_w=0.98) e pela diminuição do pH (preferencialmente entre 3,0 e 4,0), levando assim ao aumento da inibição do crescimento dos microrganismos (López-Malo, Alzamora et al. 1995, López-Malo, Alzamora et al. 1998).

Existem vários estudos acerca da inibição por parte da vanilina do crescimento de microrganismos por parte da vanilina. A uma concentração de 500 ppm a vanilina foi capaz de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Salmonela enteriditis*, *Staphylococcus aureus, Pseudomona aeroginosa*, *P. morgani* e *Escherichia coli* em meio agarizado e do fungo *Aspergillus niger* a 250 ppm (López-Malo, Alzamora et al. 1995). A 2000 ppm demosntrou ser eficaz na inibição do crescimento de diversas espécies de *Aspergillus*, em meio de cultura à base de preparados de fruta (maçã, banana, manga, papaia e ananás) (Cerruti, Alzamora et al. 1997). Em meio agarizado e em puré de maçã, durante 40 dias de armazenamento a 27°C, a vanilina, a uma concentração de 12mM foi capaz de inibir o crescimento de leveduras, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenni*, e *Zygosaccharomyces bailii*. Por outro lado, a uma concentração de 3000 ppm foi incapaz de inibir o crescimento de *Z. bailli* em puré de banana. Tal resultado permitiu concluir que o elevado conteúdo em lípidos e proteínas afetou a atividade antimicrobiana da vanilina. De facto, as interações destes compostos com a vanilina reduzem a sua quantidade disponível para exercer a ação antimicrobiana, diminuindo a sua eficácia (Cerruti, Alzamora et al. 1997, Fitzgerald, Stratford et al. 2004).

Um dos problemas da utilização deste tipo de compostos como agente antimicrobiano em produtos alimentares é o facto de afetarem as propriedades sensoriais como referido anteriormente. Estudos apontam que um que a concentração máxima de vanilina para que o efeito nas propriedades sensórias sejam mínimos é de cerca de 3000 ppm (López-Malo, Alzamora et al. 1995, Cerruti, Alzamora et al. 1997).

3 Materiais e Métodos

3.1 Manutenção das Culturas de Microrganismos

Foram testados 17 fungos filamentosos, entre eles, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor piriformis, Phome glomerata, Epicoccum nigrum* e 3 leveduras, de entre as quais *Pichia anomala* e *Candida santamarie*. Todos estes microrganismos foram isolados de vários setores da unidade industrial de Tortosendo (zona de produção de fruta, refrigeração, congelação, armazém de secos, sala de pesagem de secos e alergénicos).

Os fungos foram repicados a cada duas semanas em meio PDA (VWR Chemicals) e as placas incubadas 7 ± 2 dias a 25 ± 1°C e de seguida armazenadas a 5 ± 1°C. As leveduras foram repicadas semanalmente em meio PDA e as placas incubadas 24 ± 2h a 25 ± 1°C e armazenadas a 5 ± 1°C.

3.2 Agentes Antimicrobianos

Tabela 3. 1. Agentes antimicrobianos testados e respetivo estado físico e solvente. A vanilina é proveniente da Sigma-Aldrich, França, os fornecedores dos restantes agentes antimicrobianos não podem ser mencionados por motivos de confidencialidade.

Agente Antimicrobiano	Estado Físico	Solvente utilizado para a preparação da solução stock
Sorbato de Potássio	Sólido	Meio de cultura
Vanilina	Sólido	DMSO
Vanilina Natural	Sólido	DMSO
Aroma de baunilha em pó	Sólido	DMSO
Extrato de baunilha concentrado	Líquido	Meio de cultura
Extrato de baunilha orgânico	Líquido	Meio de cultura

3.3 Solução Stock de Esporos

As soluções stock de esporos foram preparadas através de uma adaptação do método proposto por(Simoes, Simoes et al. 2015).

Os esporos foram recolhidos adicionando 2 mL de uma solução de NaCl (0,85%) + Tween 80 (0,05%) à placa de Petri, agitando gentilmente de modo a libertar apenas os esporos. A solução de esporos foi recolhida para um tubo falcon e agitada vigorosamente num vortex (VWR VV3 S40). Um volume de 500 μL desta suspensão foram adicionados a um matraz de 500 mL contendo 100 mL de meio PDA, utilizando um magnete estéril para facilitar o espalhamento. O matraz foi incubado 7 ± 2 dias a 25 ± 1°C. A colheita dos esporos foi realizada adicionando ao matraz aproximadamente 25 mL da solução NaCl (0,85%) + Tween80 (0,05%), agitando vigorosamente de forma a raspar os esporos e o micélio da superfície do meio. De modo a obter uma suspensão unicamente com esporos, a suspensão (esporos + micélio) foi filtrada utilizado um sistema de lã de vidro. A suspensão final de esporos foi vortexada e a contagem do número de espóros foi realizada ao microscópio (Nikon Eclipse Ci) com a objetiva de 40 (Nikon E Plan 40x/0.65) utilizando uma câmara de Neubauer (Marienfeld), um software de aquisição de dados (Nikon Nis-Elements BR V 5.02.00) e uma câmara fotográfica (Nikon DS-Qi2).

De forma a preservar os esporos, a suspensão foi divida em alíquotas e criopreservada a -80°C com 10% de glicerol.

3.4 Determinação da concentração mínima inibitória para Fungos Filamentosos

O método utilizado para a determinação da concentração mínima inibitória de agentes antimicrobianos para fungos filamentosos foi desenvolvido tendo por base os métodos propostos por (Devienne and Raddi 2002) e (Arendrup, Guinea et al. 2015).

As soluções stock dos agentes antimicrobianos foram diluídas em meio NB (Merck, Alemanha) suplementado com 1,0 g/L de glicose (Fisher Chemicals, UK), 2,5 g/L de extrato de levedura (Oxoid, França) e 5,0 g/L de triptona (Merck, Alemanha), o pH foi ajustado a 4,5 com HCl 1M, utilizando um medidor de pH (VWR pHenomenal® Biotech set pH 1100 LB). Os poços da microplaca de 96 poços foram preenchidos com 100 μL de agente antimicrobiano e 100 μL de suspensão contendo 10^6 esporos/mL. A primeira coluna da microplaca foi preenchida apenas com meio, a segunda com 100 μL de meio e 100 μL de suspensão contendo 10^6 esporos/mL e a terceira com 100 μL de meio contendo a percentagem de solvente utilizado para a dissolução dos agentes antimicrobianos (no caso da vanilina, vanilina natural e aroma o solvente utilizado foi o DMSO (Fisher Chemicals, UK)), sendo que a concentração máxima final nos poços da microplaca foi de 3% uma vez que concentrações superiores afetam significativamente o crescimento do fungo) e 100 μL de suspensão contendo 10^6 esporos/mL. Foi lida a D.O. inicial a 620 nm num leitor de microplacas (Bmg Labtech Spectrostar Nano), as

placas foram incubadas a 25 ± 1°C durante 48 ± 2h e foi realizada novamente a leitura da D.O. a 620 nm.

3.5 Determinação da concentração mínima inibitória para Leveduras

O método utilizado para a determinação MIC de agentes antimicrobianos para leveduras foi conforme descrito na secção 3.4, com ligeiras alterações. O inóculo foi preparado, retirando com uma ansa estéril uma quantidade de biomassa e colocando num matraz de 250 mL com 100 mL de meio (meio NB (Merck, Alemanha) suplementado com 1,0 g/L de glicose (Fisher Chemicals, UK), 2,5 g/L de extrato de levedura (Oxoid, França) e 5,0 g/L de triptona (Merck, Alemanha)). O matraz foi incubado a 25 ± 1°C durante 16 ± 1h com agitação. A D.O. inicial do inóculo foi ajustada a 0,1 a 620 nm. A leitura da D.O. a 620 nm das microplacas foi realizada no instante inicial e após um período de incubação de 24 ± 1h a 25 ± 1°C.

3.6 Preparado de Fruta de Morango

Os preparados de fruta foram elaborados colocando todos os ingredientes numa panela (água, morango, puré de morango, espessantes, acidificantes, adoçantes e antimicrobianos). Os agentes antimicrobianos foram adicionados antes da pasteurização, sendo que o sorbato foi adicionado a 0,1% e a vanilina natural a 0,25%. A mistura foi aquecida até aos 80 ± 2°C e foi utilizado o binómio de pasteurização 80°C, 10 minutos.

Foram elaborados quatro preparados, dois com sorbato (contaminado e não contaminado) e dois com vanilina natural (contaminado e não contaminado). A contaminação foi realizada após a pasteurização. Os preparados foram contaminados com 1% de uma suspensão 10^4 esporos/mL de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp.

Posteriormente os preparados foram dosificados a 17% em iogurte.

3.7 Quantificação de Fungos Filamentosos e Leveduras

A determinação de fungos filamentosos e leveduras seguiu a ISO 21527:2008. 50g de amostra foi adicionada a 450 mL de BPW (Merck, Alemanha) e deixou-se repousar entre 30 minutos a 1 hora. Os microrganismos foram cultivados utilizando a técnica de espalhamento em que 200 μL de amostra foi espalhada, utilizando um espalhador de vidro, na superfície de placas de Petri contendo DRBC (VWR Chemicals, Equador). As placas foram incubadas durante 5 ± 2 dias a 25 ± 1°C.

3.8 Quantificação de Mesófilos Totais

A determinação de mesófilos totais seguiu a ISO 4833-1:2013. Uma amostra de 50g de amostra foi adicionada a 450 mL de BPW (Merck, Alemanha) e deixou-se repousar entre 30 minutos a 1 hora. Os microrganismos foram cultivados utilizando a técnica de incorporação em placa, onde se coloca 1mL de amostra na placa de Petri adicionando-se de seguida cerca de 20 mL de PCA (VWR Chemicals, Equador) líquido não solidificado (50 ± 1°C). As placas foram incubadas durante 3 ± 1 dias a 30 ± 1°C.

3.9 Análise Sensorial

A analise sensorial foi realizada por um painel de 17 provadores (treinados e não treinados). Para tal, foi feita uma comparação entre o iogurte contendo sorbato de potássio e o iogurte contendo vanilina natural. Os iogurtes foram comparados mediante parâmetros de acidez, doçura, adstringência, sabor e foi aferida a preferência pessoal do painel. Os provadores preencheram um questionário de avaliação sensorial que se encontra no anexo 4.

3.10 Análise económica

A analise económica foi realizada utilizando o software interno da empresa, que indica o custo dos preparados mediante os seus constituintes.

3.11 Análise Estatística

De forma a avaliar se existiam diferenças significantes entre os valores da concentração mínima inibitória obtidos para os vários microrganismos, e dada as características da amostra, foi realizado o teste não paramétrico de Friedman. Para os resultados da análise sensorial, como forma de identificar o parâmetro que apresentou uma maior influencia, foi realizada uma análise multivariada Manova. Para ambos os testes foi considerando o nível de significância de 0,05 e utilizado o software SPSS 250 (SPSS Inc, Chicago, USA)

4 Resultados e Discussão

4.1 Otimização do método de determinação da concentração mínima inibitória para fungos filamentosos

Com objetivo de observar o comportamento dos fungos e a influência dos agentes antimicrobianos selecionados no crescimento dos mesmos, foi realizado um primeiro ensaio de otimização das condições de crescimentos de cultura e quantificação dos efeitos inibitórios. Para este ensaio foi selecionando de forma aleatória um fungo, neste caso, *Cryptococcus sp*, utilizando uma suspensão de esporos de concentração 10^4 esporos/mL, os agentes antimicrobianos presentes a 5% e um período de incubação de 18h a 37°C. Os resultados das medições da D.O. encontram-se na Tabela 4. 1.

Tabela 4. 1. Valores obtidos para a D.O. no tempo 0 e após um período de incubação de 18h. Os antimicrobianos sorbato de potássio (S), vanilina (V), vanilina natural (VN), aroma de baunilha em pó (A), extrato de baunilha concentrado (C) e extrato de baunilha orgânico (O) estão representados. DMSO (D)

	Meio	Meio + Fungo	Meio+Fungo + D (10%)	S (5%)	V (5%)	VN (5%)	A (5%)	C (5%)	O (5%)
				0h					
Média	0,088	0,096	0,095	0,089	0,088	0,088	0,651	0,153	0,134
Desvio Padrão	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,005	0,109	0,006	0,004
				18h					
Média	0,100	0,142	0,138	0,281	0,268	0,248	0,675	0,277	0,172
Desvio Padrão	0,020	0,014	0,026	0,008	0,029	0,029	0,113	0,064	0,009

Segundo estes resultados é possível, logo à partida, verificar que nenhum dos agentes antimicrobianos foi eficaz na inibição do crescimento do fungo, nem mesmo o antimicrobiano atualmente utilizado na empresa, o sorbato de potássio (5% é uma concentração 50 vezes superior à utilizada), uma vez que a D.O. ao fim de 18h de incubação aumentou, indicando que houve crescimento. Analisando o crescimento do fungo, verifica-se que foi muito baixo, havendo apenas um aumento da D.O. de cerca de 0,05. Por outro lado, atentando a D.O. do meio, verifica-se que houve um aumento, tal não seria esperado visto que esses poços da microplaca só possuíam meio, seria espectável que a sua D.O. se mantivesse ao longo do tempo. Tendo em conta estes resultados, foi possível retirar algumas conclusões e colocar novas hipóteses a serem testadas. Verificou-se que, uma vez que as microplacas eram incubadas a 37°C, quando era realizada a sua leitura após o período de incubação era necessário que as

mesmas atingissem a temperatura ambiente, caso contrário iria ocorrer condensação na tampa o que levaria a um aumento da D.O., que foi o que aconteceu neste primeiro ensaio. Visto que neste caso, o crescimento do fungo foi muito baixo, foi feita uma análise do comportamento do seu crescimento.

Uma vez que existiam 17 fungos para serem usados nos ensaios, de forma a obter resultados mais significativos, foi selecionado mais um fungo de forma aleatória, *Mucor piriformis* e foi testado outro meio de cultura, MHB, bem como diferentes concentrações de suspensão de esporos e diferentes tempos de incubação de forma a encontrar as condições ótimas de crescimento. Estes resultados estão presentes no anexo 1, contudo, de uma forma geral, nenhum destes fatores influenciou o crescimento dos fungos, pois ou o crescimento era indetetável, ou pouco significativo.

A temperatura de incubação utilizada, 37°C, foi o único parâmetro que não tinha sido alterado. De forma a avaliar a sua influência, foi feito um espalhamento em placas de PDA de ambos os fungos a partir de uma suspensão de 10^6 esporos/mL. Estas placas foram incubadas a duas temperaturas diferentes, 37°C e 25°C. É possível identificar uma enorme diferença no crescimento para as duas temperaturas já ao fim de 48 horas, Figura 4. 1 e Figura 4. 2.

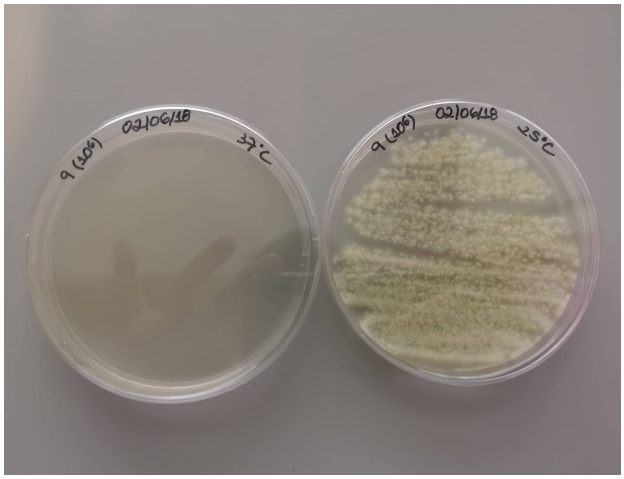


Figura 4. 1. Crescimento do fungo Cryptococcus sp (concentração suspensão 106) em placas de PDA a 37°C (placa da esquerda) e 25°C (placa da direita)

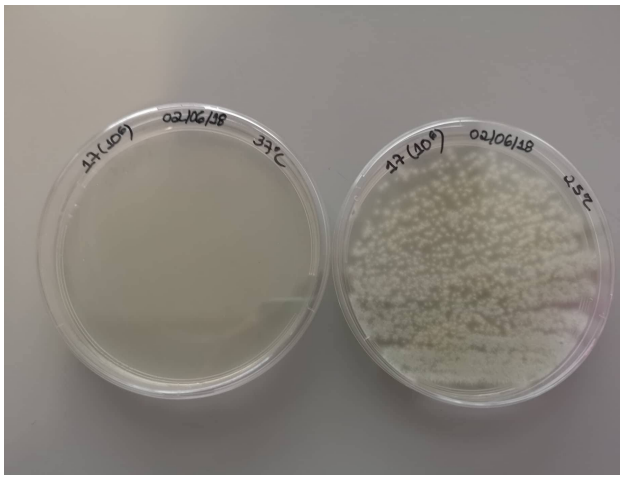


Figura 4. 2. Crescimento do fungo Mucor piriformis (concentração suspensão 106) em placas de PDA a 37°C (placa da esquerda) e 25°C (placa da direita)

A temperatura foi, a prior, o parâmetro que se pensava ter menos influência, contudo mostrou-se o mais decisivo. Tendo em conta o conhecimento sobre esporos, devido à sua versatilidade metabólica não era de esperar que a temperatura influenciasse tanto o seu crescimento (Sephton-Clark and Voelz 2018). Fazendo uma pesquisa mais exaustiva é possível encontrar estudos que confirmam estes dados. A gama de temperaturas de crescimento para o fungo *Cryptococcus sp* situa-se na gama de 4°C a 25°C, sendo que a temperatura ótima é de

17°C (BAHARAEEN and VISHNIAC 1982), já para *Mucor* sp a sua temperatura ótima encontra-se nos 25°C (Morin-Sardin, Rigalma et al. 2016) . Existem efetivamente fungos mais sensíveis à temperatura que outros. Por exemplo, *Penicillium cyclopium* é tolerante a temperaturas de 32°C enquanto que *Aspergillus fumigatus* é tolerante a temperaturas mais elevadas, 53°C (Ayerst 1969).

