UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CONSERVANTES ALIMENTÍCIOS NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FUNGOS TERMORRESISTENTES E BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

SHEYLA FERREIRA LIMA COELHO

MACEIÓ
2008

SHEYLA FERREIRA LIMA COELHO

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CONSERVANTES ALIMENTÍCIOS NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FUNGOS TERMORRESISTENTES E BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro López

MACEIÓ

2008

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

C672e Coelho, Sheyla Ferreira Lima.
Efeito de diferentes concentrações de conservantes alimentícios no crescimento *in vitro* de fungos termorresistentes e bactérias patogênicas / Sheyla Ferreira Lima Coelho. – Maceió, 2008.
79 f : tabs., grafs.

Orientador: Ana Maria Queijeiro López.
Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Microbiologia. 2. Alimentos – Conservação. 3. Conservantes. 4. Microorganismos. 5. Benzoato de sódio. 6. Sorbato de potássio. 7. Metabissulfito de sódio. I. Título.

CDU: 579.67

DEDICO

Ao meu Deus, Pai e Senhor de tudo, que vive em mim e está presente todos os dias de minha vida, me ajudando a vencer todas as lutas.

Ao meu marido Abel e às minhas filhas Elis e Luísa... ***Porque vocês são a razão de todos os meus feitos e o meu motivo de prosseguir com alegria a cada dia...***

Aos meus pais, Ademar e Maria de Lourdes, e a todos os meus irmãos em Cristo, pelo ânimo, força e pelas orações.

A Eli Cavalcante e Marcos Gama, pelas palavras de sabedoria...

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas, pelo auxílio financeiro concedido.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Nutrição, pelo acesso e pela bolsa de mestrado do programa (cota FAPEAL) concedida.

À Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro López, pela dedicação e empenho durante toda a nossa caminhada.

À Profa. Dra. Maria Cristina Delgado, pela gentileza em ceder os isolados bacterianos.

À Fundação André Tosello, por ter fornecido os isolados fúngicos utilizados neste estudo.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia / UFAL e do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de Nutrição / UFAL, pela acolhida.

A Todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Em todas as coisas, porém, somos mais do que vencedores,
por meio daquele que nos amou."

Rm 8. 37

RESUMO

Os alimentos se constituem em ótimos suprimentos para uma grande diversidade de microrganismos, sendo eles fungos filamentosos e leveduriformes ou bactérias. São, portanto, veículo de uma série de doenças infecciosas. Assim o homem tem buscado evitar tal proliferação microbiana, mantendo a integridade do produto a ser comercializado ou consumido, através de barreiras físicas e químicas. Para reduzir os riscos de multiplicação de microrganismos e a conseqüente deterioração dos alimentos, as indústrias estão utilizando, além do tratamento térmico, cada vez mais, aditivos químicos (conservantes). Entre eles, o dióxido de enxofre, ácido benzóico e o ácido sórbico, além de derivados dos mesmos, têm sido empregados em linhas de processamento. Assim, visando fornecer subsídios para se reduzir a utilização de quantidades inadequadas de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, a ingestão imprópria dos mesmos pela população, determinou-se neste trabalho as concentrações mínimas de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessárias à inibição do desenvolvimento dos fungos termorresistentes *Byssochlamys fulva, Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus,* e das bactérias *Salmonella* Enteritidis*, S.* Typhimurium*, Escherichia coli* e *Bacillus cereus in vitro*. Os meios de cultura utilizados foram Batata-Dextrose- Agar (BDA) e Triptona-Soja-Agar (acidificado com ácido cítrico, pH 3,5 e 5), respectivamente para os ensaios com fungos e com bactérias. A esses meios adicionaram-se os conservantes em diferentes quantidades, de modo a obterem-se concentrações compreendidas entre 80 e 1000 $mg.L^{-1}$ dos mesmos. Após inoculação e incubação (28 e 30 ± 2 ºC, no escuro), observou-se que as menores concentrações do metabissulfito de sódio apresentaram uma maior eficiência em inibir o crescimento de todos os microrganismos em comparação com os demais conservantes testados *in vitro.* As menores concentrações do benzoato de sódio, por outro lado, foram mais efetivas em inibir o crescimento bacteriano. Já o sorbato de potássio apresentou maior ação no combate aos fungos termorresistentes.

Palavras-chave: conservantes, microrganismos, benzoato de sódio, sorbato de potássio, metabissulfito de sódio.

ABSTRACT

The foods are excellent nutrient sources for a wide variety of microorganisms, such as filamentous fungi and yeast or bacteria. They are therefore vehicle for a number of infectious diseases. So the man has sought to prevent such proliferation microbial, and maintain the integrity of the product to be sold or consumed, through physical and chemical barriers. To reduce the risk of multiplication of microorganisms and the consequent deterioration of food, the industries are using, in addition to heat treatment, increasingly, chemical additives (preservatives). Among them, sulphur dioxide, sorbic acid and benzoic acid, and derivatives of them, have been employed in the steps of processing. Thus, seeking to provide subsidies to reduce the use of inadequate quantities of preservatives in the food industry, and therefore unfit to ingestion by the population, it was determined in this work the minimum concentrations of sodium metabisulphite, sodium benzoate and sorbate, potassium necessary for the inhibition of the development of heat-resistant fungi, such as *Byssochlamys fulva, Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus*, and of bacteria, such as *Salmonella* Enteritidis*, S.* Typhimurium*, Escherichia coli* and *Bacillus cereus in vitro*. The growth-media used were Potato-Dextrose-Agar (PDA) and Tripton-Soybean-Agar (acidified with citric acid, pH 3.5 and 5), for tests with fungi and bacteria, respectively. To these media were added the preservatives in different quantities, in order to obtain concentrations of 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 and 1000 $mg.L^{-1}$ of them. After inoculation and incubation (28 and 30 ± 2 ° C, in the dark), it was observed that the lowest concentrations of sodium metabisulphite showed greater efficiency in inhibiting the growth of all microorganisms, in comparison with the other preservatives tested *in vitro*. The lowest concentrations of sodium benzoate, on the other hand, were more effective in inhibiting bacterial growth. Already the potassium sorbate showed greater action to combat the heat-resistant fungi.

Keywords: Preservatives, microorganisms, sodium benzoate, potassium sorbate, sodium metabisulphite.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estrutura das moléculas de ácido benzóico e benzoato de sódio..... 18

Figura 2. Produção intracelular de sulfitos. Adaptado de http://www.asmabronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html..... 23

Figura 3. Estrutura das moléculas de dióxido de enxofre e metabissulfito de sódio..... 24

Figura 4. Estrutura das moléculas de ácido sórbico e sorbato de potássio..... 25

Figura 5. Crescimento abundante de *E. coli* em meio TSA acrescido de 250 mg.L^{-1} de benzoato de sódio, pH 5, após 72 h de incubação a 30 ± 2 ºC no escuro..... 34

Figura 6. Colônias de *Bacillus cereus* em meio TSA acrescido de 250 mg.L^{-1} de benzoato de sódio (A) e 250 mg.L^{-1} de sorbato de potássio (B), após 72 h de incubação a 30 ± 2 ºC no escuro..... 33

Figura 7. Aspecto do crescimento de *Salmonella* Enteritidis em meio TSA acrescido de 250 mg.L^{-1} de benzoato de sódio (A) e *S.* Typhimurium em meio TSA acrescido de 1000 mg.L^{-1} de sorbato de potássio (B), após 72 h de incubação a 30 ± 2ºC no escuro (crescimento abundante)..... 38

Figura 8. Crescimento micelial de *B. fulva* em meio BDA acrescido de 200 mg.L-1 (1) de sorbato de potássio e 100 mg.L-1 (B) de metabissulfio de sódio, pH 3,5, após 15 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 40

Figura 9. Crescimento médio de *B. fulva* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 100, 150 e 200 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro... 40

Figura 10. Crescimento médio de *B. fulva* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de benzoato de sódio (BS 500, 600 e 700 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 41

Figura 11. Crescimento médio de *B. fulva* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de sorbato de potássio (SP 400, 700 e 800 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 41

Figura 12. Crescimento micelial de *N. fischeri* em meio BDA acrescido de 80 mg.L^{-1} de metabissulfito de sódio, pH 3,5, após 15 dias de incubação a 28 ± 2 ºC no escuro..... 42

Figura 13. Crescimento médio de *N. fischeri* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 80, 100 e 150 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 43

Figura 14. Crescimento médio de *N. fischeri* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações benzoato de sódio (BS 500, 600 e 700 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 43

Figura 15. Crescimento médio de *N. fischeri* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de sorbato de potássio (SP 700, 800 e 1000 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 44

Figura 16. Crescimento médio de *T. flavus* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 80, 100 e 200 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 45

Figura 17. Crescimento médio de *T. flavus* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de sorbato de potássio (SP 400, 800 e 1000 mg.L^{-1}.), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 45

Figura 18. Crescimento médio de *T. flavus* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de benzoato de sódio (BS 250, 350 e 500 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 46

Figura 19. Crescimento micelial de *Talaromyces flavus* em meio BDA acrescido de 50 mg.L^{-1} (A) e 80 mg.L^{-1} (B) de metabissulfio de sódio, pH 3,5, após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 47

Figura 20. Crescimento micelial de *Talaromyces flavus* em meio BDA acrescido de 800 mg.L^{-1} de sorbato de potássio, pH 3,5, após 15 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro..... 47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Categorias de alimentos para efeito de avaliação do emprego de aditivos. Brasil, 1998..... 16

Quadro 2. Limite máximo para a adição de ácido benzóico e seus sais de sódio, cálcio e potássio (P.I) em g por 100 g ou 100 mL de alimentos em que podem ser adicionados..... 19

Quadro 3. Limite máximo para a adição de dióxido de enxofre na forma de metabissulfito de sódio, metabissulfito de potássio, metabissulfito de cálcio, sulfito de sódio, sulfito de cálcio, sulfito de potássio, bissulfito de cálcio, bissulfito de sódio, bissulfito de potássio (P.V) em g por 100 g ou 100 mL de alimentos em que podem ser adicionados..... 22

Quadro 4. Limite máximo para a adição de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio (P.IV) em g por 100 g ou 100 mL de alimentos em que podem ser adicionados..... 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Crescimento de *E. coli* (em UFC) em 72 h em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes..... 34

Tabela 2. Crescimento de *Bacillus cereus* (em UFC) em 72 h em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes..... 35

Tabela 3. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium (em UFC) em 72 h em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes..... 37

Tabela 4. Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (em UFC) em 72 h em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Crescimento abundante
BDA	Batata Dextrose Agar
BS 250	Benzoato de sódio – 250 $mg.L^{-1}$
BS 500	Benzoato de sódio – 500 $mg.L^{-1}$
BS 600	Benzoato de sódio – 600 $mg.L^{-1}$
BS 700	Benzoato de sódio – 700 $mg.L^{-1}$
BS 800	Benzoato de sódio – 800 $mg.L^{-1}$
BS 1000	Benzoato de sódio – 1000 $mg.L^{-1}$
CCFAC	Comitê Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes
CNM	Conselho Nacional de Saúde
CPAA	Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos
CYA	Agar Czapeck-Extrato de Levedura
DAEC	*Escherichia coli* que se adere difusamente
DOU	Diário Oficial da União
EPEC	*Escherichia coli* enteropatogênica
EIEC	*Escherichia coli* enteroinvasora
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigênica
EAggEC	*Escherichia coli* enteroagregativa
EHEC	*Escherichia coli* entero-hemorrágica
FDA	*Food and Drug Administration*
JECFA	*Joint Expert Committee on Food Additives FAO/WHO*
MB 50	Metabissulfito de sódio – 50 $mg.L^{-1}$
MB 80	Metabissulfito de sódio – 80 $mg.L^{-1}$
MB 100	Metabissulfito de sódio – 100 $mg.L^{-1}$
MB 150	Metabissulfito de sódio – 150 $mg.L^{-1}$
MB 200	Metabissulfito de sódio – 200 $mg.L^{-1}$
MB 300	Metabissulfito de sódio – 300 $mg.L^{-1}$
MEA	Agar Extrato de Malte
$mg.L^{-1}$	Miligrama por litro
MS	Ministério da Saúde
OMS ou WHO	Organização Mundial de Saúde/ *World Health Organization*
P.I	Ácido benzóico, e seus sais de sódio, cálcio e potássio.
P.IV	Ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio.
psc	Produto a ser consumido
P.V	Dióxido de enxofre: Metabissulfito de sódio, potássio e cálcio; sulfito de sódio, cálcio e potássio, bissulfito de cálcio, sódio e potássio.
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SOD	Sulfito oxidase
SP 200	Sorbato de potássio – 200 $mg.\ L^{-1}$
SP 250	Sorbato de potássio – 250 $mg.L^{-1}$
SP 400	Sorbato de potássio – 400 $mg.L^{-1}$
SP 500	Sorbato de potássio – 500 $mg.L^{-1}$
SP 800	Sorbato de potássio – 800 $mg.L^{-1}$
SP 1000	Sorbato de potássio – 1000 $mg.L^{-1}$
SVS	Secretária de Vigilância Sanitária
TSA	Triptona-Soja-Agar
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 01
2. OBJETIVOS..... 04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 06
3.1. Caracterização dos microrganismos estudados..... 11
3.1.1 Fungos filamentosos termorresistentes..... 11
a) *Byssochlamys fulva*..... 11
b)*Talaromyces flavus*..... 12
c) *Neosartorya fischeri*..... 12
3.1.2. Bactérias..... 13
a) *Salmonella* sp..... 13
b) *Escherichia coli*..... 14
c) *Bacillus cereus*..... 14
3.2. Conservantes Alimentares..... 15
3.2.1. Legislação..... 15
a) Restrições ao uso de conservantes..... 17
3.2.2. Ácido benzóico e benzoato de sódio..... 17
a) Metabolismo do benzoato de sódio no homem..... 19
b) Mecanismo de ação do benzoato de sódio nos microrganismos..... 20
3.2.3. Dióxido de enxofre e sulfitos..... 20
a) Metabolismo dos sulfitos..... 23
b) Mecanismo de ação dos sulfitos nos microrganismos..... 24
3.2.4. Ácido sórbico e sorbato de potássio..... 25
a) Metabolismo dos sorbatos..... 27
b) Mecanismo de ação dos sorbatos nos microrganismos..... 27
4. METODOLOGIA..... 28
4.1. Local das análises..... 29
4.2. Amostragem..... 29
4.2.1. Bactérias..... 29
4.2.2. Fungos..... 29
4.3. Preparo dos meios de cultura contendo conservantes..... 29
4.3.1. Meio para crescimento bacteriano..... 29
4.3.2. Meio para crescimento fúngico..... 29
4.4. Preparo do inóculo e ensaios..... 30
4.5. Análises estatísticas..... 31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 32
5.1. Crescimento bacteriano..... 33
5.1.1. *E. coli*..... 33
5.1.2. *Bacillus cereus*..... 35
5.1.3. *Salmonella* Typhimurium *e S.* Enteritidis..... 36
5.2. Fungos termorresistentes..... 39
5.2.1. *Byssochlamys fulva*..... 39
5.2.2. *Neosartorya fischeri*..... 42
5.2.3. *Talaromyces flavus*..... 44
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... 48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 50
8. APÊNDICES..... 62

Apêndice1. Artigo: Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento de fungos termorresistentes *in vitro*..... 63
Apêndice 2. Artigo: Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento de bactérias patogênicas *in vitro*..... 71

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

É sabido que uma série de doenças infecciosas são veiculadas pelos alimentos e que estes se constituem de um ótimo meio de crescimento para uma grande diversidade de microrganismos, sendo fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias. O homem desde muito tempo também procura evitar esta proliferação microbiana, procurando manter a integridade de seu produto a ser comercializado, ou para seu próprio consumo, através de barreiras físicas e químicas.

O próprio alimento apresenta uma série de fatores intrínsecos que podem impedir ou selecionar o crescimento de diferentes microrganismos. A inativação efetiva é feita associando-se uma série de fatores. As temperaturas de pasteurização, em torno de 70 a 90 °C, normalmente empregadas no tratamento térmico são eficazes contra uma série de bactérias, porém, podem não ser suficientes para inativar fungos termorresistentes, como os dos gêneros *Byssochlamys, Neosartorya* e *Talaromyces*. A pasteurização, normalmente aplicada a produtos vegetais ácidos (90 ºC), ativa os ascósporos dormentes, que germinam e crescem no produto deteriorando-o (BEUCHAT, 1986; ENIGL *et. al.*, 1993; *apud* CUNHA, 2003). Temperaturas mais elevadas afetam as características físico-químicas dos sucos e, portanto, o controle da deterioração por fungos termorresistentes baseia-se, fundamentalmente, na adoção de práticas higiênico-sanitárias adequadas, visando diminuir a possibilidade de contaminação das matérias-primas (SCHIMIDT,1995 ; VITALI & RAO, 1984).

Para tentar reduzir os riscos de multiplicação de microrganismos e a conseqüente deterioração dos alimentos, além do tratamento térmico, as indústrias estão utilizando, cada vez mais, aditivos químicos (conservantes), como o de dióxido de enxofre (sulfitos, metabissulfitos), ácido benzóico (benzoatos) e de ácido sórbico (sorbatos), evitando-se a deterioração no produto final (BRASIL, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

É obrigatória para os produtores a menção dos aditivos utilizados nas embalagens de alimentos e bebidas (BRASIL, 1998; ANÔNIMO, 2005). Muitos aditivos utilizados em alimentos e bebidas apresentam propriedades toxicológicas e, se usados em grandes concentrações podem vir a causar danos à saúde.

Portanto, é dever dos órgãos competentes fiscalizar a qualidade dos alimentos industrializados (NASCIMENTO *et. al.*, 2004).

Rajashekhara *et al.* (2000) citam o uso de benzoato de sódio e sorbato de potássio por Beuchat (1981), na inativação de conídios de *Aspergillus flavus* e ascósporos de *Byssochlamys nivea.* O mesmo também relata a dificuldade na inativação de ascósporos de *Neosartorya fischeri* em sucos de manga e uva, devido ao elevado tempo de submissão destes sucos ao calor (85°C por 18 min, ou 95°C por mais de 15 min), sendo este tempo suficiente para a degradação dos nutrientes presentes nos sucos.

Apesar de a literatura afirmar que o uso de conservantes é mais efetivo para os fungos, e que as bactérias são normalmente controladas através de modificações de pH (FRANCO & LANDGRAF, 2002; JAY, 2005), vários autores afirmam que não se pode ter certeza que alimentos ácidos estão livres de bactérias patogênicas, uma vez que algumas linhagens podem sobreviver em pH 2,5 por 2 horas ou mais (BENJAMIN & DATTA, 1995; De JONGE, 2003).

Jay (2005) relata que baixas concentrações de SO_2 (100 a 200 $mg.L^{-1}$) tem efeito bacteriostático contra *Acetobacter* spp. e bactérias produtoras de ácido lático em baixo pH. Banks & Board (1982) mostraram que o crescimento de salmonelas e outras enterobactérias foi inibido em molho inglês com adição de 600 mg/ L^{-1} de SO_2, onde as mais sensíveis foram oito sorovares de *Salmonella,* cujo crescimento foi inibido numa faixa de 15 a 109 $mg.L^{-1}$ de metabissulfito de sódio (JAY, 2005).

A fim de fornecer subsídios para se reduzir a utilização de quantidades inadequadas de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, a ingestão imprópria dos mesmos pela população, o presente trabalho teve por objetivo determinar a concentração mínima de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária para inibir o desenvolvimento de fungos termorresistentes *Byssochlamys fulva, Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* e das bactérias *Salmonella* Enteritidis*, Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* e *Bacillus cereus* em meio de cultura.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a concentração mínima de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária para inibir o desenvolvimento dos fungos termorresistentes *Byssochlamys fulva, Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* e das bactérias *Salmonella* Enteritidis*, S.* Typhimurium*, Escherichia coli* e *Bacillus cereus in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar a resposta do crescimento de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* em meio Triptona-Soja-Agar para concentrações de 100, 200 e 300 $mg.L^{-1}$ de metabissulfito de sódio.

2.2.2. Avaliar a resposta do crescimento de *Salmonella* Typhimurium*,* *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* em meio Triptona-Soja-Agar para concentrações de 250, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$ de benzoato de sódio.

2.2.3. Avaliar a resposta do crescimento de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* em meio Triptona-Soja-Agar para concentrações de 250, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$ de sorbato de potássio.

2.2.4. Quantificar o crescimento de *Talaromyces flavus, Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys fulva* em meio Batata Dextrose Agar adicionado de metabissulfito de sódio nas concentrações de 80 e 300 $mg.L^{-1}$.

2.2.5. Quantificar o crescimento de *Talaromyces flavus, Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys fulva* em meio Batata Dextrose Agar adicionado de benzoato de sódio nas concentrações compreendidas entre 100 e 1000 $mg.L^{-1}$.

2.2.6. Quantificar o crescimento de *Talaromyces flavus, Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys fulva* em meio Batata Dextrose Agar adicionado de sorbato de potássio nas concentrações compreendidas entre 200 e 1000 $mg.L^{-1}$.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

As frutas, e seus sub-produtos, como sucos, polpas, concentrados e frutas enlatadas apresentam maior susceptibilidade à contaminação e posterior deterioração por fungos termorresistentes, influenciada pela amplitude da exposição ao solo, bem como pela prevalência do fungo no solo onde as frutas crescem (BEUCHAT & RICE, 1979). Dentre os vários tipos de frutas, aquelas que são colhidas diretamente do solo ou que estão próximas dele, como morango, ameixa, maracujá, uva, abacaxi, pêssego e maçã são as mais afetadas pela deterioração por fungos termorresistentes (TOURNAS, 1994).

Segundo Garza (2006), este tipo de fungo desenvolve-se principalmente na superfície dos alimentos, devido a sua condição aeróbia com micélio aparente no produto e, às vezes, podem causar a formação de flóculos ou de uma diminuição da turbidez devido à degradação das pectinas. A alteração da coloração também pode acontecer porque o fungo difunde seu próprio pigmento e degrada os pigmentos naturais principalmente nas frutas. Muitos fungos filamentosos destroem os ácidos das frutas, como o cítrico e o ascórbico, e sintetizam outros, como o glucônico e o oxálico, produzindo modificações no pH e no sabor.

