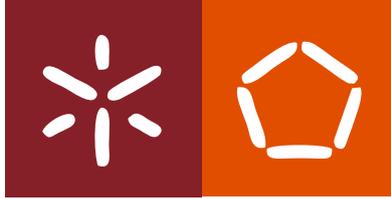




Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Paula Monteiro Gonçalves

**Estudo do efeito antimicrobiano de
compostos naturais, como alternativa
aos conservantes sintéticos**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Paula Monteiro Gonçalves

**Estudo do efeito antimicrobiano de
compostos naturais, como alternativa
aos conservantes sintéticos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação de
Professor Doutor José António Teixeira
e de
Dr.^a Cristina Rodrigues

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Paula Monteiro Gonçalves

Título da dissertação (x) / tese (): Estudo do efeito antimicrobiano de compostos naturais, como alternativa aos conservantes sintéticos

Orientador: Professor Doutor José António Teixeira

Orientador na empresa: Dr.ª Cristina Rodrigues

Ano de conclusão: 2016

Designação do Mestrado ou Ramo de Conhecimento do Doutoramento: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica / Tecnologia Química e Alimentar

3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Universidade do Minho, ___/___/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

O meu sincero obrigada,

À minha orientadora durante o estágio curricular, Dr.^a Cristina Rodrigues, por todo o apoio e compreensão, bem como pela motivação constante. Obrigada pelos ensinamentos, por todo o interesse demonstrado e pela disponibilidade, mesmo nos momentos mais trabalhosos. A sua orientação foi uma enorme mais-valia.

Ao Professor Doutor José António Teixeira, pela disponibilidade e orientação, decisivos ao longo deste trabalho.

A todas as pessoas do Departamento de Inovação da FRULACT, pela colaboração e ajuda prestada sempre que tal foi necessário, bem como ao restante capital humano da empresa, pela disponibilidade e simpatia. Agradeço também pela oportunidade de enriquecimento pessoal e profissional.

Aos meus colegas de estágio, que presenciaram todas as dificuldades e as tornaram menores. Em especial, agradeço à Helena e à Sara toda a colaboração e espírito de equipa durante o trabalho laboratorial, sem os quais não teria sido possível alcançar todos os objetivos.

A toda a minha família, pela compreensão e paciência. Ao meu irmão pela prontidão e disponibilidade totais. Ao meu pai, por estar sempre presente, ainda que à distância, pela dedicação e orgulho incondicionais. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos, e em especial ao João, por todo o carinho, pela amizade, pela alegria transmitida e pela partilha de momentos únicos. Obrigada pela ajuda nos bons e maus momentos e por me confortarem sempre que precisei.

Estudo do efeito antimicrobiano de compostos naturais, como alternativa aos conservantes sintéticos

Resumo

A atual tendência dos consumidores por produtos naturais tem vindo a traduzir-se numa procura constante por alternativas à utilização de conservantes sintéticos. Neste sentido, a incorporação de extratos naturais, que garantam a estabilidade microbiológica dos produtos, apresenta-se como uma área promissora. O presente estudo visa a aplicação de compostos antimicrobianos à base de óleos essenciais, como forma de substituir o sorbato de potássio (E202), atualmente utilizado nos preparados FRULACT. A sua utilização deverá permitir aumentar a aceitação por parte do consumidor final, bem como prevenir contaminações ambientais, levando, igualmente, a um aumento da autenticidade do preparado. A avaliação da capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais testados, foi efetuada avaliando a sua *CMI* sobre microrganismos isolados de matérias-primas e do ambiente industrial, identificados por RT-PCR. Dada a dosificação dos preparados em iogurte, estudou-se paralelamente o efeito dos óleos essenciais nas culturas *starter* dessa matriz. Para além disso, e porque estes compostos se caracterizam por possuírem propriedades organolépticas peculiares, impôs-se a realização de uma série de análises sensoriais com recurso a provadores internos da empresa. Os resultados permitiram concluir que os óleos essenciais de *Bay*, *Thym* e *Girofle clou* apresentaram valores de *CMI* inferiores, quando comparados com os restantes óleos essenciais testados. Mais ainda, não se verificou influência nas culturas lácticas analisadas - *S. thermophilus* com $\lg(\text{UFC/g})$ superior a 8 - e a aceitação dos provadores a nível organoléptico, apesar de não ser total, foi boa indicadora da possível aplicação dos óleos de *Girofle clou* e de *Thym*, no PC (preparado de cereais) e no PFB (preparado de frutos do bosque), respetivamente. Por último, a contaminação dos preparados com culturas de fungos filamentosos pertencentes aos géneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. revelou a incapacidade do óleo essencial de *Thym* em controlar o desenvolvimento fúngico, enquanto a utilização de *Girofle clou* levou a um decréscimo superior a 2, em termos de $\lg(\text{UFC/g})$, da carga inicial. Ainda assim, com este óleo essencial, não foi possível garantir a estabilidade do preparado durante os 42 d de acondicionamento das matrizes sob condições de refrigeração.

Palavras chave: óleos essenciais; preparados de fruta/cereais; *Bay*, *Thym*, *Girofle clou*, culturas *starter*, contaminação fúngica.

Study on the antimicrobial effect of natural compounds, as an alternative to synthetic preservatives

Abstract

The consumer's current trend for natural products has created a constant demand for alternatives to the use of synthetic preservatives. As so, the incorporation of natural extracts that ensure the microbiological stability of the products has become a promising area. The present study aims for the application of antimicrobial compounds based on essential oils, as a way to substitute potassium sorbate (E202), currently used on FRULACT preparations. Their use should allow for the increase of the final consumer's acceptance, as well as prevent environmental contaminations, leading to an increase on authenticity of the preparation. The evaluation of the antimicrobial activity of the tested essential oils was made by evaluating the *MIC* for microorganisms that were isolated from the raw materials and industrial environment, identified by RT-PCR. Due to the dosage of the preparations in yoghurt, the effect of essential oils on the starter cultures of that matrix has been studied, as well. Besides that, and because these compounds are characterized by their peculiar organoleptic properties, the realization of a series of sensorial analysis was in order, achieved with the help of internal (part of the company) tasting subjects. The results lead to the conclusion that *Bay*, *Thym* and *Girofle clou* essential oils exhibit the lowest *MIC* values, when compared to the remaining essential oils that were also tested. Moreover, there was no influence on the analysed lactic cultures - *S. thermophilus* with lg(CFU/g) exceeding 8 – and the acceptance of the tasters at the organoleptic level, despite it not being unanimous, was a good indicator for the possible application of the *Girofle clou* and *Thym* oils, on cereals preparation (PC) and field berry preparation (PFB), respectively. Finally, the contamination of the preparation with filamentous fungi belonging to *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. genera, revealed the *Thym*'s essential oil incapacity on fungal development control, while the utilization of *Girofle clou* leads to a decrease of more than 2, referring to lg(CFU/g), on the initial load. Even so, using this essential oil, it hasn't been possible to ensure the stability of the preparation over the 42 d of matrix storage under refrigeration conditions.

Keywords: essential oils; fruit/cereals preparations; *Bay*, *Thym*, *Girofle clou*, starter cultures; fungal contamination.

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Siglas e Abreviaturas.....	xvii
1. Enquadramento geral.....	1
1.1 A empresa.....	2
1.2 O tema e os objetivos.....	3
2. Revisão bibliográfica.....	7
2.1 Da matéria-prima ao produto acabado.....	7
2.1.1 Matérias-primas: fruta e cereais.....	8
2.1.2 Outros ingredientes – aditivos alimentares.....	9
2.1.3 Processamento alimentar dos preparados FRULACT.....	12
2.1.4 Aplicação láctea: dosificação em iogurte.....	14
2.2 Compostos antimicrobianos.....	15
2.2.1 Compostos antimicrobianos sintéticos: sorbato de potássio (E202).....	16
2.2.2 Compostos antimicrobianos naturais: óleos essenciais.....	18
3. Materiais e Métodos.....	25
3.1 Preparação dos meios de cultura, diluentes e materiais.....	26
3.2 Caracterização microbiológica de matérias-primas.....	27
3.3 Caracterização microbiológica do ambiente industrial.....	29
3.4 Obtenção e identificação de culturas puras.....	30
3.5 Avaliação da concentração mínima inibitória - <i>CMI</i>	31
3.6 Estudo do efeito nas culturas lácticas.....	32
3.7 Elaboração de preparados – análises sensoriais.....	34
3.7.1 1ª Fase.....	35
3.7.2 2ª Fase.....	36
3.7.3 3ª Fase.....	36
3.8 Estudo de preparados contaminados.....	36
4. Análise e Discussão dos Resultados.....	39
4.1 Caracterização microbiológica de matérias-primas.....	40
4.2 Caracterização microbiológica do ambiente industrial.....	41

4.3	Obtenção e identificação de culturas puras	44
4.4	Avaliação da concentração mínima inibitória - <i>CMI</i>	49
4.5	Estudo do efeito nas culturas lácticas	57
4.6	Elaboração de preparados – análises sensoriais.....	61
4.6.1	1ª Fase	61
4.6.2	2ª Fase	62
4.6.3	3ª Fase	64
4.7	Estudo de preparados contaminados	65
5.	Conclusões e Recomendações	75
	Referências bibliográficas	79
	Anexos.....	89
	Anexo A.....	89
	Anexo B.....	90
	Anexo C.....	91
	Anexo D.....	93

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da unidade industrial de Tortosendo.....	12
Figura 2 - Estrutura de compostos aromáticos (adaptado de: Gill & Holley, 2004).	21
Figura 3 – Representação da amostragem realizada na unidade fabril em Tortosendo.....	29
Figura 4 – Exemplo da aplicação da técnica por riscado para isolamento de leveduras....	30
Figura 5 – Exemplo de placa de Petri para medição do crescimento de fungos filamentosos, para avaliação da <i>CMI</i>	32
Figura 6 – Exemplo de placas de Petri para quantificação de <i>Streptococcus thermophilus</i> pelo método da gota (meio de cultura ST).	33
Figura 7 – Resultados da quantificação da carga microbiológica para diferentes lotes de matérias-primas.	40
Figura 8 - Evolução do efeito da presença dos óleos essenciais de <i>Thym</i> , <i>Bay</i> e <i>Girofle clou</i> (a 0,07 % e a 0,08 %) nas culturas de <i>S. thermophilus</i>	59
Figura 9 – Evolução da carga fúngica associada ao estudo do efeito dos óleos essenciais de <i>Thym</i> , <i>Bay</i> e <i>Girofle clou</i> (a 0,07 % e a 0,08 %) nas culturas lácticas.	60
Figura 10 - Estudo da evolução das culturas de <i>S. thermophilus</i> em amostras de iogurte com PC intencionalmente contaminado.....	65
Figura 11 - Estudo da evolução das culturas de <i>S. thermophilus</i> em amostras de iogurte com PFB intencionalmente contaminado.	66
Figura 12 – Evolução da contaminação fúngica intencional de PC ao longo do tempo (<i>t</i> / d).	67
Figura 13 – Fotografias das amostras de PC ao dia 28.....	70
Figura 14 – Evolução da contaminação fúngica intencional de PFB ao longo do tempo (<i>t</i> / d).	70
Figura 15 – Fotografias das amostras de PFB ao dia 28.....	71
Figura 16 – Fotografias das amostras de PFB dosificado em iogurte ao dia 28.	71
Figura I - Exemplo de ficha de análise sensorial utilizada para a 2ª fase da análise organolética de preparados.	89

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Limites microbiológicos legais aplicados aos iogurtes aromatizados (adaptado de: Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992).....	14
Tabela 2 – Composição dos preparados de frutos do bosque (PFB) e cereais (PC)	34
Tabela 3 – Valores de referência e obtidos na caracterização físico-química de PFB e PC	35
Tabela 4 – Resultados da avaliação da presença de fungos filamentosos e leveduras nas várias secções, e alturas consideradas, da unidade industrial de Tortosendo	42
Tabela 5 – Resultados da observação ao MOC e da identificação por RT-PCR dos microrganismos isolados a partir das fases de caracterização das matérias-primas e do ambiente industrial e respetivas origens de deteção	44
Tabela 6 – <i>CMS</i> , em concentrações volúmicas (%), obtidas para os óleos essenciais analisados e para o sorbato de potássio (E202)	50
Tabela 7 – Resultados das análises sensoriais realizadas ao preparado de cereais (PC) com óleo essencial de <i>Girofle clou</i> , a 0,07 %	63
Tabela 8 – Resultados das análises sensoriais ao preparado de frutos do bosque (PFB) com óleo essencial de <i>Thym</i> , a 0,07 %	63
Tabela I – Exemplo de ficha de análise triangular utilizada na 3ª fase da análise sensorial de preparados.....	90
Tabela II - Resultados da presença de fungos filamentosos e leveduras nas secções da unidade industrial de Tortosendo	91
Tabela III - Identificação dos microrganismos isolados nas fases de caracterização das matérias-primas e do ambiente industrial, incluindo fotografia das culturas em meio sólido, locais onde foram detetados e resultado da identificação por RT-PCR (quando aplicável) ...	93

Siglas e Abreviaturas

AR – amora (matéria-prima)

AS – secção de armazém de secos

ATP – adenosina trifosfato

AV – aveia (matéria-prima)

a_w – atividade da água

BAL – Bactérias do Ácido Láctico

BPW – *Buffered Peptone Water*

C – consistência

CE – cevada (matéria-prima)

CIP – *Cleaning In Place*

CFI (MIC) – Concentração Mínima Inibitória (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Cong. – secção de congelação

CS – compostos solúveis

DRBC – *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*

F. f. – fungos filamentosos

FB – framboesa (matéria-prima)

FDA – *Food and Drug Administration*

GMP – *Good Manufacturing Practices*

GRAS – *Generally Recognized As Safe*

ICMSF – *International Commission on Microbial Specifications for Foods*

IDF – *International Dairy Federation*

ISO – *International Organization for Standardization*

L – secção de lavagem

L. - leveduras

MI – mirtilo (matéria-prima)

MOC – Microscópio Ótico Composto

MRB – *Maximum Recovery Broth*

MRS – *de Man, Rogosa e Sharpe*

PA – produto acabado

PC – preparado de cereais

PCA – *Plate Count Agar*

PDA – *Potato Dextrose Agar*

PF – secção de preparação de fruta

PFB – Preparado de frutos do bosque

pH – Potencial de hidrogénio

pKa – Cologaritmo da constante de acidez

PS – secção de pesagem de secos

Refr. – secção de refrigeração

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerizase Chain Reaction*

SIP – *Sterilization In Place*

ST – *Streptococcus thermophilus*

t - tempo

TR – trigo (matéria-prima)

UFC (CFU) – Unidades Formadoras de Colónias (*Colony Forming Unit*)

1. Enquadramento geral

O presente projeto foi realizado na empresa FRULACT – Indústria Alimentar, S.A., mais especificamente na unidade localizada na Maia, da qual faz parte o FRUTECH – Centro de Investigação, Desenvolvimento e Inovação. A concretização do projeto surgiu da vontade de responder a uma necessidade efetiva da empresa em encontrar alternativas ao nível da utilização de compostos antimicrobianos para a preservação das matrizes alimentares.

Neste capítulo serão apresentados a empresa e o tema escolhido, dando-se uma perspetiva geral da sua abrangência e pertinência e introduzindo-se os objetivos específicos.

1.1 A empresa

A FRULACT – Indústria Agroalimentar, S.A. surgiu em 1987, na Maia, como resultado da vontade de transformar frutas e vegetais em preparados de qualidade, através da aplicação das melhores técnicas e aprimoramento das formulações. Sendo a indústria de produtos lácteos o seu principal mercado, o conhecimento do seu constante desenvolvimento proporciona uma atividade inovadora de procura pelo que é natural, saudável e atrativo. Ainda assim, a atividade da FRULACT tem-se diversificado, apostando também em produtos para as indústrias de gelados, pastelaria e bebidas.

Ao longo dos anos, como resultado da afirmação nos mercados nacional e internacional, a empresa tem vindo a crescer, tornando-se uma referência no setor agroalimentar. Atualmente, conta com, para além da unidade localizada na Maia, duas unidades fabris na Covilhã (para 1ª e 2ª transformações), uma unidade em França, duas unidades em Marrocos (também para 1ª e 2ª transformações) e uma na África do Sul.

Todo o processo produtivo da FRULACT assenta no cumprimento das exigências em termos de Qualidade, Ambiente e Segurança Alimentar, estando certificada segundo as principais normas do setor.

As parcerias com os seus clientes – nomeadamente a Nestlé, a Danone, a Unilever, a Clesa, a Lactalis, a Lactogal, a Leche Pascual - são a base do investimento da empresa. É nessas relações que nascem novas ideias, movendo a criatividade para alcançar produtos de sucesso. A inovação e a qualidade dos produtos desenvolvidos fazem da FRULACT uma empresa dinâmica, voltada para o futuro e com vontade de enfrentar todos os novos desafios do mercado.

O FRUTECH – Centro de Investigação, Desenvolvimento e Inovação, situado na Maia e inaugurado em 2012, é resultado da afirmação da empresa, provando a determinação em aumentar a competitividade e inovar com vista à total satisfação dos clientes. Neste Centro existem instalações piloto, laboratórios de microbiologia alimentar e de caracterização físico-química e sensorial para a análise dos preparados, os quais permitem uma resposta mais rápida e eficaz a todos os níveis.

1.2 O tema e os objetivos

A indústria alimentar enfrenta diariamente desafios relativos ao controlo da deterioração dos produtos, sendo que esta ocorre maioritariamente devido a reações de oxidação e à ação de microrganismos (Albarracin, Alfonso, & Sanchez, 2012). Uma estimativa da Organização Mundial de Saúde, em 2015, dá conta de que uma em cada dez pessoas adoece anualmente como resultado da ingestão de alimentos contaminados e, destas, 420 000 acabam por falecer. Para além disso, é um especial motivo de preocupação o facto de um terço das mortes registadas dizerem respeito a crianças abaixo dos 5 anos, que representam um grupo particularmente vulnerável (World Health Organization, 2015). Estes dados demonstram a importância da segurança alimentar no controlo da produção de alimentos e provam que, apesar dos esforços constantes em garantir a estabilidade dos produtos, esta é ainda uma área que carece da atenção dos produtores, de modo a minimizar eventuais ocorrências que possam pôr em causa a total satisfação dos consumidores.

De facto, as contaminações microbiológicas prevalecem apesar de todos os esforços em seguir as boas práticas de fabrico (GMP – *Good Manufacturing Practices*) e em cumprir com as normas de segurança alimentar exigidas. A perecibilidade dos produtos alimentares obriga a uma constante preocupação, por parte dos produtores, com a deterioração a eles inerente – resultante da influência de diversos fatores. O controlo de todas as condições, não só de produção, mas também de armazenamento e transporte é essencial. Atualmente, devido à deslocação dos produtos para destinos muitas vezes distantes das zonas de produção e à necessidade do aumento do tempo de vida útil, este aspeto tem-se tornado cada vez mais decisivo na formulação de produtos alimentares (Ahmed, Singh, Kour & Gupta, 2013; Albarracin et al., 2012; Mith et al., 2014).

É, portanto, essencial uma constante procura por formas mais eficazes de eliminar ou reduzir para níveis aceitáveis todo o tipo de contaminações microbianas presentes nos alimentos a ser comercializados, apostando-se na descoberta e melhoria de métodos que substituam por completo os existentes, ou pela combinação desses. De um modo geral, recorre-se à utilização de métodos físicos, químicos ou biológicos para garantir a segurança dos produtos, mas atualmente tem vindo a verificar-se que fatores como o aumento da resistência por parte de alguns microrganismos complica a eficácia no controlo microbiológico. Para além disso, a aceitação dos produtos alimentares por parte do consumidor final está, cada vez mais,

dependente do processamento a que estes são sujeitos, nomeadamente ao nível do tratamento térmico aplicado a fim de garantir a sua segurança alimentar. Por um lado, as alterações organoléticas (e.g. cor e sabor) e, por outro lado, as alterações na composição nutricional, potenciadas pelo processamento térmico adotado, constituem dois dos fatores a ter em conta na aceitação comercial dos produtos. De igual forma, o aumento do conhecimento do consumidor quanto à função e constituição nutricional de determinados ingredientes presentes nos alimentos, tem levado à crescente tendência por conseguir disponibilizar produtos rotulados como “sem conservantes”, que vão ao encontro das tão desejadas *clean labels*. Neste sentido, torna-se imperativo encontrar alternativas aos conservantes químicos utilizados pela generalidade das indústrias alimentares, apostando-se preferencialmente em compostos provenientes de fontes naturais, que não sejam obtidos sinteticamente, mas sim por processos básicos de extração (Ahmed et al., 2013; Albarracin et al., 2012; Mith et al., 2014).

De um modo mais particular, as contaminações por fungos apresentam-se como uma área muito relevante, devido à sua capacidade de desenvolvimento nos mais variados substratos alimentares, causando deteriorações microbianas significativas. O seu efeito no produto final relaciona-se tanto com a alteração das características organoléticas, como com uma eventual patogenicidade. Este ponto assenta essencialmente na capacidade de algumas espécies de fungos filamentosos - principalmente pertencentes aos géneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* - de produzir micotoxinas, as quais apresentam um perigo potencial para a saúde dos consumidores, sendo este acrescido pela sua resistência a elevadas temperaturas. Estes fatores traduzem-se muitas vezes em perdas económicas avultadas, razão pela qual o setor agroalimentar reúne cada vez mais esforços no sentido de minimizar este tipo de deterioração (Abbaszadeh, Sharifzadeh, Shokri, Khosravi, & Abbaszadeh, 2014; Lacasse, 1995; Souza, Lima, & Luna, 2005). Assim sendo, a utilização de conservantes sintéticos – dos quais o sorbato de potássio (E202) é exemplo – constitui uma das vias mais adequadas e de uso generalizado de modo a garantir a preservação das matrizes alimentares, por via do controlo da deterioração fúngica. Como referido, existe uma crescente procura por alternativas naturais, que correspondam às expectativas dos consumidores, a qual se tem traduzido na utilização de extratos naturais, que garantam a estabilidade microbiológica dos produtos. De facto, esta apresenta-se como uma área particularmente interessante, na medida em que estes podem substituir os conservantes sintéticos comumente utilizados. Numa perspetiva de

utilização de conservantes, os óleos essenciais têm vindo a apresentar resultados promissores, o que os torna alternativas potencialmente viáveis e de grande interesse (Albarracin et al., 2012).

A produção de preparados para as indústrias de lacticínios beneficia do crescimento constante verificado ao nível da produção de produtos lácteos. De facto, a nível europeu, houve uma evolução bastante positiva neste mercado, verificando-se em mais de metade dos países um crescimento superior a 6 %, e até 20 %, na produção anual (European Dairy Association, 2016). Estes dados são bons indicadores para possíveis investimentos e, dado que por via da dosificação de preparados em matrizes lácteas, estas vêm o seu valor acrescido, tanto a nível nutricional, como organolético, esta área apresenta-se como particularmente relevante. De facto, a comercialização de iogurtes em que estejam presentes estes preparados aporta propriedades benéficas para a saúde dos consumidores, associadas ao consumo de fruta e cereais, assegurando um maior teor de substâncias como vitaminas, antioxidantes e fibras (Chandan, 2006; Silva, 2015).

O presente projeto visa a aplicação de compostos antimicrobianos naturais à base de óleos essenciais, como forma de substituir o sorbato de potássio (E202), atualmente utilizado nos preparados FRULACT. A utilização deste tipo de compostos terá como principais objetivos: (1) aumentar a autenticidade do preparado; (2) aumentar a aceitação por partes do consumidor final; e (3) prevenir contaminações ambientais pós-pasteurização, no momento de dosificação dos preparados na matriz láctea, já no cliente. A utilização de óleos essenciais apresenta desafios, sendo o impacto a nível organolético um dos principais e de maior dificuldade em ser contornado.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Da matéria-prima ao produto acabado

Tendo por base: (1) dados microbiológicos internos da empresa; (2) a criticidade associada a determinadas matérias-primas; (3) a patogenicidade associada aos microrganismos-alvo capazes de constituírem um perigo para a elaboração dos preparados; e (4) e as fichas técnicas dos fornecedores, onde constam os limites microbiológicos contemplados para a comercialização das matérias-primas analisadas, foram previamente selecionados dois preparados para dar seguimento a todo o projeto. Esta seleção deveu-se essencialmente à elevada carga microbiológica associada às bagas – amora, framboesa e mirtilo - utilizadas no preparado de frutos do bosque (PFB) e ao trigo e à cevada, ambos presentes no preparado de cereais (PC). Neste sentido, ambos os preparados são considerados críticos e, portanto, bons indicadores dos resultados obtidos.

Assim sendo, o foco para o exposto ao longo deste capítulo manteve-se nos aspetos relacionados com os dois preparados FRULACT anteriormente selecionados, abordando-se a fruta e cereais que lhes estão na base, bem como os problemas a eles associados, o processamento e o seguimento dado ao produto acabado (PA). Deste modo, pretende-se apresentar o conhecimento que existe à partida, de forma a contextualizar todo o seguimento do projeto.

2.1.1 Matérias-primas: fruta e cereais

De um modo genérico, os preparados correspondem a misturas de fruta ou cereais com outros ingredientes (ver subcapítulo 2.1.2), por forma a obter um produto final atrativo e com potencial de aplicação em diferentes bases alimentares. A fruta e os cereais são matrizes bastante suscetíveis a contaminações, ainda que no caso das frutas a perecibilidade seja substancialmente maior, facto que vai sendo contornado pela redução do tempo entre a colheita e o processamento, e/ou pelo controlo das condições de armazenamento, nomeadamente em termos de temperatura (Pitt & Hocking, 1997; Silva, 2015).

A escolha da fruta a ser utilizada na formulação de preparados é criteriosa. Ainda que seja posteriormente sujeita a um processamento, que lhe alterará o aspeto visual, o estado em que se encontra no momento da elaboração de um preparado condiciona a qualidade deste. Devem então ter-se em conta aspetos como o estado de maturação, relacionado com o teor de açúcar, a consistência e a cor, o qual é decisivo para as etapas seguintes (Chandan, 2006). Devido ao seu pH baixo (aproximadamente 4), a fruta é muito mais suscetível à ação de fungos filamentosos e leveduras do que de bactérias, contudo, apresenta mecanismos de defesa bastante eficazes que limitam a variedade de espécies capazes de a contaminar (Adams & Moss, 1995; Pitt & Hocking, 1997).