Tendo em conta todos estes dados, podem colocar-se duas hipóteses, a 37°C, os fungos em causa necessitariam de mais tempo para crescer, visto que ao fim de 7 dias de incubação não se verificava nenhum crescimento nas placas, ou efetivamente a temperatura de 37°C não é favorável ao seu crescimento.

Uma vez que se queria estabelecer condições uniformes para a determinação MIC de todos os fungos, resolveu-se selecionar a temperatura de 25°C, uma vez que a maioria dos fungos cresceu a esta temperatura embora podendo não ser a ótima para certas espécies. Fixou-se a concentração da suspensão de esporos em 10^6 esporos/mL segundo o protocolo do EUCAST (Arendrup, Guinea et al. 2015) e selecionou-se o meio NB suplementado com 1,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de triptona, uma vez que se trata de um meio de fácil manuseamento que possibilita um bom crescimento dos fungos.

4.2 Determinação da concentração mínima inibitória para fungos filamentosos

De forma a determinar a MIC foi realizado um ensaio de teste para se encontrar a gama de concentrações de agentes antimicrobianos e verificar a influência do pH do meio. Por fim, foram determinadas as MIC, apresentadas na Tabela 4. 4, sendo que os gráficos referentes às medições encontram-se no anexo 2.

4.2.1 Determinação concentração mínima inibitória a pH 7

De modo a estabelecer uma gama de concentrações para os ensaios de determinação da MIC, foram testadas concentrações de 1%, 2% e 3% para o sorbato de potássio, vanilina, 1% para vanilina natural e 1%, 3% e 5% para o aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado, e extrato de baunilha orgânico. Estes ensaios foram realizados como descrito na seção 3.4, não alterando o pH do meio (7). Os resultados encontram-se na Tabela 4. 2.

Tabela 4. 2. Valores de D.O. no instante inicial e após 48h de incubação para os fungos Cryptococcus sp e Mucor piriformis, na presença dos antimicrobianos sorbato de potássio, vanilina, vanilina natural (concentrações de 1%, 2% e 3%), aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado e extrato de baunilha orgânico (concentrações1%, 3% e 5%)

		***Cryptococcus* sp**		***Mucor piriformis***	
Composto	**Concentração (%)**	**D.O. Inicial**	**D.O. 48h**	**D.O. Inicial**	**D.O.48h**
Sorbato de Potássio	1	0,092±0,001	0,176±0,028	0,088±0,001	0,088±0,002
	2	0,090±0,001	0,152±0,031	0,087±0,001	0,087±0,007
	3	0,091±0,002	0,140±0,015	0,089±0,002	0,089±0,002
Vanilina	1	0,090±0,003	0,093±0,004	0,088±0,001	0,091±0,004
	2	0,090±0,003	0,095±0,002	0,088±0,005	0,092±0,005
	3	0,090±0,001	0,096±0,001	0,087±0,003	0,093±0,002
Vanilina Natural	1	0,096±0,002	0,096±0,001	0,089±0,006	0,090±0,002
Aroma de baunilha em pó	1	0,184±0,009	0,267±0,023	0,204±0,010	0,291±0,021
	3	0,376±0,037	0,727±0,042	0,462±0,045	0,442±0,029
	5	0,788±0,062	0,727±0,042	0,972±0,055	0,850±0,042
Extrato de baunilha concentrado	1	0,150±0,003	0,512±0,035	0,141±0,002	0,480±0,037
	3	0,252±0,011	0,622±0,037	0,244±0,013	0,871±0,004
	5	0,347±0,003	0,716±0,040	0,354±0,006	0,683±0,111
Extrato de baunilha orgânico	1	0,126±0,003	0,444±0,041	0,119±0,002	0,431±0,034
	3	0,189±0,006	0,526±0,017	0,176±0,006	0,531±0,053
	5	0,307±0,001	0,625±0,072	0,230±0,008	0,588±0,061

Analisando a Tabela 4. 2, verifica-se que o sorbato de potássio não foi eficaz na inibição do crescimento de *Cryptococcus* sp pois, inclusive na concentração mais alta (3%), houve um aumento da D.O. indicando que houve crescimento. Contudo foi eficaz contra *Mucor piriformis* em toda a gama de concentrações testadas. Tais resultados não vão de encontro à legislação, uma vez que segundo o decreto lei do Conselho Europeu nº95/2/EC de 20 de fevereiro de 1995, a concentração máxima de sorbato permitida é 0,1%. Partindo-se do princípio de que esta concentração é suficiente para garantir a segurança alimentar a nível microbiológico, seria de esperar que utilizando uma concentração 30 vezes mais elevada não existisse crescimento algum.

O efeito do sorbato é dependente do pH, possuindo uma maior ação antimicrobiana para valores de pH próximos da sua constante de dissociação (pK_a= 4.76) (Davidson, Sofos et al. 2005). Relativamente à vanilina e à vanilina natural, ambas foram capazes de inibir o crescimento de ambos os fungos a uma concentração de 1%. O mesmo não acontece com o

aroma de baunilha em pó, que apenas foi eficaz contra *Cryptococcus* sp a 5% e *Mucor piriformis* a 3%. Tanto o extrato de baunilha concentrado e o extrato de baunilha orgânico não apresentaram qualquer ação antimicrobiana.

Caso estes compostos sejam mais eficazes a valores de pH mais baixos ainda poderão ter aplicação prática, caso contrário terão grande influência nas propriedades sensoriais.

Já seria de esperar que os extratos de baunilha possuíssem uma atividade antimicrobiana baixa visto que a baunilha apenas contém entre 2% a 2,8% de vanilina (composto antimicrobiano de interesse) (Anklam, Gaglione et al. 1997). Assim sendo, a quantidade presente no extrato será inferior, logo será necessária uma concentração de extrato muito elevada para possuir um efeito antimicrobiano. Por outro lado, os extratos poderiam conter compostos que possuíssem um efeito sinergético, mas tendo em conta os resultados, tal não se verifica.

4.2.2 Determinação da concentração mínima inibitória a pH 4,5

De forma a avaliar o efeito do pH, e tendo em conta que os preparados de fruta são acidificados de modo ao seu pH ser próximo de 4,5, o pH do meio de cultura foi ajustado utilizando HCl a 1M. Desta forma, para além do pH do meio estar próximo da constante de dissociação do sorbato de potássio (pK_a=4,76), permitindo assim um maior efeito antimicrobiano (Davidson, Sofos et al. 2005), as condições do meio de cultura assemelham-se mais às condições do preparado, replicando as condições reais de utilização do agente antimicrobiano. Os resultados encontram-se na Tabela 4. 3.

Tabela 4. 3. Valores de D.O. no instante inicial e após 48h de incubação para os fungos Cryptococcus sp e Mucor piriformis, na presença dos antimicrobianos sorbato de potássio, vanilina, vanilina natural, aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado e extrato de baunilha orgânico (concentrações 1%)

		***Cryptococcus* sp**		***Mucor piriformis***	
Composto	**Concentração (%)**	**D.O. Inicial**	**D.O. 48h**	**D.O. Inicial**	**D.O. 48h**
Sorbato de Potássio	1	0,092±0,003	0,099±0,004	0,084±0,002	0,094±0,004
Vanilina	1	0,095±0,003	0,092±0,003	0,086±0,002	0,086±0,002
Vanilina Natural	1	0,091±0,002	0,091±0,002	0,082±0,004	0,086±0,002
Aroma de baunilha em pó	1	0,138±0,004	0,275±0,022	0,161±0,008	0,250±0,028
Extrato de baunilha concentrado	1	0,177±0,086	0,885±0,063	0,138±0,002	0,784±0,211
Extrato de baunilha orgânico	1	0,116±0,003	0,803±0,051	0,112±0,002	0,879±0,170

A pH 4,5 o sorbato de potássio já possui efeito antimicrobiano a 1% (concentração 10 vezes superior ao limite legal). A vanilina e a vanilina natural continuam a ser capazes de inibir o crescimento. Tal já era esperado, uma vez que o seu efeito antimicrobiano também aumenta com a diminuição do pH (López-Malo, Alzamora et al. 1998). A diminuição do pH não teve qualquer influência no efeito antimicrobiano do aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado e extrato de baunilha. Para estes extratos foi fixada a concentração de 1% como o limite máximo a ser utilizado porque, segundo dados da empresa, valores superiores já iriam ter grande efeito nas propriedades organoléticas, não sendo viável a sua utilização como substituto do sorbato de potássio.

4.2.3 Determinação da concentração mínima inibitória de sorbato de potássio, vanilina e vanilina natural.

A determinação a MIC foi realizada segundo o descrito na seção 3.4 acidificando o meio a pH 4,5 com HCl 1M. Os resultados encontram-se na Tabela 4. 4

Tabela 4. 4. Valores de MIC do sorbato de potássio, vanilina e vanilina natural para fungos filamentosos, respetivamente identificados com o seu respetivo número interno na empresa.

Número	Microrganismo	Sorbato de potássio (%)	Vanilina (%)	Vanilina natural (%)
1	*Penicillium* sp	0,05	0,1	0,1
4	*Cladosporium* sp	0,05	0,1	0,1
6	NI	0,05	0,1	0,1
7	*Aspergillus* sp	0,05	0,1	0,1
8	*Aspergillus* sp *(A. chevalieri, A. amstelodami, A.heterocaryoticus)*	0,05	0,1	0,1
9	*Cryptococcus* sp	0,1	0,1	0,2
9A	*Epicoccum nigrum*	0.05	0,1	0,1
10	NI	0,05	0,1	0,1
10A	*Cadophora fastigiata*	0,1	0,05	0,05
11A	*Penicilium* sp	0,05	0,1	0,1
12A	*Aspergillus* sp	0,05	0,05	0,05
14A	*Cladosporium* sp	0,05	0,1	0,1
15	*Lecytophora* sp	0,05	0,05	0,05
17	*Mucor piriformis*	0,1	0,1	0,1
19	*Phoma glomerata*	0,05	0,1	0,1
20	*Cladosporium sp*	0,05	0,1	0,1
30	NI	0,1	0,1	0,1

Relativamente ao sorbato de potássio, os resultados vão de encontro ao que está descrito na literatura. Existem estudos que comprovam que o sorbato é eficaz contra *Aspergillus*, *Penicilium* e *Mucor*. É possível concluir também que o pH influencia significativamente a sua ação, como discutido anteriormente, e que a pH 4,5 possui um efeito antimicrobiano mais elevado, o que está de acordo com o presente na literatura (Davidson, Sofos et al. 2005). A concentração máxima que permite a inibição de todos os microrganismos é de 0,1%, indo de encontro ao limite máximo de aplicação descrito no decreto lei do Conselho Europeu nº95/2/EC de 20 de fevereiro de 1995.

A vanilina apresenta também uma concentração máxima de 0,1% para os microrganismos testados. Segundo dados bibliográficos, a vanilina é capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus niger* a 0,25% (López-Malo, Alzamora et al. 1995), sendo que, de uma forma geral, é capaz de inibir o crescimento de fungos a uma gama de concentrações entre 0,2 e 0,3% (López-Malo, Alzamora et al. 1998). O facto de os valores obtidos para os microrganismos testados serem mais baixos poderá estar relacionado com o pH, sendo que o valor da MIC irá variar também de estirpe para estirpe apesar da espécie ser a mesma.

A vanilina natural apresenta uma gama de MIC's muito próximas da vanilina comercial. Contudo, no caso do fungo *Cryptococcus* sp o seu valor é mais elevado, 0,2% ($p<0,05$). Há que ter em conta que a vanilina comercial apresenta uma percentagem de pureza de 99.9%, enquanto que a natural poderá conter uma percentagem de impurezas maior. Tal irá conduzir a um aumento da concentração mínima inibitória.

De uma forma geral, o valor da MIC para o sorbato de potássio foi sempre inferior ($p<0,05$) ou igual ao valor da MIC para a vanilina e vanilina natural, exceto no caso da *Cadophora* sp em que a MIC tanto para a vanilina como para a vanilina natural foi inferior comparativamente ao sorbato de potássio, 0,05%, 0,05% e 0,1% respetivamente ($p<0,05$). O que indica que este fungo é menos suscetível à ação do sorbato.

De salientar que os microrganismos que se encontram repetidos foram isolados de locais da unidade industrial, (nomeadamente das zonas de produção, preparação de fruta, refrigeração, congelação, armazém de secos, sala de pesagem de secos e alergénicos) e a sua identificação só foi realizada após a realização dos ensaios.

4.3 Determinação da concentração mínima inibitória para leveduras

A determinação da MIC para leveduras foi realizada segundo o descrito na seção 3.5, acidificando-se o meio até pH 4,5 com HCl 1M. Os resultados encontram-se na Tabela 4. 5. Os gráficos referentes às medições encontram-se no anexo 3.

Tabela 4. 5. Valores da MIC do sorbato de potássio, vanilina e vanilina natural para leveduras

Número	Microrganismo	Sorbato de potássio (%)	Vanilina (%)	Vanilina natural (%)
13	NI	0,1	0,2	0,2
21	*Pichia anomala*	0,1	0,3	0,3
22	*Candida Santamarie*	0,1	0,3	0,3

Analisando a Tabela 4. 5, as conclusões são em tudo semelhantes às da seção 4.2.3. Neste caso em particular, para todas as leveduras testadas, a MIC da vanilina e vanilina natural foram iguais. O sorbato de potássio foi o agente antimicrobiano que apresentou uma MIC inferior, 0,1% para todas as leveduras, sendo assim mais eficaz do que a vanilina e vanilina natural uma vez que ambas obtiveram uma valor de MIC de 0,3% ($p<0,05$). Estes resultados permitiram confirmar que o sorbato de potássio é eficaz na inibição de leveduras do género *Candida (Davidson, Sofos et al. 2005)* para além da sua eficácia quando aplicado em conformidade com o limite máximo de utilização permitido de 0,1%, segundo o decreto lei do Conselho Europeu nº95/2/EC de 20 de fevereiro de 1995.

Estes resultados não foram tidos em conta nos ensaios posteriores de aplicação dos agentes antimicrobianos em preparado de fruta, uma vez que as leveduras não são microrganismos termorresistentes, como tal são eliminados no processo de pasteurização, e segundo o historial da empresa as contaminações pós pasteurização por parte de leveduras são praticamente nulas.

4.4 Avaliação dos agentes antimicrobianos em preparados de fruta

Os preparados foram elaborados segundo o descrito na secção 3.6. De forma a avaliar a aplicabilidade e eficiência dos agentes antimicrobianos testados, estes foram incorporados em preparados de fruta de morango posteriormente dosificados a 17% em iogurte. Para tal, foram monitorizados ao longo de 28 dias, armazenados a 4°C, tanto o preparado como o iogurte. Tal consiste na quantificação de fungos filamentosos, leveduras e mesófilos totais. No caso da monitorização do iogurte apenas não se realizou a determinação de mesófilos totais. Um dos preparados foi contaminado propositadamente com uma carga de 10^4 esporos/mL de *Aspergillus* sp e *Penincilluim* sp de forma a avaliar a eficiência dos agentes antimicrobianos

aquando de uma possível contaminação. Estes fungos foram escolhidos visto serem os que mais causam contaminações em alimentos.

Os agentes antimicrobianos utilizados foram a vanilina natural e o sorbato de potássio (como controlo). A vanilina pura não foi utilizada visto que já tinha sido alvo de avaliação na tese da Sara Santos. Neste trabalho foram testados vários agentes antimicrobianos, determinando a sua concentração mínima inibitória e avaliando a sua eficácia no produto final. A vanilina foi o antimicrobiano que apresentou resultados mais promissores, obtendo um valor para a sua MIC de 0,2% (Santos 2016).

O sorbato de potássio é estável durante a etapa de pasteurização e, sendo que o objetivo é encontrar um substituinte, é necessário que a vanilina também o seja uma vez que a adição de compostos pós pasteurização é de difícil execução. A estabilidade da vanilina durante o processo de pasteurização, bem como o seu efeito nas culturas lácteas do iogurte também não foi avaliado visto já terem sido realizados esses estudos na tese da Catarina Gabriel. Para além de outros estudos foi avaliada a estabilidade da vanilina durante a pasteurização, verificando-se que manteve a sua eficácia após a mesma e não surtiu qualquer efeito nas culturas lácteas do iogurte (Gabriel 2017).

4.4.1 Monitorização dos preparados de fruta ao longo de 28 dias.

Os resultados da quantificação de fungos filamentosos, leveduras e mesófilos totais ao longo de 28 para os preparados de morango encontram-se na Tabela 4. 6.

Tabela 4. 6. Resultados da quantificação de fungos filamentosos (FF), leveduras e mesófilos totais para os preparados contendo sorbato de potássio e vanilina natural (contaminados e não contaminados) ao longo de 28 dias de armazenamento a 4℃

		Sorbato de potássio	Vanilina natural	Sorbato de potássio (preparado contaminado)	Vanilina natural (preparado contaminado)
Dia 1	FF e Leveduras, CFU/g	0	0	0	75
	Mesófilos Totais, CFU/g	<100	<100	<100	<100
Dia 5	FF e Leveduras, CFU/g	0	0	0	50
	Mesófilos Totais, CFU/g	<100	<100	<100	<100
Dia 11	FF e Leveduras, CFU/g	0	0	o	25
	Mesófilos Totais, CFU/g	<100	<100	<100	<100
Dia 20	FF e Leveduras, CFU/g	0	0	0	0
	Mesófilos Totais, CFU/g	<100	<100	<100	<100
Dia 28	FF e Leveduras, CFU/g	0	0	0	0
	Mesófilos Totais, CFU/g	<100	<100	<100	<100

Relativamente ao preparado contendo sorbato de potássio, verifica-se que ao longo dos 28 dias de armazenamento, foi capaz de inibir o crescimento de bolores e leveduras. O sorbato possui uma ação bacteriostática (Chevalier, Chaabani et al. 2018), ou seja impede a proliferação de microrganismos mas não causa a sua morte. (Aouadhi, Mejri et al. 2015) reportou também que este possui, em certos casos, uma ação bactericida. Analisado os resultados para o preparado contaminado é possível verificar que o sorbato exerceu uma ação bactericida, sendo eficaz no controlo de uma contaminação hipotética pós pasteurização, visto que não foram quantificados quaisquer fungos.