Além disso, estes fungos também podem ser resistentes às altas concentrações de peróxido de hidrogênio, irradiação, baixas concentrações de oxigênio e baixas atividades de água (a_w) (HOFFMANN, 2004).

Alguns fungos filamentosos do gênero *Fusarium* e *Mucor* podem crescer submersos no produto, causando a fermentação do mesmo e produção de álcool etílico e CO_2 (MULLER, 1981). Vicini *et al.* (1984) isolaram fungos filamentosos produtores de gás a partir de sucos de fruta envasados em embalagens Tetrabrik® que se mostravam claramente estufadas. Os isolados foram identificados como *Mucor spinensis* e *Cephalosporium roseo-griseum.* Segundo Turtura *et al.* (1988), diversas espécies dos gêneros *Penicillium, Aspergillus, Cladosporium* e *Trichoderma,* foram isoladas de bebidas alcoólicas.

As principais espécies fúngicas comumente envolvidas na deterioração de frutas e derivados de frutas são *Penicillium* sp.*, Aspergillus* sp.*, Cladosporium* sp.*, Eupenicillium brefeldianum, B. nivea* e *B. fulva, Neosartorya fischeri*, *Talaromyces*

flavus e *T. trachyspermus* (ENIGL *et al.*, 1993; TOURNAS, 1994 *apud* CUNHA, 2003; GARZA), sendo os cinco últimos termorresistentes, cujas formas anamorfas são, respectivamente, *Paecilomyces niveus, P. fulvus, Aspergillus fumigatus* e *Penicillium dangeardii* (PITT & HOCKING, 1985).

A literatura relata vários casos de contaminação de alimentos por estas espécies. Em 1933, Olliver & Smith apresentaram o primeiro relato de contaminação e deterioração de produtos de frutas engarrafados e enlatados, identificando *B. fulva* como seu causador (HOFFMANN, 2004). Em 1934, Oliver e Rendle, na Inglaterra, também identificaram fungos termorresistentes do gênero *Byssochlamys*, como agente deteriorador de frutas processadas.

Na década de 60 do mesmo século, isolou-se, a partir de morangos termicamente tratados e enlatados uma cepa de *Neosartorya fischeri* var. *spinosa* (KAVANAGH *et al.,* 1963). Os gêneros *Aspergillus, Penicillium* e *Pullularia* também foram isolados de suco de uva (KING *et al.,* 1969) enquanto *Mucor spinescens*, que produz esporos com baixa termorresitência, e *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* foram respectivamente isolados de sucos de pêra e tomate deteriorados em embalagens Tetrabrik® (VICINI *et al.,* 1983).

Aragão (1989) cita que Splittstoesser *et al.* (1971) detectaram fungos termorresistentes em pomares e vinhedos em Nova York (EUA), sendo que mais de 70% da contaminação correspondia a *B. fulva.*

Só na década de 80, Dragoni & Comi (1985) isolaram quatro espécies de fungos filamentosos a partir de sucos de fruta industrializados: *Penicillium expansum, B. fulva, B. nivea* e *Aspergillus fumigatus.*

Mucor spinescens também foi isolado em suco de laranja deteriorado e *N. fischeri* foi detectado a partir de vários sucos comerciais, enquanto *T. flavus* foi isolado de suco de abacaxi (SPOTTI & CASOLARI, 1987; SCOTT & BERNARD, 1987; KING & HALBROOK, 1987).

Aragão (1989) também isolou de polpas de frutas e diferentes sucos, fungos dos gêneros *Byssochlamys, Neosartorya, Talaromyces* e *Eupenicillium.*

Na década de 90, Engel & Teuber (1991) isolaram *B. nivea* de leite cru integral e também de leite pasteurizado enquanto Spotti *et. al. (*1992) isolaram *B. nivea, B. fulva e T. flavus* de tomates *in natura.* Kotzekidou *et. al.* (1997) isolaram *B. fulva, B. nivea e N. fischeri* de massa de tomate enlatada, assim como Baglioni

et al. (1999) também detectaram a presença de fungos filamentosos em polpa de tomate termicamente processada, numa agroindústria no estado de São Paulo. A maioria destes microrganismos mostrou-se termorresistente, principalmente o isolado identificado como *N. fischeri,* que sobreviveu ao choque térmico a 100°C por 25 minutos.

Em estudos realizados em uma indústria de sucos em Campinas (SP), Rocha *et al.* (2002) detectaram fungos termorresistentes durante o processamento de suco de manga e também no produto final. Rosenthal *et al.* (2002), na mesma cidade, apontaram a contaminação por fungos termorresistentes, principalmente os do gênero *Byssochlamys,* em sucos de abacaxi termicamente tratados. Tais fungos, além de deteriorantes, podem produzir toxinas (patulina) carcinogênicas.

Em suco de laranja pasteurizado numa unidade experimental de São Paulo, detectou-se um grande número de bactérias mesofílicas, como também de fungos filamentosos e leveduriformes. Tal incidência aumentou com a evolução do tempo de armazenamento (SUGAI *et. al.*, 2002). Da mesma forma relatou-se a contaminação por fungos filamentosos e leveduriformes não termorresistentes em suco de maracujá termicamente tratado (MATOS *et. al.,* 2004).

Mattietto *et. al.* (2004) detectaram a presença de fungos filamentosos do gênero *Byssochlamys* em néctar misto de cajá e umbu. Os frutos utilizados no preparo deste néctar foram provenientes de Belém (PA) e Salvador (BA), respectivamente.

Hoffmann (2004) relata que a farinha de mandioca, em geral, freqüentemente contém ascósporos de fungos do gênero *Byssochlamys.*

As bactérias patogênicas são responsáveis por diversos males causados aos seres humanos. Jay (2005) relata que *E. coli* é reconhecida como patógeno alimentar desde 1971.

Inicialmente, pensava-se que os alimentos contaminados por salmonelas eram aves e ovos (CAFFER & EIGUER, 1994; HUMPHREY, 1994; SANTOS *et al.,* 2000). Não obstante, leite, carne e seus derivados, e até frutas são vetores de salmonelas (SAKAI & CHALERMCHAIKIT, 1996; COSTALUNGA & TONDO, 2002; PINHEIRO *et. al.,* 2005). No Rio grande do Sul, num período de 1997 a 1999, foram notificados 116 casos de salmonelose transmitida por alimentos,

como saladas contendo maionese, massas, carne e produtos cárnicos e leite e derivados, além de um caso em sorvete (COSTALUNGA & TONDO, 2002).

No Brasil, nos anos de 1996 e de 1998 a 2000, foram registrados 192 surtos de infecção alimentar, sendo as hortaliças de folhas e raízes responsáveis por 19 (9,9%) deles (SIRVETA, 2002). Mendes *et al.* (1999) avaliaram queijo de coalho comercializado em Recife, oriundos de 15 municípios de Pernambuco e observaram a presença de *Salmonella* em queijos produzidos em 73,3% dos mesmos. Já Florentino & Martins (1999) detectaram a presença de *Salmonella* em 30% das amostras de queijo de coalho artesanal produzidos em várias regiões do Estado da Paraíba.

Pinheiro (2005) verificou a incidência de *Salmonella* sp. e coliformes fecais em amostras de mamão, melão, abacaxi, goiaba, e manga minimamente processadas e coletadas em supermercados de Fortaleza- CE.

A partir de amostras de salame coletadas nas diferentes etapas de uma linha de produção industrial, 54 cepas de *Salmonella* sp., foram isoladas, sendo os principais sorotipos: *Salmonella* Panamá (16/54), seguida pelo sorotipo O:4:5 (10/54), Newport (8/54) e *typhimurium* (6/54) (RIBEIRO *et. al.,* 2007).

Em queijo de coalho e queijo de manteiga, produzidos artesanalmente em diferentes microrregiões no Estado do Rio Grande do Norte, foram detectadas a presença de *Salmonella* em 9% e 15% das amostras, respectivamente, *e E. coli* em ambos os queijos com contaminação de 36,4% e 7,7%, respectivamente para as amostras analisadas (FEITOSA *et. al.,* 2003).

Na cidade de João pessoa (PB), Nascimento (1982) isolou coliformes totais e fecais, dentre eles *E. coli e*m amostras de leite tipo C pasteurizado. *Escherichia coli* foi isolada de leite bovino cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" comercializados em Piracicaba – SP (AVILA & GALLO, 1996) e em leite pasteurizado tipo B e C, no Rio de Janeiro (SILVA *et al.,* 2001).

Costa & Silva (2001) relatam uma grande contaminação por *E. coli* em carne de sol comercializada tanto em estabelecimentos inspecionados como não inspecionados na cidade de João Pessoa (PB), sendo respectivamente, de 56,3% e 66,7% a prevalência nas amostras analisadas. Também na Paraíba, Catão e Ceballos (2001) detectaram a presença de *E. coli* em amostras de leite cru e pasteurizado, provenientes de Campina Grande (PB) e Garanhuns (PE).

Furlanetto *et al.* (1982) detectaram em saladas com maionese adquiridas em restaurantes, lanchonetes e rotisserias, de São Paulo, a presença de *E. coli e B. cereus.* Este também foi evidenciado em macarrões comerciais, com e sem ovos, observando-se um índice médio de 70,9 % de contaminação (KNIGHT *et. al.*, 1990).

A ocorrência de bactérias do gênero *Bacillus* foi descrita por Schocken-Iturrino *et al.* (1996), ao analisarem caixas de leite longa vida na região de Ribeirão Preto (SP). O era submetido a ultra-alta temperatura (UAT), isto é, temperatura 130 °C, por 2 a 4 s, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C, e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. Os autores constataram a contaminação em 59,3% das amostras analisadas. Rezende *et al*. (2000) também analisaram 120 amostras de leite UAT, verificando que, 34,1% delas apresentaram espécies de *Bacillus*. No Egito, Bahout (2000) verificou que *B. cereus* esteve presente em 29,2% das amostras de leite UAT analisadas, enquanto 18,3% delas apresentaram *Bacillus* sp. Em 2005, Vidal-Martins *et. al.* verificaram também a contaminação de leite UAT por *B. cereus* em 11,8% das amostras estudadas.

Uma grande variedade de alimentos têm sido identificadas em surtos de contaminação por *B. cereus* bactéria, tais como carnes, leite, queijos, vegetais, massas, peixes, misturas com molhos, pudins e sopas (SESAUSP/CVE, 2002).

3.1. Caracterização dos microrganismos estudados

3.1.1. Fungos filamentosos termorresistentes

a) Byssochlamys fulva

O gênero *Byssochlamys* (Divisão Ascomycota) é caracterizado por fungos que não apresentam envoltório para os ascos durante o seu desenvolvimento, sendo estes produzidos em cachos irregulares abertos, com oito ascósporos em associação de dimensões variando entre 2,8-4,0 x 3,4-5,6 µm (BAGLIONI, 1998). As espécies destacadas na contaminação de alimentos são *B. nivea* e *B. fulva* que apresentam como formas anamorfas, respectivamente *Paecylomyces niveus e P. fulvus* .

Byssochlamys fulva produz colônias marrons amareladas em meio Extrato de Malte (MEA) ou Agar Czapeck-Extrato de Levedura (CYA), e não produz clamidósporos, diferente de *B. nivea,* que é capaz de produzir clamidósporos (BAGLIONI, 1998). Os ascósporos de *B. fulva* são bem maiores do que os de *B. nívea* (HOFFMANN, 2004). Estes fungos produzem toxinas, sendo elas a patulina, o ácido byssoclâmico, a byssotoxina A, a assimetrina e a variotina consideradas tóxicas para microrganismos, plantas e animais e extremamente nociva à saúde humana, (BEUCHAT & RICE, 1979; TOURNAS, 1994).

b) Talaromyces flavus

O gênero *Talaromyces* (Divisão Ascomycota) é caracterizado pela produção de gimnotécios brancos ou amarelos, associados ao estado anamórfico identificado como: *Penicillium, Paecilomyces* ou *Geosmithia* (HOFFMANN, 2004).

Talaromyces flavus é a espécie mais isolada de alimentos ácidos que sofreram tratamento térmico (PITT & HOCKING, 1985; SPLITTSTOESSER, 1991, *apud* BAGLIONI, 1998).

Aragão (1989), citado por Hoffmann (2004), caracteriza as colônias de *T. flavus* em MEA, por apresentarem coloração amarela com reverso variando, ao longo do tempo, de alaranjado até marrom. Os ascocarpos são amarelos, globosos, com ascos sub-globosos e oito ascósporos elipsoidais, amarelos, de paredes grossas e espinosas.

c) Neosartorya fischeri

Pertencente à divisão Ascomycota*, N. fischeri* é a única espécie do gênero reconhecida como deteriorante de alimentos, e este pode apresentar-se nas variedades *fischeri*, *spinosa* e *glabra.* Tais variedades distinguem-se pelo tipo de ornamentação presente em seus ascósporos, tipos de toxinas e outros metabólitos secundários produzidos (CUNHA, 2003). Na fase anamorfa, *N. fischeri* é denominado *A. fischeri*, entretanto a fase teleomórfica é a mais encontrada (TOURNAS, 1994).

A coloração das colônias varia entre branco e amarelo e o reverso varia de amarelo a rosa pálido ou marrom. O micélio é branco e há grande produção de

cleistotécio. As colônias têm aparência granular, devido aos cleistotécios que envolvem os ascos. Os ascósporos são elipsoidais ou ovais, de 7 a 8 µm de comprimento, e apresentam duas cristas longitudinais (CUNHA, 2003).

Algumas linhagens deste fungo são capazes de produzir toxinas como as fumitremorginas (A, B e C), verruculogena, fischerina e terreina, que são capazes de atuar no sistema nervoso central e causar tremores, convulsões e morte em animais (Tournas, 1994).

3.1.2. Bactérias

***a) Salmonella* sp**

O gênero *Salmonella* inclui várias espécies patogênicas para o homem e outros animais. São pertencentes à família *Enterobacteriaceae,* possuem formato de bastonetes de 0,5 - 0,7 µm por 1 – 3 µm, não esporulados, móveis por flagelos peritríquios, Gram-negativos e anaeróbias facultativas (PINTO, 2004). Catalase positivas e oxidase negativas (PELCZAR, 1996).

Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 35 – 37 °C, mas podem sobreviver em temperaturas de 5 a 45 °C, e não resistem a temperaturas superiores a 60°C. O gênero está adaptado a uma variação de pH de 4,5 a 9,0, mas adapta-se melhor à neutralidade, porém a sobrevivência e crescimento de *Salmonella* sp. em suco de maçã (pH 3-4) e em tecido de sementes de tomate (pH 1-4) foi demontrado por Golden *et al.* (1993), Zhuang and Beuchat (1995) e Roering *et al.* (1999), *apud* Gawande & Bhagwat (2002).

Tem como habitat o trato intestinal do homem e outros animais como animais de granja, pássaros, répteis, suínos e ocasionalmente insetos. Também pode estar presente em águas poluídas (JAY, 2005). A transmissão pode também ocorrer via contato direto com animais contaminados, sendo as aves e bovinos considerados as principais fontes de contaminação (KWANG *et al.,* 1996).

Até 2005, Jay (2005) relata a existência de 2.324 sorotipos de *Salmonella*.

b) Escherichia coli

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli, E. blattae, E. fergusonii, E. hermannii e E. vulneris.* Entretanto, *E. coli* é a espécie de maior interesse, contendo uma grande variedade de sorotipos e grupos patogênicos ao homem.

Escherichia coli apresenta-se na forma de bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de desenvolvimento variando de 35 a 37ºC, sendo considerada de origem unicamente fecal, habitando o trato intestinal do homem e animais. Fermenta a lactose com formação de gás a 35°C (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Conforme Trabulsi *et. al.* (1999) apresenta-se nas seguintes formas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) e *E. coli* que se adere difusamente (DAEC).

Reconhecida como patógeno de origem alimentar em 1971 (JAY, 2005), as variedades de *E. coli* diferem na patogenicidade, podendo causar desde leves infecções intestinais à meningites e septicemias (TRABULSI *et. al.,* 1999).

c) Bacillus cereus

O gênero compreende cerca de 50 espécies com intensa atividade metabólica, sendo capazes de degradar diversos substratos orgânicos (TRABULSI, 1999). Duas espécies porém, são reconhecidas como patogênicas: *B. cereus* e *B.anthracis* (JAY,2005).

O *B. cereus* é caracterizado como bastonete Gram-positivo com flagelos peritríquios, que podem ser centrais ou subterminais, aeróbio, mesófilo, produtor de esporos. A espécie é catalase positiva e oxidase variável, sendo produtora de hemolisinas. Sua temperatura ótima de desenvolvimento varia entre 28ºC e 35ºC, e em pH que oscila de 4,9 a 9,3.

As células vegetativas de *B. cereus* são facilmente destruídas pelo calor, mas os esporos são mais resistentes ao aquecimento (superior a 100ºC), e a toxina emética é resistente se submetida a 126ºC por 90 min (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

3.2. Conservantes Alimentares

3.2.1. Legislação

Os aditivos alimentares, dentre eles, os conservantes, tiveram o seu uso regulamentado no Brasil desde 1961, por meio do decreto nº 50.040, sendo revisto e modificado posteriormente pelo decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965 pela Comissão permanente de aditivos pan-alimentos (CPAA) vinculada ao Ministério da Saúde (MS). Em seguida, várias atualizações na legislação brasileira, a partir do Serviço de Vigilância Sanitária (SVS) do MS foram feitas visando regulamentar tecnicamente o uso de aditivos a fim de minimizar seus riscos à saúde humana.

A portaria SVS/MS nº. 540/97 define "aditivo alimentar" como: *"qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais."*

A legislação também enumerou diversas categorias de alimentos para avaliação do emprego de aditivos, as quais estão dispostas no Quadro 1.

Ainda conforme a Portaria SVS/MS nº. 540/97, uso de aditivos em alimentos é tolerado se respeitadas as seguintes condições: a) o aditivo é indispensável à adequada tecnologia de fabricação; b) ter registro no ministério da saúde; c) for empregado na quantidade estritamente necessária à obtenção do efeito desejado, respeitando-se o limite máximo fixado de acordo com o alimento a ser adicionado.

Tomando como base o resultado de pesquisas internacionais e as recomendações do CCFAC do JECFA, a CPAA tem definido e fiscalizado o emprego de aditivos pela indústria nacional.

Quadro 1. Categorias de alimentos para efeito de avaliação do emprego de aditivos. Brasil, 1998.

CATEGORIA	ALIMENTOS
1	Leite
2	Óleos e gorduras
3	Gelados comestíveis
4	Frutas e hortaliças
5	Balas, confeitos, bombons, chocolates e similares
6	Cereais e produtos de ou a base de cereais
7	Produtos de panificação e biscoitos
8	Carnes e produtos cárneos
9	Pescados e produtos da pesca
10	Ovos e derivados
11	Açúcares e mel
12	Caldos, sopas e produtos culinários
13	Molhos e condimentos
14	Produtos protéicos e leveduras
15	Alimentos para fins especiais
16	Bebidas
17	Café, chá, erva-mate e outras ervas e similares.
18	Snacks (petiscos)
19	Sobremesas e pós para sobremesas
20	Alimentos enriquecidos ou fortificados
21	Suplementos nutricionais
22	Preparados para adicionar ao leite
23	Outros

Fonte: Brasil (1998). Portaria MS nº. 1.003/98, DOU 14/12/1998.

Segundo Leitão (1978), numerosos fatores influenciam a eficiência de um tratamento com conservantes, sendo os de maior importância a concentração do conservante, a temperatura de processamento e armazenamento, o tipo de microrganismo presente, a sua quantidade e, finalmente, a natureza do alimento a ser tratado. As propriedades físicas e químicas dos conservantes e a sua relação com o alimento constituem os principais fatores na sua eficiência (ARAÚJO, 1995).

Os aditivos podem ser classificados em diretos, quando são adicionados ao alimento com um propósito específico (conferir sabor, conservar, dentre outros), sendo identificados no rótulo dos produtos, e indiretos que, normalmente, convertem-se em parte do alimento, mesmo em quantidades insignificantes (CALIL & AGUIAR, 1999; DOUGLASS & TENNANT, 1997; HUGHES, 1994; SIMÃO, 1989; MULTON, 1988).

a) Restrições ao uso de conservantes

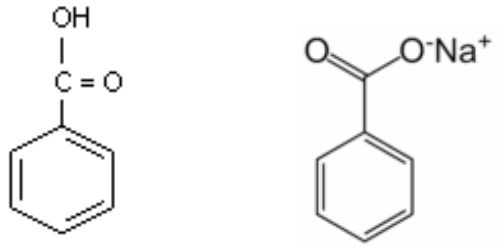
O artigo 8º do decreto nº. 50.040 de 24 de janeiro de 1961 proíbe o uso de aditivos em alimentos quando houver evidência ou suspeita de que o mesmo possui toxidade atual ou potencial, interfira sensível e desfavoravelmente no valor nutritivo do alimento, sirvam para encobrir falhas no processamento e nas técnicas de manipulação, encubra alteração ou adulteração na matéria-prima ou produto final; ou induza o consumidor a erro, engano ou confusão.

3.2.2. *Ácido benzóico e benzoato de sódio*

O ácido benzóico (C_6H_5COOH) e seus sais, tais como o benzoato (Figura 1) é um dos conservantes mais utilizados no mundo. Ele está presente em alguns vegetais, como na canela, ameixa e amora, mas aquele utilizado na indústria é obtido por síntese química (JAY, 2005, FRANCO & LANDGRAF, 2002), produzido pela oxidação do tolueno na fase líquida (SROUR, 1998). A sua ação conservadora é provocada pelas moléculas não-dissociadas, sendo o benzoato de sódio ($C_7H_5O_2Na$) produzido pela neutralização do ácido benzóico com hidróxido de sódio (NaOH).

É utilizado, em especial, para alimentos ácidos, preferencialmente em bebidas refrescantes, sucos para uso industrial, produtos lácteos, biscoitos e

conservas vegetais, como tomate e pimentões, marmeladas, crustáceos frescos ou congelados, margarinas, salsas e outros produtos. É um conservante barato, útil contra leveduras, fungos filamentosos e bactérias (com menor eficácia). Sua toxicidade é bem maior que a dos demais conservantes, além de conferir um sabor adstringente e pouco agradável (JAY, 2005).