Na sua generalidade, as frutas frescas são frequentemente deterioradas por fungos filamentosos dos géneros *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Cladosporium* e *Botrytis* (ICMSF, 2006; Lacasse, 1995; Samson, Hoekstra, Frisvad, & Filtenborg, 1996). Em bagas, particularmente, a proximidade ao solo torna-as um grupo especialmente suscetível de contaminação fúngica, facto que é igualmente favorecido pela sua forma e fragilidade – por exemplo, a amora contém uma série de protuberâncias que facilitam a deterioração pela ação microbiana. São contaminações comuns a todas as bagas, as espécies *Rhizopus stolonifer* e *Mucor piriformis* (Pitt & Hocking, 1997).

Em cereais são normalmente consideradas contaminações ocorridas durante o cultivo, aquelas que se verificam por espécies pertencentes aos géneros *Cladosporium*, *Alternaria* e *Chaetomium*. A contaminação de cereais por espécies do género *Penicillium* é tida como um dado adquirido, sendo estas as mais presentes em trigo, cevada e aveia, e estando associadas essencialmente ao incorreto armazenamento. Para além disso, surgem igualmente espécies de *Fusarium* como bastante frequentes na generalidade dos cereais. Apesar do seu efeito

relativamente negligenciável na deterioração de cereais, os géneros *Wallemia*, *Aspergillus* e *Eurotium* são também frequentemente detetados durante o armazenamento, sendo favorecidos pela redução da atividade da água (a_w) verificada neste período. Em especial, algumas espécies de *Aspergillus* surgem igualmente durante o armazenamento, sendo particularmente preocupantes devido à produção de metabolitos, aflatoxinas, cujo conhecido potencial carcinogénico constitui um risco para a segurança alimentar destas matérias-primas. Em casos de armazenamento prolongado pode também ser detetado o género *Mucor* (Adams & Moss, 2008; Baptista & Venâncio, 2003; Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 1996).

As frutas e cereais podem ser utilizados na elaboração de preparados sob diversas formas. No caso da fruta destacam-se as seguintes formas de transformação: (1) através de pedaços obtidos pelo processo de corte, de acordo com as exigências do produto em causa; (2) utilizada inteira, o que se verifica em algumas bagas, por exemplo; e (3) na forma de polpas e purés. Os cereais encontram-se normalmente sob a forma de grãos, farinhas ou farelos.

2.1.2 Outros ingredientes – aditivos alimentares

A adição de ingredientes que não fruta ou cereais impõe-se na medida em que a sua presença permite alterar propriedades organoléticas, por forma a aumentar a atratividade do produto final, no caso iogurtes, bem como corrigir parâmetros que favorecem a conservação e o seu processamento (Aurum Process Technology, 2010; Chandan, 2006; Silva, 2015).

Segundo o Regulamento (CE) N° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, os aditivos alimentares podem ser classificados de acordo com a função a que se destinam, definindo-se para isso classes funcionais. De acordo com o mesmo Regulamento, são exemplos de classes funcionais os edulcorantes, corantes, conservantes, antioxidantes, acidificantes e reguladores de acidez, intensificadores de sabor, amidos modificados, estabilizantes e espessantes (Parlamento Europeu, 2008).

Os preparados podem ser adoçados pela adição do genérico açúcar, a sacarose, ou outros adoçantes considerados nutritivos devido ao seu elevado valor energético, como a frutose. Para além disso, podem igualmente ser utilizados adoçantes intensos, ou seja, com elevado poder adoçante, que são não-nutritivos, os vulgarmente chamados edulcorantes. Esta denominação é vulgarmente utilizada por forma a distinguir os dois tipos de adoçantes, sendo,

contudo, a sua aplicação nestes termos bastante redutora, dado o seu significado ser abrangente a todas as substâncias que conferem doçura, e, portanto, incluir também as substâncias referidas inicialmente. São exemplos de edulcorantes intensos de uso generalizado: acessulfame K, aspartame, sacarina e sucralose (Chandan, 2006; Teixeira, Gonçalves, & Vieira, 2011).

Outro dos parâmetros a ter em conta é o controlo da cor, por vezes efetuado adicionando-se corantes, cuja natureza pode ser natural ou artificial, de acordo com a sua origem de produção (Chandan, 2006; Silva, 2015).

O sorbato de potássio (E202) é o conservante mais utilizado na indústria de preparados, estando por vezes presente em combinação com o benzoato de sódio. Em sistemas completamente assépticos, a exposição a contaminações microbiológicas ambientais é muito reduzida, pelo que a utilização de conservantes não se impõe. Contudo, a vontade de garantir uma segurança adicional, principalmente em indústrias cujo negócio se baseie no *business to business*, torna está prática essencial (Chandan, 2006). Para além disso, uma outra forma de conservar produtos alimentares, neste caso atuando contra as reações de oxidação que provocam alterações de cor e de propriedades organoléticas, é através da utilização de antioxidantes, que constituem, por si só, um grupo de aditivos alimentares (Parlamento Europeu, 2008).

É de salientar também o recurso à acidificação como método de conservação, a qual, não só faz sobressair o sabor de alguns frutos, como também ajuda no controlo microbiológico aquando da pasteurização. Assim, são distinguidos os aditivos acidificantes e reguladores de acidez, em que os primeiros baixam o pH e os segundos, para além disso, asseguram a estabilidade desse parâmetro ao longo do tempo. A redução do pH, tem como principal consequência a redução da sobrevivência microbiana, o que se traduz numa eficácia igualmente significativa da pasteurização quando realizada a temperaturas mais baixas do que as que seriam necessárias para um pH superior. Este facto é importante na medida em que quanto mais agressivo for um tratamento térmico, maior será a perda potencial de nutrientes e a alteração das propriedades sensoriais do PA (Aurum Process Technology, 2010; Silva, 2015). Como agentes acidificantes destacam-se os ácidos cítrico, láctico e málico, podendo igualmente verificar-se a adição de sumo de limão, que apesar de mais dispendioso, favorece as alegações de naturalidade muitas vezes procuradas pelos consumidores. A regulação da

acidez é por vezes acompanhada da adição de tampões (e.g. citrato de sódio), de modo a controlar a variação do pH (Chandan, 2006).

Os intensificadores de sabor, normalmente associados à adição de aromas, como o próprio nome indica, são adicionados com vista a conferir um sabor específico ao produto, o qual é acompanhado de um odor característico. Recorre-se por vezes à combinação de vários aromas, por forma a obter uma aromatização final mais complexa e que melhor corresponda às expectativas do consumidor (Silva, 2015). A indústria de aromas é, por si só, palco de intenso desenvolvimento. De facto, o impacto decisivo que estes ingredientes têm no PA justifica toda uma procura por inovação e distinção nesta área.

A utilização de amidos modificados, apesar de ser considerada uma classe particular pelo Regulamento (CE) N° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, apresenta a mesma função genérica que a utilização de estabilizantes e espessantes, ou seja, conferir textura e consistência ao produto através da retenção de água. De facto, o amido modificado é o estabilizante mais utilizado em preparados, podendo derivar de diferentes origens. Ainda assim, recorre-se também a outros estabilizantes, como pectinas e gomas, nomeadamente a goma de alfarroba, a goma xantana e a carragenina (Chandan, 2006; Parlamento Europeu, 2008; Silva, 2015).

Com base nas características específicas de cada aditivo, a formulação será processada seguindo algumas regras. Por exemplo, no caso de se utilizar amido, este deve ser previamente dissolvido em parte da água (aproximadamente 50 % do total), antes de ser adicionado aos restantes ingredientes, como os açúcares e conservantes. Os aromas e corantes apenas devem ser adicionados na fase final da preparação, instantes antes do início da pasteurização. A agitação é contínua ao longo de todo o processo e a temperatura vai sendo aumentada por forma a favorecer a dissolução de todos os componentes. Estas são apenas algumas indicações básicas que devem ser seguidas e adaptadas a cada produto específico, assegurando que todos os ingredientes utilizados apresentam a funcionalidade pretendida e o produto final reflete, não só uma formulação otimizada, como também um processo produtivo que permite tirar o melhor partido dessa mesma formulação (Chandan, 2006).

2.1.3 Processamento alimentar dos preparados FRULACT

O processamento das matérias-primas inicia-se em unidades de 1ª transformação e conclui-se nas unidades de 2ª transformação, nas quais se obtém o PA. Esta produção compreende várias etapas, como por exemplo, aquecimento e dissolução de alguns ingredientes que assim o exijam, homogeneização e pasteurização. Este género de operações tem lugar na secção de produção, que representa apenas uma das muitas áreas que constituem uma unidade dedicada a esta atividade.

Tomando como exemplo a unidade industrial da FRULACT. em Tortosendo, cuja instalação simplificada está apresentada na Figura 1, diferenciam-se várias secções, que, pelas suas características, apresentam diferentes riscos de contaminações ambientais dos produtos que aí são manipulados.

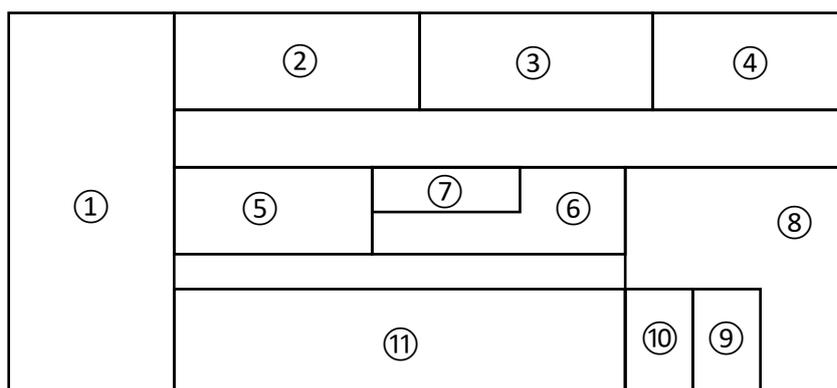


Figura 1 - Representação esquemática da unidade industrial de Tortosendo.

Nota: 1 – Receção/expedição; 2 - Refrigeração; 3 – Congelação; 4- Armazém de secos; 5 – Preparação de fruta; 6 – Pesagem de secos; 7 – Alergénios; 8 – Lavagem; 9 – CIP (*Cleaning In Place*); 10 – SIP (*Sterilization In Place*); 11 – Produção.

Antes de mais, importa conhecer o fluxo das diferentes matérias-primas de modo a ser possível rastrear a origem de possíveis contaminações microbianas, bem como compreender as possíveis causas das mesmas. Assim, à zona de receção/expedição (1) chegam todos os produtos que são em seguida encaminhados, de acordo com as respetivas exigências, essencialmente em termos de temperatura, para as zonas de refrigeração (2), congelação (3) ou armazém de secos (4). De acordo com o planeamento das produções a realizar, ocorre a preparação das matérias-primas, tanto na sala de preparação de frutas (5), onde estas são descongeladas, pesadas, ou sujeitas a uma ordem de transformação para obtenção de

pedaços ou polpas (como abordado no subcapítulo 2.1.1), como na de pesagem de secos (6), de onde as matrizes passam diretamente para a zona de produção (11). Para além disso, é realizado o controlo de substâncias alergénicas, numa secção especialmente dedicada para esse efeito (7). Após a produção, o PA é encaminhado para a secção de receção/expedição e encontra-se pronto a ser enviado para o cliente.

É de salientar que o controlo das condições de higiene compreende, de um modo geral, a adequada higienização de todas as superfícies e o cumprimento das boas práticas de manuseamento dos alimentos por parte dos operadores. Em certos casos, recorre-se também a métodos mais rigorosos e específicos, como fluxos de ar e medidas mais apertadas de higiene do pessoal, como se verifica no caso da sala de alergénios. A limpeza de todo o material utilizado na produção é também realizada seguindo práticas de utilização de produtos específicos, na zona de lavagem (8), sendo acompanhada da higienização dos contentores utilizados no embalamento do PA, no CIP (9) - *Cleaning In Place* - e no SIP (10) - *Sterilization In Place* -, que são, por esta ordem, etapas de crescente higienização.

Todos estes aspetos são importantes, ainda que se considere que os binómios de pasteurização aplicados, tempo-temperatura, são a garantia de uma completa inativação da carga microbiana presente no preparado, aquando da ingredientação. Segundo os padrões da FRULACT, a definição do binómio tempo-temperatura de pasteurização é assente nos seguintes critérios: (1) a carga microbiológica inicial associada às matérias-primas – determinada de acordo com análises realizadas internamente; (2) a escolha dos microrganismos-alvo, segundo a respetiva resistência térmica; (3) os parâmetros de inativação térmica - tendo por base os valores de pH e a_w inerentes ao preparado; e (4) as características estruturais do próprio preparado. De facto, não interessa apenas assegurar que o PA é seguro a nível microbiológico, mas sim que este seja estável ao longo de todo o seu tempo de vida útil, razão pela qual se impõe o recurso a compostos com capacidade antimicrobiana. Desta forma, é possível alegar junto do cliente uma total manutenção da segurança alimentar do PA, aquando da sua aplicação no produto a ser comercializado, e até ao momento do seu consumo pelo cliente final.

2.1.4 Aplicação láctea: dosificação em iogurte

O iogurte é definido, segundo a Portaria nº 742/92, de 24 de julho, como o produto resultante da fermentação láctica do leite pelas espécies *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, espécies estas que constituem a denominada flora específica, sendo considerado aromatizado se incluir ingredientes, tais como fruta e vegetais, ou derivados destes, sementes, especiarias, etc. Em termos microbiológicos, são igualmente definidos os parâmetros a ser respeitados na elaboração de iogurtes. A Tabela 1 apresenta valores para alguns dos indicadores considerados.

Tabela 1 – Limites microbiológicos legais aplicados aos iogurtes aromatizados (adaptado de: Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992)

Tipologia	Carga / (UFC/cm ³)
Flora específica	Mínimo de 5×10^7
Fungos filamentosos	Máximo de 20
Leveduras	Máximo de 200

A fermentação do leite é então resultado da sinergia das duas estirpes, tendo início pela ação da espécie *Streptococcus thermophilus*, responsável pela acidificação do meio, e que otimiza as condições para o desenvolvimento de *Lactobacillus bulgaricus*. Durante este desenvolvimento, são fornecidos à espécie *S. thermophilus* metabolitos essenciais, ocorrendo igualmente a produção dos compostos que conferem ao iogurte as propriedades organolépticas características (Lacasse, 1995). Quanto a aditivos alimentares, a legislação em vigor estipula a permissão para a utilização apenas de aromatizantes naturais, conservantes (ácido sórbico ou sorbato de potássio), estes apenas no caso de inclusão de fruta ou derivados por *carryover*, e corantes, igualmente presentes apenas em porções posteriormente adicionadas (Ministérios da Agricultura Florestas e Alimentação e do Comércio e Turismo, 1983).

A estabilidade microbiológica dos preparados para aplicação em iogurte visa controlar contaminações ao nível do produto final. De facto, o iogurte é particularmente suscetível ao desenvolvimento de leveduras. Esta presença é favorecida por vários fatores, tais como: (1) a presença de ácidos, lactose e sacarose; (2) a sua capacidade de hidrolisar as proteínas e a

gordura do leite; (3) a tolerância a baixas temperaturas, como as de refrigeração; e (4) o desenvolvimento fúngico em condições de pH ácido. De um modo geral, apesar dos procedimentos assépticos adotados durante a produção de iogurtes dosificados com preparados de fruta, o produto final é muitas vezes sujeito a deterioração microbiana resultante essencialmente da etapa de combinação das duas frações. Assim, impõe-se o recurso a medidas adicionais de prevenção de contaminações, ou seja, o uso de conservantes, de forma a assegurar a sua estabilidade microbiológica (Lacasse, 1995; Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 1996).

2.2 Compostos antimicrobianos

As técnicas convencionais de preservação de alimentos apresentam, por vezes, inconvenientes relacionados com a perda de nutrientes e a alteração das propriedades organolépticas. Para além disso, muitas vezes não são suficientes no que diz respeito ao controlo microbiológico, havendo a necessidade de incorporar compostos antimicrobianos que garantam a segurança e estabilidade durante o tempo de vida dos produtos (Ahmed et al., 2013). Devido em grande parte ao baixo pH, os produtos à base de fruta processada são alvo de controlo rigoroso da presença de fungos filamentosos e leveduras, sendo a eficácia contra estes microrganismos um fator decisivo na escolha de um conservante adequado (Hui, 2006b). De um modo geral, a deterioração de alimentos está dependente não só da presença de conservantes, mas também das características intrínsecas do alimento, como: (1) a_w (e os solutos presentes); (2) a concentração de hidrogénio; (3) a tensão superficial de gases, como o oxigénio e o dióxido de carbono; (4) a consistência; e (5) a composição nutricional. Para além disso, a temperatura a que os produtos são expostos, quer durante o processamento, quer durante o armazenamento, é igualmente determinante (Pitt & Hocking, 1997).

Neste subcapítulo serão abordados, para além do composto atualmente utilizado nos preparados FRULACT, o sorbato de potássio (E202), alternativas naturais com potencial de aplicação, com especial atenção para os óleos essenciais.

2.2.1 Compostos antimicrobianos sintéticos: sorbato de potássio (E202)

O sorbato de potássio (E202) é, em conjunto com ácido sórbico, a forma mais comumente utilizada na conservação alimentar. Para além destes, o sorbato de cálcio completa a lista de sorbatos permitidos pela União Europeia desde 1995, ainda que a utilização destes esteja condicionada em termos dos níveis de aplicação. Possuem igualmente o estatuto GRAS (*Generally Recognized As Safe*), pela FDA (*Food and Drug Administration*) e a sua ação assenta na inibição de microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos, a qual se observa tanto para bactérias como para fungos (European Commission, 1995; Hui, 2006b; Mendonca, 1992). A aplicação de sorbatos é normalmente realizada para preservar temperos de saladas, produtos de pastelaria e à base de fruta. Especificamente em produtos de fruta é, devido não só à sua ação microbiana, mas também pela preservação das características organoléticas, o método mais utilizado, apresentando-se esta última como uma vantagem significativa relativamente a outros conservantes comuns. (Adams & Moss, 1995; Hui, 2006b; Naidu, 2000).

A utilização generalizada de sorbato de potássio (E202) como conservante está associada à sua natureza bastante estável, alta solubilidade em água (139 g/100 mL), sabor suave, alta eficácia antimicrobiana e elevado espectro de ação relativamente ao pH. Ainda assim, a sua aplicabilidade só é significativa para alimentos com pH inferior a 7, sendo que a generalidade dos sorbatos apresenta atividade ótima para valores iguais ou inferiores a 4,8 – aumentando progressivamente com a descida deste parâmetro. O seu efeito bacteriostático está demonstrado para vários patogénicos, incluindo *L. monocytogenes*, mas a sua eficácia na inibição do crescimento fúngico é, em alguns casos, um pouco limitada, sendo inclusive inferior à do ácido sórbico. De um modo geral, os sorbatos não afetam os microrganismos produtores de ácido láctico, o que os torna preferenciais para o uso como conservantes em produtos lácteos nos quais existam essas culturas. A gama de concentrações aplicada em alimentos encontra-se geralmente entre 0,05 % e 0,3 %, sendo suficiente para alcançar uma proteção contra o crescimento microbiano, a qual se caracteriza apenas por uma inibição do crescimento celular, dado que a inativação apenas ocorre na presença de concentrações superiores (Hui, 2006a; Naidu, 2000; Schmidl & Labuza, 2000; Tarté, 2009; Theron & Lues, 2010). Segundo a Diretiva do Parlamento e Conselho Europeu nº95/2/EC de 20 de Fevereiro de 1995, relativa a aditivos alimentares, o limite máximo de aplicação de sorbatos (sejam

ácido sórbico, sorbato de potássio ou sorbato de cálcio) em preparados de fruta ou vegetais é de 1000 mg/kg (European Commission, 1995).

O sorbato de potássio (E202) atua ao nível da inibição do metabolismo de ácidos gordos por parte dos microrganismos presentes e, no caso específico de bactérias formadoras de esporos, atua ao nível da inibição reversível da germinação dos esporos induzida por aminoácidos, aquando do crescimento ou da divisão celular. O mecanismo de inibição está relacionado com a permeabilidade das membranas dos esporos, alterada na presença de sorbato de potássio (E202), acompanhada da ausência de atividade enzimática (e.g. das enzimas líticas) dessas mesmas estruturas (Naidu, 2000; Schmidl & Labuza, 2000). De um modo geral, a atividade do sorbato de potássio (E202) consiste na alteração da membrana celular, que, em conjunto com a inibição das enzimas envolvidas, se traduz numa alteração ao nível das funções de transporte, na modificação da morfologia, na inibição da atividade metabólica ou na alteração do material genético. O mecanismo específico varia em função das estirpes de microrganismos presentes, das condições externas e do processamento (Naidu, 2000).

Apesar da reconhecida eficácia contra bactérias, existem algumas espécies com a capacidade de o metabolizar. Ainda assim, está reportada inibição de gram-negativas, gram-positivas, aeróbias e anaeróbias, a qual ocorre apenas pela extensão da fase de latência. A atividade antimicrobiana advém maioritariamente da dissociação do ácido sórbico em sorbato, pelo que o aumento da eficácia para valores de pH baixos é explicado por um valor de pK_a de 4,75, que justifica que, em meios com pH elevado, se verifique uma fraca dissociação (Hui, 2006a; Schmidl & Labuza, 2000).

O reconhecimento da inibição fúngica e bacteriana do sorbato de potássio (E202) é bastante generalizado. Ainda assim, estão reportados alguns casos de resistência, dados que, pela sua baixa incidência, e tendo em conta que o efeito antimicrobiano depende, não só das estirpes consideradas, mas também da concentração de sorbato aplicada, do pH (bem como restantes características da matriz alimentar), do nível de contaminação, da temperatura e da exposição prévia, ainda que em quantidades bastante reduzidas, ao agente antimicrobiano, devem ser estudados de forma cautelosa (Alrabadi, Al-Massad, & Gharaibeh, 2013; Naidu, 2000; Tarté, 2009). De facto, a utilização abrangente deste composto na preservação alimentar é, por si só, indicadora da sua eficácia. Para além disso, o facto de se ter verificado que a estabilidade

do sorbato de potássio (E202) se mantinha durante o aquecimento e o armazenamento, aumentou o seu potencial de aplicação (Alrabadi et al., 2013).

2.2.2 Compostos antimicrobianos naturais: óleos essenciais

Os compostos antimicrobianos naturais podem ter origem vegetal ou microbiológica. De facto, as plantas podem ser utilizadas como fonte de conservantes, dado que produzem compostos com propriedades antimicrobianas, como ácidos orgânicos, compostos fenólicos e polifenólicos, alcaloides, lecitinas e polipéptidos. Quanto à utilização de culturas protetoras, que surgem como antimicrobianos de origem microbiológica, esta está associada a metabolitos produzidos pelas bactérias do ácido láctico – BAL (Cowan, 1999; Rahman, 2007).

Do ponto de vista da aplicação de compostos de origem vegetal, as especiarias apresentam-se como ingredientes de uso generalizado desde a antiguidade. As propriedades conservantes, mas sobretudo relativas ao sabor e aroma, alargaram a sua aplicação, a qual teve início com a descoberta de métodos simples que permitiam melhorar as suas características, como a utilização de recipientes de azeite para a extração e destilação, datados ainda da época antes de Cristo (Bauer, Garbe, & Surburg, 2001). A produção mais consistente de óleos essenciais a partir de especiarias deu-se com o melhoramento das técnicas de destilação, surgindo no século XIII como substâncias com potencial terapêutico em farmácias. Ainda assim, a industrialização da produção destes compostos naturais apenas ocorreu no início do século XIX devido à crescente procura para aplicações em perfumes e na intensificação do sabor de matrizes alimentares (Bauer et al., 2001; Burt, 2004). Apesar da aplicação anterior em fármacos, a ação bactericida dos vapores de óleos essenciais só foi efetivamente medida em 1881. Para além disso, são também reconhecidas propriedades antiparasitárias, inseticidas, antivirais, antifúngicas e antioxidantes. Atualmente, a sua aplicabilidade é bastante abrangente, apresentando-se como ingrediente na formulação de produtos de higiene e pomadas (Ahmed et al., 2013; Burt, 2004; Hylgaard, Mygind, & Meyer, 2014; O'Bryan, Pendleton, Crandall, & Ricke, 2015).

Os óleos essenciais são um líquido aromático oleoso produzido por plantas como metabolito secundário, podendo ser extraído de diferentes partes (e.g. folhas ou raiz), dependendo da espécie, através de técnicas como a extração com solvente ou a destilação. Atualmente, a

destilação com vapor é a técnica mais amplamente utilizada na produção comercial. Estes compostos apresentam uma baixa solubilidade em água, sendo preferencialmente dissolvidos em solventes orgânicos (Abbaszadeh et al., 2014; Burt, 2004; Cowan, 1999; Figueiredo, Barroso, Pedro, & Scheffer, 2008; Mith et al., 2014). A sua principal aplicação incide nas propriedades aromatizantes e antioxidantes, contudo a exploração das suas capacidades antimicrobianas, essencialmente devidas aos compostos fenólicos que entram na sua constituição, tem vindo a suscitar um interesse crescente (Abbaszadeh et al., 2014; Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001). Neste sentido, têm vindo a ser intensificados estudos sobre a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, sendo conhecidas ações contra microrganismos, como bactérias, fungos e vírus, e parasitas e contra a oxidação. Geralmente, as propriedades antimicrobianas devem-se ao efeito sinérgico da presença dos compostos maioritários e minoritários dos óleos. Muitas plantas têm vindo a ser estudadas devido ao seu potencial, o qual é acrescido pelo facto de possuírem um espectro de ação bastante amplo, dificultando o surgimento de resistência por parte de microrganismos patogénicos (Albarracin et al., 2012; Figueiredo et al., 2008; Mith et al., 2014).