A vanilina natural foi capaz de inibir o crescimento de bolores e leveduras, contudo, a vanilina possui uma ação bacteriostática (Rupasinghe, Boulter-Bitzer et al. 2006) e os resultados vão contra o esperado uma vez que ao longo do tempo, a vanilina vai diminuindo a carga microbiana presente apresentando assim uma ação aparentemente bactericida.

Comparando o sorbato com a vanilina, ambos foram eficazes no controlo de uma contaminação hipotética pós pasteurização. Contudo, o sorbato mostra-se mais eficaz visto que logo no primeiro dia controla a contaminação originando a morte dos microrganismos.

Relativamente à análise de mesófilos totais, tanto para o sorbato de potássico como para a vanilina natural, para todos os preparados (contaminado e na contaminado), apresenta valores inferiores a 100 CFU/g.

Os critérios da empresa de expedição do produto para o cliente baseiam-se numa contagem nula de bolores e leveduras (caso apareça uma única unidade formadora de colónia, mesmo que a contagem seja abaixo do limite de deteção do método o produto não é expedido), e a contagem de mesófilos totais tem que ser inferior 100 CFU/g. Tanto a vanilina natural como o sorbato de potássio cumprem estes requisitos.

4.4.2 Monitorização dos iogurtes o longo de 28 dias

Os resultados da quantificação de fungos filamentosos, leveduras ao longo de 28 para os iogurtes dosificados com preparado de fruta encontram-se na Tabela 4. 7

Tabela 4. 7. Resultados da quantificação de fungos filamentosos (FF) e leveduras para os iogurtes dosificados com preparados de morango contendo sorbato de potássio e vanilina natural (contaminados e não contaminados) ao longo de 28 dias de armazenamento a 4ºC

		Sorbato de potássio	Vanilina natural	Sorbato de potássio (preparado contaminado)	Vanilina natural (preparado contaminado)
FF e Leveduras, CFU/g	Dia 1	0	0	25	0
	Dia 5	0	0	0	0
	Dia 8	25	0	0	0
	Dia 11	0	0	25	0
	Dia15	0	25	50	0
	Dia 20	0	0	25	25
	Dia 28	0	0	0	0

Tanto o iogurte dosificado com preparado de morango com sorbato de potássio, como com vanilina natural, não apresentam sinais de contaminação ao longo de 28 dias de armazenamento. Os casos de 25 CFU/g no dia 8 para o sorbato e 25 CFU/g no dia 15 para a vanilina, possivelmente serão erros experimentais tendo em conta todos os outros valores.

Relativamente aos iogurtes dosificados com preparados de morango contaminados, tanto para o sorbato de potássio como para a vanilina, os resultados indicam que ambos os compostos vão perdendo a sua eficácia ao longo do tempo, no caso de uma hipotética contaminação pós pasteurização.

4.5 Avaliação sensorial do iogurte dosificado com preparado de morango

A avaliação sensorial foi realizada por um painel de 17 provadores (treinados e não treinados) pertencentes à unidade industrial da Maia. A análise foi realizada tendo sempre em conta a comparação do iogurte contendo o antimicrobiano selecionado, a vanilina natural, com o padrão contendo sorbato de potássio. Foram avaliados vários parâmetros, nomeadamente acidez, doçura, adstringência, sabor em relação ao padrão e a preferência por parte do painel. Os resultados encontram-se nas Figura 4. 3, Figura 4. 4 e Figura 4. 5.

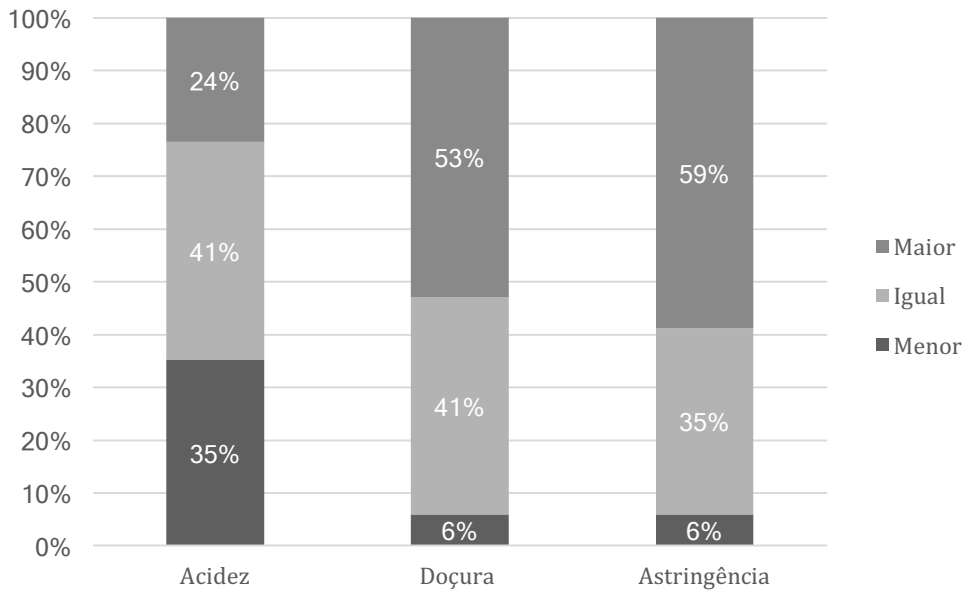


Figura 4. 3. Perceção por parte dos provadores da acidez, doçura e adstringência do iogurte contendo vanilina natural em comparação com o iogurte contendo sorbato de potássio (padrão)

Relativamente à acidez 35% dos provadores acharam que o iogurte que continha vanilina natural era menos ácido em comparação com o padrão, 41% acharam igual e 24% concluíram que era mais ácido. No caso da doçura, mais de metade do painel de provadores identificaram como mais doce o iogurte com vanilina natural, 41% acharam que a doçura era igual e apenas para 6% era menos doce. No parâmetro adstringência 59% identificaram o iogurte como mais adstringente, 35% acharam que era igual e 6% acharam que possuía uma menor sensação de adstringência

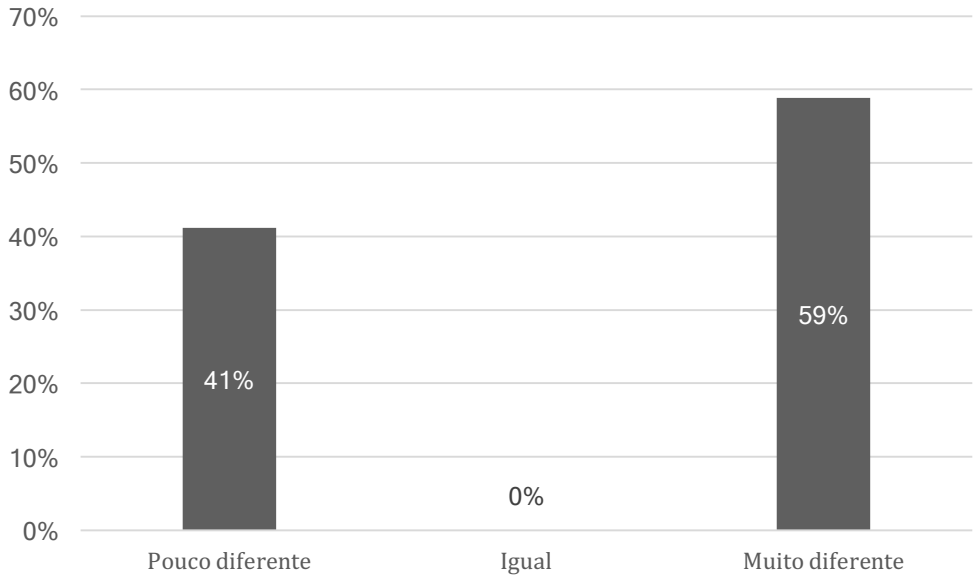


Figura 4. 4. Perceção por parte dos provadores da diferença do sabor do iogurte contendo vanilina natural em comparação com o iogurte contendo sorbato de potássio (padrão)

Quanto à diferença de sabor em relação ao padrão, 59% dos provadores concluíram que o iogurte com vanilina natural, apresentava um sabor muito diferente comparativamente com o iogurte padrão.

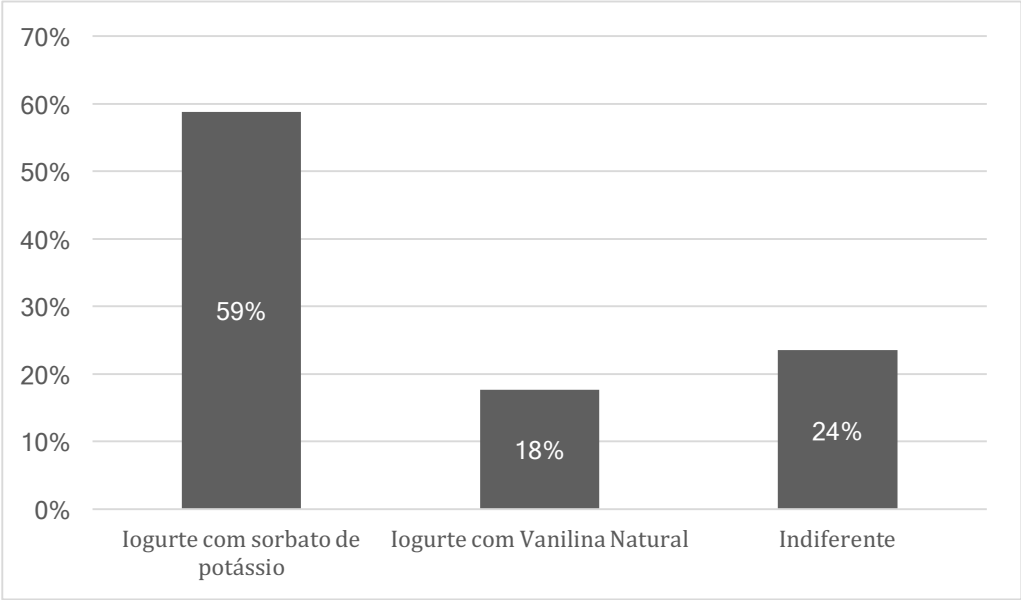


Figura 4. 5.Preferência por parte dos provadores

A preferência por parte do painel de provadores incidiu sobre o iogurte com sorbato de potássio (padrão), 59%. Contudo, para 24% do painel é indiferente a escolha de um iogurte ou outro, apenas 18% preferiu o iogurte com vanilina natural.

Analisando estatisticamente todos os resultados é possível verificar que os parâmetros com mais peso estatístico são a acidez e a adstringência, com um poder observado de 0,873 e 0,578 respetivamente. Tal permite concluir que estes são os parâmetros que mais influenciaram na diferenciação dos iogurtes.

Alguns das observações por parte do painel incidiram no facto do iogurte com vanilina natural ter um travo a baunilha, e não ser tão leve quanto o iogurte com sorbato de potássio.

Tendo em conta os resultados da análise sensorial é possível concluir que a vanilina natural não constituí uma alternativa ao sorbato de potássio. Tal acontece, uma vez que a vanilina influência significativamente as propriedades organoléticas do iogurte uma vez que a maioria do painel de provadores (59%) identificou que o iogurte possuía um sabor diferente ao do padrão, e de uma forma geral, notou diferença em todos os outros parâmetros avaliados.

A vanilina poderá eventualmente ser utilizada em outros tipos de preparados de fruta ou mesmo de baunilha, uma vez que nestes casos a sua adição poderá não ser percetível. Contudo serão necessários novos ensaios de forma a avaliar a sua aplicabilidade.

4.6 Análise Económica

De uma forma muito breve, a utilização da vanilina natural influência de forma significativa o preço do produto final. O preparado de fruta que contém sorbato de potássio como antimicrobiano possuí um preço que se situa entre 1 a 1,5€ por kg enquanto que o preparado que contém vanilina natural apresenta um preço entre 3,5 a 4€ por kg, o que iria conduzir a um aumento do preço do produto final em cerca de 3 a 4 vezes. Muito provavelmente, seria considerado como um produto *premium*, em que o consumidor estaria disposto a pagar mais por um produto mais natural, sem adição de preservantes sintéticos.

5 Conclusões

A temperatura é um fator determinante no crescimento dos fungos, uma vez que a 37°C, para os fungos em questão, não se verifica qualquer crescimento. Estabeleceu-se assim a temperatura de 25°C uma vez que esta temperatura possibilita o crescimento de todos os fungos. O pH tem uma grande influência no efeito dos agentes antimicrobianos, nomeadamente do sorbato de potássio. Verificou-se que a pH 4,5, pH próximo dos preparados de fruta, o efeito antimicrobiano do sorbato aumenta, sendo que a sua MIC, para os microrganismos testados, situa-se nos 0,1% (limite legal de aplicação). A vanilina apresentou uma MIC de 0,1% e a vanilina natural de 0,2%. Os extratos aroma de baunilha em pó, extrato de baunilha concentrado e extrato de baunilha orgânico, apresentaram valores de MIC muito elevados (superiores a 3%), o que irá influenciar significativamente as propriedades organoléticas do produto final. De tal modo, apenas o agente antimicrobiano vanilina natural foi selecionado para testes em preparado (a vanilina foi excluída visto já ter sido alvo de estudo).

Para a avaliação do comportamento da vanilina natural em preparado posteriormente dosificado em iogurte, estes foram monitorizados ao longo de 28 dias de armazenamento a 4°C, tanto os preparados como o iogurte e foi aferido o seu comportamento no controlo de uma hipotética contaminação pós pasteurização. Foram quantificados bolores, leveduras e mesófilos totais (apenas para os preparados). Para os preparados tanto o sorbato como a vanilina natural apresentaram um efeito bactericida, sendo capazes de, ao longo do tempo, reduzir a carga fúngica presente. Já os resultados para o iogurte, indicam que ambos os compostos perdem os eu efeito ao longo do tempo.

Relativamente à análise sensorial, o painel de provadores, identificou o iogurte contendo vanilina como o menos ácido (35%), mais doce (53%) e mais adstringente (59%) quando comparado com o padrão. A maioria notou uma grande diferença no sabor (59%) e a preferência do painel incidiu sobre o iogurte padrão (contendo sorbato de potássio como antimicrobiano), contudo para 24% do painel a escolha entre um e outro é indiferente.

A incorporação de vanilina nos preparados de fruta leva a um aumento do seu custo de venda entre 3 a 4 vezes.

Apesar da eficácia da vanilina natural em garantir a segurança microbiana tanto dos preparados como do iogurte, conclui-se que esta só não constituí uma alternativa viável ao sorbato de potássio, uma vez que influencia as propriedades sensórias do produto final.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

O objetivo principal deste trabalho consistia na avaliação da aplicabilidade da vanilina e fontes de vanilina como alternativa ao preservantes sorbato de potássio. A vanilina natural apresentou resultados promissores com agente antimicrobiano. Apesar de ter sido identificado um antimicrobiano natural capaz de garantir a segurança alimentar, este não pode ser considerado um substituto ao sorbato de potássio devido à sua grande influência nas propriedades sensoriais do produto acabado.

6.2 Limitações e Trabalho Futuro

A maior limitação do trabalho prende-se com o efeito nas propriedades sensoriais dos compostos antimicrobianos naturais.

Com propostas para trabalhos futuros, seria interessante avaliar o efeito sinergético da conjugação compostos naturais. Caso se verifique, a quantidade dos compostos adicionados seria menor, o que poderia influenciar menos as propriedades sensoriais.

Por outro lado, tendo em conta os resultados promissores da vanilina natura, seria interessante tentar desaromatizar a molécula. Caso seja possível, seria necessário determinar novamente a MIC, pois a desaromatização pode afetar o efeito antimicrobiano. Contudo é necessário aferir se desaromatizando a molécula ela pode ser considerada na mesma como um composto natural.

6.3 Apreciação Final

Uma das partes mais complexas de todo o trabalho e que consumiu mais tempo foi a otimização do método de determinação da MIC. De uma forma geral, acho que foram cumpridos todos os objetivos propostos. Sendo que este trabalho para além de experiência no mundo industrial, possibilitou-me a aquisição de competências que facilitaram em muito a minha integração no mercado de trabalho.

7 Referências

Anklam, E., S. Gaglione and A. Müller (1997). "Oxidation behaviour of vanillin in dairy products." Food Chemistry **60**(1): 43-51.

Antolak, H. and D. Kregiel (2017). Food Preservatives from Plants. Food Additives. D. N. Karunaratne and G. Pamunuwa. Rijeka, InTech**:** Ch. 03.

Aouadhi, C., S. Mejri and A. Maaroufi (2015). "Inhibitory effects of nisin and potassium sorbate alone or in combination on vegetative cells growth and spore germination of Bacillus sporothermodurans in milk." Food Microbiology **46**: 40-45.

Arendrup, Guinea, Cuenca-Estrella, J. Meletiadis, J. W. Mouton, K. Lagrou and S. J. Howard8 (2015). "EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3:

Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds."

Ayerst, G. (1969). "The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi." Journal of Stored Products Research **5**(2): 127-141.

BAHARAEEN, S. and H. S. VISHNIAC (1982). "Cryptococcus lupi sp. nov., an Antarctic Basidioblastomycete." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **32**(2): 229-232.

Cerruti, P., S. M. Alzamora and S. L. Vidales (1997). "Vanillin as an Antimicrobial for Producing Shelf-stable Strawberry Puree." Journal of Food Science **62**(3): 608-610.

Chevalier, E., A. Chaabani, G. Assezat, F. Prochazka and N. Oulahal (2018). "Casein/wax blend extrusion for production of edible films as carriers of potassium sorbate—A comparative study of waxes and potassium sorbate effect." Food Packaging and Shelf Life **16**: 41-50.