Ácido Benzóico **Benzoato de Sódio**

Figura 1. Estrutura das moléculas de ácido benzóico e benzoato de sódio.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera como aceitável a ingestão de até 5 mg de benzoato por Kg de peso corporal/dia. Países como Itália e Portugal proibiram seu uso em refrescos. A tendência atual é a da substituição dos benzoatos por outros conservantes menos tóxicos e de sabor neutro, como os sorbatos (JAY, 2005).

No Brasil, os níveis máximos permitidos pela legislação variam de acordo com o alimento em que o mesmo será adicionado (Quadro 2).

Quadro 2. Limite máximo para a adição de ácido benzóico e seus sais de sódio, cálcio e potássio (P.I) em g por 100 g ou 100 mL de alimentos em que podem ser adicionados.

ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100ml
Aperitivos	0,05
Cooler	0,05
Creme vegetal	0,10
Doces em pasta	0,10
Leite de coco esterilizado	0,01
Leite de coco pasteurizado	0,30
Margarina	0,10
Molhos	0,10
Néctares de frutas	0,10
Picles e azeitonas	0,10
Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes	0,05 no p.s.c
Produtos de frutas	0,10
Queijo fundido (exclusivamente na embalagem)	0,20
Refrescos e refrigerantes	0,05
Sangria	0,05
Suco de frutas	0,10
Licores	0,05
Xaropes para refrescos	0,05 no p.s.c

Fonte: Brasil (1998). Resolução CNS/MS nº 04/88, D.O.U., Seção I, 19/12/88. p.s.c.: no produto a ser consumido.

a) Metabolismo do benzoato de sódio no homem

Depois de ingerido juntamente com o alimento, o benzoato de sódio, é total e rapidamente absorvido no trato gastrointestinal tanto em animais, quanto em humanos (US FDA, 1972, 1973). Em humanos, a máxima concentração no plasma estende-se por 1–2 horas (KUBOTA *et al.,* 1988; KUBOTA & ISHIZAKI, 1991), sendo que o ácido conjuga-se com a glicina formando ácido hipúrico, que é eliminado na urina (FRANCO & LANDGRAF,2002).

Um fator limitante para a biossíntese de ácido hipúrico é a disponibilidade de glicina, pois sua utilização na detoxificação de benzoato resulta na depleção no nível corporal deste aminoácido. Conseqüentemente, a ingestão de ácido benzóico ou seus sais afetam todos os processos onde a glicina esteja envolvida, como comandar a conversão em creatina e glutamina (WHO, 2000).

Casos de urticária, asma, renites, ou mesmo de choque anafilático têm sido relatados devido à exposição oral, dérmica, ou inalação do ácido benzóico ou do benzoato de sódio. Os sintomas aparecem pouco tempo após a exposição e desaparecem num curto período de tempo quando se trata de baixa dosagem (MAIBACH & JOHNSON, 1975; CLEMMENSEN & HJORTH, 1982; LARMI *et al*., 1988; RING, 1989; GAILHOFER *et al.,* 1990; ABERER *et al.,* 1992; LAHTI *et al.,* 1995; ANDERSON, 1996; BINDSLEV-JENSEN, 1998; COVERLY *et al.,* 1998 *apud* WHO, 2000). Na literatura também são descritos casos de crises alérgicas induzidas por alimentos, particularmente em crianças sensíveis à aspirina.

b) Mecanismo de ação do benzoato de sódio nos microrganismos

As formas ativas do ácido benzóico e de seu sal de sódio, capazes de inibir a atividade microbiana, residem na molécula não-dissociada, pois neste estado são solúveis na membrana celular microbiana e, aparentemente, atuam como ionóforos, facilitando a entrada de prótons na célula, aumentando o suprimento de energia para que esta possa manter a constância de seu pH e, também, afetando o transporte de aminoácidos (GOULD *et al.,*1983 *apud* JAY, 2005).

Em *Proteus vulgaris,* foi demonstrado que o ácido benzóico, quando absorvido por microrganismos aeróbios, bloqueia a oxidação da glicose e do piruvato ao nível do acetato. Os benzoatos também agem nos microrganismos inibindo a absorção de moléculas de substrato pela célula (BOSUND, 1962, FREESE *et. al.,*1973; *apud* JAY, 2005).

3.2.3. Dióxido de enxofre e sulfitos

O dióxido de enxofre (SO_2) é utilizado em sua forma líquida, gasosa ou na forma de um de seus sais de sódio, potássio ou cálcio, sendo eles o metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_3$), metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_3$),

metabissulfito de cálcio ($Ca_2S_2O_3$), sulfito de sódio (Na_2SO_3), sulfito de cálcio (Ca_2SO_3), sulfito de potássio (K_2SO_3), bissulfito de cálcio ($CaHSO_3$), bissulfito de sódio ($NaHSO_3$), bissulfito de potássio ($KHSO_3$); adicionados aos mais diversos alimentos (DAVIDSON, SOFOS & BRANEN, 2005).

O uso dos sulfitos em alimentos está relacionado às atividades funcionais dos sulfitos livres. De acordo com Popolim (2004), estas ações estão ligadas às propriedades:

- Antimicrobiana: atua como inibidor de algumas desidrogenases bacterianas, como a lactato desidrogenase;
- Fungistática: inibem reações de escurecimento enzimático e não-enzimático;
- Antioxidante: seqüestradores de oxigênio e agentes redutores; inibem várias enzimas, incluindo proteases, oxidases e peroxidases;
- Quelante: em glicídios.

Além dessas funções primárias, os sulfitos têm outras funções secundárias durante o processamento dos alimentos. Alguns sulfitos ligam-se a moléculas presentes nos alimentos tais como aldeídos, cetonas, glicídios e taninos. Os sulfitos que não se ligam a outras moléculas são chamados de ‘sulfitos livres’, e correspondem a uma mistura de SO_2, íon bissulfito e íon sulfito em equilíbrio químico dinâmico. Em certas condições, uma porção das moléculas de sulfitos ligados, chamada de ligação sulfito reversível, dissocia-se e forma os sulfitos livres (UNITED STATES, 1975; WEDZICHA, 1981a; WEDZICHA, 1981b; BARNETT, 1985; BEHRE, 1986; MARTIN, NORDLEE & TAYLOR, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986; TAYLOR & BUSH, 1987; ROSE & PILKINGTON, 1989; BRANEN, DAVIDSON & SALMINEN, 1990; FAZIO & WARNER, 1990; WEDZICHA, 1992; TAYLOR, 1993, *apud* POPOLIM, 2004).

O efeito do uso de diferentes conservantes, associados ao tratamento térmico para inibição do crescimento microbiano, tem sido estudado por muitos autores.

Os níveis máximos permitidos pela legislação brasileira e os alimentos em que podem ser adicionados dióxido de enxofre na forma de metabissulfito de sódio, metabissulfito de potássio, metabissulfito de cálcio, sulfito de sódio, sulfito de cálcio, sulfito de potássio, bissulfito de cálcio, bissulfito de sódio, bissulfito de potássio (P.V) estão dispostos no Quadro 3.

Quadro 3. Limite máximo para a adição de dióxido de enxofre na forma de metabissulfito de sódio, metabissulfito de potássio, metabissulfito de cálcio, sulfito de sódio, sulfito de cálcio, sulfito de potássio, bissulfito de cálcio, sódio e potássio (P.V) em **g por 100 g ou 100 mL** de alimentos em que podem ser adicionados.

ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO (g por 100 g ou 100 mL)
Açúcar refinado	0,002
Batatas fritas congeladas	0,01
Bebidas alcoólicas mistas	0,01
Bebidas alcoólicas fermentadas	0,01
Camarões e lagostas (na matéria prima após a captura)	0,003 (no produto cozido)
Camarões e lagostas (na matéria prima após a captura)	0,01 (no produto cru)
Coco ralado	0,02
Cervejas	0,006 (somente ditionito)
Cooler	0,035
Filtrado doce	0,035
Frutas dessecadas	0,01
Frutose	0,002
Geleias artificias	0,02
Jeropiga	0,01
Legumes e verduras desidratadas	0,02
Leite de coco esterilizado	0,01
Leite de coco pasteurizado	0,03
Licores de frutas	0,01
Mistela composta	0,025
Néctares de frutas	0,02
Passas de frutas	0,15
Picles	0,01
Preparados Sólidos e Líquidos para refrescos com sucos de frutas	0,008 no p.s.c
Refrescos com sucos de frutas	0,008
Refrigerantes	0,004 no p.s.c.
Refrigerantes com sucos de frutas	0,004
Sangria	0,035
Saquê	0,035
Sidras	0,035
Sucos de frutas	0,02
Vinagres	0,02
Vinhos	0,035
Vinhos compostos	0,025
Vinhos de frutas	0,035
Xaropes para refrescos com sucos de frutas	0,008 no p.s.c

Fonte: Brasil (1988). Resolução CNS/MS nº 04/88, D.O.U., Seção I – 19/12/88.

a) Metabolismo dos sulfitos

A oxidação dos sulfitos a sulfatos, via enzima sulfito oxidase (SOD), é a forma básica na qual esta substância é metabolizada. Essa enzima tem maior atividade no fígado, coração e rins, metabolizando e detoxificando os sulfitos ingeridos e o SO_2 inalado pelos pulmões, e representando também a etapa final na conversão de sulfitos de aminoácidos essenciais (cisteína e metionina) a sulfatos (Figura 2), sendo excretado pela urina (POPOLIM, 2004). Um adulto, em condições normais, excreta diariamente aproximadamente 2,5 g de sulfato na urina.

Os sulfitos exógenos ingeridos representam uma pequena fração dessa excreção de sulfato. A alta capacidade da SOD resulta em um rápido metabolismo dos sulfitos exógenos. Pequenas quantidades de sulfitos não oxidadas a sulfato podem se converter a tiossulfato, também excretado na urina, ou a tiossulfato ligado a proteínas, permanecendo maior tempo no organismo (US-FDA, 1975; TAYLOR & BUSH, 1986; TAYLOR & BUSH, 1987; QUATTRUCCI & MASCI, 1992).

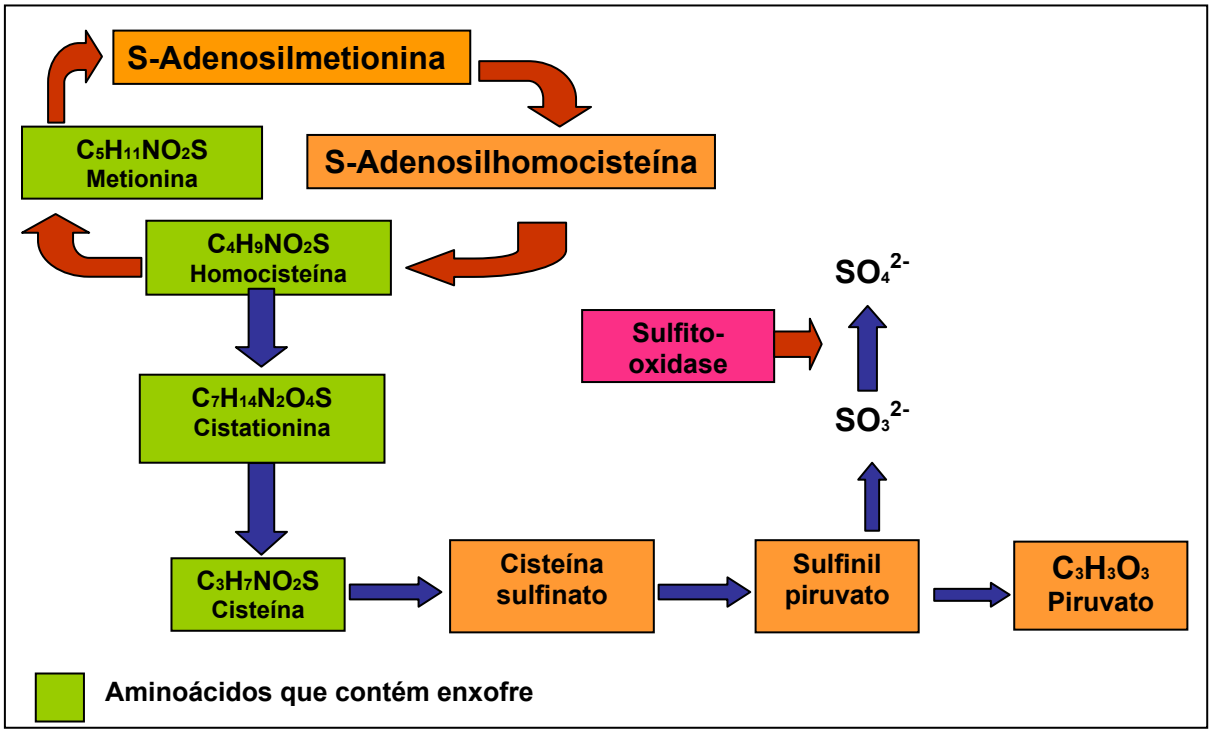


Figura 2. Produção intracelular de sulfitos. (Adaptado de http://www.asmabronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html, 2007)

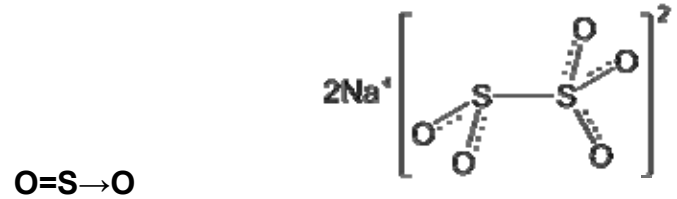
O metabolismo das formas combinadas de sulfitos, as quais são predominantemente encontradas nos alimentos, é pouco estudado. Este depende da estabilidade dessas moléculas e da probabilidade que elas tem para se tornar livres desde o processo digestivo (TAYLOR & BUSH, 1986; TAYLOR & BUSH, 1987).

Como um aditivo, pode causar reações alérgicas, particularmente irritação de pele, irritação gástrica e asma. Seu consumo não é recomendado para crianças, mas, mesmo assim, está presente em muitos concentrados de frutas diluíveis e em barras de doces (WIKIPEDIA, 2008).

Seu uso para conservar sucos de frutas é, geralmente, associado ao benzoato (GUIDOLIN,2005; JAY, 2005).

b) Mecanismo de ação dos sulfitos nos microrganismos

Nos microrganismos, o mecanismo de ação do dióxido de enxofre e derivados, como o metabissulfito de sódio (Figura 3) geralmente aplicados na forma de sais, não está bem elucidado. Estudos sugerem que a ação antimicrobiana contra organismos aeróbios deva-se ao alto poder redutor deste composto, que causa uma diminuição no nível de oxigênio, sendo inviável o crescimento destes microrganismos. Eles também agem sobre as ligações bissulfeto, afetando algumas enzimas, inativando-as, e reagindo com aldeídos no metabolismo dos carboidratos, bloqueando-os (FRANCO & LANDGRAF, 2002; JAY, 2005).



O=S→O

Dióxido de enxofre **Metabissulfito de Sódio**

Figura 3. Estrutura das moléculas de dióxido de enxofre e metabissulfito de sódio.

3.2.4. Ácido sórbico e sorbato de potássio

O ácido sórbico é um ácido graxo insaturado, presente de forma natural em alguns vegetais, mas sintetizado quimicamente na forma de benzoato de potássio ($C_6H_7O_2K$) como aditivo alimentar (Figura 4). Tem a vantagem de ser ativo em meios pouco ácidos, porém, seu custo é alto e necessita de cuidado, pois é parcialmente perdido se o produto for submetido ao calor (temperatura de ebulição). São mais eficazes contra fungos, e menos para as bactérias (FRANCO & LANDGRAF, 2002). Dentre as bactérias sensíveis estão os coliformes, salmonelas, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus* (JAY, 2005).

São utilizados principalmente em bebidas refrescantes, bolos e biscoitos, derivados cárnicos, queijos , azeitonas em conserva, em produtos lácteos com frutas, manteiga, margarina, marmeladas e em outros produtos. Na fabricação de vinho, é usado como inibidor da fermentação secundária, permitindo reduzir os níveis de sulfitos (JAY, 2005).

Os sorbatos são cada vez mais utilizados, devido à sua baixa toxicidade, em substituição aos conservantes mais tóxicos como o ácido benzóico. Seu uso está autorizado em todo o mundo. Em humanos, poucos casos peculiares de intolerância foram descritos (urticária de contato não imunológica e pseudo-alergia) (JUHLIN, 1981; SAFFORD *et al*., 1990; TFOUNI & TOLEDO, 2002).

Os níveis máximos de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio (P.IV) permitidos pela legislação brasileira e os alimentos em que podem ser adicionados encontram-se na Quadro 4.

Ácido sórbico **Sorbato de potássio**

Figura 4. Estrutura das moléculas de ácido sórbico e sorbato de potássio.

Quadro 4. Limite máximo para a adição de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio (P.IV) em g por 100 g ou 100 mL de alimentos em que podem ser adicionados.

ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO (g por 100 g ou 100 mL)
Amargos e aperitivos	0,05
Bombons e similares	0,10
Chocolates	0,10
Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,10
Coco ralado	0,20
Cooler	0,10
Creme vegetal	0,10
Doces em pasta	0,20
Filtrado doce	0,05
Frutas cristalizadas e glaceadas	0,10
Frutas dessecadas	0,05
Geléias de frutas	0,10
Leite de coco	0,20
Licores	0,05
Maioneses	0,10
Margarinas	0,10
Massas frescas, recheadas ou não, pré-embaladas e com umidade superior a 15%	0,20 sobre 0,20 (*) o peso do produto final
Massas semi-prontas, recheadas ou não, para o preparo de produtos forneáveis, doces ou salgados, pré-embalados, e com umidade superior a 15%.	0,20 sobre o peso do produto final
Molhos	0,10
Néctares de frutas	0,10
Picles e azeitonas	0,10
Pizzas, pastéis, empadas, polentas pré-embaladas e com umidade superior a 15%.	0,20 sobre o peso do produto final
Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes	0,01 no p.s.c
Produtos de frutas	0,20
Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petitsuisse e similares.	0,20
Proteína texturizada de soja (exclusivamente) no produto que deverá ser pré-hidratado para fins industriais (exceto a utilizada em produtos cárneos)	0,60 na base seca
Produtos de confeitaria	0,10
Produtos de panificação (tratamento na crosta de produtos embalados)	0,10 sobre o peso do produto a ser consumido
Produtos cárneos (somente nos revestimentos de embutidos maturados e cozidos, salames e mortadelas).	0,02
Queijo (exclusivamente na crosta)	0,10
Queijo ralado	0,20
Queijos em fatias pré-embaladas	0,10
Queijo pateurizado e fatiado	0,10
Recheios de chocolates, bombons e similares	0,10
Refrescos e refrigerantes	0,01
Sangria	0,10
Saquê	0,02
Sidras	0,05
Sucos de frutas	0,10
Vinhos	0,02
Vinhos de frutas	0,02
Xaropes para refrescos	0,01 no p.s.c.
Vegetais em conservas (exceto os submetidos à esterilização)	0,10

Fonte: Brasil (1988). Resolução CNS/MS nº 04/88, D.O.U .,Seção I, 19/12/88.

a) Metabolismo dos sorbatos

Metabolicamente, o ácido sórbico ou alguns de seus sais, se comporta no organismo como os demais ácidos graxos, sendo absorvido pelo organismo e utilizado como fonte de energia, produzindo CO_2 e H_2O (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

b) Mecanismo de ação dos sorbatos nos microrganismos

O ácido sórbico e seus sais parecem agir da mesma forma que o benzoato (pois são ambos ácidos lipofílicos). Este mecanismo envolve a força próton motiva, onde íons de hidrogênio se encontram fora das células mantendo o meio ácido, e íons hidroxila no seu interior, levando o pH à neutralidade, criando o potencial eletroquímico que a célula emprega no transporte ativo de alguns compostos, como os aminoácidos. Após se difundir pela membrana, a molécula não dissociada se ioniza, resultando num enfraquecimento do gradiente através da membrana, prejudicando o transporte de aminoácidos indispensáveis para as células microbianas (JAY, 2005).

Em fungos filamentosos, os sorbatos têm efeito fungistático, devido à inibição do sistema enzimático das desidrogenases e, nos esporos bacterianos, na fase de germinação, impedindo a multiplicação das células vegetativas (FRANCO & LANDGRAF,2002; JAY, 2005).

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Local de análise

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBPVMA) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.2. Amostragem

4.2.1. Bactérias

As cepas de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição da UFAL, as quais foram previamente isoladas de diferentes alimentos contaminados.

4.2.2. Fungos termorresistentes

As amostras de *Byssochlamys fulva* (CCT 0056)*, Neosartorya fischeri* (CCT 3491) e *Talaromyces flavus* (CCT 4683) foram fornecidas pela Coleção de Culturas Tropicais - Fundação André Tosello.

4.3. Preparo dos meios de cultura contendo conservante

4.3.1. Meio para crescimento bacteriano

Foi preparado meio TSA (Triptona-Soja-Agar), conforme instruções do fabricante, em frascos Erlenmeyer, em triplicata. Após a autoclavagem, o pH do meio foi ajustado com ácido cítrico (pH 3,5 e pH 5). Em condições assépticas, adicionou-se o conservante estudado (benzoato de sódio, metabissulfito de sódio ou sorbato de potássio) de modo a serem obtidas diferentes concentrações (100, 200, 250, 300, 400, 500, 800, 1000 $mg.L^{-1}$) do mesmo meio, e este foi vertido em placas de Petri esterilizadas para solidificação e uso nos ensaios.

4.3.2. Meio para crescimento fúngico

O meio Batata Dextrose-Agar (BDA), preparado conforme descrito por Silva *et al.* (2001), foi acidificado (pH 3,5) com ácido cítrico em frascos Erlenmeyer, em

triplicata. Após a autoclavagem, em condições estéreis, adicionou-se a esse meio o conservante estudado (benzoato de sódio, metabissulfito de sódio ou sorbato de potássio) de modo a obter-se diferentes concentrações do mesmo (80, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 1000 $mg.L^{-1}$). Após a completa homogeneização, verteu-se o meio em placas de Petri esterilizadas e aguardou-se sua solidificação para posterior inoculação.

4.4. Preparo do inóculo e ensaios

4.4.1. Bactérias

Com o auxílio de uma alça de platina coletou-se uma pequena porção de colônias de cada microrganismo (*S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *B. cereus* e *E. coli)*, e transferiu-se para o meio TSA preparado conforme instruções do fabricante e vertido em placas de Petri.