2.2.2.1 Composição dos óleos essenciais

A composição dos óleos essenciais não é imutável numa determinada espécie. De facto, ela varia em função: (1) do método adotado para realizar a extração (e.g. extração por solvente ou destilação); (2) do clima e do solo em que a planta foi cultivada; e (3) da parte da planta escolhida para extrair o óleo. Para além disso, o modo de armazenamento pode também refletir-se na composição dos óleos essenciais, sendo crucial mantê-los tanto quanto possível hermeticamente fechados e não expostos à luz. As modificações verificadas variam para diferentes óleos, podendo ser bastante significativas, tendo como principal consequência a sua alteração, tanto a nível organolético, como a nível físico-químico, nomeadamente pela alteração da viscosidade. Quanto à temperatura, esta também afeta a composição dos óleos, ainda que não exista uma gama favorável na sua generalidade. Na verdade, existem casos em que a estabilidade é maior a baixas temperaturas e outros em que se observa o contrário. De um modo geral, é conhecido o efeito que as altas temperaturas têm, por provocarem a auto oxidação e conduzirem à decomposição de hidroperóxidos e à formação inicial de radicais livres, mas, por outro, a baixas temperaturas, a estabilidade dos óleos essenciais pode ser

perdida como resultado do aumento da solubilidade do oxigénio em líquidos (Alma, Ertas, Nitz, & Kollmannsberger, 2007; Burt, 2004; Figueiredo et al., 2008; Turek & Stintzing, 2013).

Os compostos da classe dos terpenos representam a quase totalidade dos compostos presentes nos óleos essenciais. Estes são derivados de uma estrutura base, que pode surgir agregada formando diterpenos, triterpenos, tetraterpenos (os carotenoides), entre outras configurações (Cowan, 1999; Crozier, Clifford, & Ashihara, 2006). A baixa volatilidade dos diterpenos faz com apenas estejam presentes em óleos essenciais extraídos por destilação, enquanto os tri, tetra e terpenos superiores, por serem ainda menos voláteis, só se encontram em frações como resinas e gomas das plantas, não sendo extraídos durante a obtenção de óleos essenciais. Os compostos de estrutura básica dos terpenos são designados por monoterpenos, os quais se apresentam como os componentes fundamentais dos óleos essenciais.

Os terpenos, devido à sua grande variedade, são agrupados em famílias de acordo com a sua estrutura, podendo esta ser linear (e.g. geraniol e linalol), ou constituída por um anel aromático, designando-se assim terpenos fenólicos (e.g. timol, carvacrol e eugenol). É reconhecido que os terpenos fenólicos apresentam um poder antimicrobiano particularmente interessante, estando em maioria na composição de muitos dos óleos essenciais comumente estudados (Crozier et al., 2006; Turek & Stintzing, 2013). De facto, o eugenol surge muitas vezes como componente maioritário em alguns óleos essenciais, dos quais o cravinho e o louro são exemplos (ainda que, como já referido, a sua composição varie com determinados fatores intrínsecos e extrínsecos), estando referida a elevada associação entre a capacidade antimicrobiana do óleo essencial e deste componente em específico (Burt, 2004; Cowan, 1999; Ohlsson & Bengtsson, 2002). De igual forma, o óleo essencial de tomilho deve, em grande parte, o seu efeito na inibição de microrganismos à capacidade do timol, aí presente em maior abundância (Burt, 2004; Hyldgaard et al., 2014; Pina-Vaz et al., 2004). Estes dados, apesar de relevantes, não descaram as relações de sinergia e antagonismo verificadas entre os diferentes componentes presentes. A Figura 2 apresenta a estrutura de alguns compostos fenólicos associados à capacidade antimicrobiana de óleos essenciais.

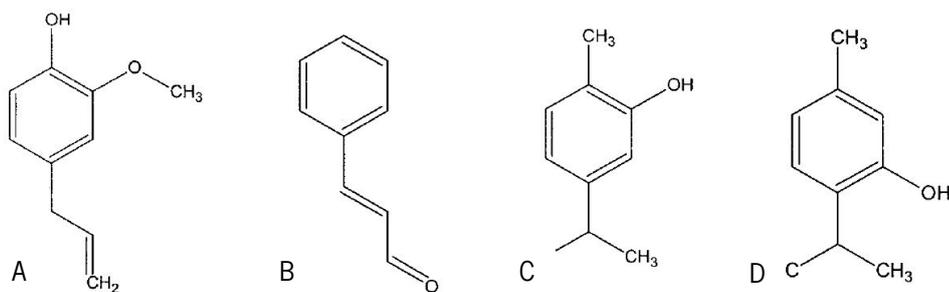


Figura 2 - Estrutura de compostos aromáticos (adaptado de: Gill & Holley, 2004).

Nota: (A) eugenol; (B) trans-cinamaldeído; (C) carvacrol e (D) timol.

2.2.2.2 Modo de ação dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é maioritariamente resultado da presença de compostos fenólicos, não descurando que alguns compostos minoritários, pelo efeito sinérgico que produzem, devem igualmente ser tidos em conta. A ação dos óleos essenciais está essencialmente associada a alterações na membrana celular, envolvendo, de um modo geral, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que, conseqüentemente, pode levar à perda de constituintes celulares, e a alteração dos sistemas enzimáticos e/ou do material genético (Burt, 2004; Hyldgaard et al., 2014; Lambert et al., 2001; Solomakos, Govaris, Koidis, & Botsoglou, 2008). De um modo mais particular, estão reportados mecanismos de: (1) aumento da permeabilidade da membrana; (2) libertação de potássio, ácidos nucleicos, aminoácidos e ATP (adenosina trifosfato); (3) lise celular; (4) inibição enzimática; (5) libertação e/ou coagulação do citoplasma e seu conteúdo; (6) inibição da atividade respiratória; (7) redução do pH das células; e (8) inibição da síntese proteica. Ainda assim, importa salientar que o mecanismo varia em função da tipologia de óleo essencial, bem como do microrganismo que é sujeito à sua ação (Hyldgaard et al., 2014; Lambert et al., 2001). A libertação de iões que asseguram a manutenção do potencial membranar das células causa a alteração do gradiente de pH e do potencial elétrico, comprometendo a força motriz que regula o transporte transmembranar e, em última instância, todo o funcionamento celular, o que explica a perda total de viabilidade das células expostas à ação dos óleos essenciais (Lambert et al., 2001). No caso de fungos, mais especificamente fungos filamentosos, foram detetadas reduções na produção de aflotoxinas por espécies de *Aspergillus* (Arora, 2004; Hyldgaard et al., 2014).

Tanto para bactérias como para fungos, está reportado o efeito inibitório e a capacidade de inativação completa de microrganismos contaminantes. De facto, esta capacidade é de máxima importância dado o reconhecimento da resistência crescente por parte dos microrganismos à ação antifúngica dos conservantes mais amplamente utilizados, bem como a incapacidade de eliminar contaminações fúngicas, registando-se apenas uma inibição do seu desenvolvimento. Isto significa que, contrariamente aos compostos antimicrobianos de origem sintética, que apenas atuam como fungistáticos, os compostos de origem natural atuam também como fungicidas (Abbaszadeh et al., 2014).

2.2.2.3 Aplicabilidade dos óleos essenciais em preparados

Pelo facto de os óleos essenciais representarem uma fração volátil das plantas, a sua aplicação em preparados – tendo em conta que estes são sujeitos a binómios de tempo-temperatura elevados – poderá ter a si associada várias limitações. De facto, o procedimento e a etapa de aplicação destes compostos, deverá garantir que a atividade antimicrobiana não é afetada. A volatilidade reconhecida dos óleos essenciais poderia sugerir uma grande suscetibilidade à aplicação de gamas de temperatura elevadas, contudo alguns estudos têm revelado o contrário. Está inclusivamente reportado um aumento da ação antimicrobiana dos componentes carvacrol e timol, presentes em vários óleos essenciais, quando submetidos a tratamento térmico de 45 °C durante 5 min, o qual é, ainda assim, substancialmente inferior às temperaturas de pasteurização praticadas pela FRULACT. Para além disso, também as propriedades antioxidantes se revelaram estáveis em condições de processamento alimentar, tendo sido testadas temperaturas até aos 180 °C, para óleos de tomilho, cravo-da-índia, orégão, noz-moscada e manjerição (Leite, Stamford, Lima, Filho, & Marques, 2008; Tomaino et al., 2005). Para o óleo essencial de orégão foi inclusivamente referido que uma gama de temperaturas entre 60 °C e 120 °C não afeta a sua ação inibitória sobre microrganismos, nem a sua composição química (Leite et al., 2008). Estes dados sugerem um bom potencial de aplicação, mesmo em condições de processamento alimentar que impliquem a aplicação de temperaturas elevadas.

De um modo geral, o carácter natural assegura o estatuto GRAS à maioria dos óleos essenciais, bem como a componentes individuais presentes na sua constituição. Contudo, a sua aplicação apresenta dificuldades ao nível da alteração das características organolépticas do

produto final. De facto, o impacto da utilização de óleos essenciais no sabor dos alimentos é substancial pelo que é crucial encontrar formas de mascarar essa influência. O conhecimento da concentração mínima inibitória - *CMi* - do composto de interesse, capaz de exercer efeito antimicrobiano sobre a carga fúngica presente na matriz, permitirá utilizar as quantidades ajustadas, não as extrapolando. Contudo, é importante realçar que o estudo da *CMi* é habitualmente desenvolvido em meio de cultura e que, na maioria das vezes, não corresponde à concentração efetivamente necessária na matriz alimentar. De facto, as interações entre o óleo essencial utilizado e os constituintes nutricionais do alimento poderão diminuir a eficácia da atividade antimicrobiana. Assim, o desafio nesta área consiste no alcance de um compromisso que, por um lado, garanta a eficácia da ação antimicrobiana e, por outro, assegure a aceitação do produto, pela manutenção das características organolépticas que lhe são associadas (Bagamboula, Uyttendaele, & Debevere, 2004; Lambert et al., 2001).

Os extratos com potencial antimicrobiano para serem adicionados a determinado tipo de alimento são passíveis de serem utilizados na forma de óleo essencial ou com recurso a apenas um ou mais componentes que este inclui (Mith et al., 2014). Contudo, do ponto de vista da rotulagem de um produto alimentar, é mais favorável a presença de um óleo essencial como ingrediente do que dos seus compostos isoladamente, pelo facto de as denominações complexas poderem não ser facilmente aceites pela generalidade dos consumidores, tendo grande impacto na comercialização dos produtos desenvolvidos com base na sua utilização. A aplicação de óleos essenciais em alimentos deverá ter em conta: (1) a manutenção de baixos valores de pH; (2) a aplicação de temperaturas de refrigeração para o armazenamento; e (3) baixos níveis de oxigénio, de modo a assegurar o efeito antimicrobiano pretendido. Para além disso, conteúdos reduzidos de gordura e/ou proteína favorecem a ação sobre bactérias, sendo o efeito do teor de gordura bastante significativo. Os hidratos de carbono têm a mesma influência, ainda que em menor escala e os níveis elevados de água e sal são também benéficos à atividade dos óleos essenciais (Burt, 2004). As limitações à difusão são igualmente relevantes, sendo que um meio onde exista uma maior mobilidade dos compostos, meio líquido, por exemplo, favorece o contacto dos óleos essenciais com os microrganismos e, conseqüentemente, potencia a sua atividade (Burt, 2004).

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão descritos os métodos levados a cabo durante o presente projeto, referindo-se os materiais necessários e a estratégia adotada.

Todos os procedimentos realizados tiveram lugar nos laboratórios do departamento de Inovação da FRULACT. As análises microbiológicas efetuadas decorreram no laboratório de microbiologia – pertencente ao FRUTECH -, com recurso, sempre que necessário, ao laboratório de Controlo de Qualidade. A elaboração de preparados, bem como o controlo dos parâmetros físico-químicos, realizou-se no laboratório de análises físico-químicas do mesmo departamento.

Como referido anteriormente, foram previamente selecionados dois preparados FRULACT, o preparado de frutos do bosque (PFB) e o preparado de cereais (PC).

Todas as metodologias foram adotadas no sentido de responder aos objetivos específicos do projeto, nomeadamente garantir a obtenção de um produto final estável - tanto a nível microbiológico, como organolético -, aliado à avaliação da viabilidade das culturas láteas, aquando da dosificação dos preparados em iogurte. É de salientar que este estudo deverá contemplar a avaliação durante todo o tempo de vida útil do produto, no sentido de entender o impacto de possíveis alterações que, em última instancia, poderão influenciar a escolha do consumidor. Assim sendo, todos os procedimentos adotados ao longo de todo o projeto seguiram os protocolos internos da empresa, de acordo com as normas europeias em vigor.

De modo a facilitar uma consulta mais objetiva, o presente capítulo encontra-se dividido em subcapítulos, que refletem as diferentes fases do projeto e são explicativos do planeamento realizado.

3.1 Preparação dos meios de cultura, diluentes e materiais

A preparação dos meios de cultura e diluentes utilizados foi sempre realizada de acordo com as instruções expressas nas respetivas embalagens, dissolvendo-se os meios em água destilada, nas proporções definidas. A sua esterilização, bem como de todo o material necessário, teve lugar no autoclave, aplicando um binómio tempo-temperatura de 121 °C, por 15 min.

De um modo geral, os mesófilos totais foram quantificados utilizando o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), da VWR Chemicals – Bélgica, enquanto para os fungos se recorreu a *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol* (DRBC), da Liofilchem – Itália. Em ambos os casos foram seguidos os protocolos internos da empresa, descritos adiante. Foi igualmente utilizado o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), VWR Chemicals – Bélgica, durante a obtenção de culturas puras.

O uso do meio de cultura PCA está de acordo com as referências normativas, nomeadamente a ISO 4833-1:2013. O meio DRBC é amplamente utilizado desde há vários anos, tendo como vantagem o facto de permitir um controlo do crescimento desenfreado de alguns fungos, nomeadamente dos géneros *Rhizopus* e *Mucor*, o qual se poderia sobrepor às restantes estirpes e impossibilitar a observação dos resultados referentes a outros fungos cuja taxa de crescimento é menor. Para além disso, é especialmente adequado para produtos lácteos e frutas e está de acordo com a ISO 21527:2008 (FDA, 2001; Pitt & Hocking, 2009). Por sua vez, o meio PDA é apropriado também para produtos pasteurizados e permite uma melhor distinção das características das colónias, nomeadamente a cor, facilitando a distinção entre diferentes géneros (Pitt & Hocking, 2009).

As culturas de *Streptococcus thermophilus* foram quantificadas através de um meio de cultura seletivo - ST Agar (*Streptococcus thermophilus*) - composto por 10 g/L triptona, 10 g/L sacarose, 5 g/L extrato de levedura, 2 g/L K₂HPO₄, 6 mL/L púrpura bromocresol e 15 g/L agar, diluídos em água destilada. Todos os ingredientes utilizados na preparação deste meio, bem como as indicações quanto à sua aplicabilidade foram fornecidos pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Estes dados vão ao encontro do método descrito por Dave e Shah (1996).

Ainda relativamente às culturas lácticas analisadas, foi utilizado o meio MRS Agar (*de Man, Rogosa e Sharpe*), da Liofilchem – Itália, para quantificar *Lactobacillus bulgaricus*, tal como especificado na norma ISO 7889:2003 (ISO and IDF, 2003) e descrito por vários autores (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2011; Zahoor, Rahman, & Farooq, 2003).

Para obtenção das suspensões-mãe, em frascos de 100 mL utilizou-se *Buffered Peptone Water* (BPW) - água peptonada -, da Merck – Alemanha. Para as diluições decimais sucessivas, obtidas a partir das suspensões-mãe, recorreu-se ao meio de suspensão *Maximum Recovery Broth* (MRB), fornecido por Liofilchem – Itália. BPW difere do MRB pelo facto de ser considerado um meio mais nutritivo, de acordo com a sua formulação. Para além disso, o BPW, selecionado em detrimento de soluções salinas, tampão fosfato ou água destilada – soluções estas capazes de constituírem meios, mas nocivas principalmente para o desenvolvimento de leveduras -, está largamente referenciado como o melhor diluente para a preparação de amostras com vista à enumeração de microrganismos pelo método de diluição em placa (Pitt & Hocking, 2009).

As placas contendo DRBC, ST e PDA foram preparadas, sempre que possível, com um mínimo de 24 h de antecedência – antes de se proceder à realização das análises -, de modo a assegurar a completa solidificação dos meios, antecedendo a aplicação adequada das técnicas de espalhamento, da gota e a repicagem de fungos. Para tal, foram vertidos cerca de 15 mL de meio para cada placa de Petri, sendo estas levemente agitadas de forma a uniformizar o meio de cultura em placa.

3.2 Caracterização microbiológica de matérias-primas

As matérias-primas contempladas na caracterização microbiológica foram bagas, nomeadamente amora, framboesa e mirtilo, e cereais - trigo, aveia e cevada -, tendo por base os critérios apontados no subcapítulo 2.1. Encontraram-se acondicionadas até ao momento de análise sob congelação e refrigeração, respetivamente, e foram caracterizadas microbiologicamente, segundo a quantificação de mesófilos totais e fungos (filamentosos e leveduras).

A cada uma das matérias-primas anteriormente selecionadas foi associado um conjunto de fornecedores, cujos parâmetros microbiológicos e, conseqüentemente, o nível de

contaminação - varia. Aquando da receção de cada matéria-prima, de acordo com o fornecedor, é associado um código – designado por lote – que permite realizar a rastreabilidade da mesma. São os frutos vermelhos (nomeadamente os frutos do bosque) e os cereais que assumem especial interesse. Para além de serem amplamente utilizados pela FRULACT, podem ter grande impacto na definição do binómio tempo-temperatura de pasteurização, dada a variabilidade da carga microbiana a si associada.

A preparação das amostras foi sempre realizada em duplicado (amostras A e B), pesando-se 10 g de matéria-prima para um frasco contendo 90 mL de BPW. A mistura obtida foi então transferida para um saco estéril, seguindo-se a sua homogeneização durante 90 s no *Stomacher* (MagMixer® - 400P Interscience). Este método amplamente referenciado, é considerado eficaz na dispersão de produtos, especialmente quando apresentam baixa granulometria, como é o caso da fruta e dos cereais (Pitt & Hocking, 2009). Por fim, foram novamente transferidos para o frasco de 100 mL, aí permanecendo por um mínimo de 30 min, antes de ser realizada a análise. Esta solução é designada como suspensão-mãe (diluição 10^{-1}). Atendendo ao nível de contaminação associada a cada matriz, foi necessário recorrer-se a diluições decimais sucessivas, podendo variar entre 10^{-4} e 10^{-2} . Todo o procedimento foi invariavelmente realizado em condições de assepsia, através do recurso ao bico de Bunsen.

Apesar de ser foco deste trabalho o controlo de fungos, principalmente ambientais, impôs-se o conhecimento generalizado do estado microbiológico das matérias-primas, avaliando-se, para tal, igualmente os mesófilos totais. A quantificação de mesófilos totais foi realizada pelo método de incorporação, pipetando-se 1 mL de suspensão correspondente a diluição para uma placa de Petri, seguida da adição de 15 mL de meio de cultura PCA. Relativamente à quantificação de fungos, a metodologia utilizada baseou-se na técnica de espalhamento, consistindo na adição de 100 μ L de suspensão a placas contendo DRBC (preparadas previamente de acordo com o descrito no subcapítulo 3.1). De seguida, com o auxílio de um espalhador de vidro, sujeito a esterilização com álcool e flamejado à chama, as suspensões inoculadas foram devidamente espalhadas pela placa de Petri. Em ambos os casos o procedimento foi realizado em duplicado para todas as diluições consideradas, segundo as normas ISO 4833-1:2013, para mesófilos totais, e ISO 21527:2008, para fungos.

As placas de Petri contendo DRBC foram incubadas na estufa a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 5 d, enquanto para as placas com PCA a temperatura de incubação foi de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante $72\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

3.3 Caracterização microbiológica do ambiente industrial

A carga microbiológica ambiental, presente durante o processo produtivo, foi estudada segundo as condições aplicadas na unidade fabril de Tortosendo. Para tal, foi realizada uma análise microbiológica ao meio envolvente das salas de produção, preparação de fruta, refrigeração, congelação, armazém de secos, sala de pesagem de secos e alergénios. Para além das salas referidas, foram também avaliadas a zona de lavagem, de limpeza - *Cleaning In Place* (CIP) - e de esterilização - *Sterilization In Place* (SIP). Para concretizar a presente análise, foram tidas em conta três zonas (A, B e C), tal como é sugerido na Figura 3. Para além disso, cada zona foi submetida a uma amostragem a três alturas distintas, não estando estas especificamente definidas. Na verdade, em função dos impedimentos presentes em cada sala, nomeadamente pela presença de equipamentos e consumíveis, ou devido ao fluxo de operadores, as alturas foram variáveis, à exceção da altura 1 que correspondia sempre a uma amostra realizada ao nível do chão. As alturas 2 e 3, corresponderam, de um modo geral, a uma zona intermédia e à zona mais alta na qual, respetivamente.

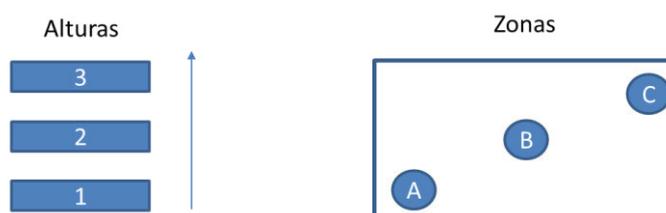


Figura 3 – Representação da amostragem realizada na unidade fabril em Tortosendo.

A recolha de amostras foi realizada em duplicado expondo placas de Petri abertas, com o meio de cultura PDA, nos locais e alturas definidos, cumprindo-se um tempo de exposição de 10 min. Findo o tempo, as placas foram fechadas e incubadas durante 5 d na estufa a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. A aplicação da presente metodologia não visa obter resultados quantitativos, mas sim qualitativos, na medida em que é apenas pretendido conhecer o tipo de

contaminação fúngica presente no ambiente industrial. Assim, o cultivo dos microrganismos identificados permitirá avaliar a eficácia dos compostos antimicrobianos a testar.

3.4 Obtenção e identificação de culturas puras

Com base na frequência de detecção fúngica, nas diferentes zonas da unidade fabril, e/ou na sua morfologia foram selecionados os microrganismos provenientes, tanto da caracterização das matérias-primas, como do ambiente. Para a obtenção de culturas puras, realizaram-se repicagens para placas contendo o meio DRBC. No caso dos fungos filamentosos, retirou-se com uma ansa metálica, previamente esterilizada à chama, aproximadamente 1 cm² de meio de cultura com crescimento fúngico e transferiu-se essa porção para o centro de uma nova placa. Relativamente ao isolamento de leveduras, é em tudo semelhante ao de bactérias, pelo que se recorreu a técnicas por riscado. Para as leveduras, a repicagem foi então feita com ansa de plástico estéril, passando-se a mesma na cultura a isolar e de seguida espalhando a porção retirada na nova placa, pela realização de um riscado, como o evidenciado na Figura 4. As placas foram então incubadas em estufa à temperatura de 25 °C ± 1 °C, durante 72 h ± 3 h.



Figura 4 – Exemplo da aplicação da técnica por riscado para isolamento de leveduras.

Posteriormente, para obter uma informação mais precisa acerca das diferenças morfológicas entre as culturas puras obtidas, os microrganismos inicialmente presentes em placas com meio DRBC foram repicados para placas com o meio PDA, seguindo o mesmo procedimento. Assim, devido a uma maior distinção entre colónias proporcionada por este meio, foi possível confirmar se todas as culturas inicialmente isoladas eram efetivamente distintas. De seguida, algumas culturas de fungos filamentosos foram observadas ao microscópio ótico composto

com o intuito de aferir quanto ao género taxonómico. Para tal, procedeu-se à passagem de uma ansa estéril pela cultura em causa e, em seguida, por uma gota de água destilada previamente colocada numa lâmina. Colocou-se a lamela e observou-se ao Microscópio Ótico Composto (MOC), com a utilização de diferentes ampliações.

Algumas das culturas puras seguiram para sequenciação por *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT – PCR). Para isso, as placas seguiram para a empresa BIOPREMIER, sediada em Lisboa.

3.5 Avaliação da concentração mínima inibitória - *CMI*

Os óleos essenciais testados foram fornecidos pela empresa H. REYNAUD & FILS, cujas amostras por eles identificadas foram: *Peppermint*, *Cornmint*, *Romarin*, *Fennel*, *Anise*, *Cardamome*, *Girofle clou*, *Mandarine verte*, *Pamplemousse*, *Bay*, *Mandarine rouge*, *Citron*, *Orange douce*, *Thym*.

A avaliação da *CMI* realizou-se tendo por base concentrações volúmicas de óleo essencial de 0,05 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,1 % e 0,2 %, a serem testadas para os microrganismos selecionados no subcapítulo 3.4. As concentrações foram obtidas em tubos de Falcon, pipetando-se entre 25 µL (0,05 %) e 100 µL (0,2 %) de óleo essencial, acompanhados da adição de 50 mL de meio de cultura PDA, a uma temperatura de 55 °C, de modo a favorecer a dissolução. A solução foi homogeneizada, vertendo-se, em seguida, o conteúdo dos tubos para placas de Petri - cerca de 15 mL -, e aguardando-se até a sua completa solidificação. As culturas puras – mantidas sob refrigeração - foram então repicadas para as placas inoculadas com o óleo essencial, de acordo com o método descrito anteriormente (subcapítulo 3.4). Por último, a observação e recolha de dados, que, no caso dos fungos filamentosos, consistia na medição do crescimento, foi realizada a partir da margem da porção repicada (ver Figura 5), aos dias 3, 5 e 7. Durante esse tempo, as placas foram mantidas na estufa à temperatura de 25 °C ± 1 °C.

De modo a permitir uma comparação efetiva, foi igualmente avaliada a *CMI* do sorbato de potássio (E202). O procedimento foi similar ao adotado para os óleos essenciais, com adaptações pelo facto de este composto se encontrar na forma granular. Assim, foi previamente feita uma dissolução de 2,5 g de sorbato de potássio (E202) numa solução

etanol/água - proporção (1:10). As concentrações volúmicas aplicadas foram: 0,05 %, 0,1 % e 0,2 %.

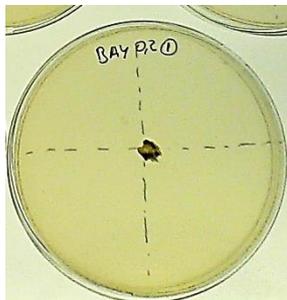


Figura 5 – Exemplo de placa de Petri para medição do crescimento de fungos filamentosos, para avaliação da *CMI*.