CleanLabel. (2018). "Clean Label." Retrieved 16/02/2018, 2017, from http://www.clean-label.de/index.php?page=clean-label.

Daglia, M. (2012). "Polyphenols as antimicrobial agents." Current Opinion in Biotechnology **23**(2): 174-181.

Davidson, P. M., J. N. Sofos and A. L. Branen (2005). Antimicrobials in Food, Third Edition, CRC Press.

Delves-Broughton, J. (2012). 6 - Natural antimicrobials as additives and ingredients for the preservation of foods and beverages. Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings, Woodhead Publishing**:** 127-161.

Devienne, K. F. U. E. P. I. d. Q. d. A. and M. S. G. U. E. P. F. d. C. F. d. A. Raddi (2002). "Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer." **v. vol.33 num.2**.

Filtenborg, O., J. C. Frisvad and U. Thrane (1996). "Moulds in food spoilage." International Journal of Food Microbiology **33**(1): 85-102.

Fitzgerald, D. J., M. Stratford, M. J. Gasson and A. Narbad (2004). "The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices." J Food Prot **67**(2): 391-395.

Frulact. (2018). "FRULACT." Retrieved 21/09/2018, from https://frulact.com/.

Gabriel, C. M. d. C. (2017). Natural antimicrobial agents. Mestrado Integrado em Bioengenharia, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Gurib-Fakim, A. (2006). "Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow." Mol Aspects Med **27**(1): 1-93.

Hossen, M. S., M. Y. Ali, M. H. A. Jahurul, M. M. Abdel-Daim, S. H. Gan and M. I. Khalil (2017). "Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review." Pharmacological Reports **69**(6): 1194-1205.

Howell, K. (2016). Spoilage: Yeast Spoilage of Food and Beverages. Encyclopedia of Food and Health. B. Caballero, P. M. Finglas and F. Toldrá. Oxford, Academic Press**:** 113-117.

Hyldgaard, M., T. Mygind and R. Meyer (2012). "Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components." Frontiers in Microbiology **3**(12).

Iwashina, T. (2000). "The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants." Journal of Plant Research **113**(3): 287-299.

Juneja, V. K., H. P. Dwivedi and X. Yan (2012). "Novel natural food antimicrobials." Annu Rev Food Sci Technol **3**: 381-403.

Lee, N.-K. and H.-D. Paik (2016). "Status, Antimicrobial Mechanism, and Regulation of Natural Preservatives in Livestock Food Systems." Korean Journal for Food Science of Animal Resources **36**(4): 547-557.

Lima, N. and C. Santos (2017). "MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi." Current Opinion in Food Science **13**: 26-30.

López-Malo, Alzamora and A. A. (1998). "Vanillin and pH Synergistic Effects on Mold Growth." Journal of Food Science **63**(1): 143-146.

López-Malo, A., S. M. Alzamora and A. Argaiz (1995). "Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems." Food Microbiology **12**: 213-219.

Lucera, A., C. Costa, A. Conte and M. A. Del Nobile (2012). "Food applications of natural antimicrobial compounds." Frontiers in Microbiology **3**: 287.

Morin-Sardin, S., K. Rigalma, L. Coroller, J.-L. Jany and E. Coton (2016). "Effect of temperature, pH, and water activity on Mucor spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese." Food Microbiology **56**: 69-79.

Negi, P. S. (2012). "Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application." International Journal of Food Microbiology **156**(1): 7-17.

Penney, V., G. Henderson, C. Blum and P. Johnson-Green (2004). "The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts." Innovative Food Science & Emerging Technologies **5**(3): 369-375.

Regnier, T., S. Combrinck and W. Du Plooy (2012). Essential Oils and Other Plant Extracts as Food Preservatives. Progress in Food Preservation, Wiley-Blackwell**:** 539-579.

Rodríguez, A., M. Rodríguez, M. J. Andrade and J. J. Córdoba (2015). "Detection of filamentous fungi in foods." Current Opinion in Food Science **5**: 36-42.

Rupasinghe, H. P. V., J. Boulter-Bitzer, T. Ahn and J. A. Odumeru (2006). "Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples." Food Research International **39**(5): 575-580.

Santos, S. C. G. d. (2016). Antifungal and functional properties of polyphenols in food products. Mestrado Integrado em Bioengenharia, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Sephton-Clark, P. C. S. and K. Voelz (2018). Chapter Four - Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. Advances in Applied Microbiology. S. Sariaslani and G. M. Gadd, Academic Press. **102:** 117-157.

Simoes, L. C., M. Simoes and N. Lima (2015). "Kinetics of biofilm formation by drinking water isolated Penicillium expansum." Biofouling **31**(4): 349-362.

Tsao, R. (2010). "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols." Nutrients **2**(12): 1231-1246.

Wang, Q. M., D. Begerow, M. Groenewald, X. Z. Liu, B. Theelen, F. Y. Bai and T. Boekhout (2015). "Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina." Studies in Mycology **81**: 55-83.

Zeng, W.-C., Q. He, Q. Sun, K. Zhong and H. Gao (2012). "Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of Cedrus deodara." International Journal of Food Microbiology **153**(1): 78-84.

Anexo 1 Otimização método de determinação da MIC para fungos filamentosos.

A1.1 Influência do tempo de incubação e concentração da suspensão de esporos no crescimento do fungo *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis em meio* NB suplementado com 1,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de triptona.

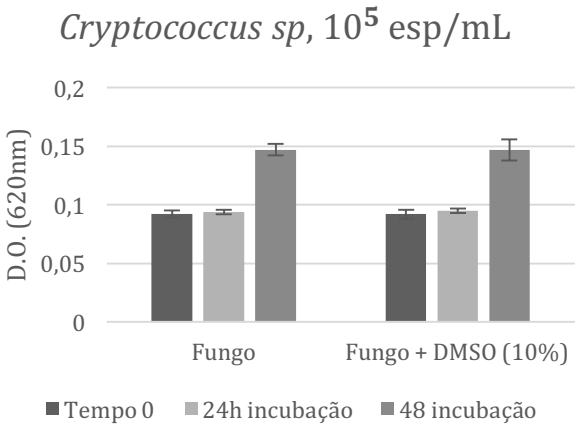


Figura A1. 1.Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 24h e 48h a 37°C (suspensão 10^5 esporos/mL)

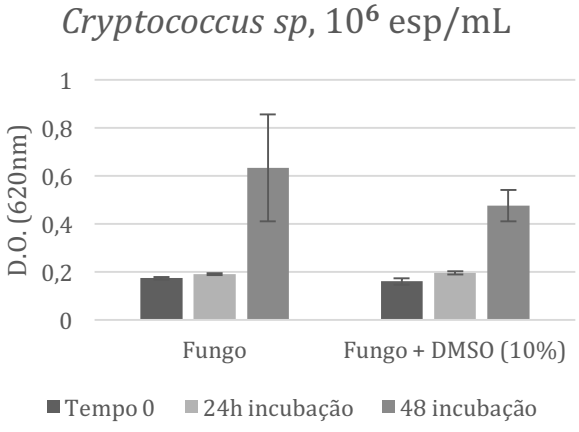


Figura A1. 2. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37°C (suspensão 10^6 esporos/mL)

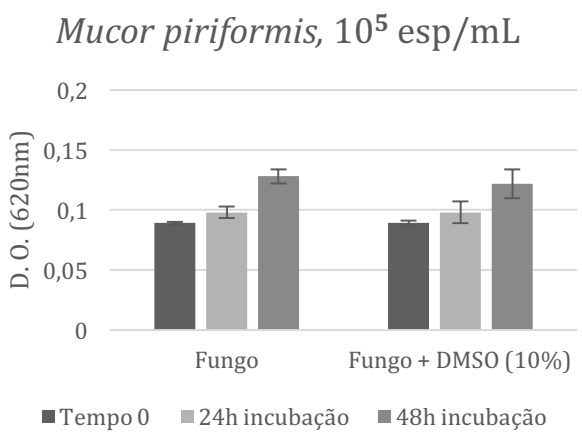


Figura A1. 4. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37° (suspensão 10^5 esporos/mL)

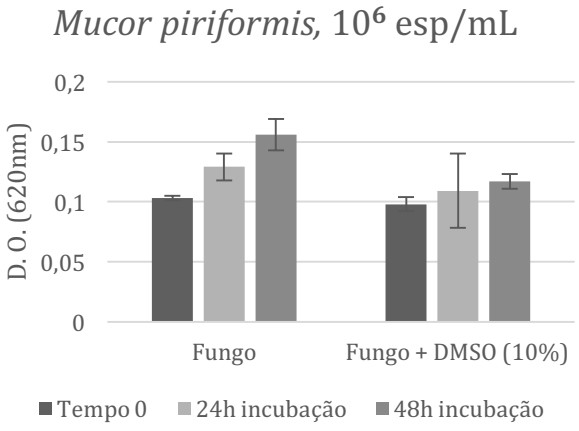


Figura A1. 3. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37°C (suspensão 10^6 esporos/mL)

Como se pode verificar, tanto para a concentração da suspensão de 10^5 esporos/mL como 10^6 esporos/mL de *Cryptococcus sp* figura A1.1, e de *Mucor piriformis*, figura A1.3 e A1.3, o crescimento do fungo foi praticamente nulo às 24h e para 48h houve algum crescimento, contudo muito pobre, apenas um aumento de D.O. de cerca de 0,05. Considerando que o crescimento e nulo nada se pode afirmar em relação a influencia do DMSO. Relativamente ao dados presentes na figura A1.2, e tendo em contas os restantes resultados, tratou-se muito provavelmente, de um erro experimental.

A1.2 Influência do tempo de incubação e concentração da suspensão de esporos no crescimento do fungo *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis em meio* MHB

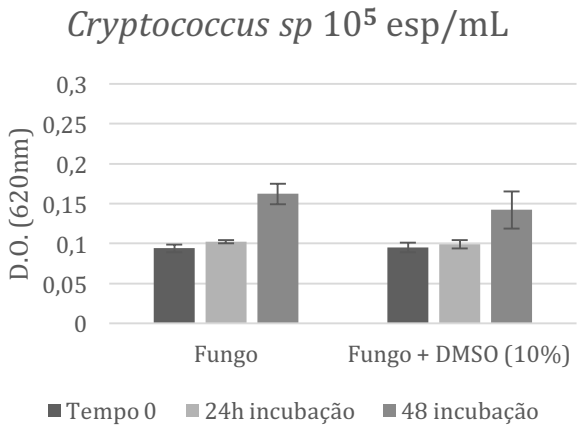


Figura A1. 5. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 24h e 48h a 37°C (suspensão 10^5 esporos/mL) em meio MHB

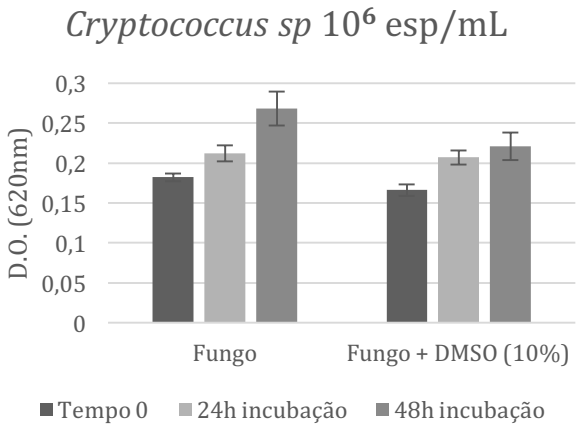


Figura A1. 6Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 24h e 48h a 37°C (suspensão 10^6 esporos/mL) em meio MHB

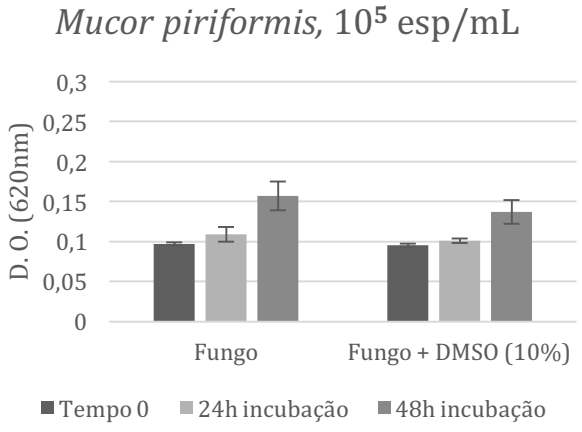


Figura A1. 7.Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37°C (suspensão 10^5 esporos/mL) em meio MHB

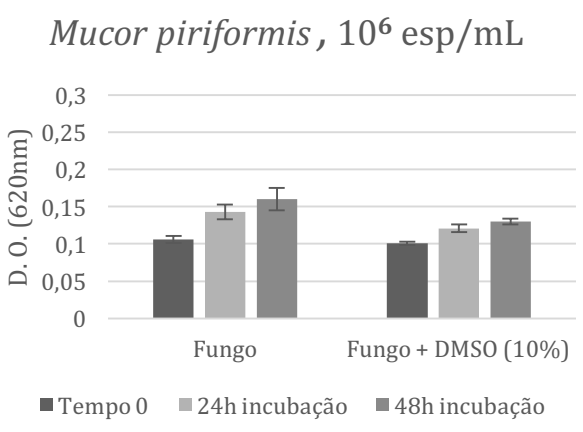


Figura A1. 8 Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 24h e 48h a 37°C (suspensão 10^6 esporos/mL) em meio MHB

Analisando os resultados, as conclusões são as mesmas da secção A1.1, de uma forma sucinta, crescimento praticamente nulo às 24h e é muito pobre para as 48h.

A1.3 Influencia da temperatura ao longo de 48h no crescimento do fungo *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis* em meio NB suplementado com 1,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de triptona (suspensão 10^6 esporos/mL)

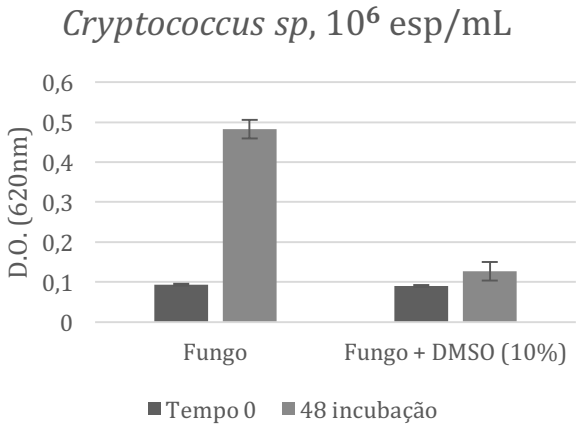


Figura A1. 9. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Cryptococcus sp ao longo de 48h a 25ºC (suspensão 10^6 esporos/mL)

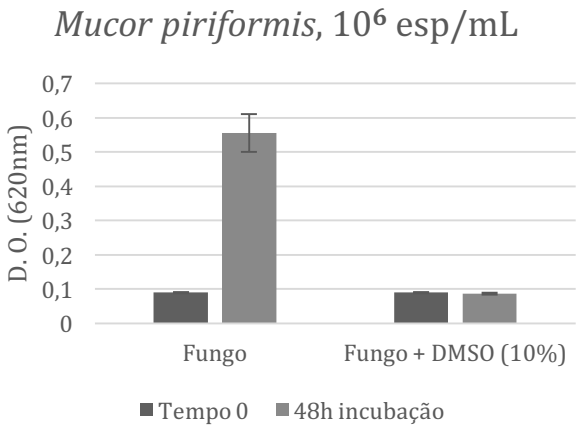


Figura A1. 10. Crescimento e influência de DMSO a 10% de Mucor piriformis ao longo de 48h a 25ºC (suspensão 106 esporos/mL)

Analisando as figuras A1.9 e A1.10, verifica-se que a temperatura constituí um fator fundamental no crescimento do fungo, para *Cryptococcus sp*, ao fim de 48h a D.O. aumentou cerca de 0,4 e para *Mucor piriformis* cerca de 0,45. Contudo existe um outro problema, o DMSO a 10% inibe o crescimento do fungo, o que significa que não é possível utilizar uma concentração de DMSO tão elevada para dissolver os agentes antimicrobianos, pois poderá conduzir a uma falsa MIC, ou seja, a inibição obtida ser por parte do DMSO e não do antimicrobiano. Tendo em conta estes resultados foi avaliado o efeito da concentração de DMSO no crescimento dos fungos de modo a identificar qual a concentração máxima de DMSO que pode ser utilizada, os resultados deste ensaio encontram-se na secção A1.4.