Após 24 h adicionou-se um volume de 10 mL de água estéril nas culturas em placas e recuperou-se esse lavado em tubos esterilizados. Uma alíquota de 1mL desse material foi retirada e adicionada a 9 mL de água destilada estéril, sendo que, dessa suspensão, novas diluições foram efetuadas (10^{-2} ou 10^{-3}). A seguir, procedeu-se à contagem de células utilizando-se Câmara de Neubawer e microscópio óptico Coleman (aumento 640 X). A partir desta contagem efetuou-se uma diluição final de cada suspensão de células, de forma a obter-se uma concentração de 10^5 cél/mL.

Depositou-se então, 100 µL (10^4 células) dessas suspensões finais em meio contendo conservante (pH 3,5 e 5), homogeneizando-se com alça de Drigalsky. Os controles constaram dos meios inoculados, porém, sem conservantes. As culturas em triplicata foram incubadas a 30 ± 2ºC, por 24, 48 e 72 h, no escuro. Em cada intervalo de tempo efetuou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.4.2. Fungos termorresistentes

Culturas dos fungos mencionados em 4.2.2., repicados a partir de discos de micélio em meio BDA acidificado (pH 3,5) com ácido cítrico, foram utilizadas como inóculo após 10 dias de incubação a 28 ± 2 ºC, no escuro. Assim, 1 disco de cerca de 5 mm de diâmetro foi retirado destas culturas e depositados no centro das placas de Petri contendo o meio BDA adicionado dos conservantes. Os

experimentos foram feitos em triplicata, e as placas foram incubadas a 28 ± 2 ºC, no escuro, por 30 dias ou até que o micélio tomasse todo o diâmetro da placa, sendo mensurados o crescimento micelial após 2, 7, 15, 22 e 30 dias de incubação, com o auxílio de um paquímetro (mm).

4.5. Análises estatísticas

A média ± desvio foi calculada. Os gráficos foram elaborados utilizando o Softwer Origin® 7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados do estudo da inibição do crescimento dos microrganismos estudados, quanto à ação dos conservantes utilizados.

5.1. Crescimento bacteriano

5.1.1. *E. coli*

Apesar de existirem na literatura vários relatos de sobrevivência bacteriana em pH ácido, principalmente para *E. coli* (GHENGHESH *et. al.*, 2005), neste estudo não foi observado nenhum sinal de crescimento bacteriano em pH 3,5, mesmo após 30 dias de incubação. Após este período as placas foram descartadas.

Para os ensaios realizados em pH 5, foi evidenciado um crescimento normal (semelhante ao controle em pH neutro). Apesar de o inóculo apresentar-se diluído (10^{-5}), na maioria dos casos o crescimento foi tão acentuado que se tornou impossível quantificar o número de UFCs, sendo o crescimento descrito como abundante (Ab), como se observa na figura 5.

O benzoato de sódio (BS) na menor concentração testada (250 $mg.L^{-1}$) não foi eficaz, atingindo efeito inibidor na concentração de 500 $mg.L^{-1}$, sendo a concentração de 1000 $mg.L^{-1}$ desnecessária no caso desta bactéria.

Já o sorbato de potássio foi requerido na concentração máxima testada de 1000 $mg.L^{-1}$ para atingir um efeito inibitório. Nas menores concentrações do mesmo, o crescimento de *E. coli* foi abundante.

O metabissulfito de sódio (MB) apresentou um bom resultado acerca da inibição do crescimento de *E. coli,* sendo eficiente numa concentração de 100 $mg.L^{-1}$ e apresentando melhor resultado se compara do aos demais conservantes testados para inibir totalmente o crescimento bacteriano após 72 h de incubação para a bactéria em questão (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento de *E. coli* (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO (mg.L^{-1})	**Número de UFC**		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	0	0
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	18,89 ± 13,63	Ab	Ab
BS 500	0	0	0
BS 1000	0	0	0
SP 250	0	Ab	Ab
SP 500	0	Ab	Ab
SP 1000	0	0	0
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias (abundante). MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 mg.L^{-1}.

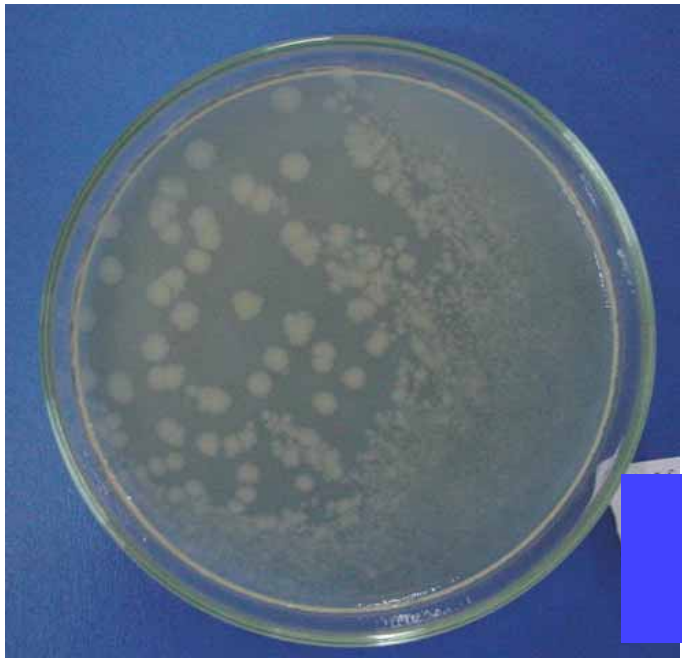


Figura 5. Crescimento abundante de *E. coli* em meio TSA acrescido de 250mg.L^{-1} de benzoato de sódio, pH 5, após 72 h de incubação a 30 ± 2ºC no escuro.

5.1.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus, por outro lado, apresentou-se mais sensível aos conservantes testados, sendo possível inclusive quantificar o número de UFC (Tabela 2, Figura 6). Da mesma forma que *E. coli*, foi inibido com mais eficiência pelo metabissulfito de sódio e em iguais concentrações de benzoato de sódio.

Já foi demonstrado que outras espécies de *Bacillus* são capazes de degradar o benzoato de sódio. Na produção de ácido lático, o benzoato é utilizado para inibir a oxidação da glicose e do piruvato ao nível do acetato (Acetil Coa), fazendo com que este microrganismo se utilize da via fermentativa, produzindo ácido lático e aumentando a produtividade (GARCÍA *et. al.*, 2004).

No presente estudo, o crescimento de *Bacillus cereus* não aumentou de acordo com o aumento da concentração de benzoato, pelo contrário, diminuiu, chegando a total inibição.

Tabela 2. Crescimento de *Bacillus cereus* (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO ($mg.L^{-1}$)	**Número de UFC**		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	0	0
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	0	2,11 ± 2,59	4,44 ± 2,08
BS 500	0	0	0
BS 1000	0	0	0
SP 250	0	7,33± 9,56	71,33 ± 93,44
SP 500	0	0,78± 1,04	1,00 ± 1,33
SP 1000	0	0	0
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias. MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$.

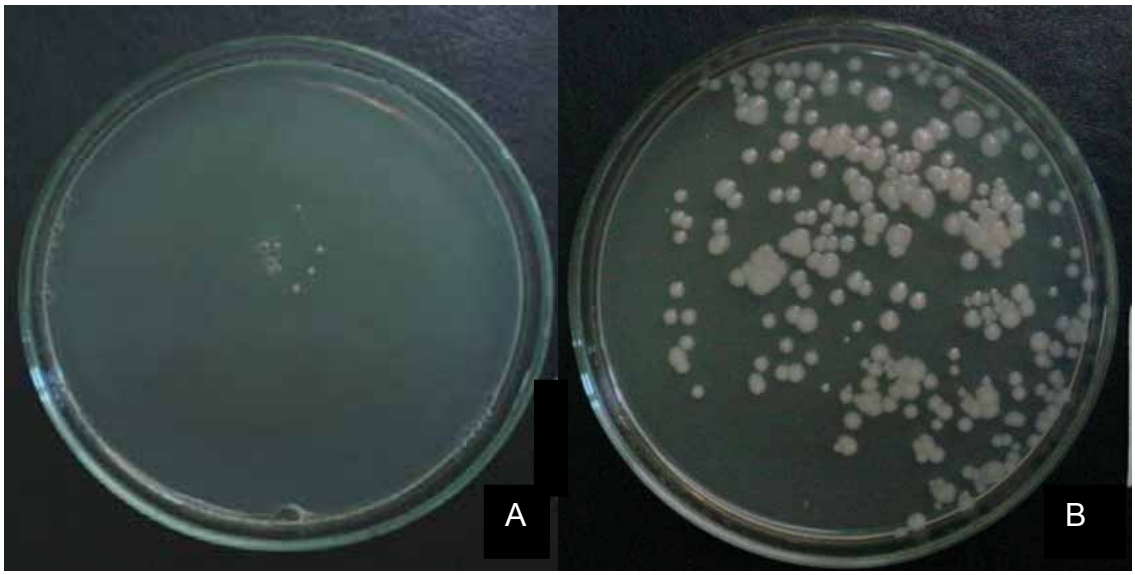


Figura 6. Colônias de *Bacillus cereus* em meio TSA acrescido de 250 mg.L^{-1} de benzoato de sódio (A) e 250 mg.L^{-1} de sorbato de potássio (B), após 72 h de incubação a 30 ± 2ºC no escuro.

Em meio ácido, não foi observado nenhum sinal de crescimento bacteriano por um período de 30 dias. Também não houve crescimento bacteriano no controle em meio acidificado (sem conservantes).

5.1.3. *Salmonella Typhimurium* e *S. Enteritidis*

No meio TSA ácido (pH 3,5) não foi observado o crescimento de *Salmonella* sp. Encontram-se descrito na literatura a sobrevivência e crescimento de *Salmonella* sp. em suco de maçã (pH 3-4) (GAWANDE & BHAGWAT, 2002) porém em meio de cultura isto não foi evidenciado.

De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 3 e 4), nenhuma das espécies de *Salmonella* foi sensível ao tratamento com sorbato de potássio, mesmo na concentração máxima testada de 1000 mg.L^{-1} (Figura 7B) apesar da literatura citar a sua eficiência frente às salmonelas (JAY, 2005).

Tanto *S.* Typhimurium como *S.* Enteritidis, tiveram seu crescimento inibido na concentração máxima testada de benzoato de sódio (1000 $mg.L^{-1}$). Nas concentrações inferiores seu crescimento foi tido como abundante (Figura 7).

Banks & Board (1982), em estudos com metabissulfito de sódio, mostraram que o crescimento de salmonelas e outras enterobactérias foi inibido em molho inglês com adição de 600 $mg.L^{-1}$ de SO_2, onde as mais sensíveis foram oito sorovares de *Salmonella,* cujo crescimento foi inibido numa faixa de 15 a 109 $mg.L^{-1}$ de metabissulfito de sódio em pH 7 (JAY, 2005).

Neste estudo, contudo, em pH 5, o metabissulfito de sódio inibiu o crescimento de *S.* Typhimurium na concentração de 100 $mg.L^{-1}$, e de *S.* Enteritidis na concentração de 200 $mg.L^{-1}$, *in vitro*, sendo esta mais resistente a este conservante.

Salmonella Typhimurium teve crescimento mais rápido que *S.* Enteritidis, mas igual comportamento para sorbato de potássio e benzoato de sódio no decorrer das 72h.

Tabela 3. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO ($mg.L^{-1}$)	**Número de UFC**		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	0	0
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	Ab	Ab	Ab
BS 500	Ab	Ab	Ab
BS 1000	0	0	0
SP 250	Ab	Ab	Ab
SP 500	Ab	Ab	Ab
SP 1000	Ab	Ab	Ab
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias. MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$.

Tabela 4. Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO (mg.L^{-1})	**Número de UFC**		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	Ab	Ab
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	0	Ab	Ab
BS 500	0	Ab	Ab
BS 1000	0	0	0
SP 250	0	Ab	Ab
SP 500	0	Ab	Ab
SP 1000	0	Ab	Ab
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias. MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 mg.L^{-1}.

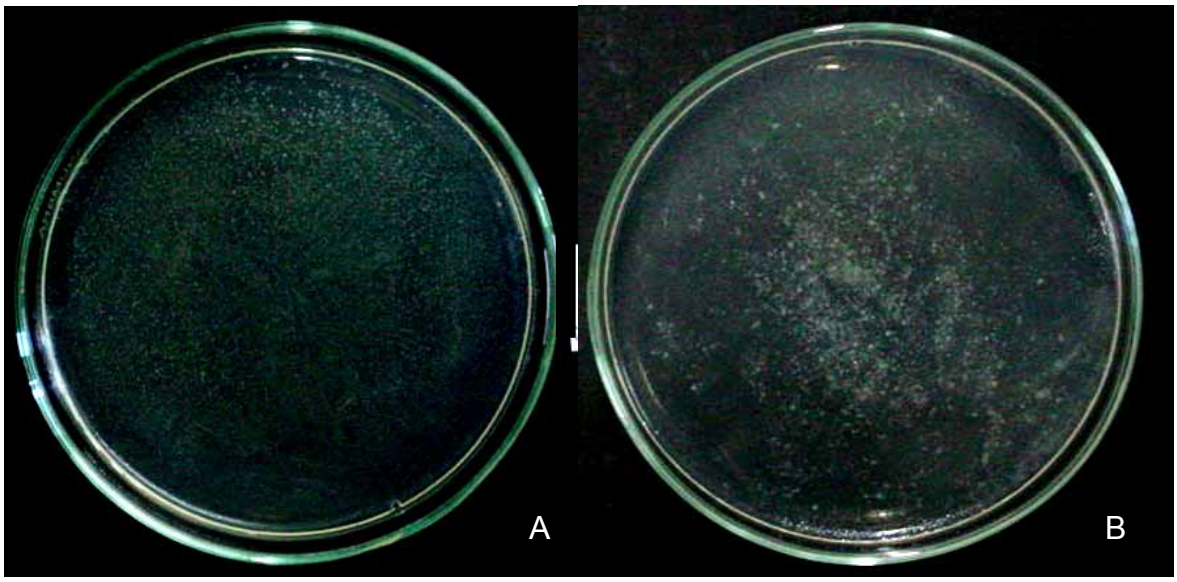


Figura 7. Aspecto do crescimento de *Salmonella* Enteritidis em meio TSA acrescido de 250 mg.L^{-1} de benzoato de sódio (A) e *S.* Typhimurium em meio TSA acrescido de 1000 mg.L^{-1} de sorbato de potássio (B), após 72 h de incubação a 30 ± 2ºC no escuro (crescimento abundante).

A concentração de conservante necessária para inibir totalmente o crescimento das espécies bacterianas estudadas, foi inferior à utilizada por algumas indústrias de alimentos que, em geral, utilizam a quantidade máxima permitida pela legislação, sem realizar ensaios que minimizem a concentração de aditivos inseridos em seus produtos. Segundo a legislação (BRASIL, 1998), os valores máximos de metabissulfito a serem adicionados nos alimentos variam até 350 $mg.L^{-1}$ de acordo com o alimento em que deve ser adicionado.

Já o sorbato de potássio tem seu limite máximo fixado em 2000 $mg.L^{-1}$, enquanto o benzoato de sódio chega a atingir 3000 $mg.L^{-1}$, com no caso de leite de coco pasteurizado (BRASIL, 1988).

É importante atentar para esse fato, de tal forma que a indústria de alimentos minimize os riscos à saúde humana, não somente no sentido de prevenir a presença de bactérias patogênicas, mas também de evitar possíveis casos de alergias, dentre outros males, causadas pelo uso excessivo de conservantes.

5.2. Fungos termorresistentes

5.2.1. *Byssochlamys fulva*

Byssochlamys fulva apresentou um rápido crescimento frente às diferentes concentrações dos conservantes testados que não apresentaram efeito inibitório, atingindo o diâmetro total suportado pela placa de Petri (em média 90 mm) em cerca de 15 dias de observação (Figura 8).

Este fungo apresentou maior resistência que os demais ao metabissulfito de sódio, tendo o seu crescimento micelial afetado a partir da concentração máxima testada de 300 $mg.L^{-1}$ de metabissulfito de sódio (Figura 9).

Para o benzoato de sódio, as concentrações inferiores a 600 $mg.L^{-1}$ não foram efetivas (Figura 10).

O sorbato de potássio foi eficiente na concentração de 800 $mg.L^{-1}$, no período de observação (Figura 11).

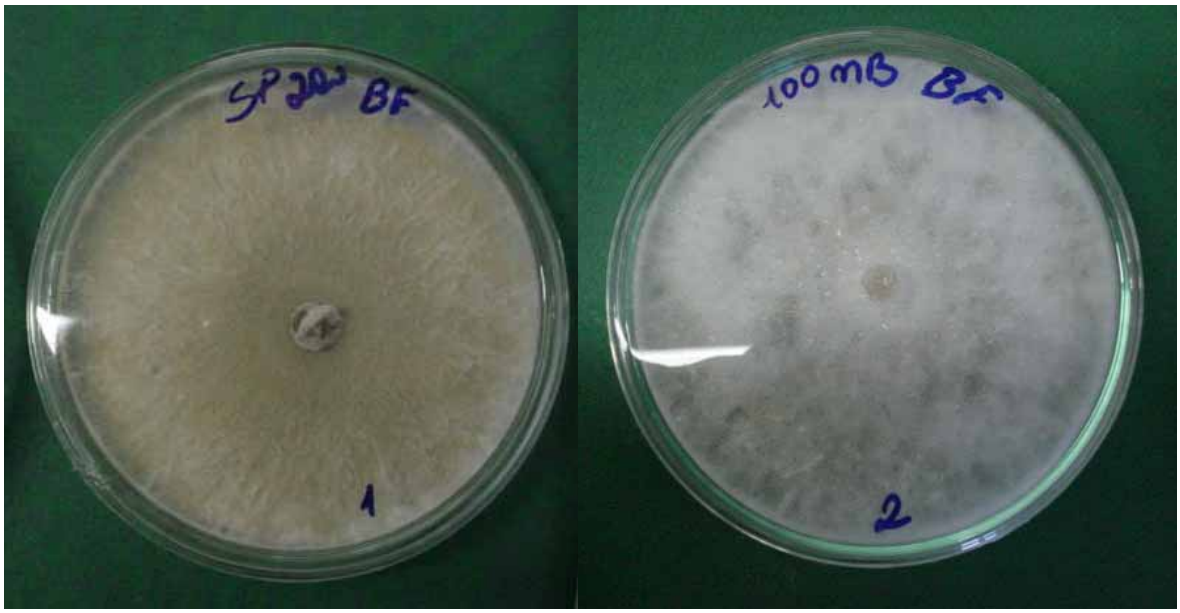


Figura 8. Crescimento micelial de *Byssochlamys fulva* em meio BDA acrescido de 200 mg.L^{-1} (1) de sorbato de potássio e 100 mg.L^{-1} (B) de metabissulfio de sódio, pH 3,5, após 15 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

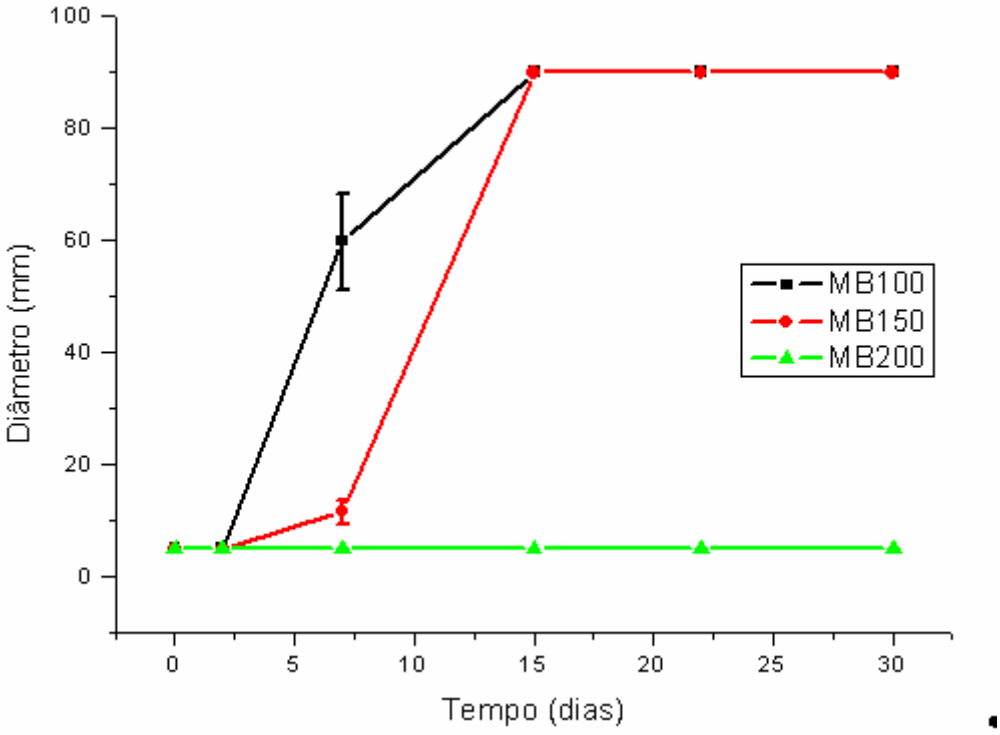


Figura 9. Crescimento médio de *B. fulva* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 100, 150 e 200 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