Por forma a aferir a carga associada aos óleos essenciais procedeu-se à realização da técnica por espalhamento em meio DRBC, para os óleos *Bay*, *Thym* e *Girofle clou* sem qualquer diluição. As placas foram, tal como nos casos anteriores, incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 d.

3.6 Estudo do efeito nas culturas lácticas

As amostras analisadas (em duplicado, A e B) consistiram em iogurte batido natural onde se adicionou os óleos essenciais *Bay*, *Thym* e *Girofle clou* a 0,07 % e 0,08 % - sem especiais condições de assepsia por forma a expor o produto aos microrganismos ambientais -, bem como um branco, constituído apenas por iogurte, sem qualquer adição. Estas variáveis (óleo essencial e concentração) foram selecionados com base nos resultados da avaliação da *CMI*.

No tempo 0 foram então preparados frascos de 100 mL suficientes para realizar o estudo durante 28 d, analisando-se aos dias 3, 7, 15, 20 e 28. Cada frasco correspondia a amostras de iogurte inoculadas com um óleo, numa concentração, para um determinado dia de análise. A adoção desta metodologia pretendeu reduzir possíveis riscos de contaminação dos frascos utilizados durante a amostragem, caso contrário, todos os resultados subsequentes poderiam ficar comprometidos. A definição da duração deste estudo teve por base o tempo de vida útil dos iogurtes utilizados, 21 d, aos quais se acresce uma semana, perfazendo 28 d. O branco

foi sempre retirado de uma embalagem intacta de iogurte, aberta apenas no momento da análise e do mesmo lote de produção que as restantes amostras.

A preparação das amostras consistiu na pesagem de 10 g do produto para um frasco contendo 90 mL de BPW, analisando-se após 30 min de tempo de contacto com o diluente. Realizaram-se diluições decimais sucessivas, sendo que as placas foram divididas em três partes, correspondendo às diluições 10^6 , 10^7 e 10^8 , tal como se observa na Figura 6. Para cada diluição, pipetou-se uma gota de 20 μ L de amostra para a zona da placa correspondente. Após solidificação da gota, as placas obtidas em duplicado foram invertidas e incubadas na estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e lidos os resultados após $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

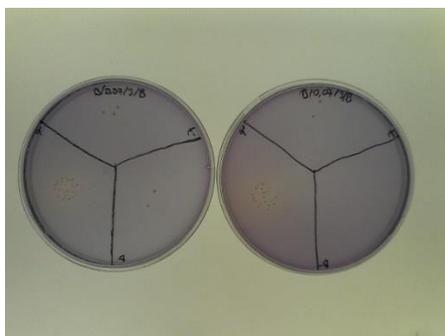


Figura 6 – Exemplo de placas de Petri para quantificação de *Streptococcus thermophilus* pelo método da gota (meio de cultura ST).

O estudo das culturas lácticas compreendeu a monitorização de *Streptococcus thermophilus*, e *Lactobacillus bulgaricus*, utilizando-se para tal, respetivamente, placas em duplicado com meios de cultura ST e MRS, preparadas como descrito anteriormente (subcapítulo 3.1). No caso de *S. thermophilus* a incubação foi realizada sob condições de aerobiose, tal como amplamente reportado (Dave & Shah, 1996; Tharmaraj & Shah, 2003). Contrariamente, a incubação com vista à quantificação de *L. bulgaricus* ocorreu em anaerobiose, de acordo com o sugerido em Dave e Shah (1996).

Paralelamente, foram igualmente monitorizadas possíveis contaminações ambientais, por fungos filamentosos e leveduras, as quais, a ocorrer, estão relacionadas com as falhas de assepsia durante a fase de preparação dos frascos. Para tal, a quantificação da carga presente foi realizada segundo a ISO 21527:2008 (subcapítulo 3.2).

3.7 Elaboração de preparados – análises sensoriais

Os preparados foram elaborados de acordo com as informações constantes nas respectivas formulações. Considerou-se um preparado “padrão” quando o conservante utilizado foi o sorbato de potássio (E202). Nos restantes casos, foi realizada a adição de óleo essencial, nomeadamente *Bay*, *Thym* e *Girofle clou*. A seleção dos preparados teve por base análise de bagas e cereais, de acordo com os critérios apresentados no subcapítulo 2.1.

As formulações gerais, com indicação dos ingredientes utilizados para a elaboração de um preparado padrão encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos preparados de frutos do bosque (PFB) e cereais (PC)

PFB	PC
Água	Água
Fruta (amora, framboesa e mirtilos)	Cereais (trigo, aveia e cevada)
Estabilizantes	Açúcar
Intensificadores de sabor	Estabilizantes
Concentrados	Intensificadores de sabor
Sorbato de potássio, E202	Sorbato de potássio, E202
Edulcorantes	Acidificante
Acidificante	

De acordo com a criticidade associada aos preparados, estes foram sujeitos a binómios tempo-temperatura de pasteurização de 85 °C, 10 min, e 95 °C, 5 min, para PFB e PC, respetivamente. Em ambos os casos, os preparados foram aplicados em iogurte natural, sendo dosificados em concentrações mássicas de 15 %, para o PFB, e a 4 %, para o PC.

Os parâmetros físico-químicos medidos aquando da elaboração de um preparado de modo a garantir o cumprimento das especificações exigidas pelo cliente, são o pH, os compostos solúveis (CS) e a consistência (C). A Tabela 3 apresenta os valores de referência exigidos para cada parâmetro para ambos os preparados, bem como os obtidos durante o presente projeto. A medição dos parâmetros físico-químicos foi realizada com recurso a um medidor de pH (Consort C860) e um refratómetro (Bellingham + Stanley Ltd. RFM732), para controlo de pH

e compostos solúveis, respetivamente. No caso da medição da consistência, foi utilizado um consistómetro de Bostwick, tendo-se registado a distância percorrida pelos preparados durante 60 s.

Tabela 3 – Valores de referência e obtidos na caracterização físico-química de PFB e PC

	PFB		PC	
	Padrão	Obtido	Padrão	Obtido
pH	3.8 ± 0,3	3.98 ± 0,05	4,2 ± 0,2	4,34 ± 0,07
CS / °Brix	8 ± 2	8,79 ± 0,85	10 ± 2	10,05 ± 0,96
C / (cm/60s)	10 ± 2,5	10 ± 1,02	9 ± 2	8,13 ± 1,53

Nota: CS – compostos solúveis; C – consistência.

3.7.1 1ª Fase

Nesta fase, tendo em conta os resultados provenientes da avaliação da *CMI* e do estudo das culturas lácticas, foram elaborados ambos os preparados com *Thym*, *Bay* e *Girofle clou*, em substituição do sorbato de potássio (E202), bem como um padrão, que servia de comparação. A aplicação dos óleos essenciais deu-se a quente, logo após a pasteurização, de modo a garantir as condições de assepsia, por um lado, e, por outro, assegurando uma dissolução adequada. A concentração mássica aplicada foi de 0,07 %.

A análise sensorial consistiu em dar a provar os preparados não dosificados e dosificados em iogurte de modo a entender quais os óleos essenciais com maior potencial de aceitação. A prova dos preparados não dosificados pretendia avaliar as diferenças de um modo mais significativo, dado que a dosificação disfarça largamente o sabor conferido pelos óleos essenciais. Ainda assim, os resultados após inclusão em iogurte são o real foco no que toca à aceitação de novos produtos, dado constituírem a forma como o produto final será comercializado.

Como se tratava de uma fase preliminar, o grupo de provadores consistiu apenas nos funcionários pertencentes ao departamento de Inovação. Esta fase visou restringir o número de pares preparado/óleo essencial, selecionando os que apresentavam maior potencial por forma a serem utilizados nas fases posteriores.

3.7.2 2ª Fase

Os óleos essenciais utilizados nesta fase foram *Thym*, para o PFB, e *Girofle clou*, para o PC, na mesma concentração da fase anterior.

Nestas condições, as provas foram realizadas tanto para os preparados, como para os preparados dosificados e abrangendo, uma vez mais, os provadores pertencentes ao departamento de Inovação. No entanto, nesta segunda fase, os provadores foram convidados a preencher fichas de Análise Sensorial, de modo a tornar os resultados mais mensuráveis. Um exemplar dessas fichas encontra-se no Anexo A.

3.7.3 3ª Fase

A última fase da análise organoléptica consistiu na realização de análises triangulares para os mesmos óleos e aplicações da fase anterior. Para tal, utilizaram-se fichas, tal como a apresentada no Anexo B, em que se pretendia avaliar se os provadores distinguiam entre o preparado padrão e o preparado com óleo essencial, ambos dosificados em iogurte. A aplicação deste tipo de análise pressupõe a prova por cada indivíduo de três amostras, inquirindo-o sobre qual delas lhe parece diferente. Em metade dos casos a amostra diferente tinha a presença do óleo essencial em causa e na outra metade a diferente era o padrão. É de salientar que, para esta fase, foi necessário alterar a aromatização do PC, após se testarem diferentes aromas alternativos, para que fosse prontamente aceite pelo provador.

Segundo esta metodologia considera-se que um produto é aceite se a diferença não for considerada perceptível, sendo que dois produtos são significativamente diferentes se, numa população de 30 provadores, 13 acertarem na prova cega.

3.8 Estudo de preparados contaminados

Para esta etapa do projeto procedeu-se à elaboração dos preparados, PFB e PC, com a adição do respetivo óleo essencial anteriormente aprovado (*Thym* para PFB e *Girofle clou* para PC). Para tal, foram igualmente contempladas análises dos preparados com sorbato de potássio (E202) e sem nenhum conservante (branco), totalizando seis preparados. Posteriormente, os

preparados foram contaminados a 1 mL/100 g com um inóculo com os géneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. A escolha destes microrganismos relacionou-se com a elevada frequência do género *Penicillium* nas análises internas, bem como com a patogenicidade associada às aflatoxinas produzidas pelo género *Aspergillus*. Estes factos tornam estas culturas bastante representativas e permitem a obtenção de resultados interessantes do ponto de vista da empresa, dado o histórico associado à sua presença.

A preparação do inóculo foi realizada com base no trabalho de Guarro, Pujol, Aguilar, Llop e Fernández-Ballart (1998), sujeito a adaptações de acordo com a disponibilidade de material e equipamentos. Assim, pipetou-se 7 mL de água destilada para placas de Petri contendo cada uma das culturas puras. Raspou-se a superfície das placas com uma ansa estéril, de modo a libertar os esporos, e pipetou-se de cada uma delas, 5 mL para um frasco com 90 mL de água destilada esterilizada, perfazendo 100 mL do inóculo contendo ambas as culturas. O inóculo assim preparado foi então incubado a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cerca de 2 h, de forma a potenciar o desenvolvimento fúngico, garantindo a contaminação dos preparados. Após esse tempo, analisou-se a carga do inóculo, de acordo com a metodologia descrita no subcapítulo 3.6, que obedece às normas da ISO 21527:2008. Atendendo a que a carga era desconhecida, optou-se por realizar diluições decimais sucessivas até 10^{-5} , para garantir a obtenção de um número quantificável das culturas em análise.

Em seguida, transferiu-se 5 mL do inóculo para cada preparado (500 g) e homogeneizou-se. Uma parte de cada preparado foi então dosificada em iogurte e prepararam-se frascos de 100 mL para a realização de análises ao longo de 42 d. Cada frasco foi apenas utilizado para uma análise, para os preparados dosificados e não dosificados, sempre em duplicado (amostras A e B). O que significa que, tal como em casos anteriores e pelo mesmo motivo, foi apenas realizada uma toma de cada frasco.

A garantia de estabilidade microbiológica de preparados assenta na sua capacidade em controlar possíveis contaminações durante um tempo correspondente ao tempo de vida útil, 28 d, acrescido de 25 %, ou seja, 42 d. Assim sendo, os preparados dosificados em iogurte foram analisados aos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42, enquanto os preparados sem dosificação foram analisados aos dias 0, 14, 28, 35 e 42. Esta distinção deveu-se às diferenças inerentes às matrizes em estudo. Para os preparados submetidos ao processo de pasteurização, a única carga microbiológica expectável de ser quantificada é a do inóculo, pelo que, tratando-se de

fungos filamentosos - cujo crescimento acontece de forma fastidiosa -, considerou-se que uma análise quinzenal seria suficiente, conduzindo igualmente a uma gestão mais eficiente dos recursos disponíveis. No caso das amostras de preparado em iogurte, é expectável o desenvolvimento de leveduras ao longo do tempo, pelas condições favoráveis que esse meio apresenta. Assim, de modo a prevenir um eventual crescimento acentuado desses microrganismos, que pusesse em causa a monitorização da contaminação intencional efetuada, optou-se pela realização de um controlo mais rigoroso, tendo sido realizado semanalmente.

A contaminação foi monitorizada através do meio de cultura DRBC, segundo o protocolo definido no subcapítulo 3.6. Tal como aí, todas as amostras foram analisadas em duplicado.

O estudo da evolução da contaminação contemplou também um estudo das culturas lácticas. Nesta fase, dada a não deteção de culturas de *L. bulgaricus* durante o “Estudo do efeito nas culturas lácticas” (subcapítulo 3.6), impôs-se uma otimização dos recursos disponíveis, pelo que se restringiu a monitorização a *S. thermophilus*, realizada de acordo com o descrito no mesmo subcapítulo. Esta análise foi conduzida no sentido de perceber se a presença dos preparados alterava os resultados previamente obtidos.

4. Análise e Discussão dos Resultados

Este capítulo será dedicado à exposição de todos os resultados obtidos ao longo do projeto, analisando-se com base em fundamentos teóricos a importância dos mesmos. Serão, portanto, discutidos pormenorizadamente os resultados de cada etapa, bem como os parâmetros que os podem ter influenciado.

O presente capítulo está, tal como capítulo 3, dividido em subcapítulos, cada um deles referente a uma etapa do projeto, de modo a aumentar a objetividade do que é apresentado e facilitar a sua consulta.

De acordo com os critérios microbiológicos praticados pela FRULACT, produtos cujos resultados apresentem contagens positivas para a quantificação de fungos (leveduras e fungos filamentosos) não são passíveis de serem expedidos. Tendo por base os métodos de análise adotados, serão analisados todos os resultados, inclusive aqueles que se apresentem abaixo do limite de deteção inerente, visto serem considerados representativos para a empresa.

4.1 Caracterização microbiológica de matérias-primas

A caracterização das matérias-primas teve por base a sua identificação por lotes, de modo a possibilitar o rastreamento de contaminações pela empresa, tal como referido no capítulo 2. Para além disso, os procedimentos adotados para as bagas e cereais analisados, normas ISO 4833-1:2013 e ISO 21527:2008, para mesófilos totais e fungos, respetivamente, asseguram o cumprimento das exigências da FRULACT ao nível da avaliação da carga microbiológica associada a cada lote de matéria-prima utilizado.

Assim, o gráfico da Figura 7 apresenta os resultados obtidos relativamente à caracterização das matérias-primas, em termos de mesófilos totais, leveduras e fungos filamentosos. Os valores de $\lg(\text{UFC/g})$ dos limites de deteção associados aos respetivos métodos de análise (descritos no subcapítulo 3.2) são de 1, para mesófilos totais, e 2, para fungos.

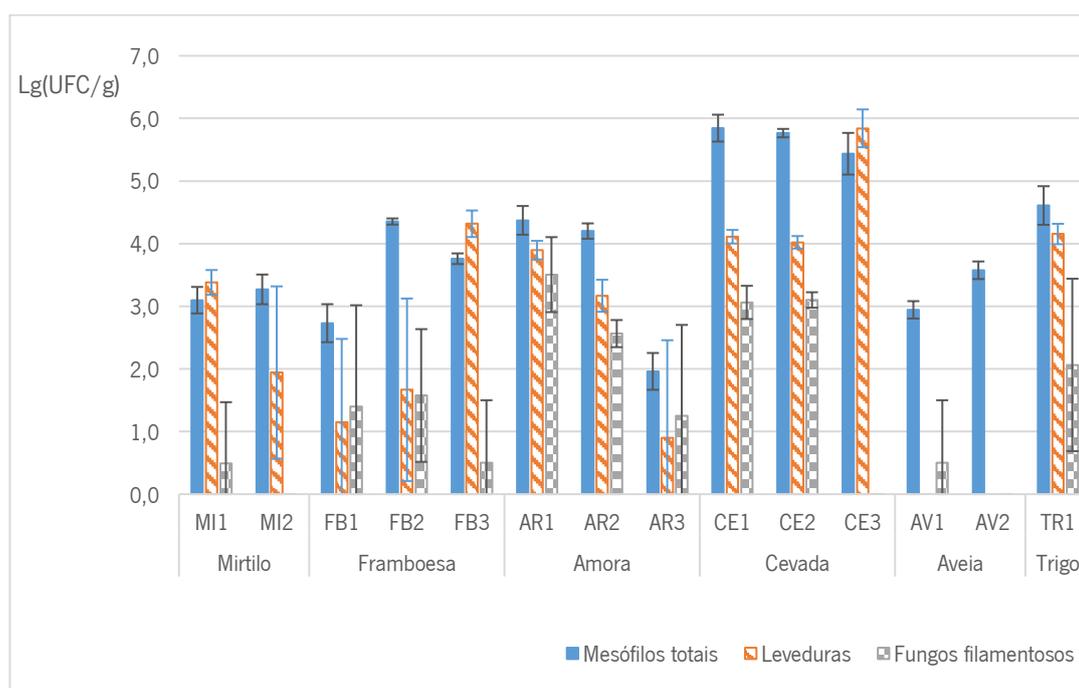


Figura 7 – Resultados da quantificação da carga microbiológica para diferentes lotes de matérias-primas.
Nota: MI – mirtilo; FB – framboesa; AR – amora; CE – cevada; AV – aveia; TR – trigo.

Dentro do grupo de bagas analisado, de um modo geral, a amora foi a boga que apresentou o maior nível de contaminação, estando presentes os três grupos de microrganismos analisados - mesófilos totais, leveduras e fungos filamentosos – em dois dos lotes em concentrações acima da do limite de deteção mais baixo. A diferença observada quanto ao

terceiro lote desta matéria-prima, o qual corresponde a um lote escolhido, pode indiciar que a matéria-prima que lhe deu origem seja pouco contaminada, diminuindo o impacto do processo de escolha das bagas, normalmente associado a um aumento da contaminação pela introdução de carga ambiental.

De facto, tal como seria expectável, por se tratar de bagas, a presença de microrganismos foi substancial, facto que é reflexo da especial apetência destas frutas para o desenvolvimento de contaminações. Estes resultados mostram que a proximidade ao solo durante o cultivo, bem como a sua morfologia - em particular o facto de apresentarem protuberâncias à sua superfície - potenciam o desenvolvimento de carga microbiológica (Pitt & Hocking, 1997).

Quanto aos cereais, a aveia foi, por ampla diferença, aquele que apresentou uma menor carga, estando inclusivamente abaixo do limite de deteção em termos de leveduras e fungos filamentosos. Os resultados relativos aos mesófilos totais apresentaram-se próximos de valores de $\lg(\text{UFC}/\text{g})$ de 3, para ambas as guias, sendo substancialmente inferior aos valores obtidos para os restantes cereais, nomeadamente perto de 6 e 5, para cevada e trigo, respetivamente. De facto, apesar de apenas ter sido possível analisar uma guia de trigo, os resultados sugerem que a cevada seja o cereal mais contaminado de entre todos os analisados, facto que se observa tanto para mesófilos totais, como para leveduras e fungos filamentosos.

De salientar, igualmente, a variabilidade dos resultados obtidos para os diferentes lotes de matérias-primas. De facto, tanto a carga quantitativa, como qualitativa, detetada em fruta e cereais depende inicialmente das condições de cultivo, onde a temperatura ambiente e a disponibilidade de água e nutrientes é decisiva, bem como do estado de maturação e das práticas de produção (Adams & Moss, 2008; Beuchat, 2002). De igual forma, durante o seu transporte e armazenamento, a temperatura e a humidade relativa são fatores que condicionam o desenvolvimento microbiano, podendo, em conjunto com as determinantes do cultivo, justificar as diferenças observadas entre os lotes analisados (Adams & Moss, 2008)

4.2 Caracterização microbiológica do ambiente industrial

A caracterização do ambiente da unidade industrial de Tortosendo visou, sobretudo, aferir acerca do tipo de microrganismos, nomeadamente leveduras e fungos filamentosos, que poderiam estar presentes em cada secção, conduzindo ao conhecimento dos dados a nível

qualitativo. Neste sentido, e de acordo com a metodologia adotada, os resultados obtidos foram bastante extensos, apresentando-se neste ponto apenas os mais significativos. A restante informação encontra-se exposta em anexo (Anexo C, Tabela II).

A Tabela 4 apresenta, então, os principais resultados da caracterização do ambiente industrial, distinguindo-se a presença de fungos filamentosos e leveduras de acordo com a altura em que foi possível a sua deteção.

Tabela 4 – Resultados da avaliação da presença de fungos filamentosos e leveduras nas várias secções, e alturas consideradas, da unidade industrial de Tortosendo

Secção	Fungos filamentosos	Leveduras	Altura
Produção	-	X	1,2,3
Preparação de fruta	X	X	1,2,3
Pesagem de secos	X	X	1
SIP	-	-	-
CIP	X	X	1,2,3
Lavagem	X	X	1,2
Armazém de secos	X	X	1,2,3
Congelação	X	X	1,2,3
Refrigeração	X	X	1,2,3

Nota: (-) sem presença de fungos; (X) presença de fungos.

Antes de mais, importa referir que, tal como é possível constatar pela análise dos dados da Tabela 4, não houve correlação entre a diferença de alturas e a predominância de determinada contaminação fúngica. Apesar de ser expectável que os fungos filamentosos, devido essencialmente ao seu tamanho e peso, estivessem presentes maioritariamente nas zonas mais altas, tal não se verificou. Efetivamente, devido às restrições operacionais da fábrica que impossibilitaram a realização de uma amostragem em zonas mais altas, observaram-se diferenças pouco significativas entre o ponto mais baixo (chão) e o mais alto, não sendo possível realizar uma análise mais aprofundada deste parâmetro. Ainda assim, a análise permitiu constatar que as secções com menor carga ambiental associada são a produção, a sala de pesagem de secos e a SIP. No primeiro caso deve-se provavelmente às boas práticas

de fabrico adotadas, bem como à eficiente limpeza de todas as superfícies e à existência de um fluxo de ar que previne as contaminações cruzadas. Estes dados são positivos pois permitem à empresa avaliar preliminarmente que o sistema de controlo de contaminações é eficaz ao nível da produção, zona esta a mais importante – visto ser onde o produto é pasteurizado e embalado, a fim de ser enviado para o cliente. Um outro ponto importante é o facto de a sala de pesagem de secos apresentar uma contaminação também bastante reduzida, apenas ao nível da altura 1. Apesar de ser nesta secção que estão armazenados produtos como açúcar e farinhas, e são pesados muitos outros do mesmo género - os quais estão normalmente associados a uma elevada carga microbiana - tal não se verificou. De facto, por todos os produtos serem secos, e, por isso, apresentarem valores de atividade da água (a_w) bastante reduzidos, é expectável que o ambiente apresente uma humidade relativa baixa, ainda que esta não tenha sido efetivamente medida. Este fator, aliado ao fluxo de ar existente em toda a secção, reduziu a presença de contaminações fúngicas, apesar de não ser possível quantificar a mesma de forma precisa.

A secção de SIP não apresentou qualquer indício da presença de fungos, o que é expectável e desejável, na medida em que, sendo uma zona de esterilização de contentores, a existência de qualquer contaminação poderia indiciar falhas no tratamento aplicado e, conseqüentemente, em toda a rastreabilidade na utilização dos mesmos.

Nas restantes secções foi possível detetar a presença tanto de fungos filamentosos, como de leveduras, estando provavelmente associados às contaminações cruzadas que ocorrem nessas zonas. Em todas é comum o facto de haver a manipulação de diferentes matérias-primas, o que aumenta consideravelmente a propensão para o desenvolvimento de microrganismos – a partir de contaminações cruzadas. Os resultados obtidos mesmo a baixas temperaturas como as de congelação não foram inconsistentes, dado que é reconhecida a capacidade de resistência dos esporos dos fungos, podendo essas estruturas sobreviver até vários anos sob estas condições (Sun, 2012).

4.3 Obtenção e identificação de culturas puras

Todas as culturas puras isoladas foram numeradas, distinguindo-se entre aquelas que provinham da caracterização das matérias-primas e do ambiente industrial (as últimas eram acrescidas de um “A”, e.g. 1.A).

Determinados microrganismos isolados - leveduras e fungos filamentosos - foram identificados geneticamente por RT-PCR, tendo sido previamente realizada uma observação ao MOC (Microscópio Ótico Composto). Este passo permitiu aferir qual o género taxonómico provavelmente associado a alguns dos fungos filamentosos isolados. A Tabela 5 resume os resultados de ambas as análises efetuadas. Informações complementares encontram-se em anexo (Anexo D, Tabela III), nomeadamente fotografias das culturas em meio sólido (PDA), bem como informação inerente às matérias-primas ou secções da fábrica de onde foram isolados. Essa informação está aí referida tanto para as culturas identificadas por RT-PCR, como para as restantes. De referir que, em alguns dos resultados, não foi possível obter uma identificação exata, pelo que são apresentadas as possibilidades de espécies, de acordo com a informação fornecida pela empresa BIOPREMIER, onde foi realizado o RT-PCR.

Tabela 5 – Resultados da observação ao MOC e da identificação por RT-PCR dos microrganismos isolados a partir das fases de caracterização das matérias-primas e do ambiente industrial e respetivas origens de deteção (Continua)

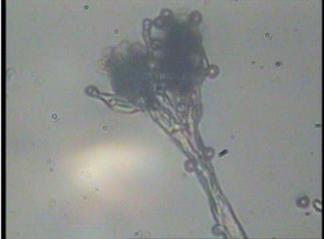
Número	Imagem MOC (ampliação utilizada)	Origem	Identificação por RT-PCR
1	(1000×) 	TR, L, PS	<i>Penicillium</i> sp.
2	(400×) 	TR, CE, FB, AR	<i>Cladosporium</i> sp.