A1.4 Influência da concentração de DMSO no crescimento de *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis*, ao longo de 48h em meio NB suplementado com 1,0 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de triptona (suspensão 10^6 esporos/mL)

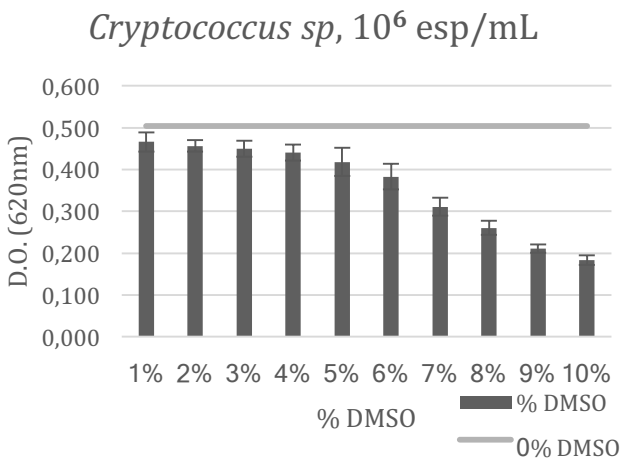


Figura A1. 11. Influência da concentração de DMSO no crescimento de Cryptococcus sp ao longo de 48h a 25°C (suspensão 10^6 esporos/mL)

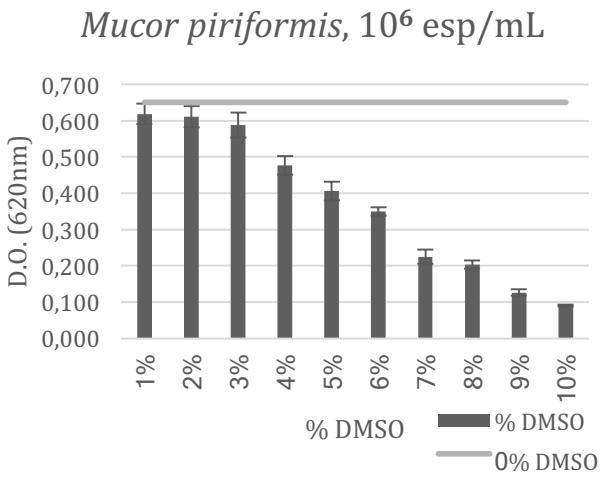


Figura A1. 12. Influência da concentração de DMSO no crescimento de Mucor piriformis ao longo de 48h a 25°C (suspensão 10^6 esporos/mL)

Nas figuras A1.11 e A1.12, fungo *Cryptococcus sp* e *Mucor piriformis* respetivamente, é possível verificar-se que o fungo *Mucor piriformis* é mais sensível à ação do DMSO uma vez que o seu crescimento é mais afetado, por exemplo enquanto que que a uma concentração de 4% para *Cryptococcus sp* a D.O. decresce 0,064 no caso de *Mucor piriformis* decresce 0,174. Pela análise das figuras e tendo em conta que o erro de um leitor de microplacas situa-se nos 0,06 de absorvância, foi selecionada como concentração máxima de DMSO que não afeta o crescimento a concentração de 3%, uma vez que a esta concentração, para *Cryptococcus sp* a D.O. decresce 0,054 e para *Mucor piriformis* decresce 0,063, muito próximo do erro associado a leitura da D.O.

Anexo 2 Gráficos da determinação da MIC para fungos filamentosos.

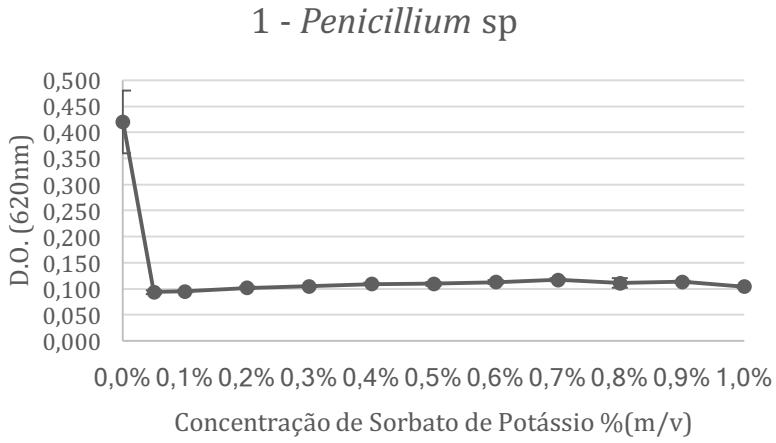


Figura A2. 1. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp

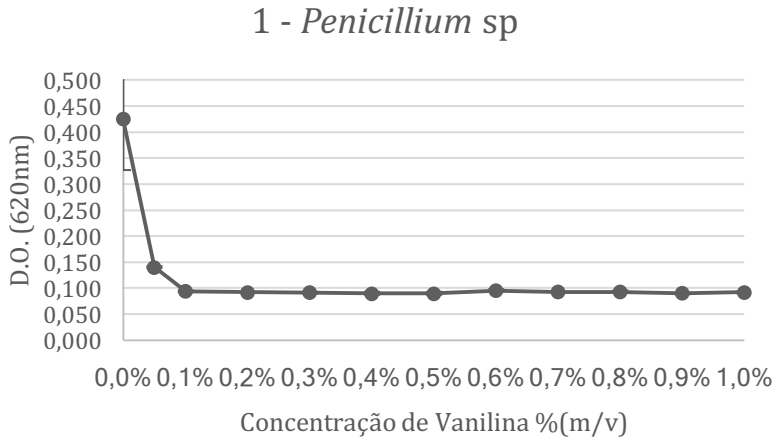


Figura A2. 2. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Penicillium sp

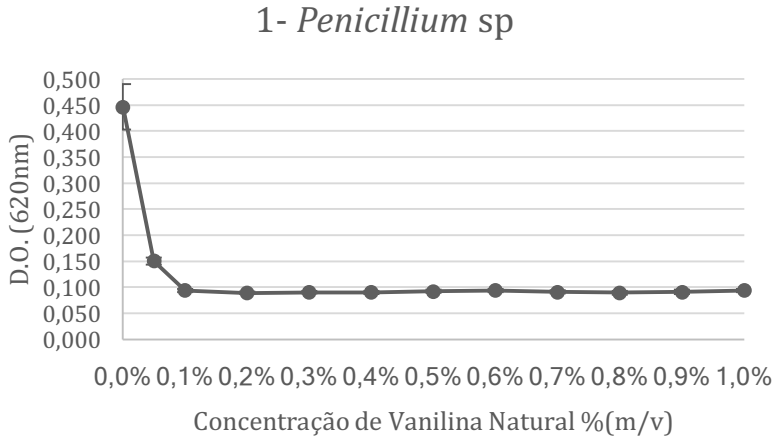


Figura A2. 3. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Penicillium sp

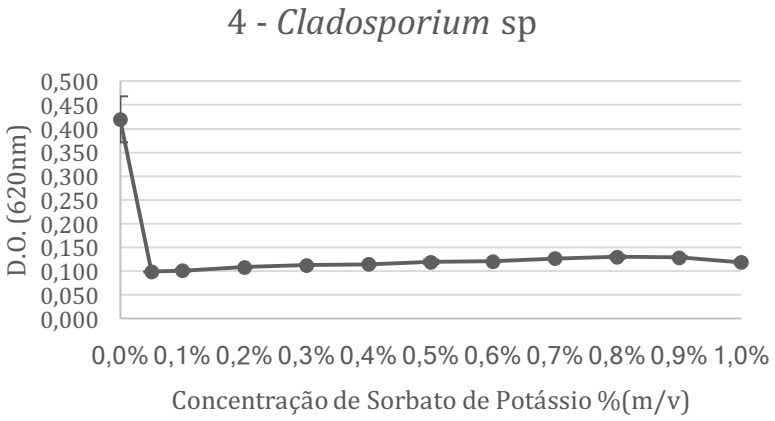


Figura A2. 4. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cladosporium sp

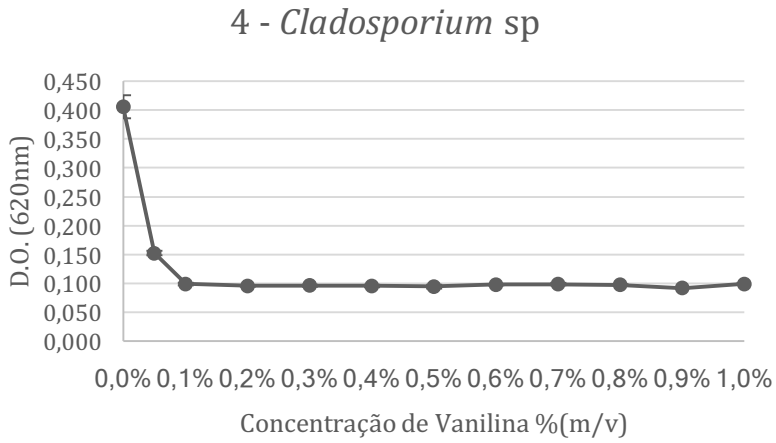


Figura A2. 5.Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp

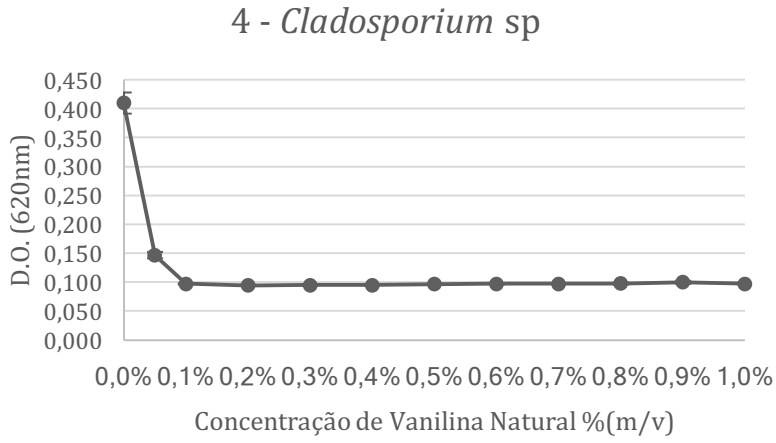


Figura A2. 6. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp

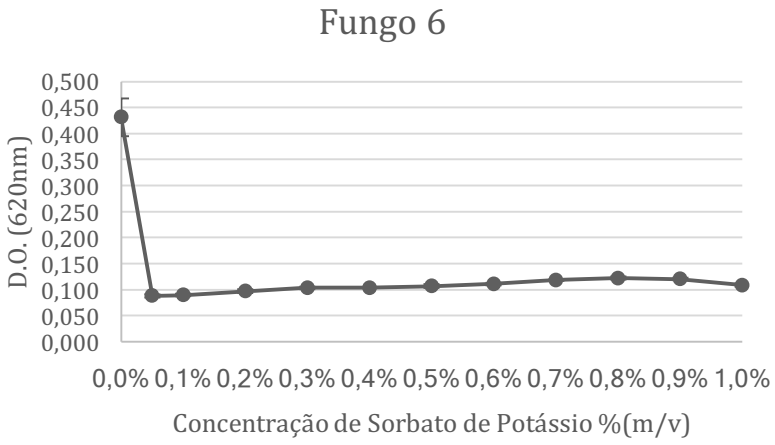


Figura A2. 7. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo 6

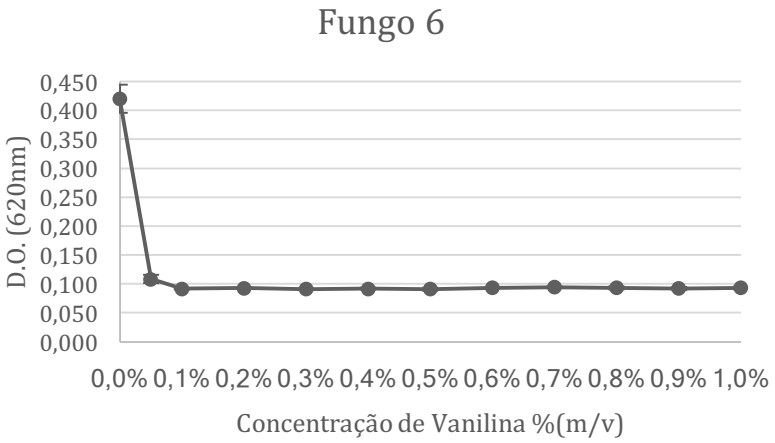


Figura A2. 8. Efeito da vanilina no crescimento do fungo 6

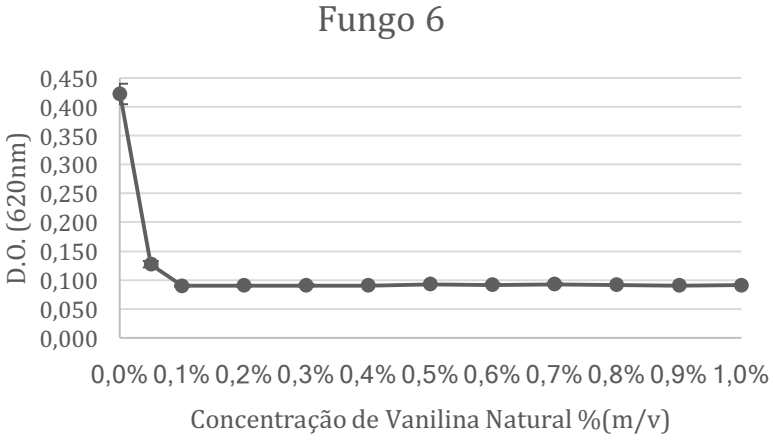


Figura A2. 9. feito da vanilina natural no crescimento do fungo 6

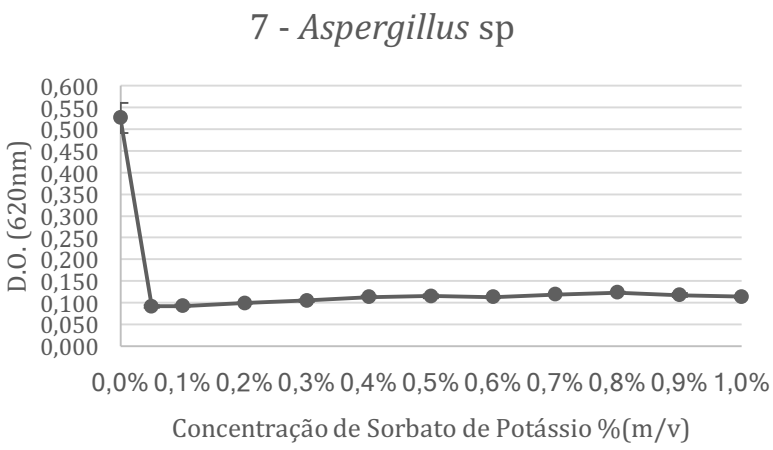


Figura A2. 10.Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Aspergillus sp

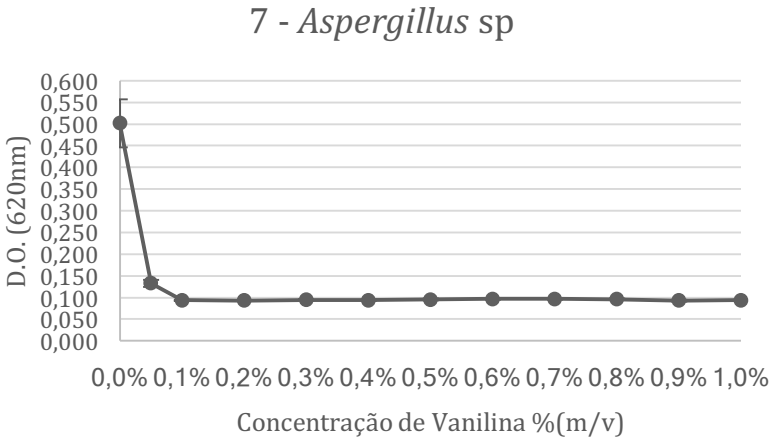


Figura A2. 11.Efeito da vanilina no crescimento do fungo Aspergillus sp

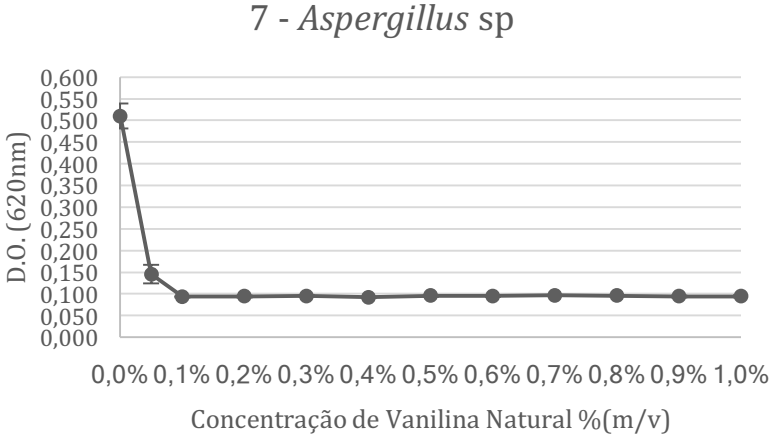


Figura A2. 12.Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Aspergillus sp

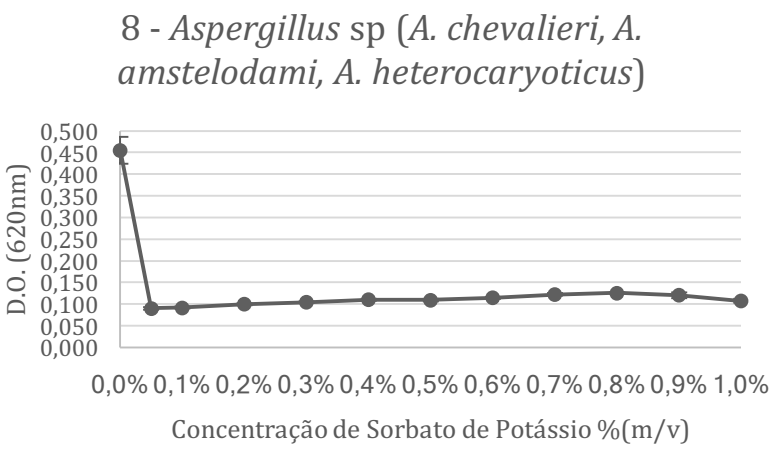


Figura A2. 13. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Aspergillus sp (A. chevalieri, A. amstelodami, A heterocaryoticus)

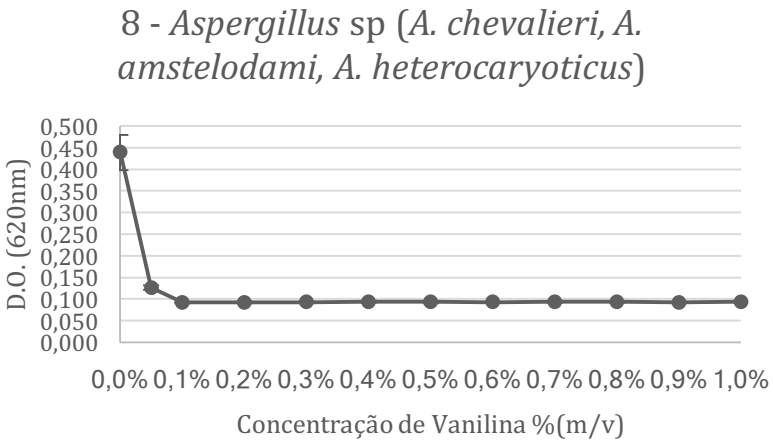


Figura A2. 14. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Aspergillus sp (A. chevalieri, A. amstelodami, A heterocaryoticus