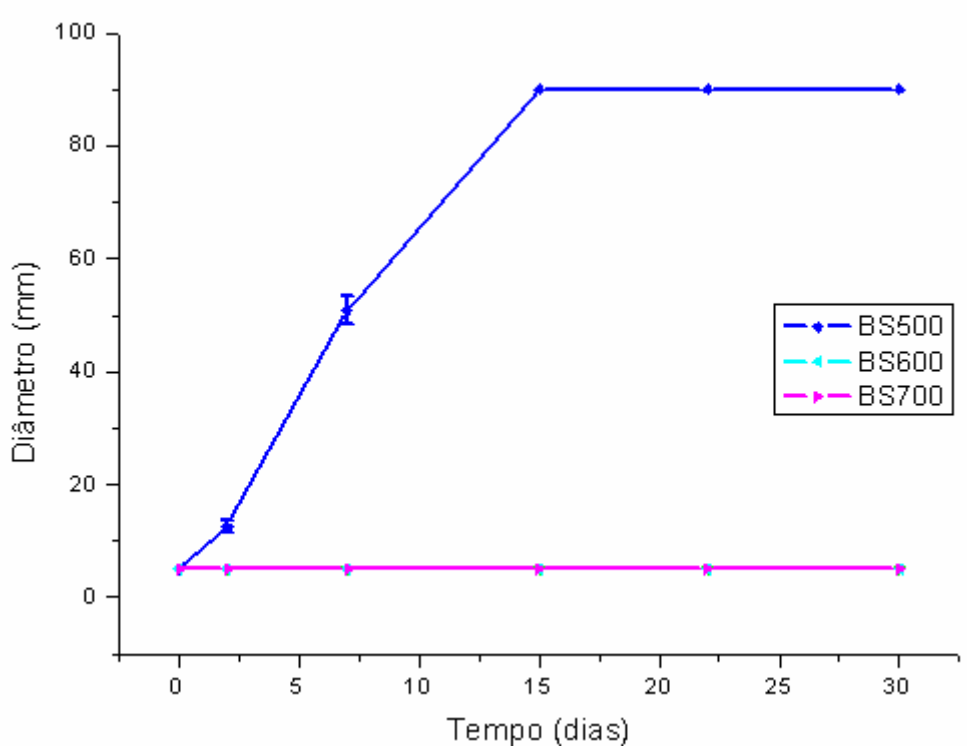


Figura 10. Crescimento médio de *B. fulva* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de benzoato de sódio (BS 500, 600 e 700 $mg.L^{-1}$) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

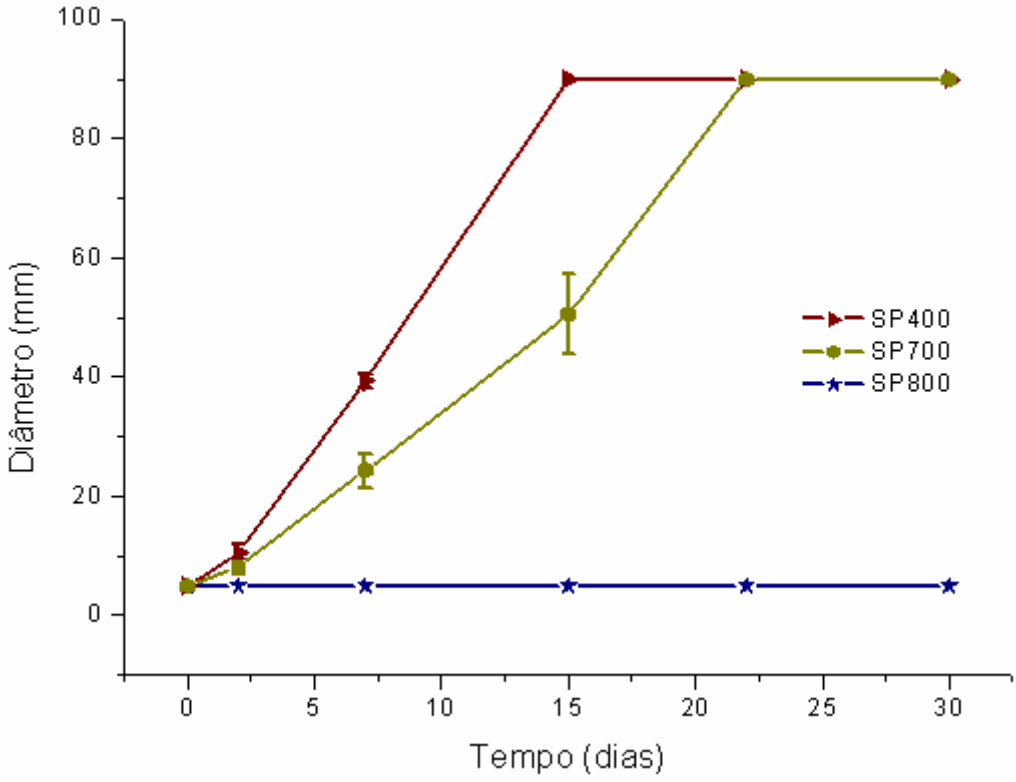


Figura 11. Crescimento médio de *B. fulva* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de sorbato de potássio (SP 400, 700 e 800 $mg.L^{-1}$) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

5.2.2. *Neosartorya fischeri*

Neosartorya fischeri apresentou baixa resistência ao metabissulfito de sódio, tendo seu desenvolvimento inibido na concentração de 100 mg.L^{-1}(Figuras 12 e13).

O desempenho deste conservante foi mais notável para este fungo do que para os demais fungos testados neste estudo.

Figura 12. Crescimento micelial de *N. fischeri* em meio BDA acrescido de 80 mg.L^{-1} de metabissulfito de sódio, pH 3,5, após 15 dias de incubação a 28 ± 2 ºC no escuro.

Em estudos realizados por Rajashekhara *et. al.* (2006), visando a inativação térmica de esporos de *N. fischeri* em sucos de uva e manga, também foi evidenciado que o uso de benzoato de sódio e do sorbato de potássio reduziram o tempo necessário para a inativação dos esporos deste fungo.

O benzoato de sódio apresentou um bom desempenho na inibição do crescimento de *N. fischeri* (Figura 14) sendo efetivo para tal, na concentração de 600 mg.L^{-1}. Já o sorbato de potássio apresentou efeito inibitório em 800 mg.L^{-1} (Figura 15), semelhante à *B. fulva.*

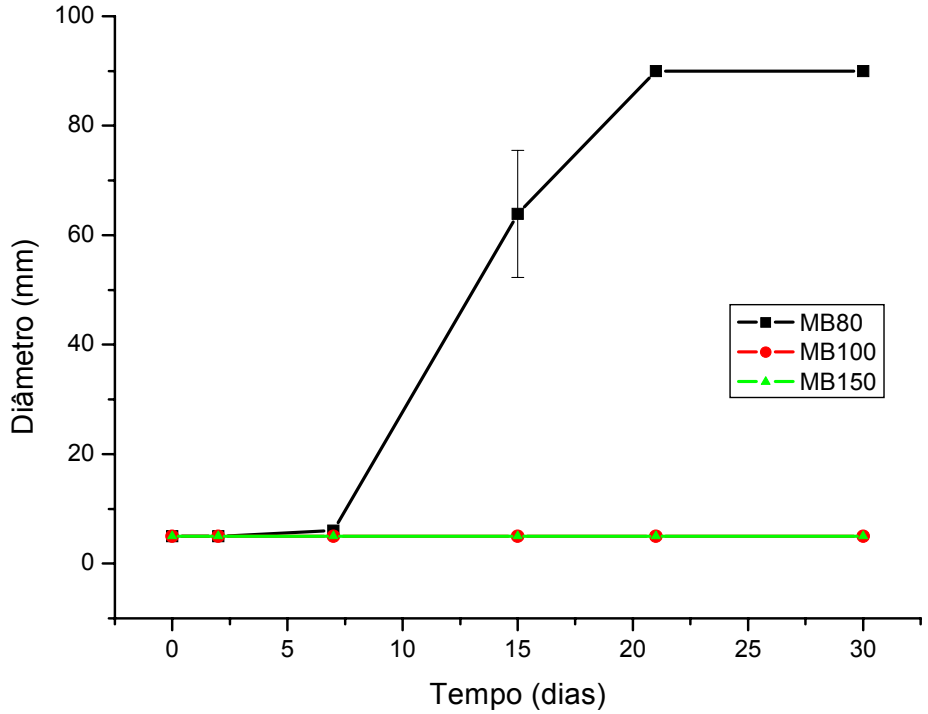


Figura 13. Crescimento médio de *N. fischeri* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 80, 100 e 150 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

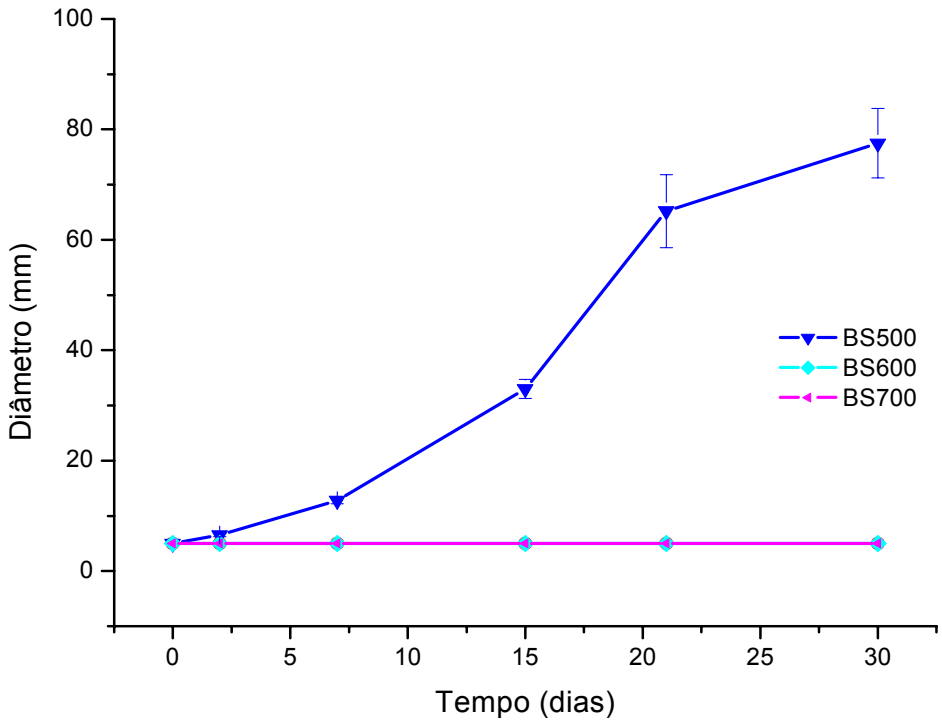


Figura 14. Crescimento médio de *N. fischeri* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações benzoato de sódio (BS 500, 600 e 700 mg.L^{-1}) após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

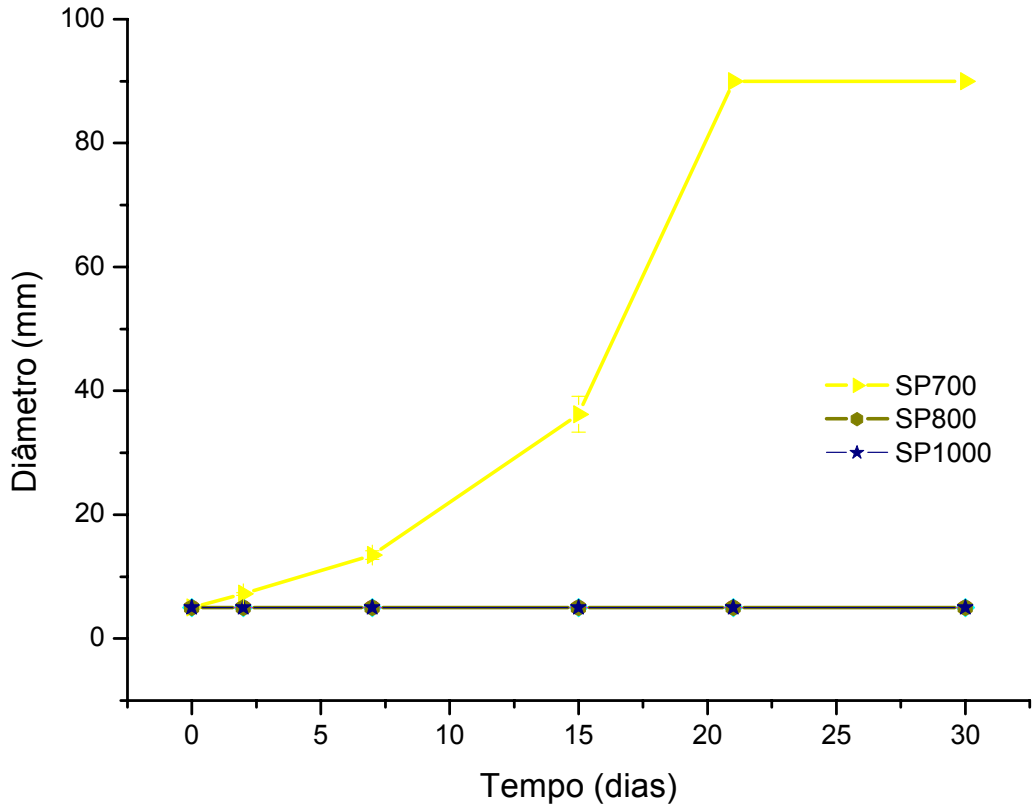


Figura 15. Crescimento médio de *N. fischeri* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de sorbato de potássio (SP 700, 800 e 1000 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

5.2.3. *Talaromyces flavus*

O crescimento de *T. flavus* em meio contendo metabissulfito de sódio foi bem semelhante nas menores concentrações testadas para este conservante, de 80 e 100 mg.L^{-1}. A inibição do crescimento foi obtida na concentração de 200 mg.L^{-1} (Figura 16).

O mesmo aconteceu para sorbato de potássio, apresentando crescimento semelhante nas concentrações de 400 e 800 mg.L^{-1}, porém seu crescimento só foi inibido por este conservante na concentração máxima testada de 1000 mg.L^{-1} (Figura 17).

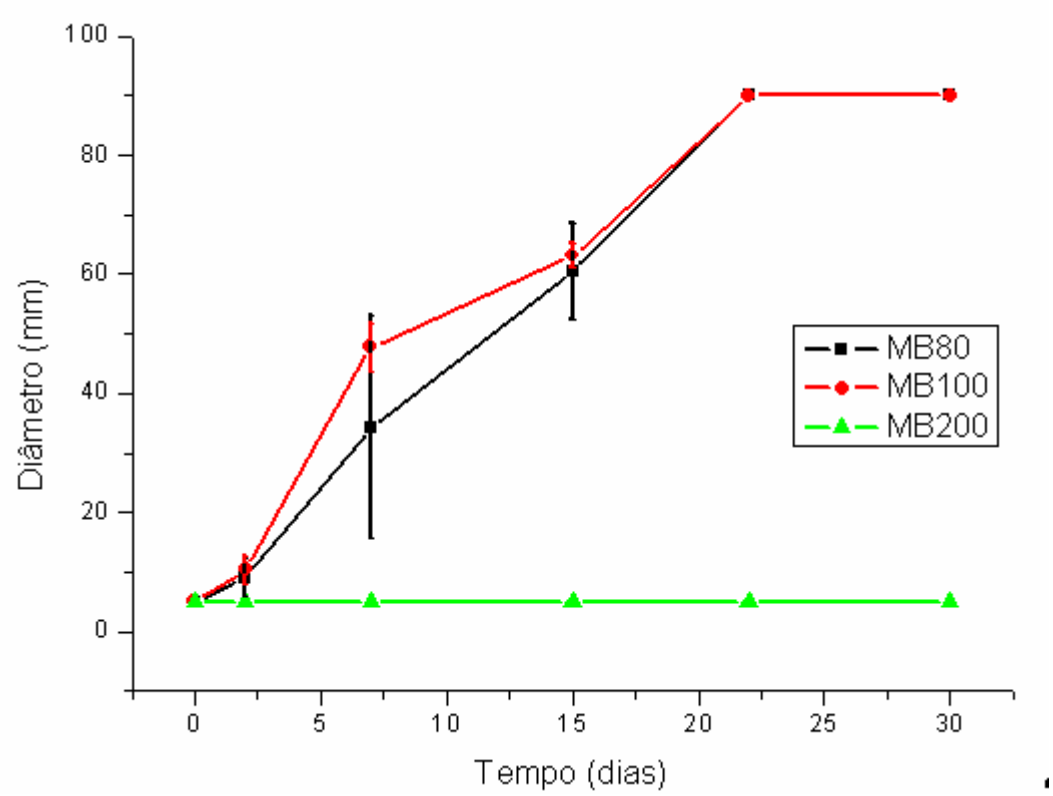


Figura 16. Crescimento médio de *T. flavus* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 80, 100 e 200 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

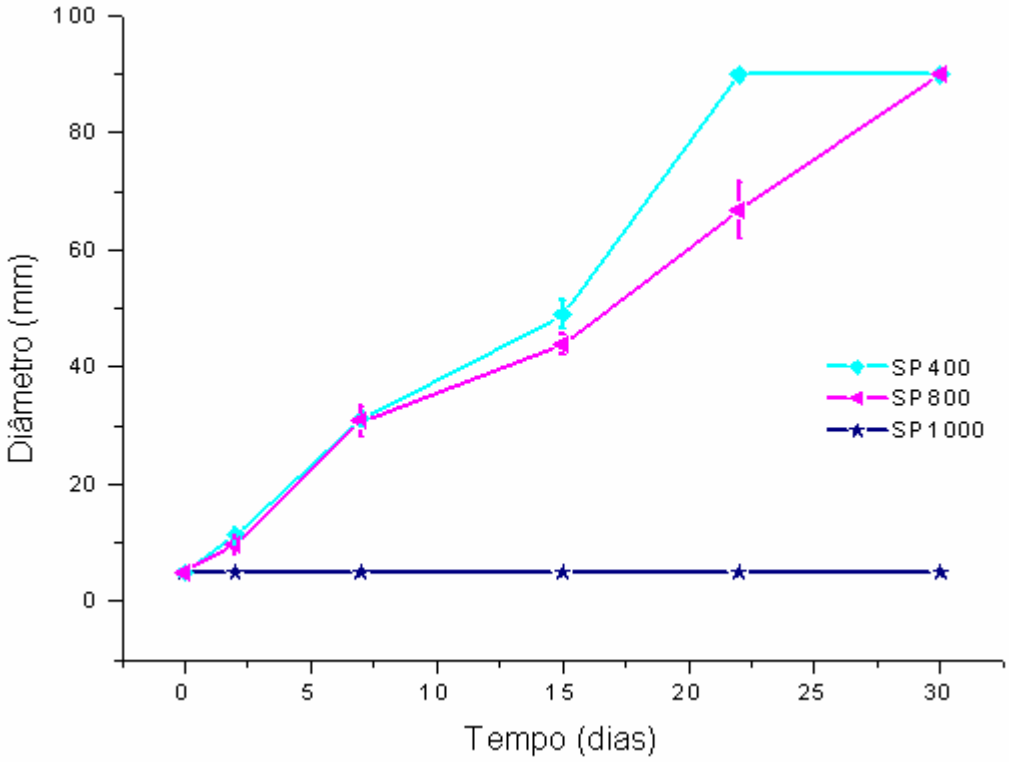


Figura 17. Crescimento médio de *T. flavus* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de sorbato de potássio (SP 400, 800 e 1000 mg.L^{-1}.), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

Dentre todos os fungos termorresistentes estudados, este foi o de menor resistência ao benzoato de sódio, em menores concentrações (Figura 18), onde este conservante apresentou efeito inibitório na concentração de 350 mg.L^{-1}.

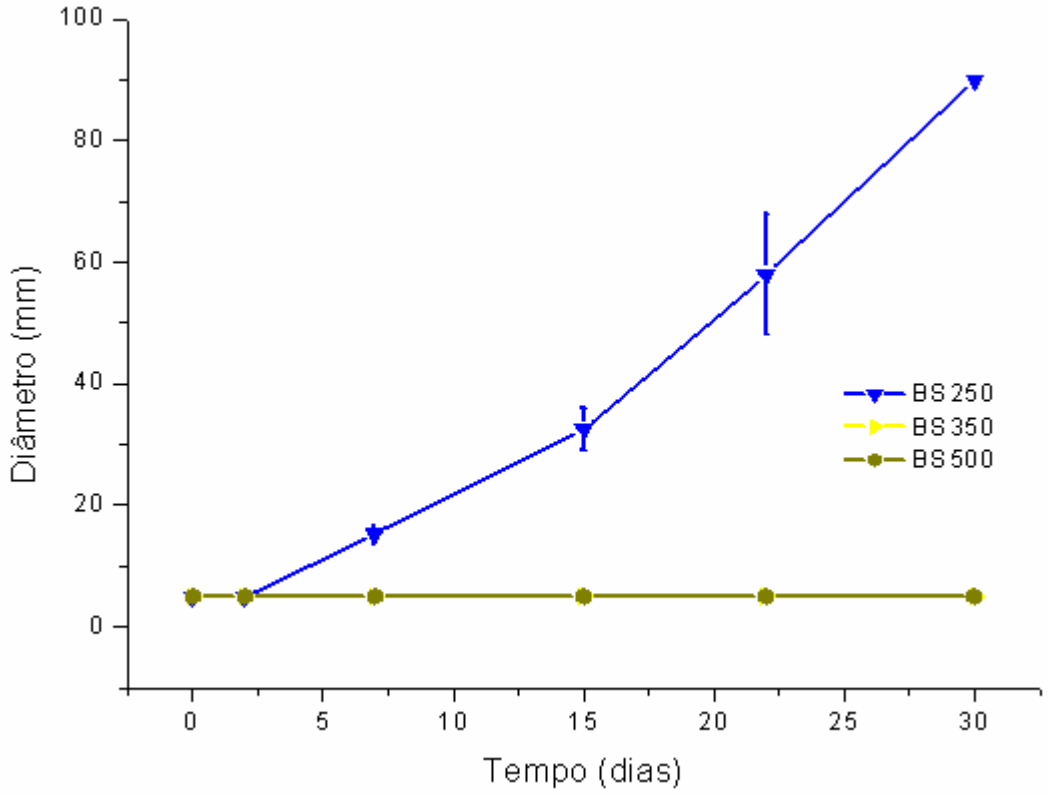


Figura 18. Crescimento médio de *T. flavus* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de benzoato de sódio (BS 250, 350 e 500 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

Jay (2005), relata que concentrações variando entre 30 e 300 mg.L^{-1} de benzoato de sódio são suficientes para inibir o crescimento de diversos fungos filamentosos. Isto não se aplica para *B. fulva* e *N. fischeri* onde os valores das concentrações inibitórias foram superiores, atingindo a concentração de 600 mg. L^{-1}.

Durante todo o período de observação este fungo apresentou um crescimento irregular, em relação ao aspecto e coloração de acordo com o meio (concentração de determinado conservante) em que era submetido (Figuras 19 e 20).