Tabela 5 - (Continuação)

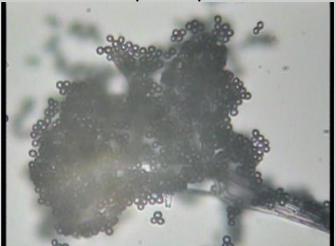
Número	Imagem MOC (ampliação utilizada)	Origem	Identificação por RT-PCR
5	(400×) 	AV, TR	<i>Penicillium</i> sp.
7	(1000×) 	TR	<i>Aspergillus</i> sp.
8	(1000×) 	TR	<i>Aspergillus</i> sp.: <i>A. chevalieri</i> ; <i>A. amstelodami</i> ; <i>A. heterocaryoticus</i>
10		CE, TR, FB, AR, MI	<i>Cryptococcus</i> sp.
11		CE, TR, FB, AR, MI	<i>Pseudomonas</i> sp.
14		CE, TR, MI	<i>Pseudomonas</i> sp.
15	(100×) 	FB	<i>Chaetomium</i> sp.: <i>C. pratense</i> ; <i>C. funicola</i> ; <i>C. indicum</i>
17	(400×) 	TR, FB, PS	<i>Mucor piriformis</i>

Tabela 5 - (Continuação)

Número	Imagem MOC (ampliação utilizada) (400×)	Origem	Identificação por RT-PCR
19		AR	<i>Phoma glomerata</i>
1.A		PF, Cong., AS	<i>Candida sake</i>
3.A		PF	<i>Pischia</i> sp.
6.A		Cong.	<i>Phoma pinodella</i>
7.A		CIP	<i>Phoma</i> sp.; <i>Peyronellaea prosopidis</i>
8.A		PS, Refr., PF, CIP	<i>Penicillium</i> sp.: <i>P. spinulosum</i> ; <i>P. glabrum</i>
9.A		PS	<i>Epicoccum nigrum</i>
11.A		PF, PS	<i>Penicillium</i> sp.

Nota: MI – mirtilo; FB – framboesa; AR – amora; CE – cevada; AV – aveia; TR – trigo.

PF – preparação de fruta; PS – pesagem de secos; L – lavagem; AS – armazém de secos, Cong. – congelação; Refr. – refrigeração.

Antes de analisar os dados resultantes da identificação das culturas puras, importa fazer referência aos resultados dos microrganismos 11 e 14. Apesar da deteção fúngica ser assente na utilização de um meio seletivo para fungos, a identificação por RT-PCR mostrou a presença de bactérias entre as culturas puras isoladas. Este facto deve-se à resistência das estirpes de *Pseudomonas* ao antibiótico presente em ambos os meios de cultura utilizados (DRBC e PDA), o cloranfenicol, a qual está referenciada em vários estudos (Fernández et al., 2011; Strateva & Yordanov, 2009). Espécies pertencentes ao género *Penicillium* foram detetadas em trigo e aveia, bem como nas secções de lavagem, sala de pesagem de secos, refrigeração, preparação de fruta e CIP. Tal como seria esperado, este género encontra-se presente em cereais, sendo usualmente considerado uma contaminação resultante do armazenamento (Adams & Moss, 2008; Baptista & Venâncio, 2003; Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 1996). Também por essa razão, a sua presença foi praticamente transversal a toda a unidade industrial por onde passam matérias-primas potencialmente contaminadas por esses fungos filamentosos. Ainda que nas frutas analisadas não tenha sido possível verificar a presença de

espécies pertencentes ao género *Penicillium*, apesar de outros fungos filamentosos estarem presentes, o facto de ter surgido na caracterização do ambiente da sala de preparação de fruta indicia que outras frutas poderão igualmente apresentar este tipo de fungos, facto que se apresenta como bastante provável, dada a presença reconhecida deste género em frutas frescas. Mais especificamente, a espécie *P. glabrum*, detetada em várias secções, é reconhecida pelo seu habitat em frutas e cereais, e, para além disso, em ambientes fechados, como são aqueles onde surgiu (ICMSF, 2006; Lacasse, 1995; Samson et al., 1996).

O género *Cladosporium* foi identificado em trigo, cevada, framboesa e amora. Dado que é associado a frutas frescas e a cereais, decorrente mais especificamente da fase de cultivo, esta é uma presença previsível neste contexto. Para além disso, várias espécies de *Cladosporium*, como *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. macrocarpum* e *C. sphaerospermum* são conhecidas pela sua disseminação por um largo espectro de habitats, destacando-se a presença no solo, em plantas e sementes, bem como no ar (Adams & Moss, 1995; Baptista & Venâncio, 2003; ICMSF, 2006; Lacasse, 1995; Pitt & Hocking, 2009; Samson et al., 1996). Já o surgimento do género *Aspergillus* em trigo indicia uma contaminação que pode ter resultado do armazenamento desta matéria-prima (Adams & Moss, 2008; Baptista & Venâncio, 2003). Este microrganismo é particularmente importante devido à sua produção de aflatoxinas que, em última instância, constituem um risco para a segurança alimentar dos preparados FRULACT. Transversal às fases de cultivo, colheita e armazenamento, o género *Cryptococcus* pode também surgir numa grande variedade de cereais, pelo que a presença em cevada e trigo era relativamente previsível. Para além disso, esta levedura está também muitas vezes associada a frutas frescas processadas, facto que justifica a contaminação detetada em framboesa, amora e mirtilo (Deák, 2008; Oliveira, Zannini, & Arendt, 2014).

Apesar da sua presença estar mais frequentemente associada à contaminação fúngica de cereais durante o cultivo, fungos filamentosos pertencentes ao género *Chaetomium* foram detetados em framboesa. Este facto sugere igualmente um aparecimento nesse fruto durante o cultivo, uma vez que pode provir do solo, tal como acontece na contaminação dos cereais. (Pitt & Hocking, 1997). A espécie *Mucor piriformis*, por ser um fungo filamentoso também associado à contaminação desta tipologia de baga, vê justificada a sua presença em framboesa. Para além disso, de um modo mais geral, todo o género *Mucor* está relacionado com o armazenamento prolongado de cereais, bem como com uma ampla variedade de frutas

(Baptista & Venâncio, 2003; ICMSF, 2006; Pitt & Hocking, 1997; Stelato, Concon, Shimada, & Srebernick, 2010). Ainda na tipologia de bagas, a espécie *Phoma glomerata* foi isolada de uma amostra de amora. Para além disso, é uma espécie que pode igualmente ser encontrada numa vasta gama de substratos ambientais. De salientar a capacidade de fungos filamentosos desta espécie em apresentar patogenicidade para humanos e plantas, o que constitui um fator de especial importância (Samson et al., 1996).

O género *Candida*, incluindo a espécie *Candida sake*, podem surgir em cereais armazenados, ou provir ainda do cultivo, tal como se verifica para espécies de *Pichia*, as quais foram detetadas na sala de preparação de fruta (Baptista & Venâncio, 2003; Oliveira et al., 2014; Stelato et al., 2010). Ainda que não tenham sido detetadas nos cereais analisados, o facto de existir uma variedade elevada de cereais em circulação na unidade industrial poderá explicar o seu surgimento em diversas secções.

A presença da espécie *Phoma pinodella* e do género *Phoma* sp., em secções da unidade industrial de Tortosendo, indiciam uma contaminação pela manipulação de matérias-primas onde essas espécies microbianas estejam presentes - nomeadamente cereais, principalmente, mas também amora, como é sugerido pelo resultado anterior da identificação de *Phoma glomerata* (Tabela 5) (Samson et al., 1996). Ainda assim, é importante salientar a presença destas espécies em zonas onde as condições são particularmente adversas, congelação e CIP, o que por si só é revelador da resistência destes microrganismos. Paralelamente à identificação do género *Phoma*, foi também detetada a espécie *Peyronellaea prosopidis* na secção de CIP. Estes fungos não são frequentemente detetados, não existindo estudos muitos extensivos quanto à sua presença em diferentes substratos. Ainda assim, o facto de esta espécie ter sido já identificada em soja, pode sugerir a propagação por plantas semelhantes, tornando-a uma contaminação provável em indústrias que utilizem matérias-primas pertencentes a esta tipologia (Fernandes, Pereira, Silva, Bento, & Queiroz, 2015). Por último, a espécie *Epicoccum nigrum* é um fungo filamentoso conhecido pela sua distribuição ubíqua, podendo ser encontrada nos mais diversos substratos, nos quais se incluem cartão degradado, que poderá ser a origem da sua presença na sala de pesagem de secos. Todo o género está, para além disso, associado a isolamentos partir de amostras de solo e ar, sendo frequentemente encontrado em alimentos, apesar de não causar deterioração significativa (Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 1996).

4.4 Avaliação da concentração mínima inibitória - *CMi*

Todos os óleos essenciais foram analisados com vista ao estudo do seu potencial antifúngico, avaliando-se, para tal, a concentração mínima inibitória, para concentrações volúmicas de 0,05 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,1 % e 0,2 %, para os microrganismos previamente isolados (subcapítulo 4.3). Dada a quantidade de óleos essenciais, e de culturas microbianas selecionadas, foi necessário proceder à sua seleção prévia a partir da realização de ensaios preliminares (cujos resultados estão igualmente presentes na Tabela 6), pelo que nem todas as combinações óleo essencial - microrganismo foram testadas. Assim, apenas nos casos em que se obteve resultados apelativos para os microrganismos testados inicialmente, se alargou a avaliação das *CMi*s a mais culturas. Os valores de *CMi*s obtidos encontram-se na Tabela 6.

Sendo este estudo realizado previamente à receção dos resultados da identificação por RT-PCR, os microrganismos avaliados para cada composto foram selecionados com base na disponibilidade das culturas puras a cada momento. Ainda assim, para os óleos essenciais com maior potencial foram avaliados todos os fungos isolados, de modo a obter uma maior abrangência da sua eficácia na inibição fúngica. Como termo de comparação, foi também avaliada a *CMi* do sorbato de potássio (E202).

O facto de não serem conhecidas nesta fase as estirpes isoladas, fez com que fossem também estudadas as culturas de *Pseudomonas*, as quais, segundo os dados da Tabela 6, apresentaram uma maior resistência à ação tanto dos óleos essenciais (visível para *Girofle clou*, *Bay* e *Thym*), como do sorbato de potássio (E202). Quanto ao sorbato de potássio (E202), este resultado não foi de encontro ao esperado, uma vez que a sua ação contra fungos se tem revelado inferior à observada para bactérias. No caso específico de *Pseudomonas*, Stanojevic, Comic, Stefanovic e Solujic-Sukdolak (2009), obtiveram uma *CMi* inferior à obtida para espécies de *Aspergillus* e *Candida*, o que contraria os resultados do presente projeto. Ainda assim, pelo facto de serem conhecidos casos de resistência de estirpes de *Pseudomonas*, para concentrações entre 0,01 % e 0,3 %, os resultados obtidos podem refletir essa realidade (Lund, Baird-Parker, & Gould, 2000; Mendonca, 1992; Stanojevic et al., 2009; Tarté, 2009). Para o género *Penicillium* sp. (8A) e para *Pseudomonas* sp não se observou inibição pelo sorbato de potássio (E202) em nenhuma das concentrações testadas. De facto, para o ácido sórbico e seus sais, a resistência de algumas espécies pertencentes ao género *Penicillium* é acentuada, podendo ter-se refletido nos valores apresentados (Lund et al., 2000).

Tabela 6 – *C/Ms*, em concentrações volúmicas (%), obtidas para os óleos essenciais analisados e para o sorbato de potássio (E202)
(Continua)

	<i>Romarin</i>	<i>Cardamome</i>	<i>Peppermint</i>	<i>Corriant</i>	<i>Fennel</i>	<i>Anise</i>	<i>Girofle clou</i>	<i>Bay</i>	<i>Thym</i>	<i>Mandarine verte</i>	<i>Pamplemousse</i>	<i>Mandarine rouge</i>	<i>Citron</i>	<i>Orange douce</i>	Sorbato de potássio, E202	
Fungos filamentosos	<i>Penicillium</i> sp. [1]	X	X	X	X	X	0,1	0,07	0,08	X	X	X	X	X		
	<i>Cladosporium</i> sp. [2]	X	X	0,2	X	X	X	0,05	0,07	0,07	X	X	X	X	0,05	
	[4]	X	X	X	X	X	X	X	0,1	X	X	X	X	X		
	<i>Penicillium</i> sp. [5]	X	X	X	X	X	X	0,1	X	X	X	X	X	X		
	<i>Aspergillus</i> sp. [7]			X	X	X		0,05	0,05	0,05					0,05	
	<i>Aspergillus</i> sp.: [8] <i>A. chevalieri</i> , <i>A. amstelodami</i> , <i>A. hetrocaryoticus</i>			0,2	0,2	0,2		0,07	0,05	0,1						
	<i>Chaetomium</i> sp.: [15] <i>C. pratense</i> , <i>C. fruticola</i> , <i>C. indicum</i>	X	X	0,07	0,05	X	0,2	0,05	0,1	0,05	X	X	X	X	X	0,05
	<i>Mucor piriformis</i> [17]	X	X	0,2	0,2	X	X	0,05	0,05	0,05	X	X	X	X	X	0,1
	<i>Phoma glomerata</i> [19]	X	X	X	X	X	X	0,08	0,2	X	X	X	X	X	X	0,1
	<i>Phoma pinodella</i> [6.A]							0,05	0,05	0,07						0,2
	<i>Phoma</i> sp.; <i>Peyronellaea prosopis</i> [7.A]							0,05	0,07	0,05						

Tabela 6 - (Continuação)

		<i>Romarin</i>	<i>Cardamome</i>	<i>Peppermint</i>	<i>Cornmint</i>	<i>Fennel</i>	<i>Anise</i>	<i>Girofle clou</i>	<i>Bay</i>	<i>Thym</i>	<i>Mandarine verte</i>	<i>Pamplemousse</i>	<i>Mandarine rouge</i>	<i>Citron</i>	<i>Orange douce</i>	Sorbato de potássio, E202
Fungos filamentosos	<i>Penicillium</i> sp.: [8.A] <i>P. spinulosum</i> , <i>P. glabrum</i>							0,08	X	X						X
	<i>Epicoccum nigrum</i> [9.A]							0,05	0,05	0,05						0,05
	<i>Penicillium</i> sp. [11.A]							0,05	0,1	0,1						
Leveduras	[6]							<u>0,05</u>	0,05	0,05						
	<i>Cryptococcus</i> sp. [10]	X	X					<u>0,05</u>	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>						0,05
	<i>Candida sake</i> [1.A]							<u>0,05</u>	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>						0,05
	<i>Pischia</i> sp. [3.A]							<u>0,07</u>	<u>0,2</u>	<u>0,05</u>						
	[4.A]							<u>0,05</u>	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>						
Bactérias	<i>Pseudomonas</i> sp. [11]	X	X					X	<u>0,2</u>	X						X
	<i>Pseudomonas</i> sp. [14]	X	X					X	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>						X

Nota: X - não houve inibição; S - inibição a partir do 3º dia.

Para alguns dos restantes fungos, a inibição pelo sorbato de potássio (E202) foi significativa, tendo-se verificado na menor concentração testada, 0,05 %, para as culturas de *Aspergillus*, *Candida sake*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cryptococcus* e *Epicoccum nigrum*. Este facto revela a elevada eficácia deste composto no controlo do crescimento fúngico, mesmo numa concentração correspondente a metade da aplicada nos preparados FRULACT. Nos fungos filamentosos das espécies *Mucor piriformis* e *Phoma pinodella* os resultados mostraram um maior efeito inibitório por parte dos óleos essenciais com maior potencial fungistático comparativamente ao do sorbato de potássio (E202). Estes dados sustentam a substituição do antimicrobiano atualmente utilizado e refletem a ação dos óleos essenciais de *Girofle clou*, *Bay* e *Thym* contra o desenvolvimento de contaminações fúngicas. Quanto à atividade do sorbato de potássio (E202) contra *Phoma glomerata*, verificou-se o comportamento seguido também pelos óleos essenciais, os quais apresentaram valores de *CMI* superiores, observando-se que o óleo essencial de *Thym* não foi capaz de inibir este fungo filamentoso na maior concentração analisada, 0,2 %.

De facto, os resultados da Tabela 6, permitem constatar que o efeito fungistático dos óleos essenciais de *Girofle clou*, *Bay* e *Thym* foi significativamente superior ao dos restantes óleos testados, para os quais se verificou uma total ausência de inibição de alguns microrganismos. Assim, importa referir algumas especificações destes óleos essenciais. Segundo as respetivas fichas técnicas, foram obtidos por destilação com vapor, provindo: (1) *Girofle clou* da flor de *Syzygium aromaticum* L. syn. *Eugenia caryophyllus*; (2) *Bay* de folhas de *Pimenta racemosa*; e (3) *Thym* de *Thymus zygis*. Os óleos essenciais de *Romarin*, *Cardamome*, *Mandarine verte*, *Pamplemousse*, *Mandarine rouge*, *Citron* e *Orange douce* não apresentaram nenhum indício de inibição fúngica para as concentrações aplicadas, o que demonstra o seu baixo poder antimicrobiano, tornando-os compostos de uso improvável do ponto de vista da conservação alimentar. De um modo semelhante, *Peppermint*, *Cornmint*, *Fennel* e *Anise*, revelaram uma ação bastante reduzida para os microrganismos testados, sendo que nos casos em que houve inibição esta ocorreu quase na totalidade para valores de *CMI* correspondentes ao máximo testado, 0,2 %. Os resultados de *Peppermint* e *Cornmint* para o género *Chaetomium* sp., apesar de positivos, por serem dissonantes face às restantes estirpes estudadas não são suficientes para a indicação de uma boa eficácia na inibição fúngica.

Destes óleos essenciais, é reconhecido que *Mandarin*, *Anise*, *Orange*, *Rosemary* e *Peppermint* inibem espécies pertencentes aos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*, facto que não foi

presentemente confirmado (Guynot et al., 2003). De facto, para esses géneros, apenas *Peppermint* inibiu o crescimento do género *Aspergillus* sp. (*A. chevalieri*, *A. amstelodami* e *A. heterocaryoticus*), tendo esta ação apenas ocorrido para a maior concentração aplicada. Importa igualmente analisar os resultados obtidos em função da resistência dos fungos à ação dos óleos essenciais. As culturas de *Aspergillus* (*A. chevalieri*, *A. amstelodami* e *A. heterocaryoticus*), *Chaetomiun* (*C. pratense*, *C. fruticola* e *C. indicum*), *Mucor piriformis* e *Cladosporium* apresentaram uma menor resistência, tendo inclusivamente sido inibidos por óleos essenciais com poder fungistático limitado. Em sentido contrário, as culturas 4, *Penicillium* sp (9 e 8A) e *Phoma glomerata* são os casos em que se verificou uma menor ação inibitória por parte dos óleos essenciais testados. Para estes fungos, mesmos os óleos essenciais que demonstraram melhor desempenho na inibição, foram, em alguns casos, incapazes de afetar de forma visível o seu desenvolvimento.

O óleo essencial de *Girofle clou*, vulgarmente conhecido como essência de cravinho, apresentou uma inibição da quase totalidade dos fungos, tendo sido o óleo essencial com melhores resultados (Tabela 6). É reconhecido que a atividade antimicrobiana deste óleo essencial se deve em grande parte à elevada concentração de um terpeno, o eugenol (que tem sido encontrada na composição do óleo essencial entre 75 % e 85 %), estando documentada a sua ação, não só contra fungos, como também contra bactérias (Burt, 2004; Cowan, 1999; Ohlsson & Bengtsson, 2002). Ainda assim, como referido anteriormente, não se observou inibição das culturas de *Pseudomonas*, nas concentrações de óleo essencial aplicadas (Tabela 6). Contudo, este resultado contraria o obtido em Mith et al. (2014), cujos ensaios evidenciaram a inibição da espécie *Pseudomonas fluorescens* a uma concentração de 0,15 % do óleo essencial. Hyldgaard et al. (2014), graças à aplicação do composto eugenol, detetou inibição a 0,1 % da mesma espécie bacteriana. Como já referido, estas diferenças podem dever-se aos diferentes métodos de extração utilizados, zonas de cultivo e ambiente de crescimento da planta. De referir, também, que para o fungo 4 não houve inibição, contudo, pelo facto de não ter sido identificado por RT-PCR, não é possível analisar detalhadamente este resultado. A *CMI* mais elevada para este óleo essencial observou-se contra o género *Penicillium* (números 1 e 9). Abbaszadeh et al. (2014) e Souza et al. (2005) reportaram a ação inibitória do eugenol contra espécies de *Penicillium*. No primeiro estudo, os dados mostraram *CMIs* para *P. citrinum* e *P. chrysogenum*, semelhantes às obtidas para as culturas dos géneros *Aspergillus* e *Cladosporium*, corroborado pelos resultados obtidos para as

espécies pertencentes ao género *Penicillium* - identificadas como 8.A e 11.A (Abbaszadeh et al., 2014). Este facto pode indicar que, dentro de um mesmo género, a suscetibilidade à ação de um óleo essencial varia significativamente, devendo, por isso, estudar-se, tanto quanto possível, espécies isoladas.

Neste estudo, culturas de *Aspergillus* e *Candida sake* foram inibidas a valores de *CMI* baixos (entre 0,05 % e 0,07 %). Tal como reportado em Fu et al. (2007), o óleo essencial de cravinho apresenta atividade antimicrobiana para fungos dos mesmos géneros, pelo que estes resultados vão ao encontro das expectativas iniciais. De um modo mais particular, para *Candida albicans* está reportado um valor de *CMI* de 0,13 %, para o mesmo óleo essencial, o qual é bastante inferior ao obtido presentemente para *Candida sake* (0,05 %), iniciando que, dentro do mesmo género, esta espécie é mais suscetível à inibição (Hammer, Carson, & Riley, 1999). Resultados do efeito do óleo de cravinho para as espécies *A. niger* e *A. flavus*, mostraram inibição para uma concentração de 0,033 %, substancialmente inferior à obtida nesta análise. (Martos, Navajas, López, & Álvarez, 2007). Para além disso, o eugenol também inibe espécies de *Aspergillus*, o que poderá justificar a atividade do óleo essencial, ainda que se saiba que ação total resulta sempre da interação entre todos os componentes, maioritários e minoritários (Abbaszadeh et al., 2014; Hyldgaard et al., 2014).

Analisando comparativamente as *CMIs* de *Girofle clou* e do sorbato de potássio (E202), observa-se que o conservante empegue nos preparados FRULACT apresentou valores de concentração superiores para *P. spinulosum*/*P. glabrum*, *Mucor piriformis*, *Phoma glomerata* e *Phoma pinodella*. E, nos restantes fungos analisados, as *CMIs* obtidas foram iguais em ambos os casos, resultados estes que sugerem um elevado desempenho do óleo de *Girofle clou* no controlo do desenvolvimento da carga fúngica, em condições laboratoriais, tornando-o numa alternativa com potencial de aplicação. Ainda assim, são necessários estudos extensivos que atestem e alarguem o espectro de ação do óleo essencial.

A avaliação das *CMIs* de *Bay* para as culturas fúngicas selecionadas revelou o seu potencial fungistático em alguns casos. Contudo, de acordo com os resultados presentes na Tabela 6, para o género *Penicillium* sp. (9 e 8.A) não houve inibição nas concentrações estudadas, facto que representa uma desvantagem face aos resultados de *Girofle clou*. O principal componente deste óleo essencial é, segundo a respetiva ficha técnica, o eugenol (49,66 %), estando, contudo, presente em quantidade inferior à que deverá existir no utilizado *Girofle clou*. Para

além deste componente, 1,8-cineol e linalool completam, de acordo com vários estudos, os compostos tidos como ativos neste óleo essencial (Guynot et al., 2003; Ivanovic, Misic, Ristic, Pesic, & Zizovic, 2010; Ohlsson & Bengtsson, 2002; Suhr & Nielsen, 2003). Esta diferença, no teor de eugenol, poderá justificar a discrepância nos valores de *CMI* obtidos para os óleos essenciais de *Baye Girofle clou*, o que uma vez mais atesta o efeito que todos os compostos presentes têm nas características dos óleos essenciais, mais especificamente ao nível da sua ação antifúngica. O valor da *CMI* obtido para a espécie *Candida sake* (0,05 %, de forma parcial, apenas a partir do 3º dia) pode ser equiparado ao presente em Hammer, Carson e Riley (1999) onde, para a espécie *Candida albicans*, foi obtido um valor de 0,06 % - sendo, em ambos os casos, um bom indicador da eficácia deste óleo essencial para espécies deste género de levedura. A inibição de *Bay* em fungos filamentosos dos géneros *Penicillium* (Tabela 6: 1 e 11.A) e *Aspergillus* foi observada para concentrações entre 0,05 % e 0,1 %, o que vai ao encontro de dados semelhantes, onde se detetou a inibição fúngica de espécies de espécies pertencentes a esses géneros (Guynot et al., 2003; Suhr & Nielsen, 2003).

Comparando com a ação do sorbato de potássio (E202), observou-se que a inibição por *Bay* ocorreu para valores de concentração inferiores ao do conservante sintético em análise, para as espécies *Mucor piriformis*, *Phoma pinodella* e o género *Pseudomonas* sp. Contrariamente, para as culturas de *Chaetomium*, *Phoma glomerata* e *Cladosporium* a *CMI* do óleo essencial foi superior.

Os resultados da inibição fúngica de *Thym* foram bastante semelhantes aos de *Girofle clou* e *Bay*. Tal como este último, o óleo essencial de *Thym* não inibiu os fungos filamentosos pertencentes ao género *Penicillium* sp. (Tabela 6: 9 e 8.A) e, para além disso, não inibiu igualmente a espécie *Phoma glomerata*, o fungo filamentoso 4 e as culturas de *Pseudomonas*. De facto, este foi, de entre os óleos essenciais que apresentaram maior potencial (*Girofle clou*, *Baye Thym*), aquele que não atuou sobre um número de fungos mais elevado.