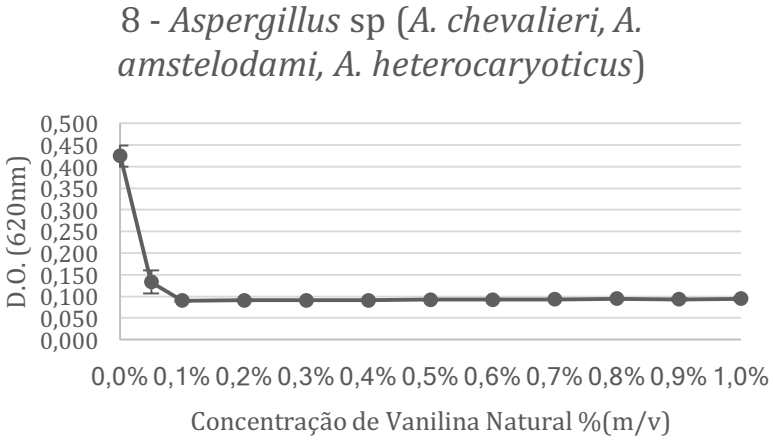


Figura A2. 15. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Aspergillus sp (A. chevalieri, A. amstelodami, A heterocaryoticus

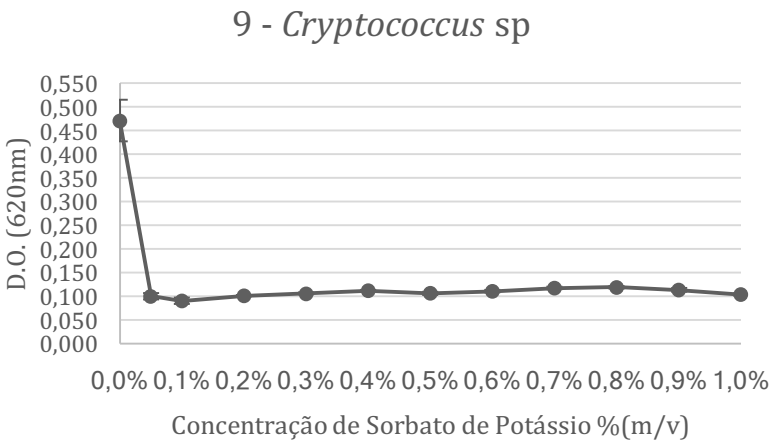


Figura A2. 18. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cryptococcus sp

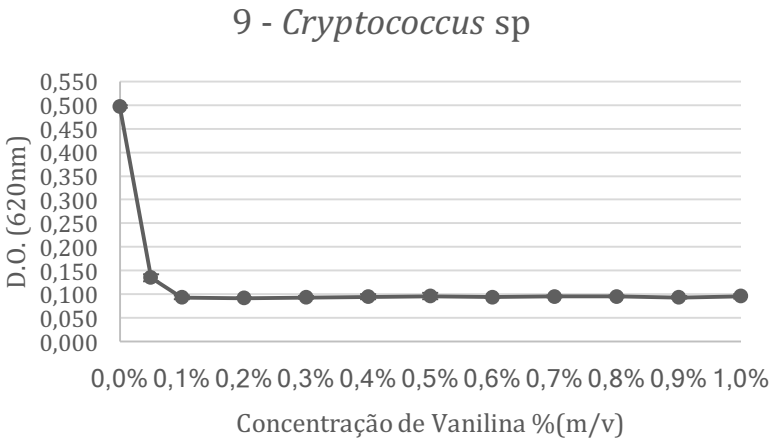


Figura A2. 17. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cryptococcus sp

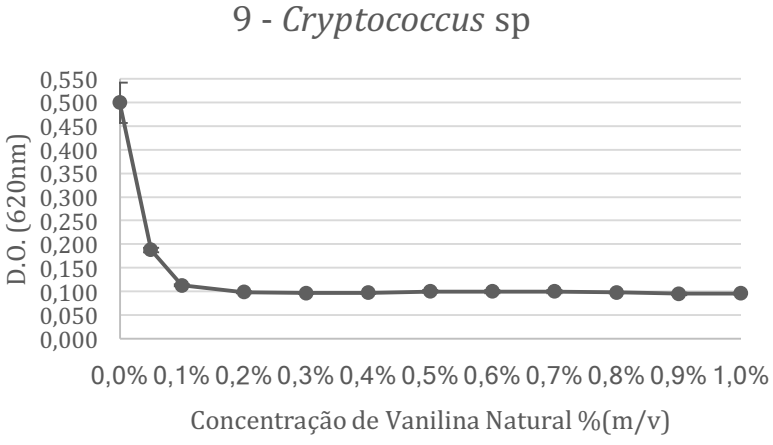


Figura A2. 16. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cryptococcus sp

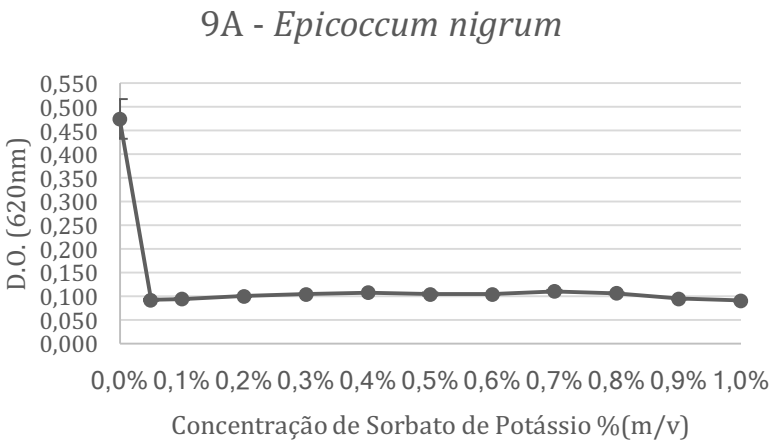


Figura A2. 20. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Epicoccum nigrum

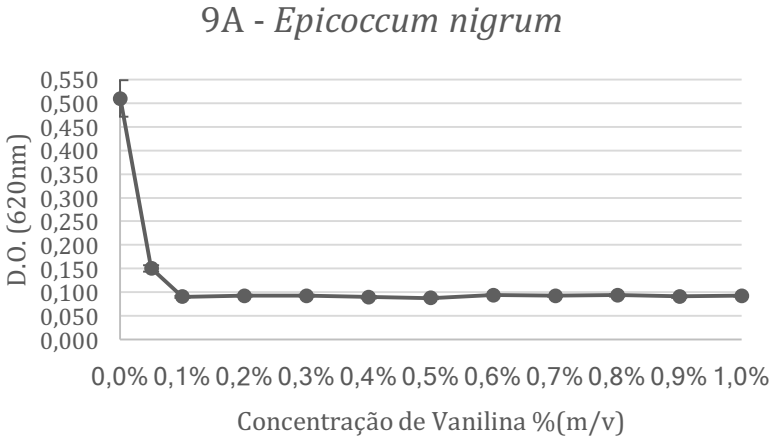


Figura A2. 21. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cryptococcus sp

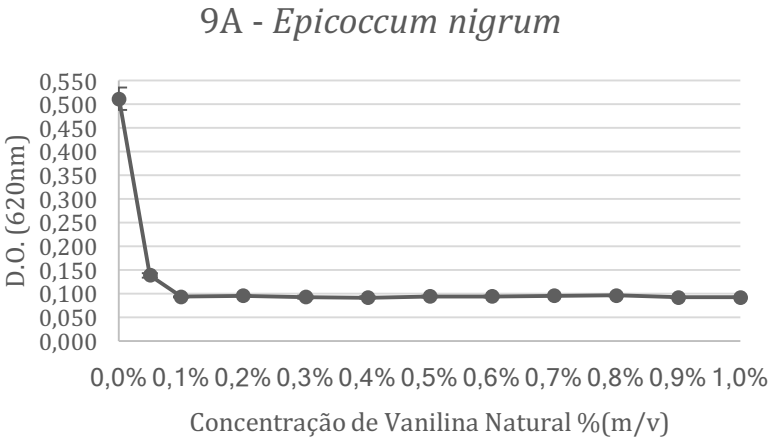


Figura A2. 19.Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cryptococcus sp

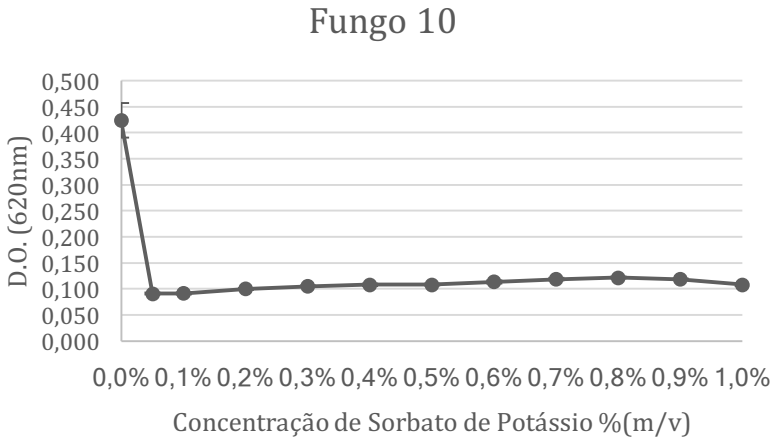


Figura A2. 23. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo 10

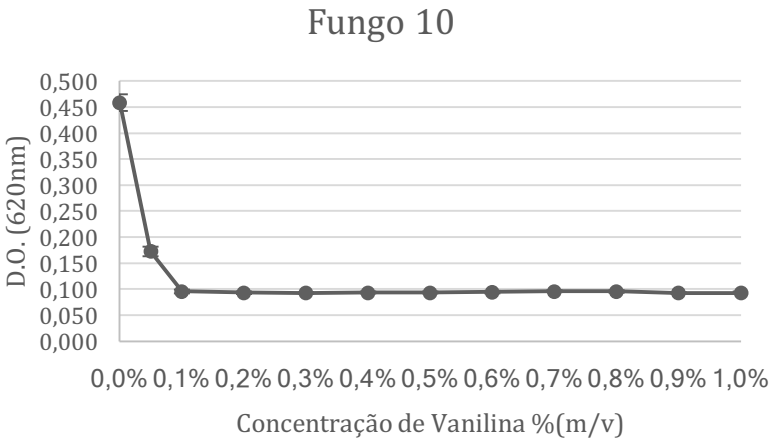


Figura A2. 22. Efeito da vanilina no crescimento do fungo 10

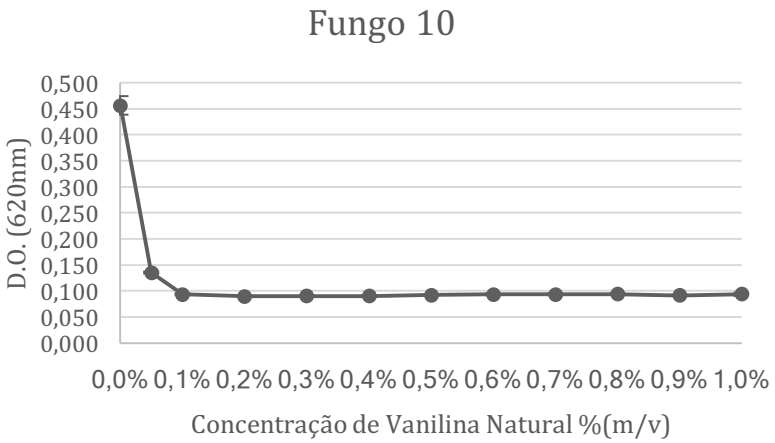


Figura A2. 24. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo 10

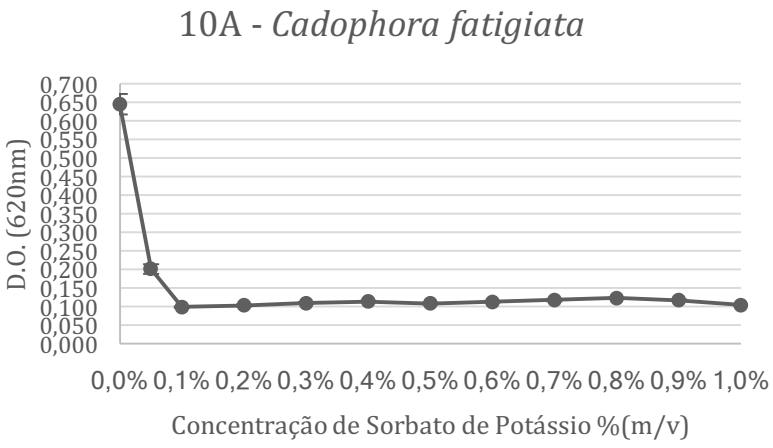


Figura A2. 27. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cadophora fatigiata

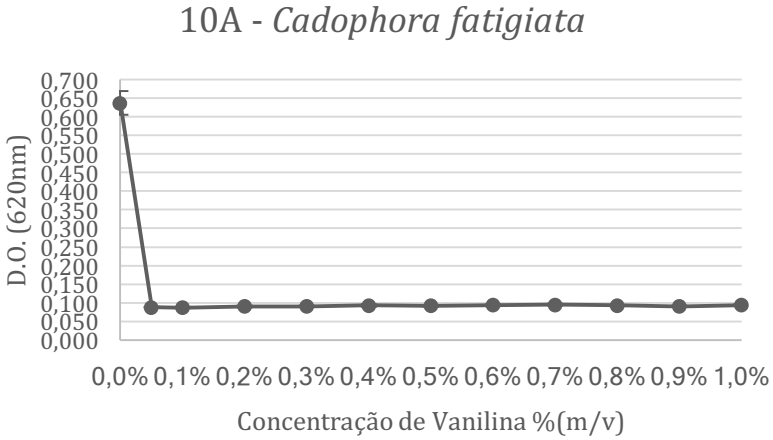


Figura A2. 26. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cadophora fatigiata

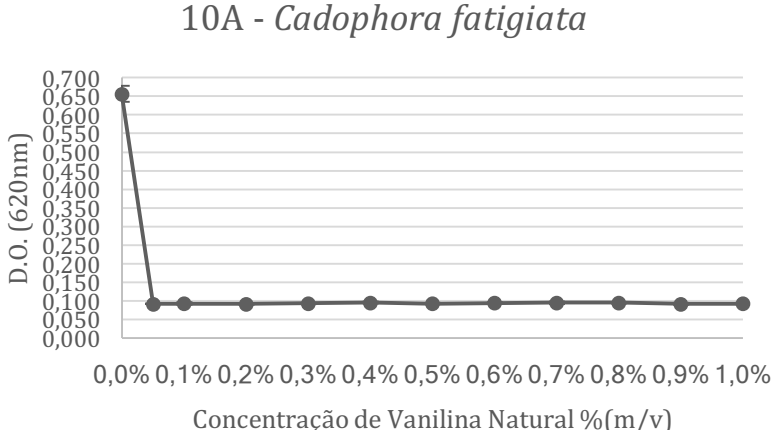


Figura A2. 25. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cadophora fatigiata

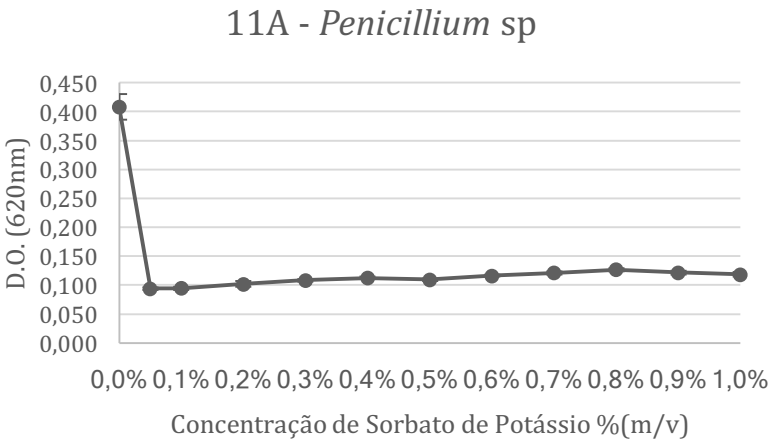


Figura A2. 29.Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp

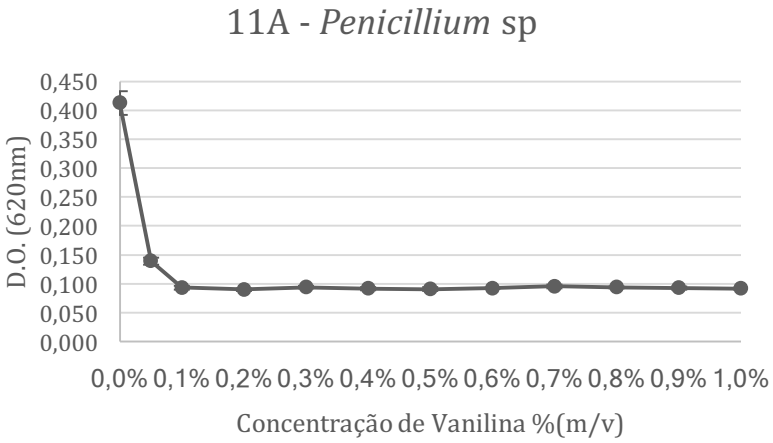


Figura A2. 30. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Penicillium sp

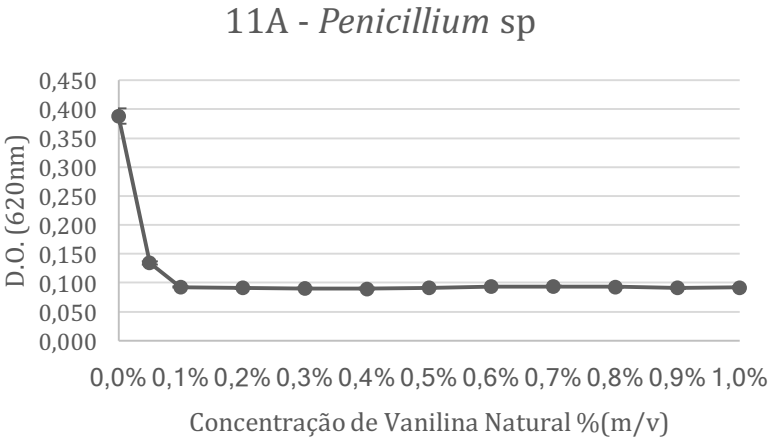


Figura A2. 28. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Penicillium sp