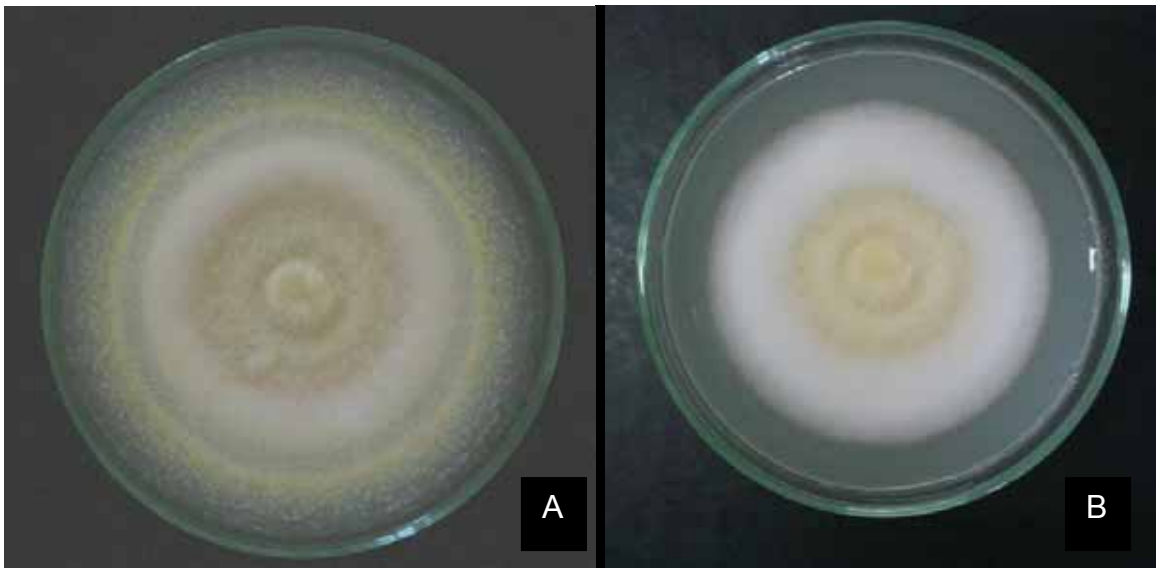


Figura 19. Crescimento micelial de *Talaromyces flavus* em meio BDA acrescido de 50 $mg.L^{-1}$ (A) e 80 $mg.L^{-1}$ (B) de metabissulfio de sódio, pH 3,5, após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

Figura 20. Crescimento micelial de *Talaromyces flavus* em meio BDA acrescido de 800 $mg.L^{-1}$ de sorbato de potássio, pH 3,5, após 15 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Verificou-se que, para os microrganismos aqui estudados, o metabissulfito de sódio, em menores concentrações, apresentou uma maior eficiência em termos de inibição de crescimento, que os demais conservantes testados *in vitro.*

O benzoato de sódio, por outro lado, em menores concentrações foi mais efetivo para a inibição do crescimento bacteriano, enquanto o sorbato de potássio foi mais eficiente no combate aos fungos termorresistentes do que para as bactérias patogênicas testadas.

Pode-se inferir, por comparação com as concentrações desses conservantes utilizadas pelas indústrias processadoras de alimentos, que estas podem ser reduzidas se testes como os que foram alvo deste trabalho forem utilizados pelas mesmas antes de adicionar uma quantidade acima da necessária.

Novos estudos acerca de outros microrganismos de interesse sanitário e industrial devem ser conduzidos, bem como novos conservantes podem ser testados e testes referentes à combinação de mais de um conservante devem ser avaliados para que se possam criar dados mais seguros que venham a beneficiar não só a indústria produtora, mas também o consumidor.

Ensaios direcionados, levando-se em consideração o produto alimentício, o aditivo que pode ser adicionado ao mesmo e os microrganismos que podem contaminá-lo poderiam surtir um bom efeito, uma vez que os resultados dos testes *in vitro* foram favoráveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERER W, KAGER B, ZIEGLER V, HORAK F. Schnupfen durch chneiderkreide Allergie, Pseudoallergie, Rhinopathie oder Einbildung? Dermatosen, 40(6):231–234. 1992. apud WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000

ANDERSON J.A. Allergic reactions to food. Critical reviews in food science and nutrition, 36:S19–S38. 1996. apud WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000

ANÔNIMO. http://www.bevtech.com.br. consultado em 20 de dezembro de 2005.

ARAGAO, G.M.F. Identificacao e determinacao da resistencia termica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 1989. 139p. Dissertacao de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

AVILA, C.R. de; GALLO, C.R.. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “minas frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. Sci. agric., Piracicaba, v. 53, n. 1, 1996.

BAGLIONI, F.; GUMERATO, H. F.; MASSAGUER, P. R. Occurrence of heat resistant molds in tomato pulp packed aseptically. Ciênc. Tecnol. Aliment., May/Aug., vol.19, no.2, p.258-263, 1999.

BAHOUT, A.A. Prevalence of Bacillus species in UHT milk. Assoc. Vet. Med. J., v.42, p.47-53, 2000.

BARNETT, D. Sulphites in foods: their chemistry and analysis. Food Technol. Aust., Sydney, v.37, n.11, p.503-505, 1985. *apud* POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004.

BEUCHAT, L.R. & RICE, S.L. Byssochlamys spp. and their importance in processed fruits. Advances in Food Research, v.25, p.237-289, 1979.

BEHRE, L.M. Sulphite food additives: to ban or not to ban? Dairy Food Sanit. Ames, v.6, n.9, p.386-390, 1986. *apud* POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004

BENJAMIN, M. M. & DATTA, A. R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, v. 61, p.1669–1672. 1995.

BEUCHAT, L.R. & RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. Advances in Food Research, v.25, p.237-289, 1979.

BEUCHAT, L. R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. Journal of Food Science, v. 51, n. 6, p. 1506-1510, 1981.

BINDSLEV-JENSEN C. ABC of allergies. Food allergy. British medical journal, 316:1299–1302. 1998. apud WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000.

BRADBURN, N.; COKER, R.D. Aflatoxin contamination in maize**.** Tropical Science, v.33, n.44, p.418-428, 1993.

BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P.M.; SALMINEN, S., eds. Food additives. New York: Marcel Dekker, 1990. 736p. (Food Science and Technology, 35), apud POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 544. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de novembro de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Visalegis. Legislação. Decreto nº. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº. 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº. 691, de 13 de março de 1962. Disponível em: http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=22. Acesso em: 15 jan. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portarias. Portaria nº. 1003, de 11 de dezembro de 1998. Categoria de alimentos para efeito do emprego de aditivos. Disponível em: htpp://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1003_98.htm. Acesso em: 10 abr. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portarias. Portaria nº. 1007, de 15 de dezembro de 1998. Definição do Grupo de Trabalho de Aditivos. Disponível em: htpp://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1007_98.htm. Acesso em: 10 abr. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portarias. Portaria nº. 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação. Disponível em: htpp://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm. Acesso em: 10 abr. 2006.

BRUNINI, M. B.; DURIGAN, J. F.; OLIVEIRA, A. L. de. Quality of 'Tommy-Atkins' mango pulp frozen and stored at – 18º. Ver. Brás. Frutic., v.24, n°.3, p.651-653. 2002.

BUENO, S. M.; LOPES, M. do R. V.; GRACIANO, R. A. S. *et. al.* Avaliação da Qualidade de Polpas de Frutas Congeladas. Ver. Inst. Adolfo Lutz, v. 62 (2):121-126, 2002.

CAFFER, M.I., EIGUER, T. *Salmonella Enteritidis* in Argentina. Int. J. Food Microbiol., 21: 15-19, 1994.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. de. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(3): 281-287, set.-dez. 2001.

CHANTARAPANONT, W. et al. Factors influencing inactivation of *Salmonella* Enteritidis in hard-cooked eggs**.** Journal of Food Protection, v. 63, n. 1, p. 36-43, 2000.

CLEMMENSEN, O., HJORTH, N. Perioral contact urticaria from sorbic and benzoic acid in salad dressings. Contact dermatitis, 8:1–6. 1982. apud WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000

COSTA, E. L. da, SILVA, J. A. Avaliação microbiológica da carne-de-sol elaborada com baixos teores de cloreto de sódio. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(2): 149-153, maio-ago. 2001.

COSTALUNGA, S., TONDO E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999**.** Braz. Journal of Microbiol. v. 33, p.342-346, 2002.

COVERLY, J., PETERS, L., WHITTLE, E., BASKETTER, D.A. Susceptibility to skin stinging, non-immunologic contact urticaria and acute skin irritation; is there a relationship? Contact dermatitis, 38(2):90–95. 1998. apud WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000.

CUNHA, V. A. B. da. **Estudo Experimental e Modelagem do Crescimento de Fungos Filamentosos Termorresistentes em Sucos Tropicais.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. **Antimicrobials in food**. 13º ed. CRC Press, 706p. 2005.

DE JONGE, R., TAKUMI, K., RITMEESTER, W. S., LEUSDEN, F. M.. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH. Journal of Applied Microbiology, v.94, p.555–560. 2003.

DRAGONI, I. y COMI, G. Presenza di mufle e lieviti in succhi di frutta prodotti industrialmente. Ind. Bevande. 14, 599-606. 1985.

ELLIS, W. O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K.; OLDHAM, J.H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.30, n.4, p.403-439, 1991.

ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. International Journal of Food Microbiology, v. 12, p. 225-234, 1991.

ENIGL, D. C.; KING Jr., A.D. & TOROK, T. *Talaromyces trachyspermus*, a heat resistant mold isolated from fruit juice. Journal of Food Protection, v. 56, n. 12, p. 1039-1042, 1993.

FAZIO, T.; WARNER, C.R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. Food Addit. Contam., Basingstoke, v.7, n.4, p.433-454, 1990. *apud* POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, É. H. F. de; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 23(Supl): 162-165, dez. 2003

FILHO, P.A.T. disponível on-line em: http://www.asmabronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html. consultado em 04/05/2006.

FLORENTINO, E.S.; MARTINS, R.S. Características microbiológicas do "queijo de coalho" produzido no estado da Paraíba. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, 1999.

FRANCO, B.D. de M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** 1° Ed. Editora Atheneu, 182 p. 2002.

FRANK, H. K. Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. J. Food Sci*.* 33, 89-100. 1968.

FREESE, E., SHEU, C.W., GALLIERS, E. 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature 241: 321-325 *apud* JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Ed. Editora Artmed, São Paulo. 711p. 2005.

FURLANETTO, S. M. P.; LACERDA, A. A.; CERQUEIRA-CAMPOS, M. L. Pesquisa de alguns grupos de microrganismos em saladas com maionese adquiridas em restaurantes, lanchonetes e "rotisseries". Ver. Saúde públ., São Paulo. v .16, p.307-16. 1982

GAILHOFER G, SOYER HP, LUDVAN M Nahrungsmittelallergien und Pseudoallergien — Mechanismen, Klinik und Diagnostik. Wiener Medizinische Wochenschrift, 140:227–232. 1990. *apud* WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000

GARCÍA, M.T.; LUCAS, R.; ABRIOUEL,H.; OMAR, N.B.; PÉREZ, R. GRANDE, M. J.; MARTINEZ-CAÑHAMERO; GÁLVEZ, A. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against "*Bacillus macroides/ Bacillus maroccanus"* isolated from zucchini purée. Journal of Applied Microbiology., v. 97, p.731-737. 2004.

GARZA, S. G. **Caracterización reológica y microbiológica, y cinéticas de deterioro en cremogenado de melocotón.** Dissertação de Mestrado. Universitat de Lleida. Disponível on-line em: . Acessado em 20 de novembro de 2006.

GAWANDE, P.V.; BHAGWAT, A. A. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of *Salmonella* spp. Journal of Applied Microbiology, v.93, p. 689–696. 2002.

GHENGHESH, K. S.; BELHAJ, K.; EL-AMIN, W. B.; EL-NEFATHI, S.E. ZALMUM, A. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli–Libya. Food Control 16 (2005) 855–858.

GUIDOLIN, F. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SENAI-RS. 2005. disponível on-line em: http://www.sbrt.ibict.br. acessado em 25 de abril de 2006.

HOFFMANN, F.L. *et al.*. Microrganismos contaminantes de polpas de frutas. Ciên. Tecnol. Aliment., 17(1):32-37. jan/abr. 1997.

HOFFMANN, M.V.G. de S. Estudo de resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. Dissertação de mestrado. Florianópolis - SC, 2004.

HUMPHREY, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis*:* a review**.** Int. J. Food Microbiol, 21: 31-40, 1994.

http://www.furg.br/portaldeembalagens/quatro/sucos.html. consultado em 20 de dezembro de 2005.

ILHA, M.H.; FÁVARO, R.M.D.; OKADA, M.M. *et al*. Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado. Rev. Inst. Adolfo Lutz,9(1/2):39-44, 2000.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Ed. Editora Artmed, São Paulo. 711p. 2005.

JUHLIN, L: Recurrent urticaria. clinical investigation of 330 patients. Br J Dermatol **104** : 369–381, 1981.

KAVANAGH, J.; LARCHET, N.; STUART, M. Occurrence of heat resistance species of Aspergillus in canned strawberries. Nature, v.198, p.1322, 1963.

KING, J. D. A; HALBROOK, W. U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. Journal of Food Science, Chicago, v.52, n.5, 1987.

KING, J., A.D.; MICHENER, H. D.; ITO, K. A. Control of Byssochlamys and related heat-resistant fungi in grape products. Appl. Microb. 18(2): 166-173, 1969.

KNIGHT, I.C. S. Mc., LEITÃO, M.F. de F., LEITÃO, R.F. de F. *Bacillus cereus* em macarrões industrializados: II Ocorrência em produtos comerciais e sua

multiplicação no alimento preparado para consumo. Rev. Microbiol. 21 (3): 268-75, set. 1990.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. Journal of Food Science, v. 62, n. 2, p. 410-412/437, 1997.

KUBENA, L. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; CORRIER, D. E.; HUFF, W. E. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. Poultry Science, v.69, p.727-735, 1990.

KUBOTA, K.; ISHIZAKI, T. Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans. European journal of clinical pharmacology,41(4):363–368, 1991.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: CHELKOWSKI, J. Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Amsterdam: Elsevier Science, p. 77-118. 1991.

LAHTI, A., PYLVANEN, V., HANNUKSELA, M. Immediate irritant reactions of benzoic acid are enhanced in washed skin areas.Contact dermatitis, 33:177–182. 1995. *apud* WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000.

LARMI, E., LAHTI, A., HANNUKSELA, M. Effects of sorbitansesquioleate on non-immunologic immediate contactreactions to benzoic acid. Contact dermatitis, 19:368–371. 1988.*apud* WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de sucos e produtos ácidos. Boletim do ITAL, Campinas, n. 33, p. 9-42, 1973.

LEITÃO, M. F. F. Microbiologia das frutas tropicais e seus produtos. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (Campinas, SP). **Frutas tropicais:** aspectos tecnológicos. Campinas, 1978. p.83-144.

MAIBACH, H.I., JOHNSON, H.L. Contact urticaria syndrome. Archives of dermatology, 111:726–730.1975. *apud* WHO. World Health Organization Benzoic Acid and Sodium Benzoate Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000

MARTIN, L.B.; NORDLEE, J.A.; TAYLOR, S.L. Sulfite residues in restaurant salads. J. Food Prot., Des Moines, v.49, n.2, p.126-129, 1986. *apud* POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004

MARTINEZ, V. C. El Mundo de las Plantas. 2005. Disponível on-line em http://www.botanical-online.com/lasfrutas.htm, acessado em 11 de dezembro de 2005.

MATTIETTO, R de A; LOPES, A. S; MENEZES, H. C. Estabilidade do néctar misto de cajá e umbu. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2004

MATOS, A. V. DE,; ROSENTHAL, A.; COSTA, S. D. de O. *et. al.* Quantificação de fungos de elevada e baixa termorresistência em Linha de "Esterilização Comercial" e envase asséptico de suco de maracujá. Disponível on-line em: http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/tecnologia_de_alimentos/758.htm. acessado em 15 de dezembro de 2005.

MENDES, E.S.; LIMA, E.C.; NUMERIANO, A.K.M.; COELHO, M.I.S. *Staphylococcus* aureus, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de "coalho" comercializadas em Recife. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, 1999.

MULLER, G. **Microbiología de los alimentos vegetales**. Editorial Acribia. Zaragoza. 1981.

NASCIMENTO, D. Contribuição ao conhecimento das condições bacteriológicas de amostras de leite tipo C, antes e após pasteurização, vendido na cidade de João Pessoa-PB, 1977/78. 1982, 88p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo.

NASCIMENTO, R.F., PRATA, L. F., AQUINO, F.W.B. AMORIM, A.G.N. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(1): 032-038, jan.-mar. 2004

OLLIVER, M. & RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. Journal of Society Chem. Ind., v. 53, p. 166T, 1934.

PELCZAR Jr, M. J.; CHAN, E. C. S. & KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. Volume 2 2º edição, 1996. São Paulo . Makron books.

PERALES, I.; GARCÍA, M. I. The influence of pH and temperature on the behaviour of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 in home-made mayonnaise. Letters in Applied Microbiology, v. 10, p. 19-22, 1990.

PINHEIRO, N. M. DE S.; FIGUEIREDO, E. A. T. DE; FIGUEIREDO, R. W. DE; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M. DE. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 153-156, 2005.

PINTO. A. DE F. M. A. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. Disponível on-line em: http://www.ipv.pt/millenium/ect4_1.htm. acessado em 18 de novembro de 2004.

PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985, 413p.

POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004.

QUATTRUCCI, E.; MASCI, V. Nutritional aspects of food preservatives**.** Food Addit Contam. v. 9 nº5, p.515-25, 1992.

RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R. & ETHIRAJ, S. Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. Journal of Applied Bacteriology, v. 81, p. 337-340, 1996.

REZENDE, N.C.M.; ROSSI Jr., O.D.; AMARAL, L.A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). Rev. Bras. Ciên. Vet., v.7, p.162-166, 2000.

RIBEIRO, V. B.; ANDRIGHETO, C.; BERSOT, L. S.; BARCELLOS, V.; REIS, E. F.; DESTRO, M. T. Serological and genetic diversity amongst salmonella strains isolated in a salami processing line. Brazilian Journal of Microbiology, 38:178-182. 2007

RING J. Arzneimittelunverträglichkeit durch pseudoallergische Reaktionen. Wiener Medizinische Wochenschrift, 139:130–134. 1989 *apud* WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000

ROCHA, A.C.; ROSENTHAL, A; XAVIER, A.; DUARTE, S. *et. al.* Avaliação da microbiota fúngica termorresistente em linha de suco de manga. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Disponível on-line em: www.cbcta2002.ufrgs.br

ROSE, A.H.; PILKINGTON, B.J. Sulphite. In: GOULD, G.W. Mechanisms of action of food preservation procedures. New York: Elsevier Applied Science, 1989. cap.8, p.201-223. apud POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004

ROSENTHAL, A.; FILHO, D.G.; XAVIER, A.; DUARTE, S. *et. al.* Fungos filamentosos termorresistentes em linha de suco de abacaxi envasado assepticamente. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Disponível on-line em: www.cbcta2002.ufrgs.br

ROSENTHAL, A. Nova técnica para conservar sucos - Alta pressão permite preservar sabor e nível nutricional originais. Ciência Hoje On-line 02/08/00. disponível em: http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3789, acessado em 01 de janeiro de 2006.

SAKAI, T.; CHALERMCHAIKIT, T. The major sources of Salmonella Enteritidis in Thailand. International Journal of Food Microbiology, v. 31, p. 173-180, 1996.

SANTOS, D.M.S.; JUNIOR, A.B.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. Salmonella em carcaças de frango congeladas. Pesq. Vet. Bras., 20: 39-42, 2000.

SCHIMIDT, F.L. Deterioração de sucos de frutas em embalagens assépticas. Um "novo" microrganismo desponta: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Informativo FRUTHOTEC, Campinas, v. 2, n. 4, 1995.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas do gênero *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. Hig. Aliment., v.10, p.25-27, 1996.

SCHVARTSMAN, S. Aditivos alimentares. Pediat. (S. Paulo) 4: 202-210. 1982

SCOTT, V. N. & BERNARD, D. T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from comercial fruit juices. Journal of Food Protection, v. 50, n. 1, p. 18-20, 1987.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. INFORME-NET DTA. MANUAL DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS*.* Texto organizado pela Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, ano *2002.*

SILVA, Z. N DA; CUNHA, A. S DA; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C DE F; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. Rev Saúde Pública; 35(4):375-9 375, 2001.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA; V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 2º Ed. Editora Varela. 2001

SIRVETA - SISTEMA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE ENFERMIDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS. Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. Módulo dinâmico de acesso a la informatión. Disponível em: <http://www.panalimentos .org/sirveta/e/index>.Acesso em: 25 de set. 2004.

SPLITTSTOESSER, D.F.; KUSS, F. R. HARRISON, W.; PREST, B. D. Incidence of heat-resistant molds in eastern orchards and vineyards: Applied Microbiology, Washington, v.21, n.2, p.335-337, 1971. *apud* HOFFMANN, M.V.G. de S. Estudo de resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. Dissertação de mestrado. Florianópolis - SC, 2004.

SPLITTSTOESSER, D.F.; CHUREY, J.J. Reduction of heat resistance of Neosartorya fischeri ascospores by sulfur dioxide. Journal of Food Science, Chicago, v.56, n3, p.876-877, 1991. *apud* HOFFMANN, M.V.G. de S. Estudo de

resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. Dissertação de mestrado. Florianópolis - SC, 2004.

SPOTTI, E.; CASOLARI, A. Indagine sul contenuto di catalasi di muffe gasogene e altri microrganismi. Indústria Conserve, v.62, p.22-24, 1987.

SPOTTI, E.; QUINTARALLA, S. & MUTTI, P. Contaminazione da spore fungine termoresisrenti di fruta, promodoro e loro derivati. Industria Conserve, v. 6.7, p. 421-425, 1992.

SROUR, R. Benzoic acid and derivatives. In: Srour R, ed. Aromatic intermediates and derivatives. Paris, pp. A.IV.1– A.IV.17 .1998.

SUGAI, A.Y.; SHIGEOKA, D.S.; BADOLATO, G.G.; TADINI, C.C. análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 22(3): 233-238, set.-dez. 2002.