Para o género *Pseudomonas* sp., *Thym* apresentou inibição a 0,2 %, ou nenhuma inibição. Este facto está de acordo com os resultados de Mith et al., 2014, em que a *CMI* obtida para a inibição de uma espécie do mesmo género (*P. fluorescens*), foi superior a 0,1 %. No caso do estudo individual do timol, composto mais abundante (47,90 %) no óleo essencial de *Thym* - proveniente da planta *Thymus zygis* - de acordo com a respetiva ficha técnica e consensual entre vários estudos, a inibição da mesma espécie foi conseguida para 0,1 % - o que pode

indiciar que os restantes compostos deste óleo essencial não atuam sinergicamente na ação antimicrobiana (Burt, 2004; Hyldgaard et al., 2014; Pina-Vaz et al., 2004).

A capacidade de *Thym* para inibir espécies dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, nomeadamente *A. flavus*, *A. niger* e *P. caryophilum* e *P. roqueforti* é reconhecida, ainda que esse facto não tenha sido completamente demonstrado nos resultados obtidos (Tabela 6) (Guynot et al., 2003; Suhr & Nielsen, 2003). Para as espécies de *Aspergillus* anteriormente mencionadas, foram obtidas *CMIs* próximas de 0,04 %, valor que se aproxima de 0,05 %, valor avaliado para o género *Aspergillus* sp. (Tabela 6: 7) (Martos et al., 2007). Para um estudo contemplando um conjunto mais alargado de espécies de *Aspergillus*, as *CMIs* variaram entre 0,016 % e 0,032 %, o que revela de forma mais evidente a eficácia deste óleo essencial contra estes fungos filamentosos (Pinto et al., 2006). Ainda assim, é de salientar que o timol tem sido referido como um inibidor menos eficaz para espécies pertencentes ao género *Penicillium*, comparativamente a *Aspergillus* e *Cladosporium*, sendo este último o género com menor *CMI* (Abbaszadeh et al., 2014). Este facto vai ao encontro dos resultados do presente estudo, em que para o género *Cladosporium* sp., *Thym* teve uma *CMI* de 0,07 % e, para os restantes fungos, valores superiores, o que mostra uma forte correlação entre o efeito do timol e do óleo essencial como um todo. No estudo de Klaric, Kosalec, Mastelic, Pieckova e Pepeljnak (2006) acerca da atividade antifúngica de *Thym* foram também obtidas *CMIs* superiores para o género *Penicillium* sp. às das culturas de *Aspergillus* e *Cladosporium*. Para além disso, no mesmo trabalho, *Mucor* spp. foi, de entre os fungos analisados, o caso em que a inibição ocorreu para valores mais elevados de concentração do óleo essencial (Klaric et al., 2006). Este resultado não é confirmado no presente estudo, em que se avaliou que o crescimento de *Mucor piriformis* foi inibido na menor *CMI* avaliada, 0,05 %.

Para a levedura *Candida sake* foi detetada inibição a 0,05 %, que, dado ser a menor concentração aplicada, vai ao encontro do resultado obtido por Hammer et al. (1999) para o óleo essencial de *Thymus vulgaricus*, 0,03 %, desta feita para *Candida albicans* e dos resultados para várias espécies de *Candida*, cujos valores de *CMI* variaram entre 0,032 % e 0,064 % (Pinto et al., 2006).

Relativamente aos resultados obtidos para o sorbato de potássio (E202), *Thym* apresentou menor inibição - maior *CMI* -, para o género *Cladosporium* sp. Para além disso, nos casos das culturas de *Phoma glomerata* e *Penicillium* (*P. spinulosum* e *P. glabrum*), em que *Thym* não

mostrou efeito inibitório, o sorbato de potássio (E202) apenas conseguiu impedir o desenvolvimento fúngico para o primeiro caso. Ainda assim, é de notar que para *Mucor piriformis* e *Phoma pinodella* se obteve uma *CMI* inferior à do sorbato de potássio (E202). De facto, esta foi uma tendência observada para os três óleos essenciais com maior poder fungistático - *Girofle clou*, *Baye Thym* -, o que revela de forma particular a baixa eficácia deste conservante sintético contra estas duas espécies.

Seguindo a metodologia descrita no subcapítulo 3.5, não se detetou a presença de nenhuma contaminação fúngica dos óleos essenciais de *Girofle clou*, *Baye Thym*. Apesar de poder existir uma presença abaixo do limite de deteção, a mesma não é expectável, dado o efeito inibitório verificado sobre a vasta gama de fungos testados durante a avaliação da *CMI*. Assim, pode considerar-se que os óleos essenciais utilizados durante todas as fases posteriores do projeto não apresentam carga fúngica detetável, não constituindo este um fator influenciador dos resultados.

4.5 Estudo do efeito nas culturas lácticas

Por forma a avaliar possíveis influências dos óleos essenciais na matriz láctea onde os preparados são introduzidos, era forçoso estudar a evolução das culturas lácteas presentes no iogurte - *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* - na presença desses compostos.

A análise das culturas lácticas mostrou que a presença da espécie *L. bulgaricus* não foi detetada em nenhum momento. De facto, nem mesmo na análise das amostras correspondentes ao branco - às quais não foi feita nenhuma adição de óleo essencial e que consistiram, em cada momento de análise, na abertura de uma nova embalagem de iogurte intacta -, se verificou a presença desta cultura. Este facto pode indiciar, por um lado, a necessidade de otimizar a metodologia utilizada para a quantificação da cultura, ou, por outro, uma carga muito reduzida, inclusivamente abaixo do limite de deteção, cujo valor de $\lg(\text{UFC/g})$ é 3. Como a legislação apenas define a quantidade mínima total de bactérias lácticas presentes em iogurte, não existe uma evidência para a proporção em que as duas culturas, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, devem estar presentes no iogurte, pelo que o facto de existir uma carga reduzida de *L. bulgaricus*, não é obrigatoriamente indicativo de um desvio às normas estabelecidas (Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992). Contudo,

é conhecido que, por forma a obter iogurtes com o sabor apropriado, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* devem estar presentes em proporções entre 1:1 e 1:3, o que contraria uma presença tão reduzida de *L. bulgaricus* (Pesic-Mikulec & Niketic, 2009). O efeito do armazenamento na viabilidade de *L. bulgaricus* não é consensual. De facto, existem estudos que mostram que o armazenamento de iogurtes com as duas culturas *starter* não afeta a sua viabilidade, pelo menos durante um período de 35 dias, o que poderia excluir este fator como originário da baixa quantificação da cultura de *L. bulgaricus* (Mani-López, Palou, & López-Malo, 2014). Contudo, Lourens-Hattingh e Viljoen (2011) referem uma perda de viabilidade acentuada de *Lactobacillus* sob condições de refrigeração, devido à redução dos valores de pH, resultante da manutenção da atividade das restantes bactérias lácticas presentes, ainda que de forma reduzida, após o final da fermentação (Lacasse, 1995).

No que respeita à metodologia utilizada, a temperatura de incubação pode ser um dos fatores que impedem que as culturas lácteas se desenvolvam. Na verdade, para esta cultura, está usualmente reportada uma temperatura de 45 °C, em detrimento dos 30 °C presentemente utilizados (Dave & Shah, 1996). Ainda assim, a ISO 7889:2003 refere uma temperatura de incubação de 37 °C, que se encontra mais próxima da utilizada e mostra que este é um fator cuja influência seria pertinente avaliar de modo mais exaustivo, uma vez que a mesma norma refere também essa temperatura para a incubação de *S. thermophilus*, o que não demonstrou, neste estudo, ter limitado a quantificação destas culturas (ISO and IDF, 2003). Para além disso, o pH do meio de cultura utilizado - MRS agar - pode ser igualmente determinante. Este meio apresenta um pH de $6,2 \pm 0,2$, estando distante das condições referidas por Tharmaraj & Shah (2003), em que a incubação de *L. bulgaricus* se mostrou eficaz, na utilização do mesmo meio, para valores de pH de 4,58 e 5,2.

Como referido anteriormente, as amostras foram analisadas ao longo de 28 dias, pelo que o efeito da presença dos óleos essenciais em diferentes concentrações volúmicas foi comparado com uma amostra sem qualquer adição, que constituiu o branco. Os resultados da carga microbiológica, referente apenas às culturas de *S. thermophilus*, das diferentes amostras de iogurte analisadas, encontram-se apresentados na Figura 8, na qual consta igualmente o limite de deteção respetivo - carga de 3, em termos de $\lg(\text{UFC}/\text{g})$ -, de acordo com o procedimento adotado (descrito no subcapítulo 3.6).

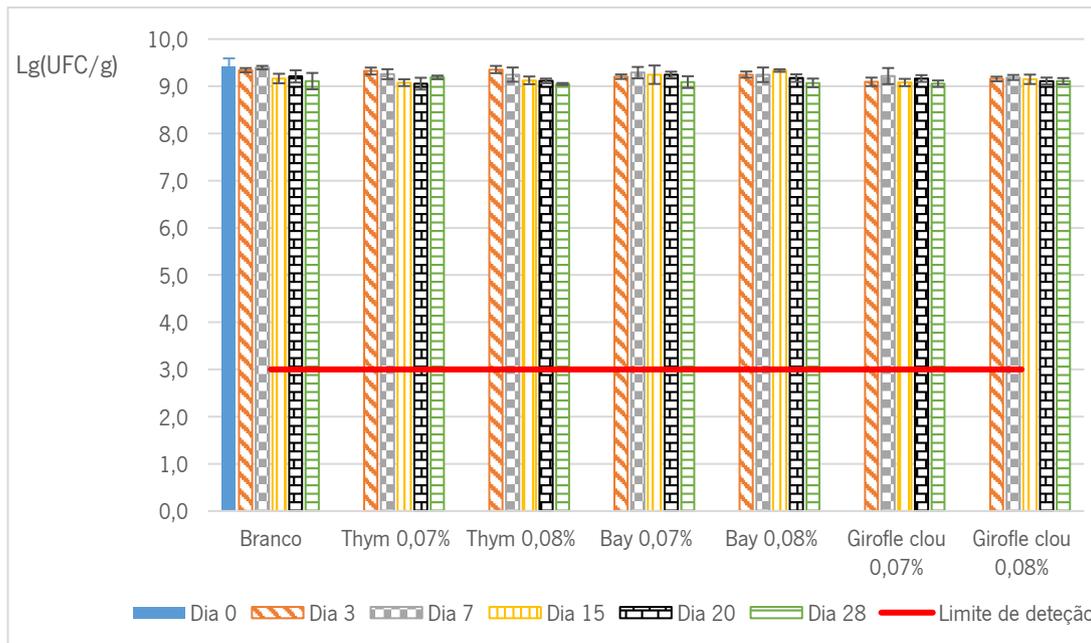


Figura 8 - Evolução do efeito da presença dos óleos essenciais de *Thym*, *Baye Girofle clou* (a 0,07 % e a 0,08 %) nas culturas de *S. thermophilus*.

Pela análise gráfica (Figura 8), foi possível verificar que nenhum dos óleos essenciais testados afetou as culturas de *S. thermophilus*. De facto, para todos os pares óleo essencial/concentração, os valores de lg(UFC/g) mantiveram-se acima de 9, o que assegura o cumprimento das exigências legais, cuja especificação para a flora específica do iogurte é de que seja superior a 5×10^7 colónias/cm³ (aproximadamente 5×10^7 UFC/g), ao longo de todo o tempo de vida do produto (Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992). Uma vez que, tal como referido anteriormente, não existe referência à proporção de cada uma das estirpes da flora específica, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, considera-se que é cumprido este requisito.

Relativamente à análise da carga fúngica, esta não foi detetada nas análises realizadas até ao dia 15, pelo que são apenas apresentados os resultados posteriores a esse momento (Figura 9).

É de assinalar que o branco não apresentou em nenhum dos dias analisados a presença de fungos, facto que deverá estar fortemente relacionado com a metodologia utilizada, que consistiu na análise desta amostra pela abertura, em cada um dos dias, de uma nova embalagem de iogurte sob condições de assepsia. Este resultado indicia que os fungos presentes nos frascos submetidos a dosificação dos óleos essenciais em estudo, resultaram

de contaminações ambientais, ocorridas durante a preparação dos fracos das amostras, a qual não foi realizada em condições de assepsia, de modo a avaliar o efeito que a exposição a um ambiente não controlado teria nos produtos analisados. Ainda assim, a contaminação fúngica ocorreu, quase na sua totalidade, em valores abaixo do limite de detecção, sendo esta tendência uma constante se se considerar individualmente cada grupo de fungos. É de assinalar, ainda assim, a predominância de leveduras face aos fungos filamentosos, sendo esta realidade reflexo das condições do iogurte serem particularmente favoráveis ao desenvolvimento desses microrganismos (Pitt & Hocking, 2009).

Os resultados apresentados na Figura 9 refletem a quantificação distinta de fungos filamentosos e leveduras, sendo igualmente apresentado o limite de detecção da metodologia adotada (ver subcapítulo 3.6), em que $\lg(\text{UFC/g})$ é 2.

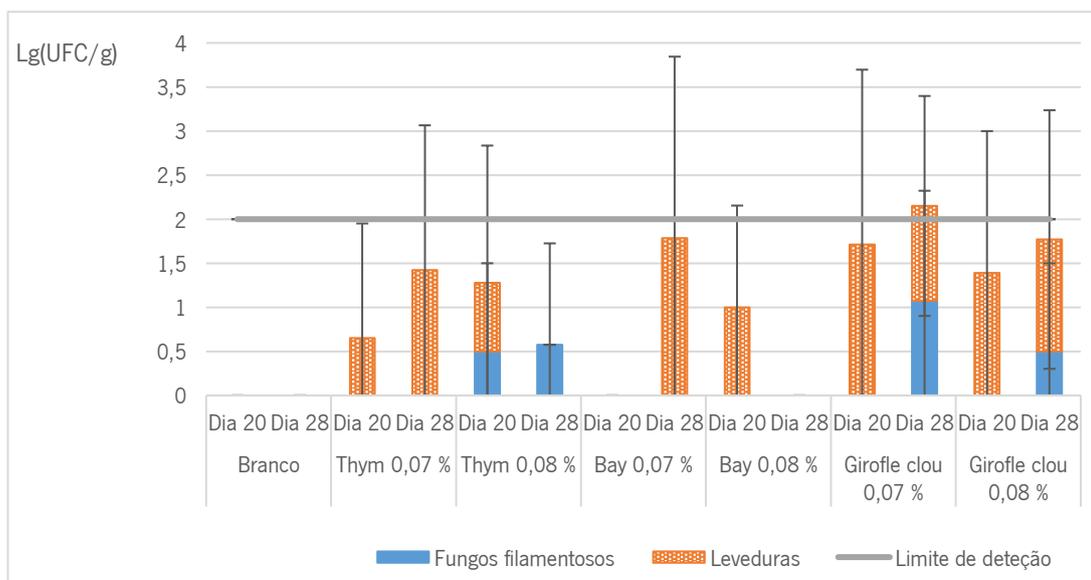


Figura 9 – Evolução da carga fúngica associada ao estudo do efeito dos óleos essenciais de *Thym*, *Baye* *Girofle clou* (a 0,07 % e a 0,08 %) nas culturas lácticas.

A baixa representatividade destes resultados, por não corresponderem a uma presença de microrganismos efetivamente detetável, inviabiliza uma análise mais exaustiva deste estudo. Contudo, pode observar-se que, de um modo geral, o aumento da concentração dos óleos essenciais se traduziu numa redução da carga fúngica, o que indicia uma vez mais a sua ação antimicrobiana. No caso dos óleos essenciais de *Bay* e *Thym*, essa influência só foi efetivamente detetada a partir do dia 28, o que indicia um efeito retardado da ação destes

óleos. De facto, apenas a partir desse momento, para a concentração de 0,08 %, se observou uma diminuição da carga fúngica, contrariamente ao verificado para os mesmos compostos na concentração de 0,07 %. Importa também referir que na presença de *Girofle clou*, o desenvolvimento de fungos foi mais acentuado, estando inclusivamente acima do limite de deteção no dia 28, a 0,07 %. O facto dos valores apresentados se deverem em grande parte à presença de leveduras poderia ser associado à deterioração do iogurte, contudo, dado que tal presença não se verificou em nenhum momento na análise do branco, este não deverá ser um fator justificativo e, assim sendo, é indicativo de uma possível baixa eficácia de *Girofle clou* no controlo da carga fúngica. A impossibilidade de realizar análises durante um período que não exceda o prazo de validade dos iogurtes utilizados, pode ter condicionado em todos os estudos a quantidade de leveduras presentes nesse produto, dado que estes microrganismos são os principais responsáveis pela deterioração ao longo do tempo. Este dado é importante mesmo tendo em conta os dados do branco, que não mostraram qualquer indício da presença de nenhum fungo, pela diferença já referida nas condições a que foram expostas as diferentes amostras. Assim, comprova-se que a contaminação existente nas amostras com óleos essenciais proveio do meio envolvente, como resultado da sua manipulação.

4.6 Elaboração de preparados – análises sensoriais

As análises organoléticas iniciaram-se com a elaboração de preparados com diferentes óleos essenciais, com uma concentração mássica de 0,07 %. Por um lado, foi escolhida esta percentagem dado que a diferença entre esta concentração e 0,08 %, também em termos mássicos, não se mostrou significativa em nenhuma das etapas anteriores e, por outro, o perfil organolético conduziu a uma melhor aceitação por parte dos provadores. Os óleos essenciais utilizados foram, então, *Girofle clou*, *Baye Thym*.

4.6.1 1ª Fase

De um modo geral, foi considerado pelos provadores que o PC apresentava um perfil organolético mais marcado devido à presença dos óleos essenciais. Contudo, para que fosse possível manter a análise dos dois preparados até ao final do projeto, foi selecionado - com base nas opiniões dos provadores desta fase -, o óleo essencial com maior potencial de

aceitação no presente preparado. Assim, dado que foi unânime a preferência pelo PC com *Girofle clou*, optou-se por seguir com esta combinação. Importa também referir que para a maioria dos provadores a pior combinação foi aquela em que estava presente o óleo essencial de *Bay*. De igual forma, para o PFB foi também referido pela quase totalidade dos provadores que a presença de *Bay* alterava fortemente as características organoléticas do produto, pelo que este óleo essencial foi descartado nas fases posteriores. Ainda para o PFB, o óleo essencial que, de forma mais abrangente, provocou alterações organoléticas menos assinaláveis foi o *Thym*, pelo que esta combinação foi também utilizada nas restantes fases das análises sensoriais.

De salientar que em todos os casos a dosificação dos preparados em iogurte se traduziu numa maior aproximação das amostras com óleo essencial às amostras-padrão - com sorbato de potássio (E202). De facto, a dosificação do preparado em iogurte consiste na sua diluição na matriz, pelo que o perfil organolético é amenizado.

4.6.2 2ª Fase

Nesta fase foi pedido aos provadores que preenchessem uma ficha de análise sensorial semelhante ao exemplo constante em anexo (Anexo A). Pelo facto de os provadores não serem especificamente treinados, os resultados foram bastante dissonantes em alguns casos. Contudo, sendo esta metodologia seguida na empresa, optou-se por tirar o melhor partido das informações recolhidas. Ainda assim, devido a essa questão, os resultados não foram apresentados sob a forma de médias, mas sim discriminados na sua totalidade (Tabela 7 e Tabela 8). Como explicado anteriormente, as combinações utilizadas nesta fase foram *Girofle clou* e *Thym*, para PC e PFB, respetivamente. Para ambos os casos, tal como na fase anterior (subcapítulo 4.6.2), foram analisados tanto os preparados como os iogurtes dosificados. Os resultados apresentados refletem a distância em termos dos parâmetros descritores selecionados dos produtos em causa relativamente ao padrão.

Os dados da Tabela 7, referentes à análise sensorial do PC, comprovam que a disparidade dos resultados impossibilita uma análise mais detalhada, sendo, ainda assim, de assinalar alguns aspetos importantes. Tal como na fase anterior (subcapítulo 4.6.1), destaca-se a diminuição das diferenças observadas em todos os parâmetros quando o preparado foi

dosificado em iogurte. Para além disso, a característica que, de um modo geral, foi menos distinguida foi a adstringência. Apesar de este parâmetro ter sido descrito em ensaios laboratoriais realizados internamente pela empresa, tal não se verificou de forma significativa nos óleos essenciais testados neste estudo. Em sentido contrário, o sabor geral, apresentou-se como o principal parâmetro destacado durante a prova, apresentando valores próximos do máximo considerado, 7,1 cm.

Tabela 7 – Resultados das análises sensoriais realizadas ao preparado de cereais (PC) com óleo essencial de *Girofle clou*, a 0,07 %

Provador	<i>Girofle clou</i> em PC				<i>Girofle clou</i> em PC no iogurte			
	Acidez	Doçura	Adstringência	Sabor	Acidez	Doçura	Adstringência	Sabor
1	2,2	1,7	0	4,8	1	0	0	1,1
2	1,9	-2,4	5,2	2	0	0	0	1
3	0	0	0	1,9	0	0,4	0	0
4	-2,3	-2,3	0	5,7	0	1,7	1,7	2,6
5	0	0	3,2	5,8	0,9	0	0	1
6	0,4	-1,4	0,8	6,2	0,8	-1	0,3	0,4
7	5,6	0	0	5,3	0	0	0	5

Nota: todos os valores apresentados estão em centímetros (cm), com um erro de medição 0,1 cm, numa escala de 0 cm a 7,1 cm. Os valores positivos revelam um incremento no parâmetro descritor e os negativos um decréscimo.

Tal como para o PC, na Tabela 8 encontram-se apresentados os dados da análise sensorial do PFB, efetuada igualmente segundo o exemplo de ficha presente em anexo (Anexo A).

Tabela 8 – Resultados das análises sensoriais ao preparado de frutos do bosque (PFB) com óleo essencial de *Thym*, a 0,07 %

Provador	<i>Thym</i> em PFB				<i>Thym</i> em PFB no iogurte			
	Acidez	Doçura	Adstringência	Sabor	Acidez	Doçura	Adstringência	Sabor
1	1,1	1,2	0	0,5	0	0	0	0,2
2	0	1,1	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	7,1	0	0	0	7,1
4	1,1	0,3	0	6,7	0	0,3	1,7	0,9
5	0	0	0	5,9	0,8	0	0	1,5
6	1,7	-4,2	4,8	6,4	0,5	-0,5	1,4	2,1
7	0	0	0	6,7	0	0	0	0

Nota: todos os valores apresentados estão em centímetros (cm), com um erro de medição de 0,1 cm, numa escala de 0 a 7,1 cm. Os valores positivos revelam um incremento no parâmetro descritor e os negativos um decréscimo.

Os resultados da presença de *Thym* no PFB seguiram a tendência apresentada para *Girofle clou* em PC, ainda que em todos os casos as diferenças observadas tenham sido inferiores, tanto para o preparado em si, como para este dosificado em iogurte. Assim, a adstringência e o sabor geral foram os parâmetros mais e menos destacados, respetivamente. De salientar que foi unânime que a presença de iogurte desacentuou as diferenças assinaladas pelos provadores.

As observações efetuadas durante ambas as provas deveram-se essencialmente ao sabor conferido pelos óleos essenciais, tendo sido referido um aumento da amargura com a presença de *Girofle clou* no PC, o qual foi desacentuado aquando da prova em iogurte, bem como o sabor geral associado a cada um dos óleos.

4.6.3 3ª Fase

A 3ª fase consistiu na análise triangular dos preparados analisados anteriormente: *Girofle clou* para o PC e *Thym* para o PFB. Neste caso, apenas foi realizada a prova das amostras em iogurte, dado que esta matriz é a usualmente utilizada para a aplicação dos preparados FRULACT. Previamente, procedeu-se à otimização do perfil aromático do PC na presença do óleo essencial. Para tal, foram testados diferentes aromas, de forma a seleccionar uma alternativa que conduzisse a diferenças organoléticas menos significativas, aquando da dosificação do PC em iogurte. Encontrada uma formulação adequada ao presente estudo, prosseguiu-se para as análises triangulares, decorridas tendo por base o exemplo presente em anexo (Anexo B). Os resultados mostraram que 19 provadores acertaram na prova do PC e 15 na do PFB. Isto significa que nenhum dos preparados foi aceite, dado que, assim sendo, a diferença se considera perceptível, com um intervalo de confiança de 80 % - o que acontece caso se verifique uma resposta correta por parte de, pelo menos, 13 pessoas.

Ainda assim, importa destacar algumas das observações feitas pelos provadores. Aproximadamente 33 % das pessoas referiram que o PC com *Girofle clou* apresentava características como “mais fresco”, “mais condimentado” e um “sabor mais intenso”. Estas indicações são uma mais-valia, dado que ainda que o preparado apresente diferenças significativas face ao padrão, as mesmas não são necessariamente negativas - aliás as

observações feitas sugerem precisamente o contrário. No caso do PFB, 30 % dos provadores afirmaram diferenças ao nível do aumento da doçura, frescura e intensidade de sabor, diminuição da aromatização e da deteção dos edulcorantes. Tal como para o PC com *Girifole clou*, estes são dados que devem ser analisados com um maior cuidado, dado que indiciam uma alteração das propriedades organoléticas de uma forma positiva. Devido a limitações de tempo, tal análise não foi possível no presente projeto - contudo, está dado um primeiro passo para a obtenção de preparados com óleos essenciais que preencham os requisitos sensoriais dos consumidores.

4.7 Estudo de preparados contaminados

De acordo com a metodologia descrita no subcapítulo 3.8, os preparados (PC e PFB) foram inoculados com culturas de *Aspergillus* e *Penicillium*. A carga fúngica de cada preparado foi monitorizada em três formulações distintas: com óleos essenciais (*Girifole clou* e *Thym*); com sorbato de potássio (E202); sem nenhum composto com efeito conservante, que constituíram os brancos. Paralelamente, foi também avaliada a carga de *S. thermophilus* para os três casos, por forma a comprovar os resultados obtidos anteriormente. Os resultados deste estudo encontram-se expressos nos gráficos da Figura 10 e da Figura 11, sendo que se utilizou, tal como anteriormente, *Girifole clou* para o PC e *Thym* para o PFB. Tal como no subcapítulo 4.5, o limite de deteção associado é, em termos de $\lg(\text{UFC/g})$, 3, dado que se seguiu a mesma metodologia (ver subcapítulo 3.8).