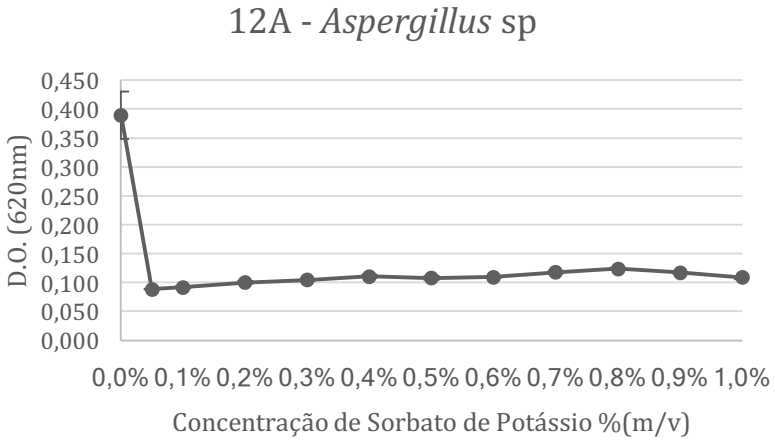


Figura A2. 31. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp

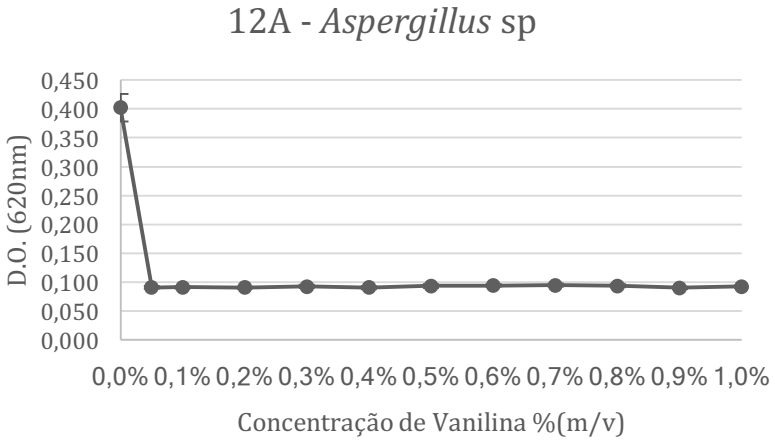


Figura A2. 32. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Penicillium sp

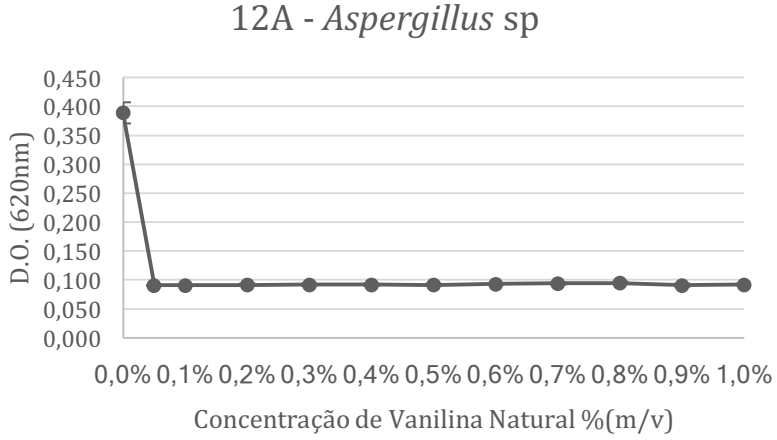


Figura A2. 33.Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Penicillium sp

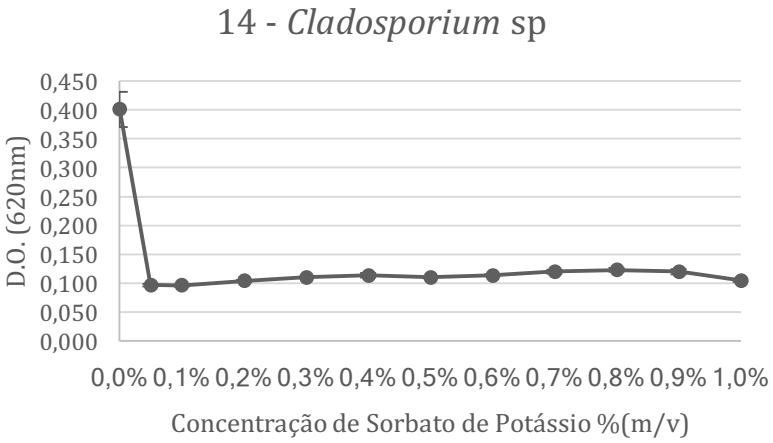


Figura A2. 34. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cladosporium sp

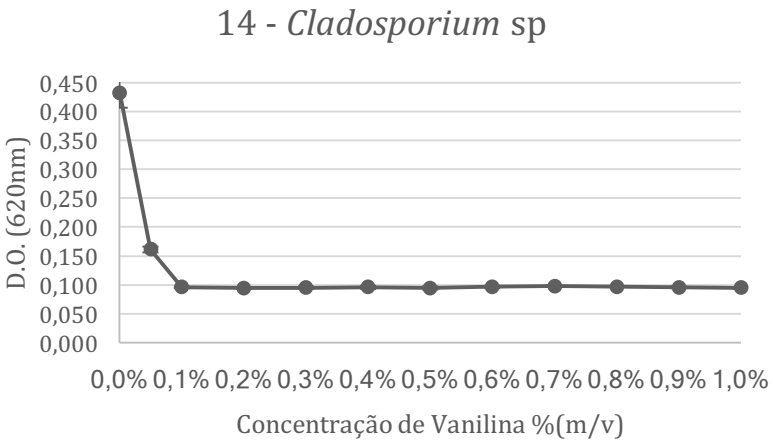


Figura A2. 35. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp

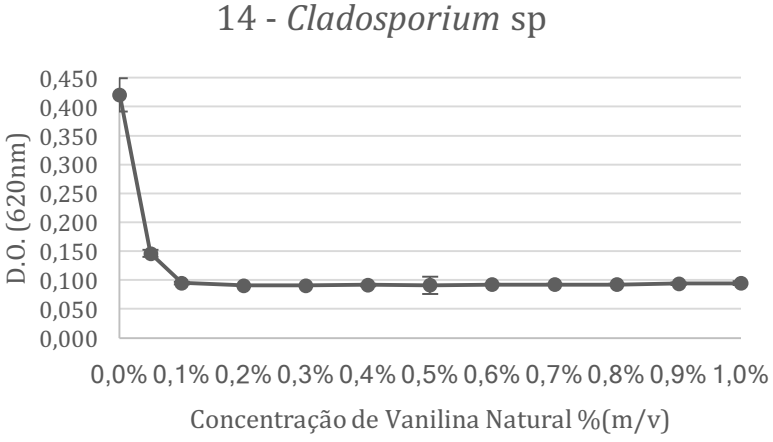


Figura A2. 36. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp

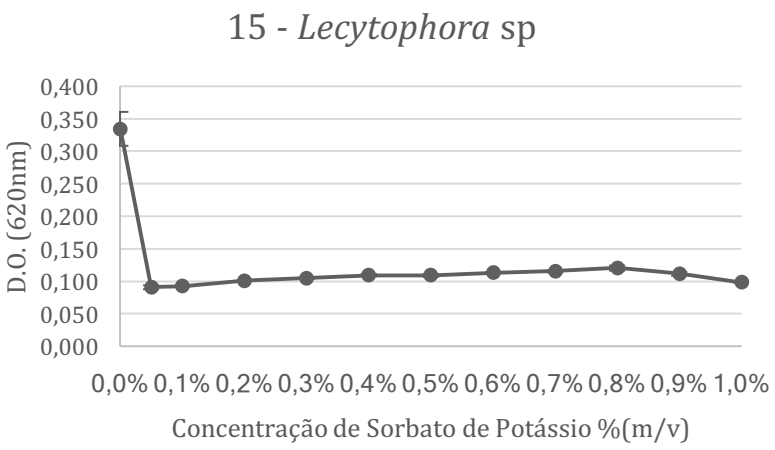


Figura A2. 37. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Lecytophora sp

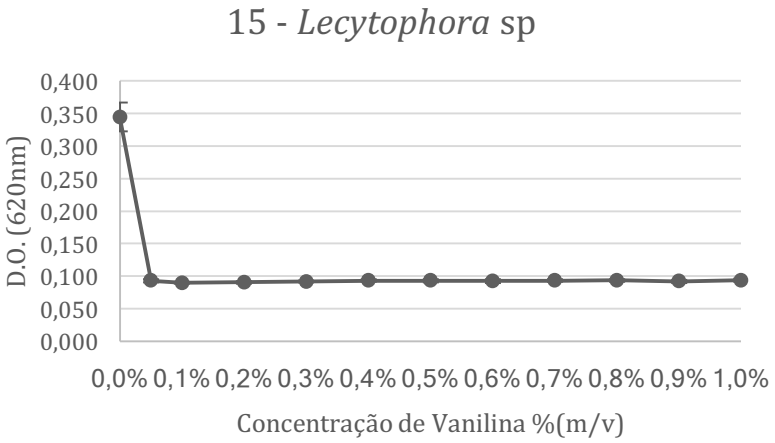


Figura A2. 38. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp

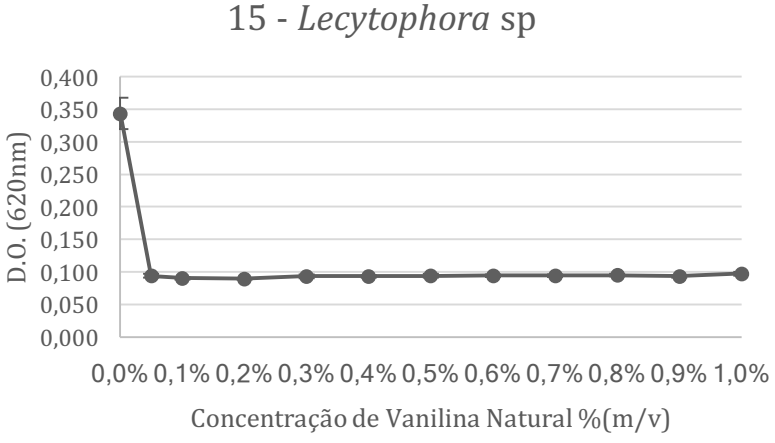


Figura A2. 39.Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp

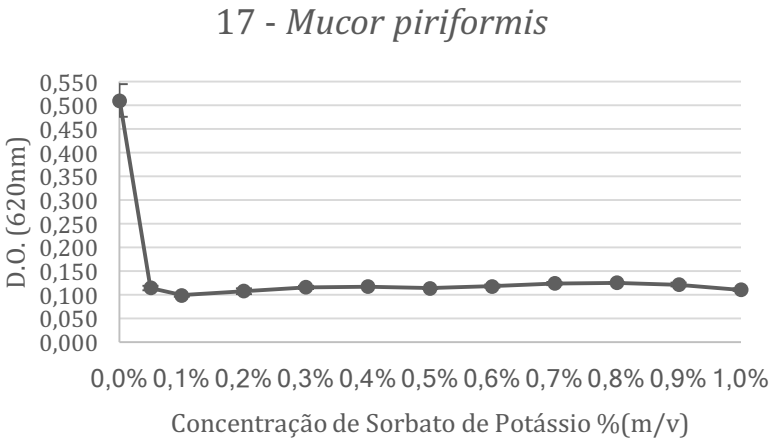


Figura A2. 42. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Mucor piriformis

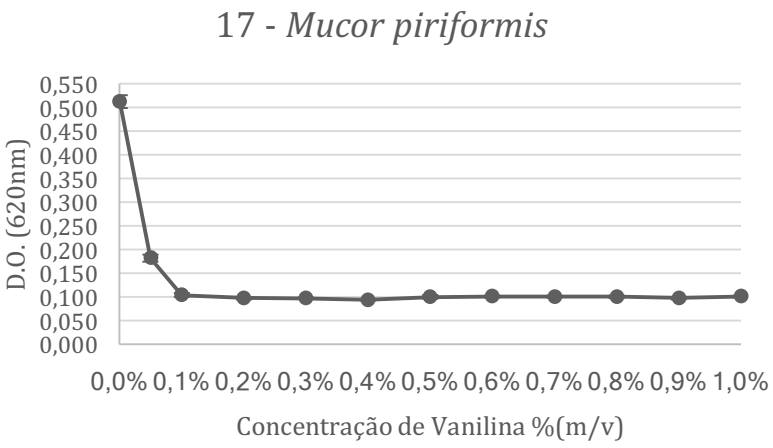


Figura A2. 40. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Mucor piriformis

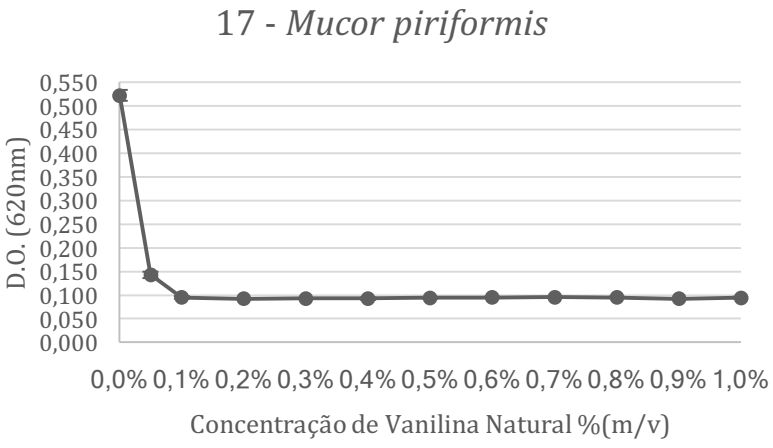


Figura A2. 41. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Mucor piriformis

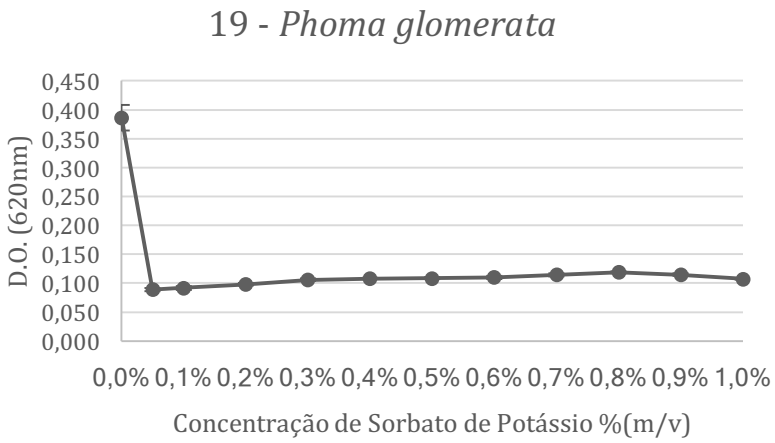


Figura A2. 43. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Phoma glomerata

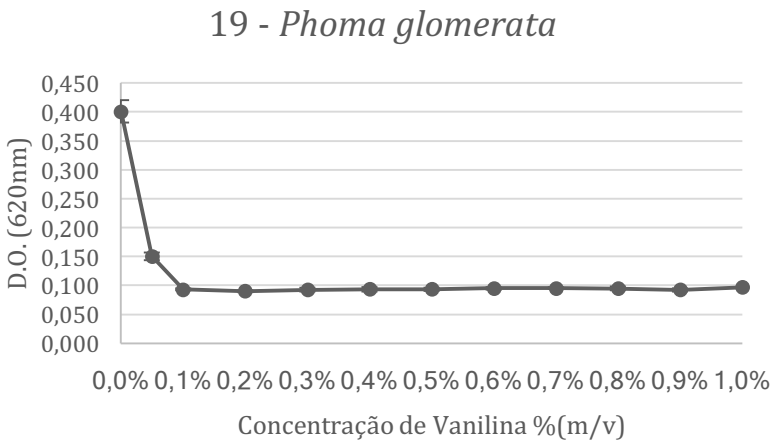


Figura A2. 44. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Phoma glomerata

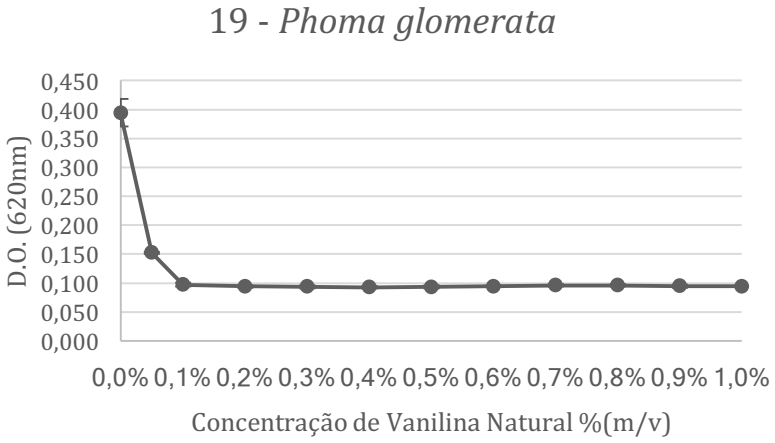


Figura A2. 45. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Phoma glomerata