TAYLOR, S.L. Why sulfite alternatives?. Food Technol., Chicago, v.47, n.10, p.14, 1993.

TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. Food Technol., Chicago, v.40, n.6, p.47-52, 1986.

TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. Food Technol. Aust., Sydney, v.39, n.11, p.532-536, 1987.

TAYLOR, S.L.; HEFLE, S.L. Food allergies and other food sensitivities. Food Technol., Chicago, v.55, n.9, p.68-83, 2001.

TFOUNI, S.A.V.; M.C.F. TOLEDO. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. Food Control 13 (2002) 117–123.

TOURNAS, V.; TRAXLER, R. W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. Journal of Food Protection, v. 57, n. 9, p. 814-816, 1994.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3º ed. São Paulo, Editora Atheneu. 586p. 1999.

TURTURA, G. C.; MASSA, S. y CICCARONE, C. 1988. Microbiological researchs on soft drinks. IX. A study of fruit juices in soft-pack, multilayer containers. *Microbiologie-Aliments- Nutrition*. 6, 201-208.

US FDA. *GRAS (Generally Recognized As Safe) foodingredients: benzoic acid and sodium benzoate.* Washington, DC, US Food and Drug Administration, 1972.

US FDA *Evaluation of the health aspects of benzoic acid and sodium benzoate as food ingredients*. Bethesda, MD, US. Food and Drug Administration, Life Sciences Research Office (PB-223 837) 1973.

VICINI, E.; BARBUTI, S.; SPOTTI, E.; CAMPANINI, M.; CASTELVETRI, F.; GOLA, S.; MANGANELLI, E.; CASSARA, E. y CASOLARI, A. 1984. Alterazione di succhi di frutta causata da muffe gasogene. Ind. Conserve. 59, 4-7.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI JR., O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura**.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.57, n.3, p.396-400, 2005.

VITALI, A.A. & RAO, M.A. Flow properties of low-pulp concentrated orange juice: serum viscosity and effect of pulp content. Journal of Food Science, Chicago, v. 49, n. 3, p. 876-881, 1984.

WEDZICHA, B.L. Chemistry of sulphiting agents in food. Food Addit. Contam., Basingstoke, v.9, n.5, p.449-459, 1992. *apud* POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004.

WEDZICHA, B.L. Suphur dioxide. Nutr. Food Sci., Bradford, v.72, p.12-13, 19, 1981a, *apud* POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004.

WEDZICHA, B.L. Suphur dioxide part 2. Nutr. Food Sci., Bradford, v.73, p.14-16, 1981b, apud POPOLIM, W.D. Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**.** Dissertação de mestrado. SÃO PAULO – 2004.

WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000.

WIKIPEDIA. Disponível on-line em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Metabissulfito_de_s%C3%B3dio. Ultima modificação em 27 de Janeiro de 2008. Acessado em 30 de janeiro de 2008.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Artigo: Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento de fungos termorresistentes *in vitro*.

Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento de fungos termorresistentes *in vitro*.

Sheyla Ferreira Lima-Coelho[1], Ana Maria Queijeiro López[1].

[1]Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, *Campus* AC Simões s/n, Tabuleiro dos Martins

RESUMO

Os fungos termorresistentes dos gêneros *Byssochlamys, Neosartorya* e *Talaromyces* representam um problema para indústria processadora de alimentos, principalmente de frutas e outros vegetais, devido a seus esporos extremamente resistentes e a produção de micotoxinas termoestáveis. Este estudo teve por objetivo determinar a concentração mínima necessária de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio para inibir o crescimento micelial de *B. fulva, N. fischeri* e *T.flavus* em meio Batata Dextrose Agar (BDA) acidificado (pH 3,5) visando fornecer subsídios para redução da utilização de quantidades inadequadas de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, a ingestão imprópria dos mesmos pela população. Os experimentos demonstraram que o metabissulfito de sódio apresentou uma maior eficiência em termos de inibição de crescimento micelial, em menores concentrações que os demais conservantes testados *in vitro.* Pode-se inferir, por comparação com os protocolos utilizados pelas indústrias processadoras de alimentos, que estas podem reduzir a concentração de tais produtos se testes como os que foram o alvo deste trabalho forem efetuados pelas mesmas.

Palavras-chave: *Byssochlamys, Neosartorya, Talaromyces*, metabissulfito de sódio, benzoato de sódio, sorbato de potássio.

ABSTRACT

The heat-resistant fungi of the genus *Byssochlamys, Neosartorya* and *Talaromyces* represent a problem to the food industry, mainly of fruits and other vegetables, due to their extremely resistant spores and/or their production of heat-stable fungitoxins. The purpose of this study was to determine the minimum concentrations of sodium metabisulphite, sodium benzoate and sorbate, potassium necessary for the inhibition of the development of heat-resistant fungi, such as *B. fulva, N. fischeri* and *T. flavus*, in Potato-Dextrose-Agar (BDA) médium acidified (pH 3,5), to provide subsidies to reduce the use of inadequate quantities of preservatives in the food industry, and therefore unfit to ingestion by the

population. The in vitro experiment showed that sodium metabisulphite had a higher efficiency in inhibiting the micelial growth, at lower concentrations than the other preservatives. By comparison to the protocols used by food industries, it is possible conclude that these companies can reduce the concentration of such preservatives if tests such as the ones used in this work were carried out by them.

Keywords: Preservatives, *Byssochlamys, Neosartorya, Talaromyces*, sodium benzoate, potassium sorbate, sodium metabisulphite.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos dos gêneros *Byssochlamys, Neosartorya* e *Talaromyces* são responsáveis pela deterioração de uma variedade de alimentos processados em indústrias, devida principalmente aos ascósporos termorresistentes que eles produzem. Os alimentos com maior susceptibilidade à contaminação e posterior deterioração por fungos termorresistentes são as frutas e seus derivados, como sucos, polpas, concentrados e frutas enlatadas [12, 19].

Dentre os vários tipos de frutas, aquelas que são colhidas diretamente do solo ou que estão próximas dele, como morango, ameixa, maracujá, uva, abacaxi, pêssego e maçã, são as mais afetadas, dependendo também da prevalência do fungo no solo onde estas são cultivadas [4, 23]. Além da alta resistência térmica destes fungos, eles também são responsáveis pela produção de metabólitos tóxicos secundários, designados como micotoxinas. As micotoxinas são moléculas de baixo peso molecular, sendo a maioria suficientemente termo-estável, resistindo a processos deletérios o suficiente para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produzem, e acumulando-se no produto final [6, 8, 17]. Isso resulta em impacto econômico negativo em todos os níveis de produção, comercialização e utilização dos produtos [11].

A literatura relata vários casos de contaminação com estas características [1, 10, 20, 22]. Em 1933, Olliver e Smith apresentaram o primeiro relato de contaminação e deterioração de produtos de frutas engarrafados e enlatados, identificando *B. fulva* como seu causador [9]. Em 1934, Oliver & Rendle também identificaram fungos termorresistentes do gênero *Byssochlamys*, como agente deteriorador de frutas processadas, na Inglaterra.

Dragoni & Comi (1985) isolaram quatro espécies de fungos filamentosos a partir de sucos de fruta industrializados: *Penicillium expansum, Byssochlamys fulva, B. nivea,* e *Aspergillus fumigatus.* Em polpa de tomate termicamente processada, Baglioni *et al.* (1999) detectaram a presença de fungos filamentosos numa agroindústria no estado de São Paulo, sendo a maioria deles termorresistentes.

Para tentar reduzir os riscos de multiplicação e a conseqüente deterioração dos alimentos, além do tratamento térmico, as indústrias estão utilizando, cada vez mais, aditivos químicos, destacando-se o uso de dióxido de enxofre (sulfitos, metabissulfitos), benzoatos e de sorbatos, evitando-se a deterioração no produto final [3, 13].

Rajashekhara *et al.* (2000) relatam o uso de benzoato de sódio e sorbato de potássio por Beuchat (1981), na inativação de conídios de *Aspergillus flavus* e ascósporos de *B. nivea.* Tais autores também descrevem a dificuldade na

inativação de ascósporos de *N. fischeri* em suco de manga e uva, devido ao elevado tempo de submissão ao calor (85°C por 18 min, ou 95°C por mais de 15 minutos), requerido por esses sucos sendo suficiente para a degradação dos nutrientes presentes.

Os sorbatos são cada vez mais utilizados, devido à sua baixa toxicidade, em substituição aos conservantes mais tóxicos como o ácido benzóico. Seu uso está autorizado em todo o mundo [27].

Porém, os conservantes quando usados em quantidades excessivas podem ocasionar riscos à saúde humana. A ingestão de ácido benzóico ou seus sais afetam todos os processos onde a glicina esteja envolvida, como comandar a conversão em creatina e glutamina, e casos de urticária, asma, renites, ou mesmo de choque anafiláticos tem sido relatados devido a exposição oral, dérmica, ou inalação do ácido benzóico ou benzoato de sódio[27, 28].

O dióxido de enxofre, dentro das quantidades permitidas nos alimentos, não causa efeitos adversos na maioria das pessoas. No entanto, os asmáticos, podem ser bastante sensíveis ao conservante, com reações ocorrendo de 10 a 20 minutos após a ingestão [7, 24, 25, 26]. Peroni & Boner (1995) registraram que, em crianças com asma severa, cerca de 35 a 65% demonstram bronco-espasmo após a administração de alimentos com sulfitos. Há também casos de reações adversas em pacientes em nutrição parenteral [16].

A importância de testes que visem à redução da quantidade de conservantes, como metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio, em meio de cultura é de importância para a elaboração de novos estudos em alimentos, a cerca da quantidade mínima de conservantes necessária à inativação fúngica e bacteriana, visando à redução da ingestão destes aditivos por seres humanos. Este trabalho tem por objetivo de determinar a concentração mínima de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária para inibir o crescimento micelial de *B. fulva, N. fischeri* e *T flavus* em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) acidificado (pH 3,5).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

As amostras de *Byssochlamys fulva* (CCT 0056)*, Neosartorya fischeri* (CCT 3491) e *Talaromyces flavus* (CCT 4683) foram fornecidas pela Coleção de Culturas Tropicais - Fundação André Tosello.

2.1. Preparo do Meio com Conservante

O meio Batata Dextrose Agar (BDA), preparado conforme descrito por Silva *et al.* (2001), foi acidificado (pH 3,5) com ácido cítrico em frascos Erlenmeyer. Após a autoclavagem, em condições estéreis, adicionou-se a esse meio o conservante estudado (benzoato de sódio, metabissulfito de sódio ou sorbato de potássio) de modo a obter-se diferentes concentrações do mesmo (80, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 1000 $mg.L^{-1}$). Após a completa homogeneização, verteu-se o meio em placas de Petri esterilizadas e aguardou-se sua solidificação para posterior inoculação.

.

2.2. Preparo do inóculo e ensaios

Culturas dos fungos, repicados a partir de discos de micélio em meio BDA acidificado (pH 3,5) com ácido cítrico, foram utilizadas como inóculo após 10 dias de incubação a 28 ± 2ºC, no escuro. Assim, 1 disco de cerca de 5 mm de diâmetro foi retirado destas culturas e depositados no centro das placas de Petri contendo o meio BDA adicionado dos conservantes. Os experimentos foram feitos em triplicata, e as placas foram incubadas a 28 ± 2ºC, no escuro, por 30 dias ou até que o micélio tomasse todo o diâmetro da placa, sendo mensurados o crescimento micelial após 2, 7, 15, 22 e 30 dias de incubação, com o auxílio de um paquímetro (mm).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Byssochlamys fulva*

Byssochlamys fulva apresentou um rápido crescimento frente às diferentes concentrações dos conservantes testados que não apresentaram efeito inibitório, atingindo o diâmetro total suportado pela placa de Petri (em média 90 mm) em cerca de 15 dias de observação.

Este fungo apresentou maior resistência que os demais ao metabissulfito de sódio, tendo o seu crescimento micelial afetado a partir da concentração máxima testada de 300 $mg.L^{-1}$ de metabissulfito de sódio. Para o benzoato de sódio, as concentrações inferiores a 600 $mg.L^{-1}$ não foram efetivas. O sorbato de potássio foi eficiente na concentração de 800 $mg.L^{-1}$, no período de observação (Figura 1).

3.2. *Neosartorya fischeri*

N. fischeri apresentou baixa resistência ao metabissulfito de sódio, tendo seu desenvolvimento inibido na concentração de 100 $mg.L^{-1}$(Figura 2). O desempenho deste conservante foi mais notável para este fungo do que para os demais fungos testados neste estudo.

O benzoato de sódio apresentou um bom desempenho na inibição do crescimento de *N. fischeri* sendo efetivo para tal, na concentração de 600 $mg.L^{-1}$. Já o sorbato de potássio apresentou efeito inibitório em 800 $mg.L^{-1}$, semelhante à *B. fulva.*

Alguns estudos visando a inativação térmica de esporos de *N. fischeri* em sucos de uva e manga, também foi evidenciado que o de benzoato de sódio e o sorbato de potássio reduziram o tempo necessário para a inativação dos esporos deste fungo [18].

3.3. *Talaromyces flavus*

O crescimento de *T. flavus* em meio contendo metabissulfito de sódio foi bem semelhante nas menores concentrações testadas para este conservante, de 80 e 100 $mg.L^{-1}$. A inibição do crescimento foi obtida na concentração de 200 $mg.L^{-1}$. O mesmo aconteceu para sorbato de potássio, apresentando crescimento semelhante nas concentrações de 400 e 800 $mg.L^{-1}$, porém seu crescimento só foi inibido por este conservante na concentração máxima testada de 1000 $mg.L^{-1}$ (Figura 3). Dentre todos os fungos termorresistentes estudados, este foi o de menor resistência ao benzoato de sódio, em menores concentrações, onde este conservante apresentou efeito inibitório na concentração de 350 $mg.L^{-1}$.

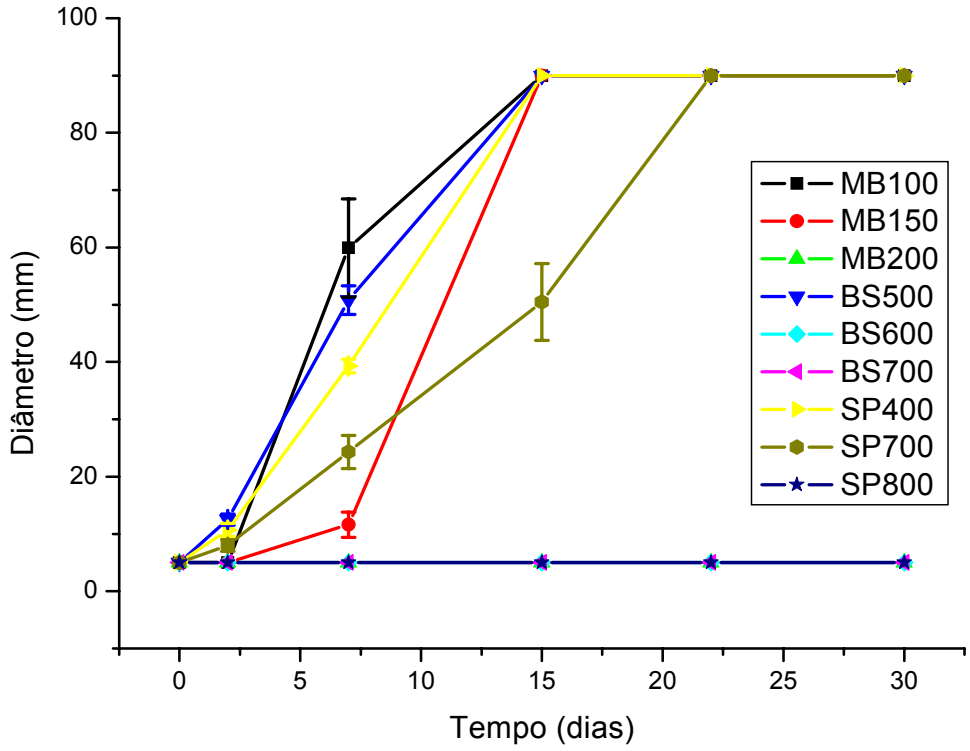


Figura 1. Crescimento médio de *B. fulva* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 100, 150 e 200 mg.L^{-1}), benzoato de sódio (BS 500, 600 e 700 mg.L^{-1}) e sorbato de potássio (SP 400, 700 e 800 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

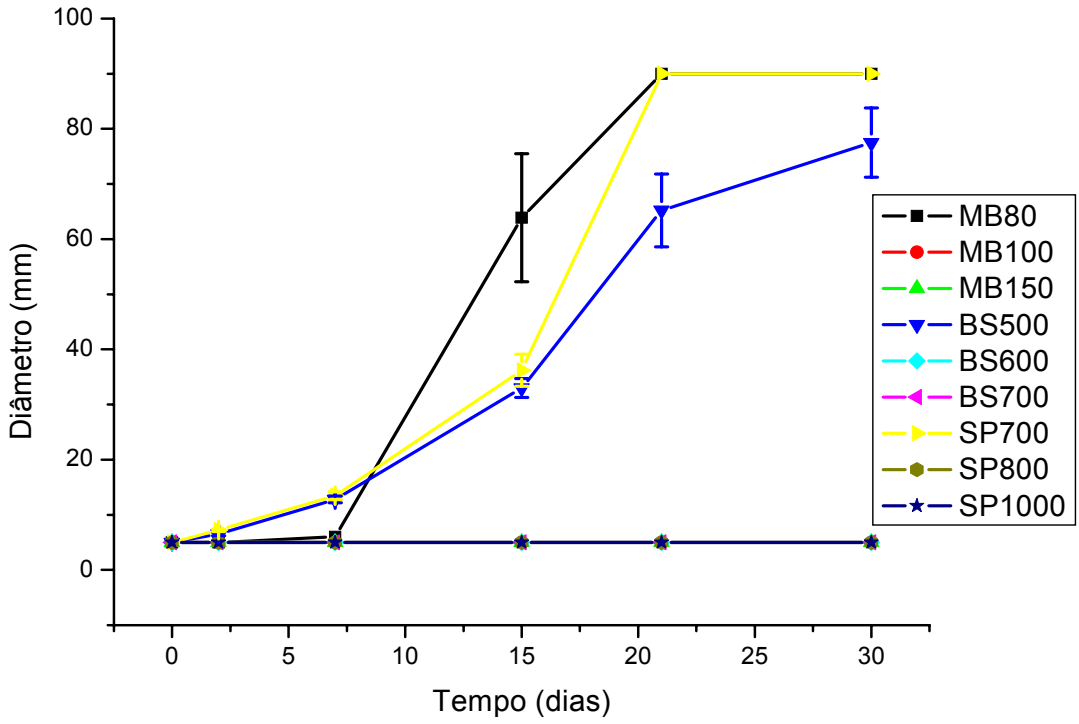


Figura 2. Crescimento médio de *N. fischeri* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 80, 100 e 150 mg.L^{-1}), benzoato de sódio (BS 500, 600 e 700 mg.L^{-1}) e sorbato de potássio (SP 700, 800 e 1000 mg.L^{-1}), após 30 dias de incubação a 28 ± 2 ºC no escuro.

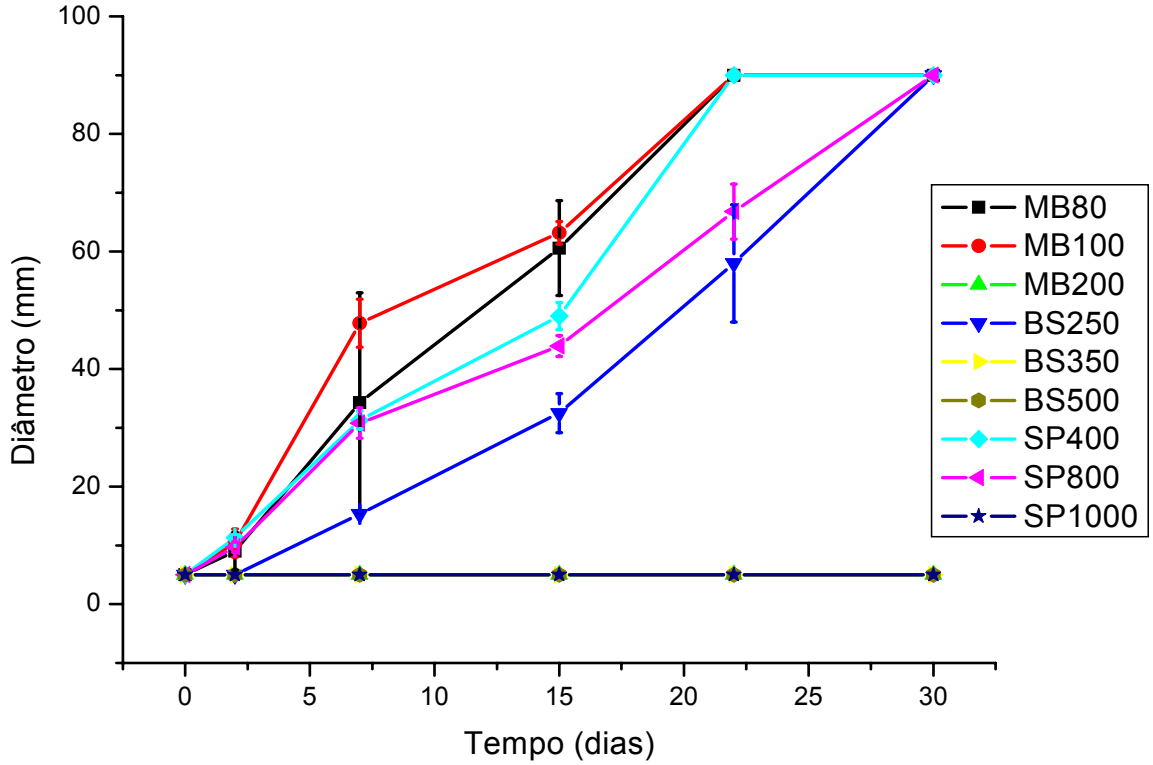


Figura 3. Crescimento médio de *T. flavus* em meio BDA (pH 3,5) acrescido de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio (MB 80, 100 e 200 mg.L^{-1}), benzoato de sódio (BS 250, 350 e 500 mg.L^{-1}) e sorbato de potássio (SP 400, 800 e 1000 mg.L^{-1}.), após 30 dias de incubação a 28 ± 2ºC no escuro.