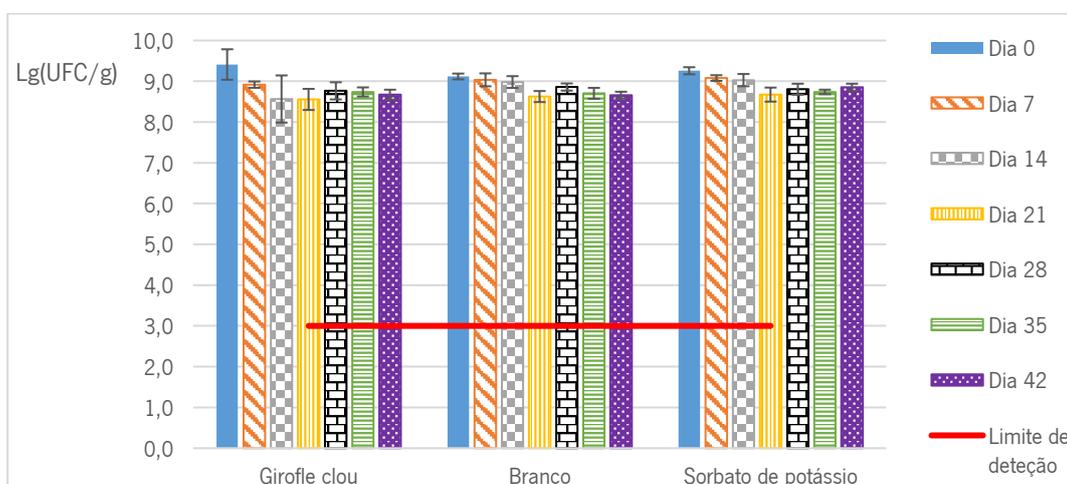


Figura 10 - Estudo da evolução das culturas de *S. thermophilus* em amostras de iogurte com PC intencionalmente contaminado.

Pela análise gráfica (Figura 10), foi possível observar que os resultados obtidos foram ao encontro dos obtidos previamente, no subcapítulo 4.5. De facto, a quantificação das culturas de *S. thermophilus* conduziu a valores de lg(UFC/g) acima de 8, cumprindo igualmente os requisitos exigidos (Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992). Para além disso, não houve diferenças assinaláveis entre as três amostras, o que assegura que este óleo essencial não afetou as culturas de *S. thermophilus*.

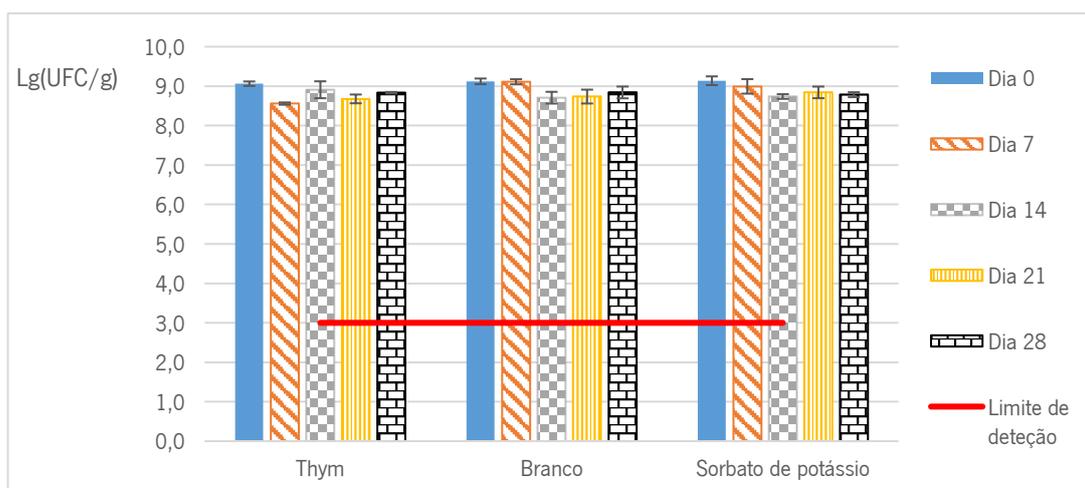


Figura 11 - Estudo da evolução das culturas de *S. thermophilus* em amostras de iogurte com PFB intencionalmente contaminado.

À semelhança dos resultados obtidos para o PC, o PFB apresentou a manutenção da viabilidade da cultura de *S. thermophilus*, acima de 8, em termos de lg(UFC/g) (Figura 11). Este facto assegura, uma vez mais, o cumprimento dos requisitos da legislação em vigor, bem como a não influência de *Thym* na flora do iogurte (Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992).

Antes de se iniciar o estudo dos preparados contaminados foi avaliada a carga do inóculo. Os resultados obtidos mostraram valores de lg(UFC/g) de $4,92 \pm 0,32$ para *Aspergillus* sp. e $5,73 \pm 0,06$ para *Penicillium* sp. (*P. spinulosum* e *P. glabrum*). Dado que os preparados foram contaminados a 1 %, a análise destes no tempo 0 deveria apresentar uma redução da carga, lg(UFC/g), de mais de 1 face à carga do inóculo.

A evolução da contaminação fúngica dos preparados foi monitorizada para amostras com e sem iogurte. Na presença de iogurte, os valores foram invariavelmente calculados tendo em

conta a dosificação em peso - 4 % e 15 %, para PC e PFB, respetivamente - sendo assim possível fazer uma análise da evolução da contaminação dos preparados em iogurte, em vez de uma análise ao valor global.

A Figura 12 apresenta os resultados para o PC, distinguindo-se as colónias de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (*P. spinulosum* e *P. glabrum*), números 7 e 8.A, respetivamente. De acordo com a metodologia adotada, o limite de deteção corresponde a um valor de $\lg(\text{UFC/g})$ igual a 2, estando o mesmo representado na Figura 12 e na Figura 14.

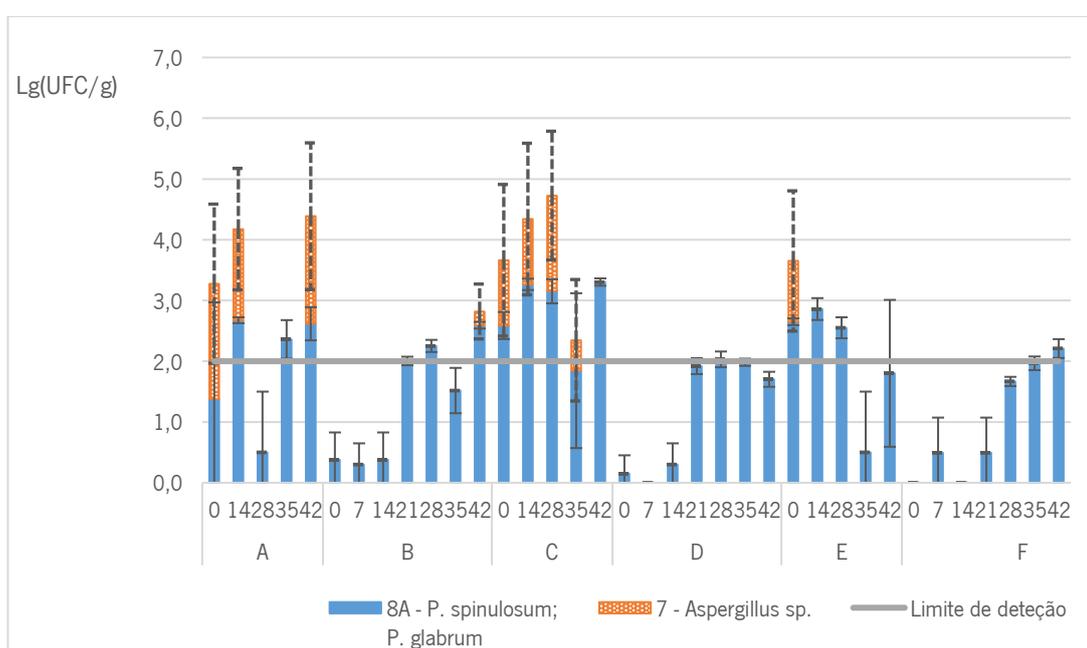


Figura 12 – Evolução da contaminação fúngica intencional de PC ao longo do tempo (t/d).

Nota: (A) preparado com *Girofle clou*; (B) preparado com *Girofle clou* dosificado em iogurte; (C) branco (preparado sem conservante); (D) branco dosificado em iogurte; (E) preparado com sorbato de potássio; (F) preparado com sorbato de potássio dosificado em iogurte.

Um dado relevante baseia-se no facto da quantificação da cultura de *Penicillium* ser substancialmente superior à verificada para a cultura de *Aspergillus*. De facto, para várias amostras analisadas, a presença da cultura de *Aspergillus* não foi detetada, o que sugere que as condições dos meios não são propícias ao seu desenvolvimento. Este dado foi igualmente verificado para o PFB (Figura 14). É reconhecido que algumas espécies pertencentes ao género *Penicillium* sp. têm capacidade de crescer em ambientes de armazenamento a baixas temperaturas. Nomeadamente *P. glabrum* e *P. spinulosum* conseguem desenvolver-se a 5 °C após 7 dias, o que é particularmente relevante dado que a secção de refrigeração, onde todas as amostras foram mantidas até ao momento da análise, se encontra a uma temperatura que

varia entre os $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Peberdy, 1987). Este dado pode indicar que, apesar do aumento detetado na carga destes fungos filamentosos nos primeiros dias analisados, o seu desenvolvimento foi retardado por força da adaptação das culturas às condições de refrigeração. Para além disso, outras referências sugerem uma temperatura mínima de crescimento de $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ para espécies de *P. glabrum* (Nevarez et al., 2009) e de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para espécies mais resistentes, como *P. expansum* (Adams & Moss, 1995). De um modo geral, para determinadas espécies pertencentes ao género *Penicillium* sp., as temperaturas ótimas de crescimento são inferiores às detetadas pelas espécies pertencentes ao género *Aspergillus* sp. (Arora, 2004; Marín et al., 1998), o que pode justificar a diferença observada a partir do dia 0, sendo que neste dia a temperatura não tinha ainda condicionado o desenvolvimento fúngico. Nos restantes momentos de análise, observaram-se diferenças mais significativas que a inicial, do inóculo - que foi de $\lg(\text{UFC}/\text{g})$ inferior a 1 -, na quantificação das duas culturas, evidenciando-se a perda de viabilidade das culturas de *Aspergillus* durante o armazenamento a baixas temperaturas. De igual forma, o pH pode influenciar o crescimento dos fungos filamentosos seleccionados. Por exemplo, para a espécie *P. glabrum*, o pH ótimo está referenciado como sendo 5,5 (Nevarez et al., 2009). Contudo, de um modo geral, os fungos filamentosos crescem em gamas de pH bastante alargadas (entre 2 a 9), não sendo este um fator extrínseco determinante quando se trata de promover o seu desenvolvimento, mas sim em casos em que se pretende otimizar a produção de certos metabolitos. O intervalo considerado ótimo para a generalidade dos fungos filamentosos, incluindo *Penicillium* e *Aspergillus*, é 3,8 – 6,0, o que vai ao encontro dos parâmetros dos preparados presentemente utilizados (Kun, 2006; Pitt & Hocking, 2009).

Pelo facto de não terem sido detetados fungos, para além da tipologia inoculada no preparado, considera-se que a matriz se apresenta conforme, dado que a carga fúngica introduzida foi bastante superior a qualquer exposição ambiental a que os produtos poderão eventualmente estar sujeitos no decorrer do normal processo produtivo. Para além disso, este facto exclui uma possível influência de outras estirpes microbianas no desenvolvimento dos fungos filamentosos com os quais se contaminou os preparados.

Na presença de *Girofle clou*, observou-se que a partir do dia 28 houve um decréscimo da carga fúngica do PC, $\lg(\text{UFC}/\text{g})$, de quase 4, seguido de um aumento a partir do dia 35. Este comportamento foi bastante semelhante ao detetado para o sorbato de potássio (E202), podendo indiciar que, após uma fase inicial em que os fungos se adaptaram às condições da

matriz e, portanto, houve um aumento no desenvolvimento da carga fúngica, a ação dos dois compostos se fez sentir, inibindo esse desenvolvimento. Esta ação retardada dos dois compostos, mais acentuada na presença de *Girofle clou*, não inviabiliza a sua utilização apenas indica que as análises deste género devem ser realizadas, tal como no presente estudo, no mínimo ao longo de todo o tempo de vida útil de um produto, por forma a obter uma imagem completa do efeito de um conservante sobre os microrganismos em causa. Numa fase final, o aumento detetado nos preparados pode ter-se devido à perda de atividade antimicrobiana, a qual resultou num novo incremento do valor da carga fúngica, dado este que demonstra que, tal como o sorbato de potássio (E202), também o óleo essencial de *Girofle clou*, não apresentou ação fungicida, mas apenas fungistática. Assim, estes dados mostram que a estabilidade do preparado, conferida pela adição de *Girofle clou*, não foi conseguida nestas condições ao longo dos 42 dias, da mesma forma que ocorreu para o sorbato de potássio (E202), já que nas duas últimas análises efetuadas (dias 35 e 42) a carga volta a surgir acima do limite de deteção.

Pela análise comparativa dos resultados do branco - preparado sem adição de conservantes - é possível considerar que uma eventual diminuição da carga fúngica numa fase final do armazenamento poderá ter ocorrido devido à perda de viabilidade das culturas pela longa exposição às condições do PC. Contudo, como este comportamento apenas se verificou neste caso, tal não deve ter influenciado os resultados obtidos na presença de *Girofle clou* e de sorbato de potássio (E202). De ressaltar que, no último dia de análises, a deterioração do branco, com e sem iogurte, foi também visível por uma perda da viscosidade das amostras, fator associado, no caso da presença da matriz láctea, à sua deterioração (Lacasse, 1995). No entanto, a partir do dia 28 foi visível que o branco, não dosificado, começou a apresentar alterações visíveis, neste caso foi notória uma mudança na cor, que se tornou mais esbranquiçada, comparativamente ao padrão (Figura 13). O facto de nenhuma destas alterações ter sido detetada na presença de *Girofle clou*, é igualmente positivo para a aplicação deste óleo essencial neste preparado.

Apesar de no caso do PC dosificado em iogurte, a contaminação estar praticamente em todos os dias analisados abaixo de uma carga, em $\lg(\text{UFC}/\text{g})$, de 2, importa referir que houve um aumento da carga fúngica tanto no branco, como em presença de *Girofle clou* e sorbato de potássio (E202). Este facto poderá dever-se à baixa dosificação do PC - 4 % -, que se traduz numa maior quantidade de iogurte e, conseqüentemente, numa maior atividade da água (a_w).

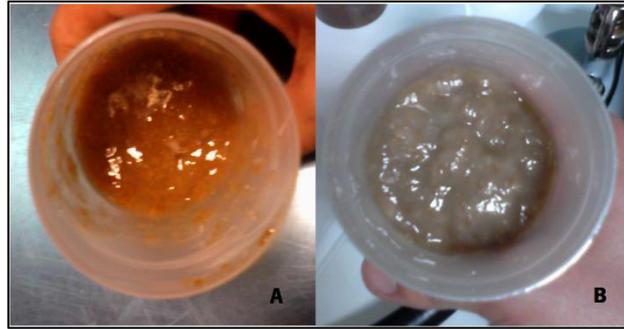


Figura 13 – Fotografias das amostras de PC ao dia 28.
Nota: (A) amostra formulada com sorbato de potássio; (B) branco.

De facto, o iogurte utilizado apresenta um pH de $4,18 \pm 0,01$ e $9,3 \text{ }^\circ\text{Brix} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{Brix}$. Assim, sendo o desenvolvimento fúngico favorecido por valores de a_w elevados, ainda que estes microrganismos apresentem uma tolerância notável a este parâmetro, este comportamento era espectável (Pitt & Hocking, 2009).

De igual modo para o PFB, foi feita uma quantificação separada dos fungos introduzidos no preparado, estando os resultados na Figura 14, bem como o respetivo limite de deteção.

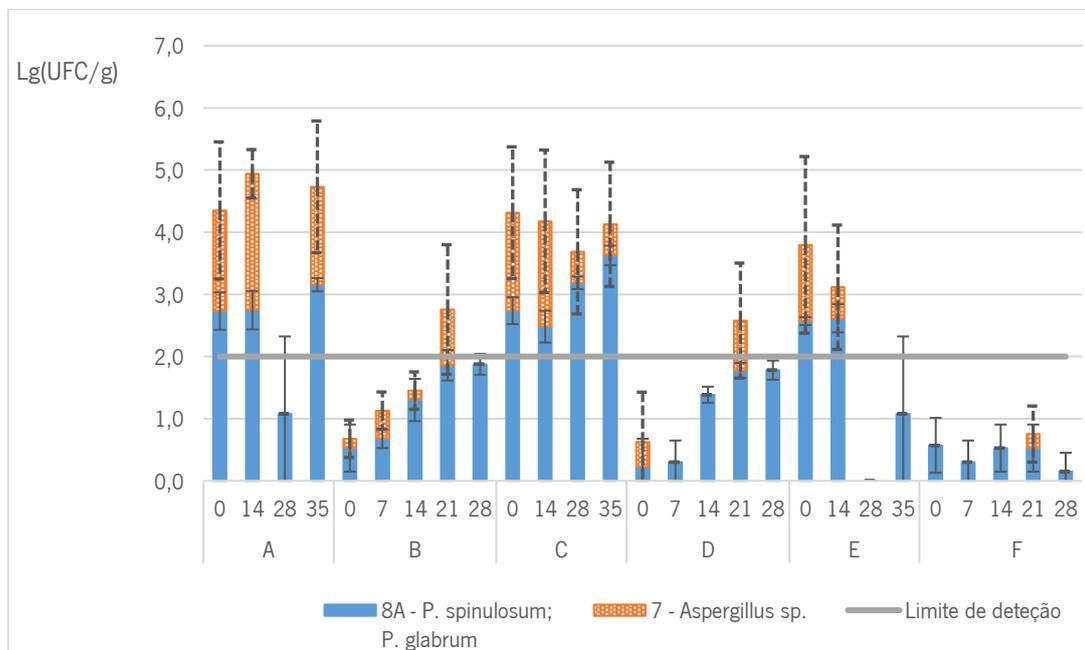


Figura 14 – Evolução da contaminação fúngica intencional de PFB ao longo do tempo (t / d).
Nota: (A) preparado com *Thym*; (B) preparado com *Thym* dosificado em iogurte; (C) branco (preparado sem conservante); (D) branco dosificado em iogurte; (E) preparado com sorbato de potássio; (F) preparado com sorbato de potássio dosificado em iogurte.

Primeiramente, é de salientar que a análise às amostras de PFB não foi efetuada no período previamente estabelecido. Este facto deveu-se à deteção visual de deterioração tanto do PFB, como deste dosificado em iogurte, na presença de *Thym* (Figura 15 e Figura 16). Por este motivo, não se prosseguiu com este estudo até ao dia 42, dado que esta observação era, por si só, indicadora do mau controlo da contaminação por parte deste óleo essencial. De referir que, face aos resultados incoerentes do dia 28 dos preparados não dosificados, nomeadamente com *Thym* e sorbato de potássio (E202), realizou-se uma análise também ao dia 35, por forma a consolidar essa informação.

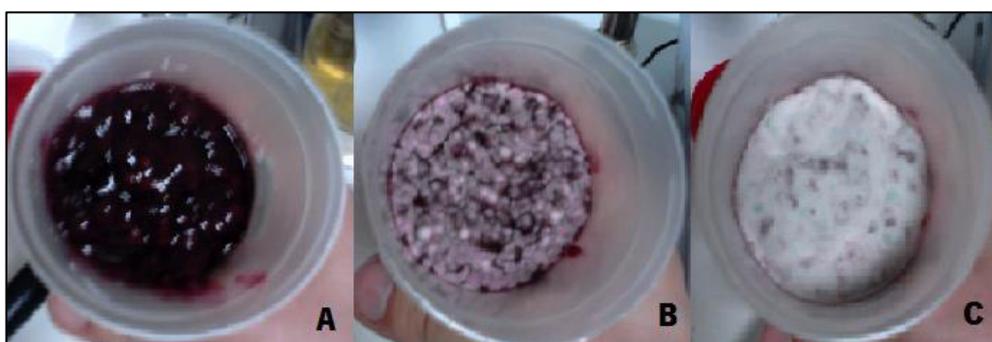


Figura 15 – Fotografias das amostras de PFB ao dia 28.

Nota: (A) amostra formulada com sorbato de potássio (E202); (B) amostra formulada com *Thym*; (C) amostra sem conservante - branco.

Pela observação da Figura 15 é facilmente detetável que o desenvolvimento fúngico alterou por completo o aspeto das amostras com *Thym* e do branco, em comparação com aquelas a que havia sido adicionado sorbato de potássio (E202).

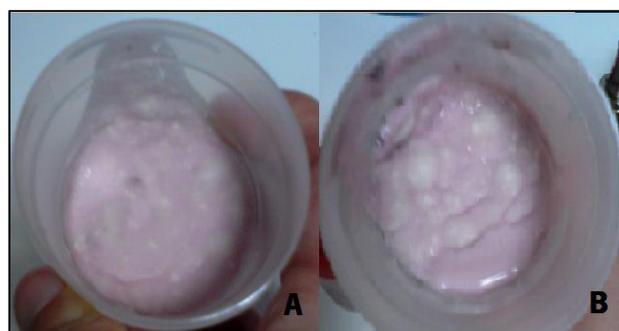


Figura 16 – Fotografias das amostras de PFB dosificado em iogurte ao dia 28.

Nota: (A) amostra formulada com *Thym*; (B) amostra sem conservante - branco.

Como verificado pela análise gráfica (Figura 14) e pela observação das amostras (Figura 15 e Figura 16), o *Thym* não foi capaz de controlar o desenvolvimento dos fungos filamentosos introduzidos nos preparados, não exercendo o seu efeito fungistático. De facto, mesmo tendo apenas em consideração os aspetos visuais, a contaminação desenvolveu-se significativamente na presença do óleo essencial, estando, ou não, o PFB dosificado em iogurte.

Uma vez mais, é de assinalar o controlo do iogurte pela ausência de fungos à exceção das culturas que foram propositadamente inoculadas na matriz. Analisando os dados quantitativos da carga fúngica (Figura 14), é notável a influência desprezável de *Thym* no PFB, dado que a carga se manteve na ordem dos 4, valor de $\lg(\text{UFC/g})$, tal como se verificou para o branco. À exceção do dia 28, cujo resultado se deveu provavelmente a uma fraca homogeneização da amostra - e conseqüente análise de uma porção cuja carga fúngica não foi tão significativa -, todas as amostras com *Thym* apresentaram uma contaminação fúngica acima do limite de deteção. Ainda assim, é de salientar que a estabilidade nos valores observados indicia uma ação deste óleo essencial na inibição do desenvolvimento dos fungos utilizados. Contudo, pelo facto de o mesmo comportamento ter ocorrido no branco, essa inibição pode dever-se não à ação de *Thym*, mas a condicionantes do meio de PFB para o desenvolvimento fúngico. Comparando estes dados com os obtidos na presença do sorbato de potássio (E202), facilmente se deteta que este conservante foi mais eficaz no controlo microbiológico - apresentando, a partir do dia 14, valores abaixo do limite de deteção.

Para os preparados dosificados em iogurte, detetou-se, de um modo geral, um aumento constante da carga associada às amostras do branco e com *Thym*, em contraste com a estabilização no caso do sorbato de potássio (E202) (Figura 14). Tendo por base os valores de compostos solúveis ($8 \text{ }^\circ\text{Brix} \pm 2 \text{ }^\circ\text{Brix}$ para o PFB e $9,3 \text{ }^\circ\text{Brix} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{Brix}$ para o iogurte), o PFB tem uma maior a_w , pelo que seria de esperar que na presença do iogurte (com menor a_w) os fungos não apresentassem uma tendência de crescimento acentuada. Contudo, provavelmente pelo facto do PFB ser dosificado a 15 % no iogurte, sendo este um valor bastante elevado para a generalidade dos preparados, e também pelas diferenças de a_w não serem previsivelmente muito significativas, esta influência não se fez sentir. Ainda assim, pela dissolução da carga no tempo 0 ao dosificar o PFB em iogurte, os resultados mantiveram-se maioritariamente abaixo do limite de deteção, impossibilitando uma análise mais detalhada. Este facto também poderá ter refletido a dificuldade dos fungos filamentosos que constituíram

o inóculo em desenvolver-se quando presentes em baixa quantidade no produto, como constatado, de igual forma, para o PC (Figura 12).

5. Conclusões e Recomendações

A análise microbiológica das matérias-primas utilizadas nos preparados em estudo, PC e PFB, realizada com vista à quantificação de mesófilos totais, leveduras e fungos filamentosos, mostrou que, de entre as frutas analisadas – mirtilo, framboesa e amora -, a amora apresentou a carga microbiana mais elevada. Relativamente aos cereais, a aveia apresentou-se como aquele em que se detetou uma presença menos acentuada de microrganismos e, em sentido contrário, os resultados da análise da cevada mostraram que esta é matéria-prima mais contaminada, de entre todas as estudadas. Estes dados apresentam-se como fundamentais do ponto de vista da segurança alimentar dos produtos comercializados pela empresa, na medida em que esta necessita de aferir acerca do estado microbiológico das matérias-primas utilizadas. Contudo, concluiu-se que os resultados obtidos no decorrer do presente projeto não são preocupantes, dado que a pasteurização aplicada durante o processamento alimentar inativa toda a carga microbiana identificada.

Realizada segundo um método qualitativo, a caracterização do ambiente industrial da unidade de Tortosendo, permitiu aferir que as secções de produção, sala da pesagem de secos e SIP apresentam a menor diversidade de fungos presentes. Nas restantes secções, a presença, tanto de fungos filamentosos como de leveduras, é indicadora de possíveis contaminações cruzadas resultantes da manipulação de diferentes tipologias de matérias-primas. Ainda assim, pelos resultados obtidos, foi possível concluir que as práticas de fabrico adotadas, principalmente ao nível da produção e esterilização do material, são eficazes na redução qualitativa dos fungos ambientais.

O isolamento de fungos, realizado com base nos resultados das etapas anteriores, permitiu identificar géneros e, em alguns casos, espécies de fungos filamentosos e leveduras. Destacam-se, pela sua presença mais diversificada, e pela relevância dessa mesma presença, espécies pertencentes aos géneros *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.. De um modo geral, tanto os géneros referidos, como os restantes identificados vão ao encontro do expectável neste contexto, dado serem frequentemente associados a contaminações de produtos como frutas e cereais, e também a nível ambiental.