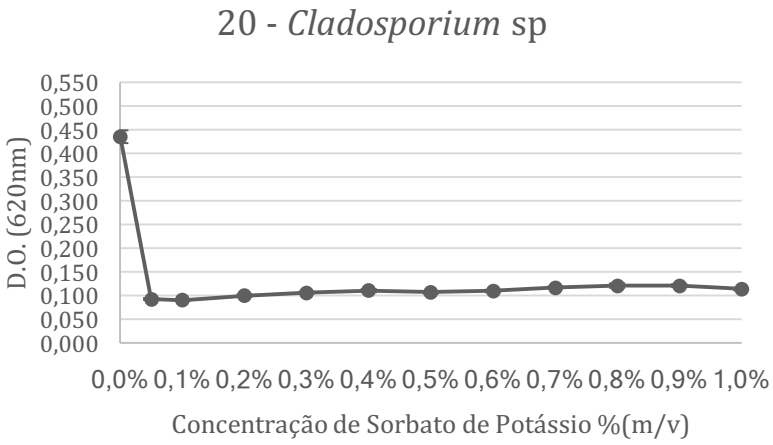


Figura A2. 46. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo Cladosporium sp

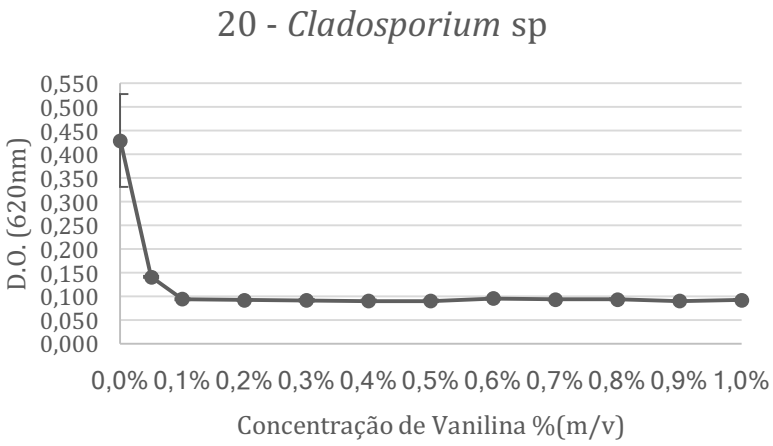


Figura A2. 47. Efeito da vanilina no crescimento do fungo Cladosporium sp

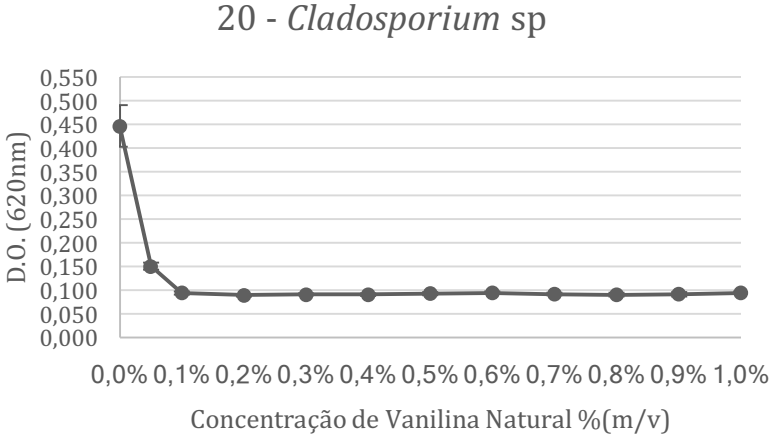


Figura A2. 48. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo Cladosporium sp

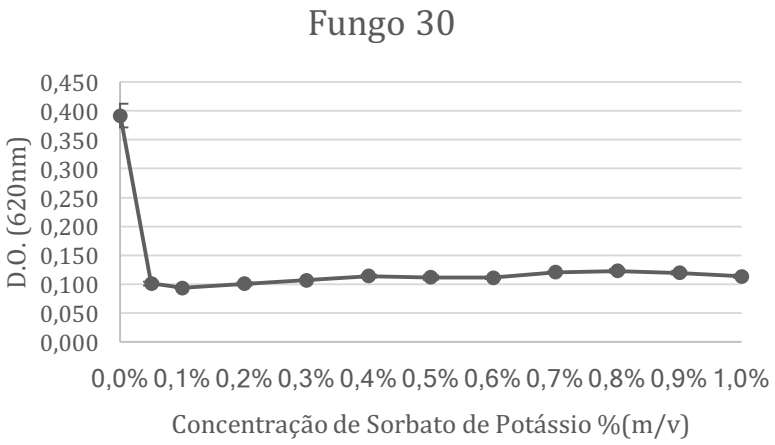


Figura A2. 49. Efeito do sorbato de potássio no crescimento do fungo 30

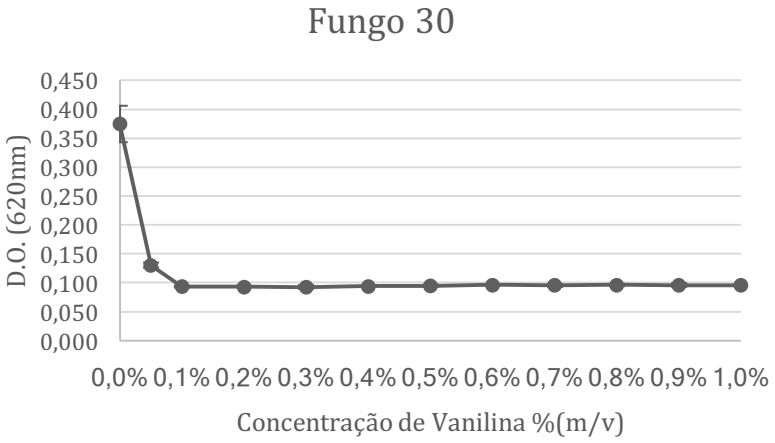


Figura A2. 50. Efeito da vanilina no crescimento do fungo 30

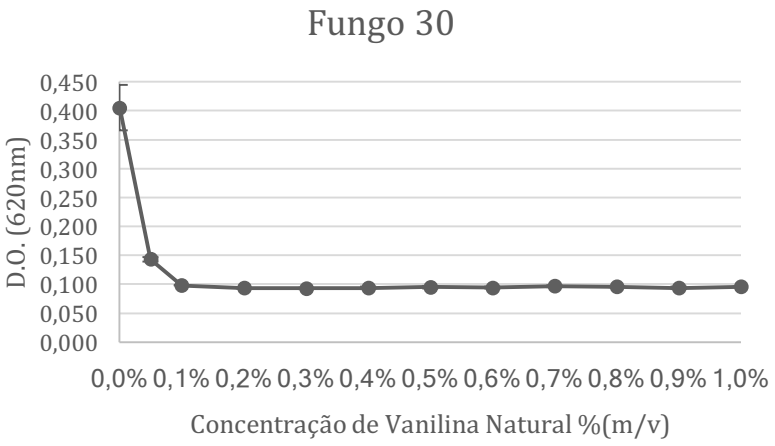


Figura A2. 51. Efeito da vanilina natural no crescimento do fungo 30

Anexo 3 Gráficos da determinação da MIC para leveduras.

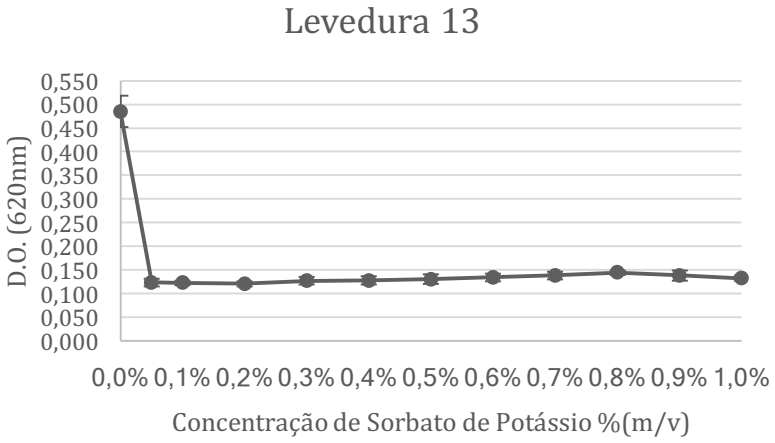


Figura A3. 1.Efeito do sorbato de potássio no crescimento da levedura 13

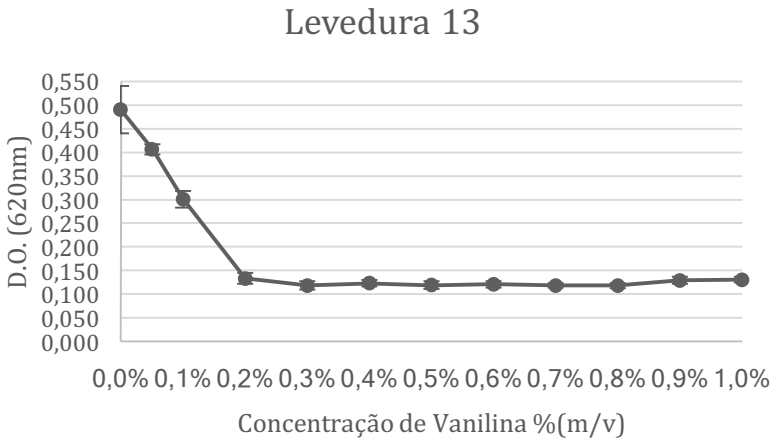


Figura A3. 2. Efeito da vanilina no crescimento da levedura 13

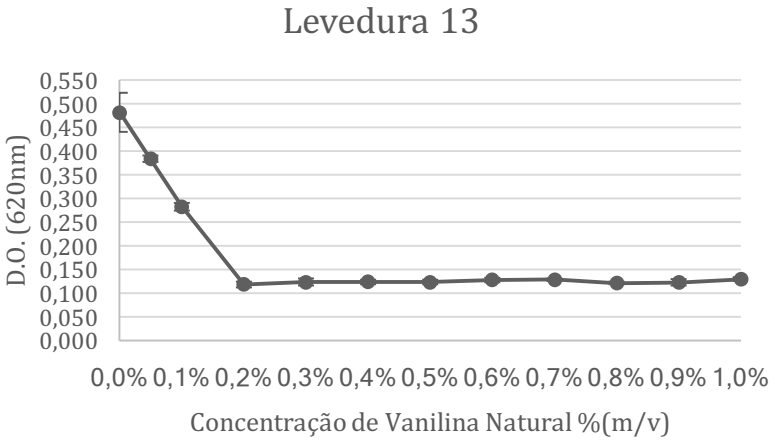


Figura A3. 3. Efeito da vanilina natura no crescimento da levedura 13

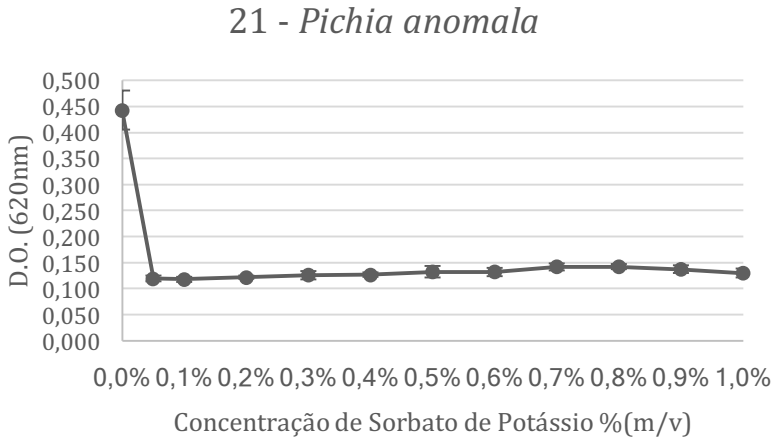


Figura A3. 4. Efeito do sorbato de potássio no crescimento da levedura Pichia anomala

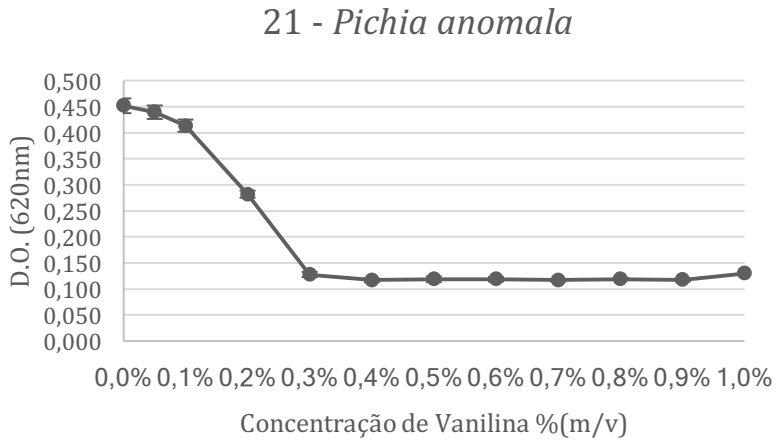


Figura A3. 5. Efeito da vanilina no crescimento da levedura Pichia anomala

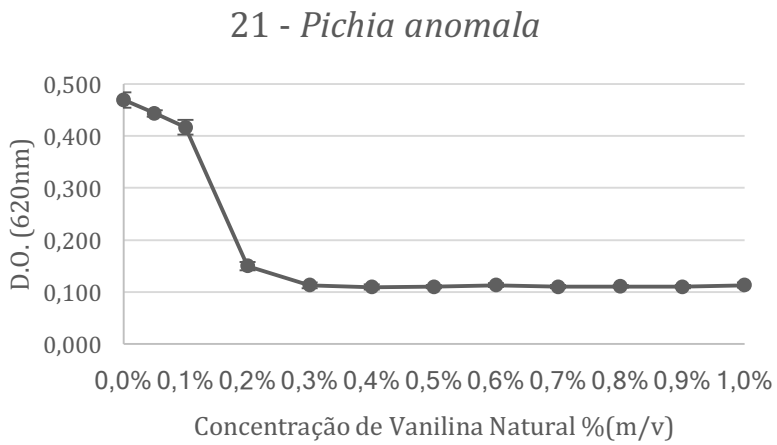


Figura A3. 6. Efeito da vanilina natural no crescimento da levedura Pichia anomala

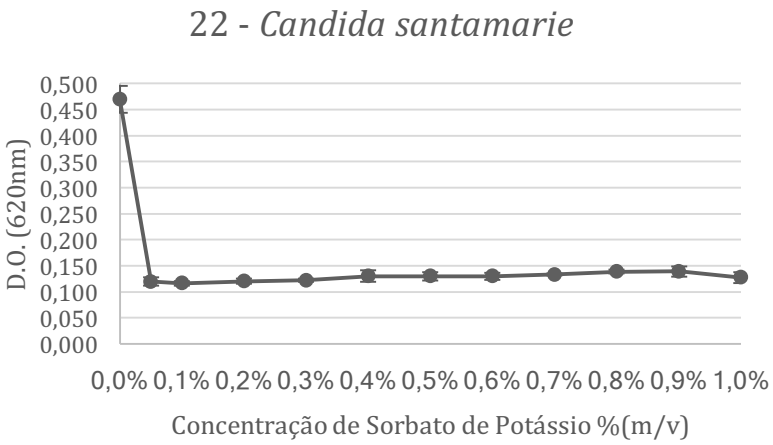


Figura A3. 7. Efeito do sorbato de potássio no crescimento da levedura Candida Santamarie

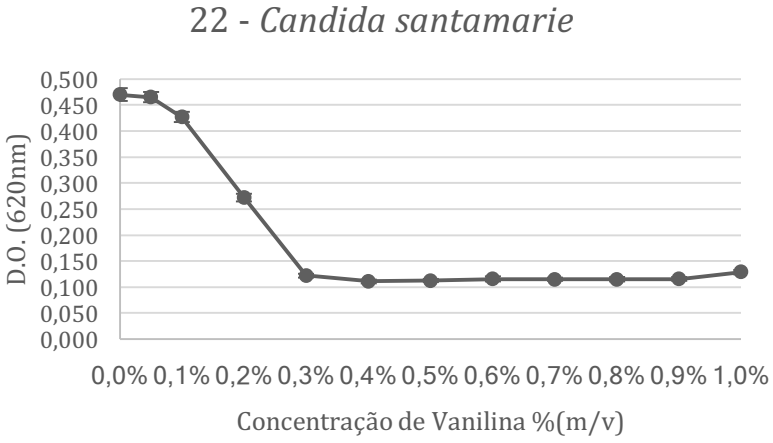


Figura A3. 8. Efeito da vanilina no crescimento da levedura Candida Santamarie

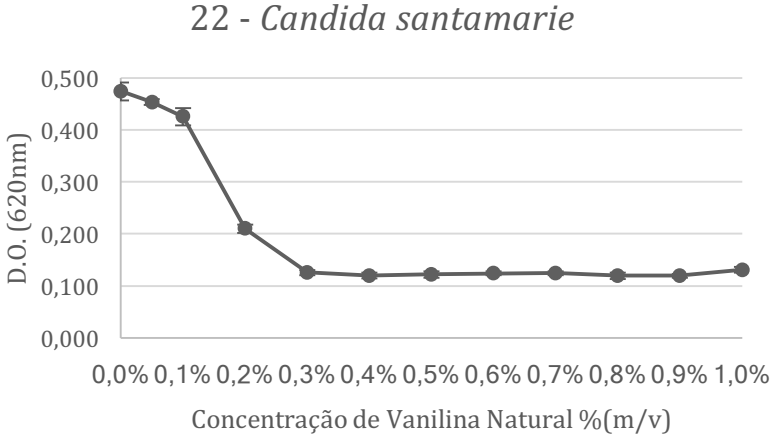


Figura A3. 9. Efeito da vanilina natural no crescimento da levedura Candida Santamarie

Anexo 4 Questionário Análise Sensorial

frulact Avaliação sensorial de iogurte de morango

1.

Descritores	Menos (-)	Igual	Mais (+)
Acidez			
Doçura			
Adstringência			

Nota: comparação deve ser realizada tendo em conta o padrão

2. Sabor em relação ao padrão:

☐ Pouco diferente ☐ Igual ☐ Muito diferente

3. Preferência:

☐ Padrão ☐ Amostra 1 ☐ Indiferente

4.Observações:

_____

Figura A4. 1. Questionário utilizado na análise sensorial