4. Conclusões

Verificou-se que, para os microrganismos aqui estudados, o metabissulfito de sódio apresentou uma maior eficiência em termos de inibição de crescimento micelial, em menores concentrações que os demais conservantes testados *in vitro.*

Pode-se inferir, por comparação com as concentrações desses conservantes utilizadas pelas indústrias processadoras de alimentos, que as mesmas podem ser reduzidas se testes como os que foram o alvo deste trabalho forem empregados.

5. Referências Bibliográficas

[1] ARAGAO, G.M.F. Identificacao e determinacao da resistencia termica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 1989, 139p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

[2] BAGLIONI, F.; GUMERATO, H. F.; MASSAGUER, P. R. Occurrence of heat resistant molds in tomato pulp packed aseptically. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 19, n. 2, p. 258-263, 1999.

[3] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 1003, de 11 de dezembro de 1998. Categoria de alimentos para efeito do emprego de aditivos. Disponível on-line em: htpp://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1003_98.htm. Acesso em: 10 abr. 2006.

[4] CUNHA, V. A. B. Estudo experimental e modelagem do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes em sucos tropicais Florianópolis, 2003, 98p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

[5] DRAGONI, I.; COMI, G. Presenza di mufle e lieviti in succhi di frutta prodotti industrialmente. Ind. Bevande., v. 14, p. 599-606, 1985.

[6] ELLIS, W. O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K.; OLDHAM, J.H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 30, n. 4, p. 403-439, 1991.

[7] FILHO, P.A.T. disponível on-line em: http://www.asmabronquica.com.br/ medical/ tipos de_asma_asma_sulfitos.html. Acessado em 04 de maio de 2006.

[8] FRANK, H. K. Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. J. Food Sci., v. 33, p. 89-100, 1968.

[9] HOFFMANN, M. V. G. S. Estudo de resistência térmica *de Byssochlamys nivea e Talaromyces flavus* em suco de maçã. Florianópolis, 2004, 98p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

[10] KING, J. D. A; HALBROOK, W. U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. Journal of Food Science, v. 52, n. 5, 1987.

[11] KUBENA, L. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; CORRIER, D. E.; HUFF, W. E. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. Poultry Science, v. 69, p. 727-735, 1990.

[12] LEITÃO, M. F. F. Microbiologia das frutas tropicais e seus produtos. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (Campinas, SP). Frutas tropicais: aspectos tecnológicos. Campinas, p. 83-144, 1978.

[13] NASCIMENTO, R.F., PRATA, L. F., AQUINO, F.W.B. AMORIM, A.G.N. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 24, n. 1, p. 32-38, 2004.

[14] OLLIVER, M. & RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. Journal of Society Chem. Ind., v. 53, p. 166T, 1934.

[15] PERONI, D. G.; BONER, A.L. Sulfite sensitivity. Clin. Exp. Allergy, Oxford, v. 25, n. 8, p. 680-681, 1995.

[16] PERRIN-ANSART, M.C. Sur les sulfites employés comme conservateurs. Cah. Nutr. Diet., Vineuil, v. 24, n. 4, p. 291-297, 1989.

[17] PINTO. A. DE F. M. A. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. Disponível on-line em: http://www.ipv.pt/millenium/ect4_1.htm. Acessado em 18 de novembro de 2004.

[18] RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R. & ETHIRAJ, Modulation of thermal resistance of ascospores of Neosartorya fischeri by acidulants and preservatives in mango and grape juice. Food Microbiology, v. 17, p. 269-275, 2000.

[19] SCHIMIDT, F.L. Deterioração de sucos de frutas em embalagens assépticas. Um "novo" microrganismo desponta: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Informativo FRUTHOTEC, v. 2, n. 4, 1995.

[20] SCOTT, V. N. & BERNARD, D. T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from comercial fruit juices. Journal of Food Protection, v. 50, n. 1, p. 18-20, 1987.

[21] SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2º edição. São Paulo: Varela. 2001.

[22] SPOTTI, E.; CASOLARI, A. Indagine sul contenuto di catalasi di muffe gasogene e altri microrganismi. Indústria Conserve, v. 62, p. 22-24, 1987.

[23] SROUR, R. Benzoic acid and derivatives. In: Srour R, ed. Aromatic intermediates and derivatives. Paris, pp. A.IV.1– A.IV.17 .1998.

[24] TAYLOR, S.L. Why sulfite alternatives? Food Technol., v. 47, n. 10, p. 14, 1993.

[24] TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. Food Technol., v. 40, n. 6, p. 47-52, 1986.

[26] TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. Food Technol., v. 39, n. 11, p. 532-536, 1987.

[27] TFOUNI, S.A.V.; M.C.F. TOLEDO. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. Food Control, v. 13. p. 117–123, 2002.

[28] WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000.

APÊNDICE 2. Artigo: Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento de bactérias patogênicas *in vitro*.

Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento de bactérias patogênicas *in vitro*.

Sheyla Ferreira Lima-Coelho[1], Ana Maria Queijeiro López[1]

[1]Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, *Campus* AC Simões s/n, Tabuleiro dos Martins.

RESUMO

Alguns microrganismos causadores de infecções alimentares são facilmente removidos pelo tratamento térmico ou pH ácido, outros são mais resistentes e de difícil eliminação. Em alguns alimentos, o uso de conservantes tem sido a solução para inviabilizar a multiplicação bacteriana. Porém, alguns desses aditivos são mais eficazes para fungos, sendo pouco indicados para o controle bacteriano. Visando fornecer subsídios para reduzir a utilização de quantidades inadequadas de conservantes pela indústria de alimentos e a ingestão imprópria pela população, este trabalho teve por objetivo determinar a concentração mínima de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária para inibir o crescimento de *Salmonella* Enteritidis*, Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* e *Bacillus cereus in vitro*. Assim, adicionou-se ao meio TSA (Triptona-Soja-Agar) contendo ácido cítrico (pH 3,5 e 5) o conservante selecionado, de modo a obter-se concentrações de 100, 200, 250, 300, 400, 500, 800, 1000 mg L^{-1}. Em seguida inoculou-se 100µL de uma suspensão aquosa de bactérias dos os isolados testados (10^4 células. mL^{-1}), recém preparada a partir de culturas jovens (24 h) em Agar Nutriente (AN), e 24 h depois procedeu-se a contagem de UFC. O isolado de *B. cereus* foi o mais susceptível aos conservantes testados, com menores taxas de crescimento. O metabissulfito de sódio apresentou uma maior eficiência em termos de inibição do crescimento, e em menores concentrações.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis*, Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* e *Bacillus cereus,* metabissulfito de sódio, benzoato de sódio, sorbato de potássio.

ABSTRACT

Some microorganisms that cause infections food are easily removed by heat treatment or acid pH, others are more resistant and difficult to disposal. In some foods, the use of preservatives has been the solution to avoid the bacterial proliferation. But some of these additives are most effective for fungi, being less indicated to control bacteria. To provide subsidies to reduce the use of inadequate quantities of preservatives by the food industry, and improper intake of the same by the population, this study aimed to determine the minimum concentration of sodium metabisulphite, sodium benzoate, potassium sorbate required to inhibit the growth of *Salmonella* Enteritidis*, Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* and *Bacillus cereus in vitro*. Thus, to the medium TSA (Tripton-Soybean-Agar), containing citric acid (pH 3.5 and 5), it was added the selected preservative in order to obtain concentrations of 100, 200, 250, 300, 400, 500, 800, 1000 mg L^{-1}. Then, it was inoculated 100 µL of a aqueous suspension of the bacteria (10^4 cells. mL^{-1}) freshly prepared from young cultures (24 h) in Nutrient Agar (NA), and 24 h later it was proceeded the count of CFU. The strain of *B. cereus* was the most susceptible to all the preservatives, with lower growth rates. The sodium metabisulphite showed greater efficiency in terms of inhibition of growth of the microorganisms, and at lower levels.

Keywords: Preservatives, *Salmonella* Enteritidis*, Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, sodium benzoate, potassium sorbate, sodium metabisulphite.

1. INTRODUÇÃO

O preparo ou armazenamento inadequado de alimentos pode levar os consumidores a apresentarem desde um pequeno desconforto intestinal até doenças graves, devido aos microrganismos patogênicos que as veiculam. Para a indústria, o problema é agravado, pois a contaminação resulta, muitas vezes, também em grandes perdas financeiras [11], por comprometerem seriamente a imagem do produto, prejudicando inclusive possíveis exportações [8].

As bactérias patogênicas causam distúrbios não só pela sua capacidade invasiva, mas também pela produção de toxinas [4, 10]. Algumas delas são facilmente removidos por tratamento térmico, outras são termorresistentes, como cianobactérias, tiobacilos, bacilos e clostrídios, que apresentam temperatura mínima de crescimento em torno de 45°C, podendo a máxima ultrapassar os 70°C [4], sendo de difícil eliminação.

Vários autores afirmam que não se pode ter certeza que alimentos ácidos estão livres de bactérias patogênicas, uma vez que algumas linhagens podem sobreviver em pH 2.5 por 2 h ou mais [1, 2]. Além disso, na última década várias surtos causados por *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Cryptosporidium* e vírus Norwalk foram demonstrados e associados com consumo de suco de fruta não pasteurizado [7]

Em estudos realizados por Ilha (2000), no estado de São Paulo, a presença de coliformes a 45°C em suco de laranja pasteurizado foi constatada. Sugai *et. al.*

(2002), detectaram que o grande número de bactérias mesofílicas e de fungos filamentosos e leveduriformes, aumentaram em suco de laranja em decorrência do tempo de armazenamento.

Em alguns alimentos, como sucos, geléias, bolos, queijos, carnes e mais uma grande variedade, o uso de conservantes tem sido uma boa solução para inviabilizar a multiplicação bacteriana. Porém, alguns destes aditivos são mais eficazes para fungos, sendo pouco indicados para o controle bacteriano [4]. Dentre as bactérias sensíveis estão os coliformes, salmonelas, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus* [10].

Jay (2005) relata que baixas concentrações de SO_2 (100 a 200 $mg.L^{-1}$) têm efeito bacteriostático contra *Acetobacter* spp. e bactérias produtoras de ácido lático em baixo pH. Banks & Board mostraram que o crescimento de salmonelas e outras enterobactérias foi inibido em molho inglês, quando foi usada uma concentração de 600 mg/L^{-1} de SO_2. As bactérias mais sensíveis foram oito sorovares de *Salmonella,* cujo crescimento foi inibido numa faixa de 15 a 10^9 $mg.L^{-1}$ de metabissulfito de sódio [10].

Porém, quando usados em quantidades excessivas, os conservantes podem ocasionar riscos à saúde humana, variando desde a pequenas intolerâncias a casos de urticária, asma, renites, ou mesmo de choque anafiláticos [3, 13, 14, 15, 16, 17].

A fim de fornecer subsídios para se reduzir a utilização de quantidades inadequadas de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, a ingestão imprópria dos mesmos pela população, determinou-se neste trabalho a concentração mínima de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária para inibir o crescimento de *Salmonella* Enteritidis*, S.* Typhimurium*, Escherichia coli* e *Bacillus cereus in vitro.*

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de análise

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia / UFAL.

2.2. Amostragem

As cepas de *Salmonella* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* foram isoladas de alimentos e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Nutrição /UFAL.

2.3. Preparo do Meio com Conservante

Preparou-se o meio TSA (Triptona-Soja-Agar), segundo as orientações do fabricante. Após sua autoclavagem (120 ºC, 1 atm, 20 min) e ajuste de pH (3,5 e 5) com ácido cítrico, em condições assépticas adicionou-se ao meio (a 45 ± 2 ºC) o conservante estudado (benzoato de sódio, metabissulfito de sódio e sorbato de potássio) de modo que perfizesse a concentração adequada desejada (100, 200, 250, 300, 400, 500, 800, 1000 $mg.L^{-1}$).

Após a completa homogeneização, verteu-se o meio em placas de Petri estéreis e aguardou-se sua solidificação para posterior inoculação.

2.4. Preparo do inóculo e ensaios

Os isolados de cada microrganismo (*S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *B. cereus* e *E. coli)* foram repicados a partir de culturas em tubos em ágar nutriente (AN), no mesmo meio, a fim de se obterem culturas com 24 h para os ensaios com os conservantes.

A seguir 10 mL de água estéril foram adicionados às culturas em placas (AN) e recuperados em tubo estéril, onde 1 mL foi retirado e adicionado a 9 mL de água estéril. Dessa suspensão, novas diluições foram efetuadas (10^{-2} ou 10^{-3}), e procedeu-se à contagem de células utilizando a Câmara de Neubawer. A partir desta contagem efetuou-se uma diluição final de cada suspensão de células dos microrganismos para 10^5 células.mL^{-1}.

Desta, coletou-se 100µL (10^4 células) e inoculou-se esse volume nas placas contendo o meio TSA (pH 3,5 e 6,5) com o conservante. O controle sem conservantes foi inoculado no mesmo meio e nas mesmas condições de pH. Esse inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski e as culturas foram incubadas a 30 ± 2º C por 24, 48 e 72 h, no escuro. Em cada intervalo de tempo, efetuou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de cada cultura em triplicata por tratamento. Os experimentos foram repetidos três vezes, num delineamento experimental de blocos ao acaso.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Escherichia coli*

Apesar do inóculo apresentar-se diluído (10^{-5} células.mL^{-1}), na maioria dos casos o crescimento foi tão acentuado que tornou-se impossível quantificar o número de UFCs, sendo descrito como abundante (Ab). Há vários relatos de sobrevivência bacteriana em pH ácido, principalmente para *E. coli* [7], porém, neste estudo não foi observado nenhum sinal de crescimento bacteriano em pH 3,5, mesmo após 30 dias de incubação. Após este período, as placas foram descartadas.

O benzoato de sódio (BS) na menor concentração testada (250 mg.L^{-1}) não foi eficaz, atingindo efeito inibidor na concentração de 500 mg.L^{-1}, sendo a concentração de 1000 mg.L^{-1} desnecessária no caso desta bactéria.

Já o sorbato de potássio foi requerido na concentração máxima testada de 1000 mg.L^{-1} para atingir um efeito inibitório. Nas menores concentrações do mesmo, o crescimento de *E. coli* foi abundante.

O metabissulfito de sódio (MB) apresentou um bom resultado acerca da inibição do crescimento de *E. coli,* sendo eficiente numa concentração de 100 mg.L^{-1} e apresentando melhor resultado se compara do aos demais conservantes testados para inibir totalmente o crescimento bacteriano após 72 h de incubação para a bactéria em questão (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento de *E. coli* (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO ($mg.L^{-1}$)	Número de UFC		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	0	0
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	18,89 ± 13,63	Ab	Ab
BS 500	0	0	0
BS 1000	0	0	0
SP 250	0	Ab	Ab
SP 500	0	Ab	Ab
SP 1000	0	0	0
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias (abundante). MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$.

3.1.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus, por outro lado, apresentou-se mais sensível aos conservantes testados, sendo possível inclusive quantificar o número de UFC (Tabela 2). Da mesma forma que *E. coli*, *B. cereus* foi inibido com mais eficiência pelo metabissulfito de sódio, e em concentrações de 500 $mg.L^{-1}$ de benzoato de sódio e 1000 $mg.L^{-1}$ de sorbato de potássio.

Já foi demonstrado que outras espécies de *Bacillus* são capazes de degradar o benzoato de sódio. Na produção de ácido lático, o benzoato é utilizado para inibir a oxidação da glicose e do piruvato ao nível do acetato (Acetil Coa), fazendo com que este microrganismo se utilize da via fermentativa, produzindo ácido lático e aumentando a produtividade [5].

No presente estudo, o crescimento de *B. cereus* não aumentou de acordo com o aumento da concentração de benzoato, pelo contrário, diminuiu, chegando a total inibição.

Em meio ácido, não foi observado nenhum sinal de crescimento bacteriano por um período de 30 dias. Também não houve crescimento bacteriano no controle em meio acidificado (sem conservantes).

Tabela 2. Crescimento de *Bacillus cereus* (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO (mg.L^{-1})	**Número de UFC**		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	0	0
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	0	2,11 ± 2,59	4,44 ± 2,08
BS 500	0	0	0
BS 1000	0	0	0
SP 250	0	7,33± 9,56	71,33 ± 93,44
SP 500	0	0,78± 1,04	1,00 ± 1,33
SP 1000	0	0	0
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias. MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 mg.L^{-1}.

3.1.3. *Salmonella* Typhimurium e *S.* Enteritidis

De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 3 e 4), o sorbato de potássio não foi eficaz na inibição de *S.* Typhimurium e *S.* Enteritidis, pois nenhuma das espécies de *Salmonella* foi sensível ao tratamento com sorbato de potássio na concentração máxima testada de 1000 mg.L^{-1}.

O metabissulfito de sódio apresentou-se mais eficiente em baixas concentrações, uma vez que *S.* Typhimurium teve seu desenvolvimento inibido na concentração de 100 mg L^{-1}, porém, *S.* Enteritidis foi mais resistente a este conservante, sendo a concentração inibitória de 200 mg.L^{-1}.

Salmonella Typhimurium teve crescimento mais rápido que *S.* Enteritidis, mas igual comportamento para sorbato de potássio e benzoato de sódio no decorrer das 72 h.

Em meio ácido (pH 3,5), não foi observado o crescimento de *Salmonella* sp. Encontram-se descritos na literatura a sobrevivência e crescimento de *Salmonella* sp. em suco de maçã (pH 3-4) [6], porém, em meio de cultura, isto não foi evidenciado.

Tabela 3. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO ($mg.L^{-1}$)	**Número de UFC**		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	0	0
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	Ab	Ab	Ab
BS 500	Ab	Ab	Ab
BS 1000	0	0	0
SP 250	Ab	Ab	Ab
SP 500	Ab	Ab	Ab
SP 1000	Ab	Ab	Ab
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias. MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$.

Tabela 4. Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (em UFC) após 72 h de incubação em meio TSA (pH 5) acrescido de diferentes concentrações de conservantes.

CONSERVANTE TESTADO/ CONCENTRAÇÃO ($mg.L^{-1}$)	**Número de UFC**		
	24 h	48 h	72 h
MB 100	0	Ab	Ab
MB 200	0	0	0
MB 300	0	0	0
BS 250	0	Ab	Ab
BS 500	0	Ab	Ab
BS 1000	0	0	0
SP 250	0	Ab	Ab
SP 500	0	Ab	Ab
SP 1000	0	Ab	Ab
CONTROLE	Ab	Ab	Ab

Ab= nº incontável de colônias. MB= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; 100, 200, 250, 300, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$.

A concentração de conservante necessária para inibir totalmente o crescimento das espécies bacterianas estudadas foi inferior à utilizada por algumas indústrias de alimentos que, em geral, utilizam a quantidade máxima

permitida pela legislação, sem realizar ensaios que minimizem a concentração de aditivos inseridos em seus produtos. É importante atentar para esse fato, de tal forma que a indústria de alimentos minimize os riscos à saúde humana, não somente no sentido de prevenir a presença de bactérias patogênicas, mas também de evitar possíveis casos de alergias, dentre outros males causados pelo uso excessivo de conservantes.

4. Conclusões

Verificou-se que, para os microrganismos aqui estudados, o metabissulfito de sódio apresentou uma maior eficiência em termos de inibição de crescimento, em menores concentrações que os demais conservantes testados *in vitro.*

Bacillus cereus apresentou-se mais susceptível aos conservantes testados, apresentando menores taxas de crescimento.

5. Referências bibliográficas

[1] BENJAMIN, M. M., & DATTA, A. R. (1995). Acid tolerance of enterohemorrhagic Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1669–1672.

[2] DE JONGE, R., TAKUMI, K., RITMEESTER, W. S., & LEUSDEN, F. M. (2003). The adaptive response of Escherichia coli O157 in an environment with changing pH. Journal of Applied Microbiology, 94, 555–560.

[3] FILHO, P.A.T. disponível on-line em: http://www.asmabronquica.com.br /medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html. consultado em 04/05/2006.

[4] FRANCO, B.D. de M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. 1° Ed. Editora Atheneu, 182 p. 2002.

[5] GARCÍA, M.T.; LUCAS, R.; ABRIOUEL,H.; OMAR, N.B.; PÉREZ, R. GRANDE, M. J.; MARTINEZ-CAÑHAMERO; GÁLVEZ, A. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against "*Bacillus macroides/ Bacillus maroccanus"* isolated from zucchini purée. Journal of Applied Microbiology. 2004, 97, 731-737.

[6] GAWANDE, P.V.; BHAGWAT, A. A. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of *Salmonella* spp. Journal of Applied Microbiology, v.93, p. 689–696. 2002.

[7] GHENGHESH, K. S.; BELHAJ, K.; EL-AMIN, W. B.; EL-NEFATHI, S.E. ZALMUM, A. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli–Libya. Food Control 16 (2005) 855–858.

[8] GÓES L. M. N. DE B.; MENDES, P. DE P.; MENDES, E. S.; RIBEIRO, C. M. DE F.; E SILVA, R. P. P. Uso do metabissulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Acta Sci. Biol. Sci. Maringá, v. 28, n. 2, p.153-157, April/June, 2006.

[9] ILHA, M.H.; FÁVARO, R.M.D.; OKADA, M.M. *et al*. Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado. Ver. Inst. Adolfo Lutz,9(1/2):39-44, 2000.

[10] JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª Ed. Editora Artmed, São Paulo. 711p. 2005.

[11] PELCZAR Jr, M. J.; CHAN, E. C. S. & KRIEG, N. R. Microbiologia conceitos e aplicações. Volume 2 2º edição, 1996. São Paulo . Makron books.

[12] SUGAI, A.Y.; SHIGEOKA, D.S.; BADOLATO, G.G.; TADINI, C.C. análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 22(3): 233-238, set.-dez. 2002.

[13] TAYLOR, S.L. Why sulfite alternatives? Food Technol., Chicago, v.47, n.10, p.14, 1993.

[14] TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. Food Technol., Chicago, v.40, n.6, p.47-52, 1986.

[15] TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. Food Technol. Aust., Sydney, v.39, n.11, p.532-536, 1987.

[16] TFOUNI, S.A.V.; M.C.F. TOLEDO. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. Food Control 13. 117–123. 2002.

[17] WHO. World Health Organization BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE Concise International Chemical Assessment Document 26. Geneva, 2000.