De acordo com os dados obtidos pela avaliação das *CMS* dos diferentes óleos essenciais, foi notório o maior potencial de *Girofle clou*, *Bay* e *Thym*, relativamente aos restantes testados. Estes resultados corroboram estudos anteriores realizados tanto com estes óleos essenciais,

como com alguns dos seus componentes, revelando-se promissores como agentes antimicrobianos.

A influência dos óleos essenciais com maior potencial, avaliados de acordo com os resultados das *CMTs*, nas culturas lácticas do iogurte permitiram concluir que *Thym*, *Bay* e *Girofle clou* não afetaram as culturas de *S. thermophilus*. Quanto ao estudo do seu efeito em *L. bulgaricus*, não foi possível obter conclusões, uma vez que essas culturas não foram detetadas em nenhum dos momentos de análise, para nenhuma das amostras. Tendo em vista a obtenção de uma total compreensão neste contexto, será, de facto, vantajoso aferir o efeito dos óleos essenciais nas culturas *L. bulgaricus*. Para tal, deverão ser testadas diferentes condições de crescimento, nomeadamente ao nível do pH do meio utilizado e da temperatura de incubação.

Quanto às propriedades organoléticas dos preparados contendo os óleos essenciais *Girofle clou*, *Bay* e *Thym* foi notória uma alteração significativa em ambos os preparados, PC e PFB, na presença de *Bay* - facto que levou à exclusão desse óleo essencial das fases subsequentes do projeto. Fazendo uma análise abrangente a todas as fases de análises organoléticas, foi possível constatar que a utilização de *Girofle clou* em PC e *Thym* em PFB conduziu a alterações perceptíveis relativamente ao padrão. Contudo, estes dados impõem que se refira que algumas das observações dos provadores foram no sentido de enaltecer as características conferidas pelos óleos essenciais, tendo inclusivamente sido afirmado que essa presença melhorava o perfil sensorial dos preparados. Para além disso, o facto da utilização de aromas alternativos ter melhorado o perfil organolético do PC, com *Girofle clou*, indicia que um estudo mais aprofundado nesta área poderá conduzir a uma aceitação mais generalizada e que melhor corresponda as exigências dos consumidores. De facto, é recomendado que tal seja contemplado em ensaios posteriores, visto ter ficado demonstrada a forte influência dos diferentes aromas, os quais se mostraram capazes de ajudar a “mascarar” a presença do óleo essencial.

De modo a otimizar as alternativas à base de óleos essenciais ao sorbato de potássio (E202), impõe-se a realização de ensaios subsequentes em que se afira, por exemplo, a sinergia entre diferentes óleos essenciais. É de salientar que, para que haja sinergia é necessário que a concentração aplicada seja inferior à soma das concentrações individuais de cada óleo essencial, o que se traduz, obviamente, numa redução da quantidade destes agentes microbianos nas matrizes alimentares e, conseqüentemente, num menor impacto organolético

(Burt, 2004). Assim, será possível aliar a aceitação dos consumidores - pela utilização de conservantes naturais - a um perfil organoléptico mais agradável. De facto, inúmeros estudos têm sido realizados de modo a avaliar esta possibilidade. Bassolé e Juliani (2012) referiu sinergia na inibição bacteriana de óleos essenciais provenientes de diferentes espécies de plantas, nomeadamente *O. vulgare*/*Rosmarinus officinalis* (correspondente ao óleo *Romarin*), *Lippia multiflora*/*Mentha piperita* (Peppermint), *M. piperita*/*O. basilicum*, *C. zeylanicum*/*S. aromaticum* (*Girofle clou*). Para além disso, também para fungos, nomeadamente pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, estão identificadas relações sinérgicas quando utilizados os óleos essenciais de tomilho e orégão (Stevic et al., 2014). Paralelamente, também os componentes dos óleos essenciais têm apresentado sinergia, o que poderá igualmente ser um bom indicador (Bassolé & Juliani, 2012; Burt, 2004). O desenvolvimento nesta área tem sido promissor, indiciando que o futuro poderá passar pelo alcance efetivo de conservantes naturais à base de óleos essenciais para aplicação em preparados.

Para os preparados contaminados a 1 % com um inóculo das culturas de *Aspergillus* e *Penicillium*, foram atestados os resultados obtidos quanto à viabilidade das culturas de *S. thermophilus*, não tendo, uma vez mais, sido verificado qualquer efeito devido à presença dos óleos essenciais. Tanto no caso do PC, como do PFB, verificou-se que, de entre as culturas presentes no inóculo, a cultura de *Penicillium* foi mais quantificada, o que permite constatar a maior resistência deste género às condições consideradas, nomeadamente em termos de temperatura.

Na presença de *Girofle clou*, no PC, foi detetada uma diminuição da contaminação, o que atesta o efeito fungistático deste óleo essencial, ainda que de forma mais retardada do que o verificado para o sorbato de potássio (E202) - 28 dias, em vez de 14. Ainda assim, pelo facto de ter havido um aumento da carga fúngica na fase final da análise, a eficácia de *Girofle clou* no controlo da contaminação intencionalmente realizada não foi completamente conseguida, ainda que não tenha sido observado nenhum tipo de alterações visuais ao nível de nenhuma das amostras com este óleo essencial, tal como foi verificado no branco. Contudo, esse incremento final, observado também para o conservante sintético atualmente utilizado - sorbato de potássio (E202) -, é indicativo da não existência de uma ação fungicida em nenhum dos compostos. Relativamente à contaminação de PFB, foi evidenciada a incapacidade do óleo essencial de *Thym* controlar o desenvolvimento fúngico. De facto, a deterioração dos

preparados, mesmo dosificados em iogurte, foi evidente a partir do dia 28, o que inviabilizou, desde logo uma análise mais extensiva.

De modo a obter uma informação mais detalhada e pertinente, seria crucial avaliar também o efeito dos óleos essenciais em preparados contaminados com leveduras. De facto, pela elevada propensão dos iogurtes para o desenvolvimento destes fungos, o seu controlo pelo agente antimicrobiano dos preparados aí introduzidos é imperativo, uma vez que se pretende que a estabilidade microbiológica seja assegurada em todo o produto final (Lacasse, 1995; Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 1996). Tal não foi presentemente possível devido ao tempo disponível, ficando ainda assim feita a sugestão para trabalhos futuros.

Referências bibliográficas

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol , carvacrol , eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24, 51–56. <http://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (1995). *Food Microbiology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing.
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology* (3rd Editio). Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=g4zkCkoQRQ0C&pgis=1>
- Ahmed, N., Singh, J., Kour, H., & Gupta, P. (2013). Naturally Occurring Preservatives in Food and their Role in Food Preservation. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(1), 22–30.
- Albarracin, W., Alfonso, C., & Sanchez, I. (2012). APPLICATION OF ESSENTIAL OILS AS A PRESERVATIVE TO IMPROVE THE SHELF LIFE OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*). *Vitae-Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 19(1), 34–40.
- Alma, M. H., Ertas, M., Nitz, S., & Kollmannsberger, H. (2007). Chemical Composition and Content of Essential Oil from the Bud of Cultivated Turkish Clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources*, 2(2), 265–269. Retrieved from https://www.ncsu.edu/bioresources/BioRes_02/BioRes_02_2_265_269_Alma_ENK_CloveOil_Turkish.pdf
- Alrabadi, N. I., Al-Massad, M., & Gharaibeh, A. A. (2013). The antifungal effect of potassium sorbate on *Penicillium* sp. in Labaneh. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 13, 1497–1502. <http://doi.org/10.5829/idosi.ajeaes.2013.13.11.81265>
- Arora, D. K. (2004). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. New York: Marcel Dekker.

- Aurum Process Technology, S. L. (2010). O setor das bases ou preparados de frutas. Retrieved from <http://www.aurumprocess.com/pt/aplicaciones/proceso-industrial-de-frutas/produccion-bases-de-frutas-o-preparados-de-frutas>
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, *21*, 33–42. [http://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](http://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos* (1st Editio). Guimarães: Forvisão - Consultoria em formação integrada.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, *17*, 3989–4006. <http://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (2001). *Common fragrance and flavor materials*. Weinheim: WILEY-VCH.
- Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 413–423.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*, 223–253. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Chandan, R. C. (2006). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (1st Editio). Ames, Iowa: Blackwell Publishing. Retrieved from https://books.google.pt/books?id=_2QagyHQHboC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(4), 564–582.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing.

- Dave, R. I., & Shah, N. P. (1996). Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, *79*, 1529–1536.
- Deák, T. (2008). *Handbook of Food Spoilage Yeasts* (2nd Editio). New York: CRC Press. Retrieved from https://books.google.com/books?id=RR21g8_2OXIC&pgis=1
- European Comission. (1995). European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners. *Official Journal of the European Union*, (1), 1–53.
- European Dairy Association. (2016). Economic Report 2016/2017.
- FDA. (2001). Bacteriological Analytical Manual.
- Fernandes, E. G., Pereira, O. L., Silva, C. C., Bento, C. B. P., & Queiroz, M. V. (2015). Diversity of endophytic fungi in *Glicine max*. *Microbial Research*, *181*, 84–92. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010>
- Fernández, M., Conde, S., Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J., & Duque, E. (2011). Mechanisms of Resistance to Chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 1001 – 1009. <http://doi.org/doi:10.1128/AAC.05398-11>
- Figueiredo, A. ., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, *23*, 213–226. <http://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*. <http://doi.org/10.1002/ptr.2179>
- Gill, A. O., & Holley, R. a. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 5750–5755. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5750>

- Guarro, J., Pujol, I., Aguilar, C., Llop, C., & Fernández-Ballart, J. (1998). Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *42*, 385–387. <http://doi.org/10.1093/jac/42.3.385>
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Setó, L., Purroy, P., Sanchis, V., & Marín, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products fungal isolates. *Journal of Applied Microbiology*, *94*, 893–899.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, *86*, 985–990.
- Hui, Y. H. (2006a). *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. New York: CRC Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=brdM8-ahRg4C&pgis=1>
- Hui, Y. H. (2006b). *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. Retrieved from https://books.google.pt/books?id=Vu8gsgLeW-YC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2014). Antimicrobial compounds from natural sources. In *Antimicrobial compounds from natural sources* (pp. 36–42). Frontiers Media. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- ICMSF. (2006). *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. New York: Springer Science & Business Media. Retrieved from https://books.google.com/books?id=Yy_oBodctoIC&pgis=1
- ISO and IDF. (2003). ISO 7889:2003(en), Yogurt – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37 degrees C. Retrieved from <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:7889:ed-1:v1:en>
- Ivanovic, J., Misic, D., Ristic, M., Pesic, O., & Zizovic, I. (2010). Supercritical CO₂ extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.) – chemical composition and antibacterial activity. *Journal of Serbian Chemical Society*, *75*(3), 395–404. <http://doi.org/doi:10.2298/JSC090303003I>

- Klaric, M. S., Kosalec, I., Mastelic, J., Pieckova, E., & Pepeljnak, S. (2006). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, *44*, 36–42. <http://doi.org/doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02032.x>
- Kun, L. Y. (2006). *Microbial Biotechnology - Principles and Applications* (2nd Editio). Singapore: World Scientific Publishing. Retrieved from https://books.google.pt/books?id=P3enKvasnywC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Lacasse, D. (1995). *Introdução à microbiologia alimentar*. Lisboa: Instituto Piaget.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(3), 453–462. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Leite, E., Stamford, M., Lima, O., Filho, M. B., & Marques, O. M. (2008). Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil, *28*(2), 418–422.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2011). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, *11*, 1–17.
- Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Maryland: Aspens Publishers, Inc. Retrieved from https://books.google.pt/books?id=lks9dALNzZAC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mistures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, *97*, 2578–2590. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7551>
- Marín, S., Sanchis, V., Sáenz, R., Ramos, A. J., Vin, I. a., & Magan, N. (1998). Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 25–36.

- Martos, M. V., Navajas, Y. R., López, J. F., & Álvarez, J. A. P. (2007). Antifungal Activities of Thyme, Clove and Oregano Essential Oils. *Journal of Food Safety*.
- Mendonca, A. F. (1992). *Mechanism of inhibitory action of potassium sorbate in Escherichia coli* (Doctoral dissertation). Digital Repositorium @ Iowa State University.
- Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo. (1992). Portaria n°742/92, de 24 de Julho. *Diário Da República - I Série-B, N°169*.
- Ministérios da Agricultura Florestas e Alimentação e do Comércio e Turismo. (1983). Decreto do Governo n°83/83, de 9 de Dezembro. *Diário Da República - I Série - N°282*.
- Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 403–16.
<http://doi.org/10.1002/fsn3.116>
- Naidu, A. S. (2000). *Natural Food Antimicrobial Systems*. Boca Raton, Florida: CRC Press. Retrieved from https://books.google.com/books?id=_rmdPO9BNBcC&pgis=1
- Nevarez, L., Vasseur, V., Le Madec, A., Le Bras, A., Corroller, L., Leguérinel, I., & Barbier, G. (2009). Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. *International Journal of Food Microbiology*, 166–171. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.013>
- O'Bryan, C. A., Pendleton, S. J., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2015). Potential of Plant Essential Oils and Their Components in Animal Agriculture – in vitro Studies on Antibacterial Mode of Action. *Frontiers in Veterinary Science*, 2(September), 1–8.
<http://doi.org/10.3389/fvets.2015.00035>
- Ohlsson, T., & Bengtsson, N. (2002). *Minimal processing technologies in the food industry*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. Retrieved from https://books.google.pt/books?id=hvGiAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Oliveira, P. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. *Food Microbiology*, 37, 78–95. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.003>

- Parlamento Europeu. (2008). Regulamento (CE) N.o 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial Da União Europeia, 2007*, 16–33.
- Peberdy, J. F. (1987). *Penicillium and Acremonium*. New York: Springer Science & Business Media.
- Pesic-Mikulec, D., & Niketic, G. B. (2009). Compositional characteristics of commercial yoghurt based on quantitative determination of viable lactic acid bacteria. *APTEFF, 40*. <http://doi.org/10.2298/APTO940087P>
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., ... Martinez-de-Oliveira, M. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. <http://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.00886.x>
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., ... Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 1367–1373. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.46443-0>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage* (2nd Editio). Springer Science + Business Media, B. V.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3rd Editio). New York: Springer Science & Business Media. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=B1s6GhOlzkC&pgis=1>
- Rahman, M. S. (2007). *Handbook of Food Preservation* (2nd Editio). New York: CRC Press. Retrieved from https://books.google.com/books?id=sKgtq62GB_gC&pgis=1
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1996). *Introduction to food-borne fungi* (5th Editio). Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Schmidl, M. K., & Labuza, T. P. (2000). *Essentials Of Functional Foods*. Gaithersburg, Maryland: Springer Science & Business Media. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=Yp44IzX8hVAC&pgis=1>
- Silva, C. J. (2015). *Desenvolvimento de preparado de fruta com massa base de casca de maracujá e aplicação em iogurte* (Master's thesis).

- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, *80*(2), 159–166.
<http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.11.014>
- Souza, E. L. De, Lima, E. D. O., & Luna, K. R. De. (2005). Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods, *48*, 245–250.
- Stanojevic, D., Comic, L., Stefanovic, O., & Solujic-Sukdolak, S. (2009). Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science Agricultural Academy*, *15*(4), 307–311.
- Stelato, M. M., Concon, M. M., Shimada, D., & Srebernich, S. M. (2010). Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*, *69*(3), 285–290.
- Stevic, T., Beric, T., Savikin, K., Sokovic, M., Godevac, D., Dimkic, I., & Stankovic, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, *55*, 116–122.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 1133 – 1148.
<http://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 665–674.
- Sun, D. (2012). *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. New York: CRC Press.
 Retrieved from
https://books.google.pt/books?id=sxzOBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Tarté, R. (2009). *Ingredients in Meat Products*. Madison, Wisconsin: Springer Science & Business Media. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-71327-4>
- Teixeira, S., Gonçalves, J., & Vieira, E. (2011). Edulcorantes: Uso e aplicação na alimentação, com especial incidência na dos diabéticos. *Revista de Alimentação Humana*, *17*(1-3), 47–54.

- Tharmaraj, N., & Shah, N. P. (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science*, *86*, 2288–2296. Retrieved from [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(03\)73821-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(03)73821-1/pdf)
- Theron, M. M., & Lues, J. F. R. (2010). *Organic Acids and Food Preservation*. CRC Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=7lrGwQTt1aMC&pgis=1>
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., & Saija, A. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, *89*(4), 549–554. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.011>
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(1), 40–53. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- World Health Organization. (2015). WHO | WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/>
- Zahoor, T., Rahman, S. U., & Farooq, U. (2003). Viability of *Lactobacillus bulgaricus* as Yoghurt Culture Under Different Preservation Methods. *International Journal of Agriculture & Biology*, 46–48. Retrieved from <http://www.ijab.org>

Anexos

Anexo A

Ficha de avaliação sensorial do produto X

Nome: _____ Data: _____

Descritores	Definição	Menos (-)	Padrão	Mais (+)
Acidez	Percepção da acidez do preparado			
Doçura	Percepção da doçura do preparado			
Adstringência	Sensação de aperto da mucosa bucal			
Sabor	Sabor do preparado comparativamente ao padrão (Sabor incharacterístico – Igual)			

NOTA: A avaliação deve ser realizada através da comparação com o padrão

Causas da diferença observada ao nível do sabor geral, se aplicável:

Figura I - Exemplo de ficha de análise sensorial utilizada para a 2ª fase da análise organolética de preparados.

Anexo B

Tabela I – Exemplo de ficha de análise triangular utilizada na 3ª fase da análise sensorial de preparados

Data da aplicação em PA							
Data da aplicação do PA em iogurte							
Data da prova de sabor em iogurte							
	Provedores	Identificação das amostras			S	N	Observações
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							

Nota: S – resposta certa; N - resposta errada.

Anexo C

Tabela II - Resultados da presença de fungos filamentosos e leveduras nas secções da unidade industrial de Tortosendo
(Continua)

Secção	Zona	Altura	F. f.	L.	Secção	Zona	Altura	F. f.	L.
Produção	A	1	-	-	Pesagem de secos	B	2	-	-
	A	1	-	-		B	3	-	-
	A	2	-	-		B	3	-	-
	A	2	-	-		C	1	-	-
	A	3	-	-		C	1	X	-
	A	3	-	-		C	2	-	-
	B	1	-	-		C	2	-	-
	B	1	-	X		C	3	-	-
	B	2	-	-		C	3	-	-
	B	2	-	-	Limpeza	SIP	1	-	-
	B	3	-	-		SIP	1	-	-
	B	3	-	X		SIP	2	-	-
	C	1	-	-		SIP	2	-	-
	C	1	-	-		SIP	3	-	-
	C	2	-	-		SIP	3	-	-
	C	2	-	X		CIP	1	X	-
C	3	-	-	CIP		1	X	-	
C	3	-	-	CIP		2	X	-	
Preparação de fruta	A	1	X	-		CIP	2	-	X
	A	1	-	X		CIP	3	-	X
	A	2	-	X		CIP	3	-	X
	A	2	-	-		Lavagem	1	-	X
	A	3	-	-		Lavagem	1	-	X
	A	3	-	X		Lavagem	2	X	-
	B	1	X	X	Lavagem	2	X	-	
	B	1	-	X	Lavagem	3	-	-	
	B	2	X	X	Lavagem	3	-	-	
	B	2	-	X	Armazém de secos*		1	X	-
	B	3	-	X			1	X	-
	B	3	-	X			2	X	-
	C	1	X	X			2	X	-
	C	1	-	X			3	X	-
C	2	-	X			3	X	-	
C	2	-	X	Congelação*		1	-	-	
C	3	-	X			1	X	X	
C	3	-	X			2	X	X	
Pesagem de secos	A	1	-		-		2	X	X
	A	1	-		X		3	-	-
	A	2	-		-		3	-	X
	A	2	-	-	Refrigeração*		1	X	-

Tabela II - (Continuação)

Secção	Zona	Altura	F. f.	L.	Secção	Zona	Altura	F. f.	L.
Pesagem de secos	A	3	-	-	Refrigeração*		1	-	X
	A	3	-	-			2	X	-
	B	1	-	-			2	X	-
	B	1	-	-			3	-	-
	B	2	-	-			3	X	-

Nota: F. f. = Fungos filamentosos; L. = Leveduras.

(-) sem presença de fungos; (X) presença de fungos.

* - secções com apenas uma zona de amostragem.

Anexo D

Tabela III - Identificação dos microrganismos isolados nas fases de caracterização das matérias-primas e do ambiente industrial, incluindo fotografia das culturas em meio sólido, locais onde foram detetados e resultado da identificação por RT-PCR (quando aplicável)
(Continua)

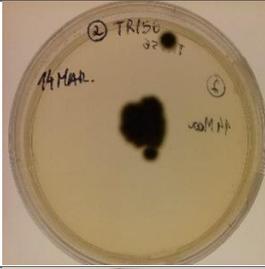
Número	Fotografia	Presença	Identificação por RT-PCR (quando aplicável)
1		TR1 (origem do isolamento), L (2), PS (1, 2)	<i>Penicillium</i> sp.
2		TR1 (origem do isolamento), CE1, CE2, FB2, FB3, AR1, AR2, AR3	<i>Cladosporium</i> sp.
4		CE2 (origem do isolamento), CE1	
5		AV1 (origem do isolamento), TR1	<i>Penicillium</i> sp.
6		TR1 (origem do isolamento), CE1, CE2, AR1, AR2, AR3	

Tabela III - (Continuação)

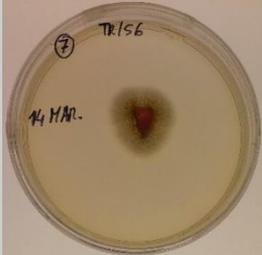
Número	Fotografia	Presença	Identificação por RT-PCR (quando aplicável)
7		TR1 (origem do isolamento)	<i>Aspergillus</i> sp.
8		TR1 (origem do isolamento)	<i>Aspergillus</i> sp.: <i>A. chevalieri</i> ; <i>A. amstelodami</i> ; <i>A. heterocaryoticus</i>
10		CE2 (origem do isolamento), CE1, FB1, FB3, TR1, AR1, AR2, AR3, MI1, MI2	<i>Cryptococcus</i> sp.
11		CE2 (origem do isolamento), CE1, FB1, FB3, TR1, AR1, AR2, AR3, MI1, MI2	<i>Pseudomonas</i> sp.
13		CE2 (origem do isolamento)	
14		CE2 (origem do isolamento), CE1, MI1, TR1	<i>Pseudomonas</i> sp.

Tabela III - (Continuação)

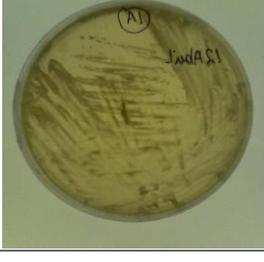
Número	Fotografia	Presença	Identificação por RT-PCR (quando aplicável)
15		FB2 (origem do isolamento)	<i>Chaetomium</i> sp.: <i>C. pratense</i> ; <i>C. funicola</i> ; <i>C. indicum</i>
16		FB2 (origem do isolamento)	
17		FB2 (origem do isolamento), TR1, PS (1,2)	<i>Mucor piriformis</i>
18		FB3 (origem do isolamento)	
19		AR2 (origem do isolamento)	<i>Phoma glomerata</i>
1.A		PF (1A, 2C, 1C, 3C, 3A, 1B, 2B, 3B), Cong. (3), AS (1A)	<i>Candida sake</i>

Tabela III - (Continuação)

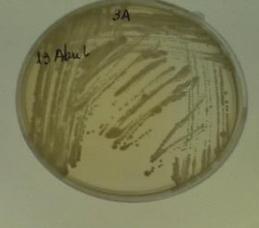
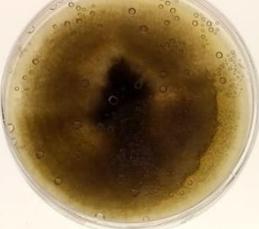
Número	Fotografia	Presença	Identificação por RT-PCR (quando aplicável)
2.A		PF (3B, 2C, 2A, 3C, 3B, 1B, 2B, 1C), PS (1)	
3.A		PF (2C)	<i>Pischia</i> sp.
4.A		Refr. (2), Cong. (2)	
5.A		PF (3B)	
6.A		Cong. (1)	<i>Phoma pinodella</i>
7.A		CIP (2)	<i>Phoma</i> sp.; <i>Peyronellaea prosopidis</i>

Tabela III - (Continuação)

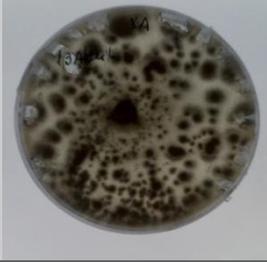
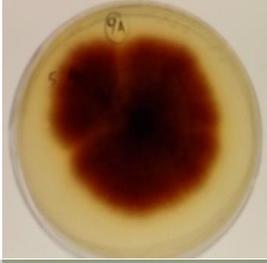
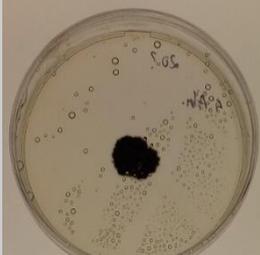
Número	Fotografia	Presença	Identificação por RT-PCR (quando aplicável)
8.A		PS (1, 3), Refr. (2, 3), PF (1C, 1B, 2B, 3B, 1A), CIP (1)	<i>Penicillium</i> sp.: <i>P. spinulosum</i> , <i>P. glabrum</i>
9.A		PS (2)	<i>Epicoccum nigrum</i>
10.A		PS (1, 2, 3), Refr. (1), Cong. (2)	
11.A		PF (1A), PS (3)	<i>Penicillium</i> sp.
12.A		Refr. (2)	
13.A		Cong. (3), PF (3B, 2B)	

Tabela III - (Continuação)

Número	Fotografia	Presença	Identificação por RT-PCR (quando aplicável)
14.A			<i>Cladosporium</i> sp.

Nota: MI – mirtilo; FB – framboesa; AR – amora; CE – cevada; AV – aveia; TR – trigo.

PF – preparação de fruta; PS – pesagem de secos; L – lavagem; AS – armazém de secos, Cong. – congelação; Refr. – refrigeração.