

Efeito *in vitro* de concentrações de metabisulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio sobre fungos termorresistentes

In vitro effect of concentrations of sodium metabisulphite, sodium benzoate and potassium sorbate on heat-resistant fungi

RIALA6/1211

Ana Maria Queijeiro LÓPEZ*, Sheyla Ferreira LIMA-COELHO, Luis Fernando Romanholo FERREIRA

*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Campus A.C. Simões s/n. Tabuleiro dos Martins, Maceió, AL, Brasil, CEP: 57072-970. e-mail: amql@qui.ufal.br.

¹Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brasil.

Recebido: 29.01.2009 – Aceito para publicação: 11.08.2009

RESUMO

Os fungos termorresistentes dos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces* representam grave problema para a indústria processadora de alimentos, especialmente de frutas e hortaliças, em virtude da ocorrência de ascósporos extremamente resistentes e/ou de micotoxinas termoestáveis. Com o propósito de fornecer subsídios quanto ao uso de quantidades mais racionais de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, tornar seu consumo menos danoso à população, o presente estudo determinou *in vitro* a concentração mínima de metabisulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária e suficiente para inibir o crescimento micelial e a germinação de ascósporos de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* em meio de cultivo acidificado (pH 3,5). Foi demonstrado que metabisulfito de sódio em baixas concentrações é tão eficiente na inibição dos fungos mencionados quanto aos demais conservantes em altas concentrações. Por comparação com os procedimentos utilizados pelas indústrias de alimentos, é possível inferir que estas podem reformular o uso de conservantes, considerando-se o tipo de matéria-prima, a temperatura de processamento, a combinação e concentração efetivamente necessária de aditivos, bem como os efeitos tóxicos desses compostos para a saúde humana.

Palavras-chave. *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, metabisulfito de sódio, benzoato de sódio, sorbato de potássio, fungos termorresistentes.

ABSTRACT

Heat-resistant fungi of *Byssochlamys*, *Neosartorya* and *Talaromyces* genera represent a serious issue to the food processing industry, especially of fruits and vegetables, due to the occurrence of extremely resistant ascospores and/or heat-stable mycotoxins. In order to provide subsidies to the food industry in using the most rational amounts of preservatives, and to assure the safe consumption of them by the population, this *in vitro* investigation was conducted to determine the minimum concentrations of sodium metabisulphite, sodium benzoate and potassium sorbate needed to inhibit the mycelial growth of *B. fulva*, *N. fischeri* and *T. flavus*, in acidified (pH 3,5) medium. This study showed that sodium metabisulphite in low concentrations was as much effective in inhibiting the above mentioned fungi as other preservatives in high concentrations. Comparing with the procedures used by the industries, it may be presumed that food manufacturers could reformulate the use of preservatives, taking into account the type of raw material, the processing temperature, the use of combining additives and in the minimum concentrations actually effective, being aware of the toxic effects of these preservatives to the human health.

Key words. preservatives, *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, sodium benzoate, potassium sorbate, sodium metabisulphite, heat-resistant fungi.

INTRODUÇÃO

A maioria das deteriorações fúngicas em alimentos, especialmente de frutos/ pseudo-frutos colhidos diretamente do solo ou próximos dele, e seus derivados processados (sucos, polpas, concentrados e frutos enlatados)¹⁻¹³, deve-se a poucas espécies que produzem esclerócios ou ascósporos resistentes à pasteurização, como aquelas pertencentes aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces*¹. Além da alta resistência térmica, tais fungos também sintetizam metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular e termoestáveis, que se acumulam na matéria-prima beneficiada. Isso resulta em impacto econômico negativo em todos os níveis de produção, comercialização e consumo¹⁴⁻¹⁷.

Para tentar reduzir os riscos desses fatos, além do tratamento térmico, as indústrias lançam mão do uso dos aditivos químicos, ainda que essa prática não agrade os consumidores por conduzir danos à saúde humana, especialmente em concentrações excessivas. Os mais utilizados são os sulfitos, benzoatos e sorbatos¹⁸⁻²¹, e sua eficácia depende da sua concentração, temperatura de processamento e armazenamento, do tipo e quantidade de micro-organismo a ser combatido e da natureza do alimento^{1,18,22}.

A ação conservadora do ácido benzoico (C_6H_5COOH) e do benzoato de sódio (BS), deve-se à ingestão de moléculas não-dissociadas que afetam todos os processos em que a glicina esteja envolvida. Em combinação com o ácido ascórbico, BS pode formar benzeno, um carcinógeno, e individualmente causa danos ao ácido desoxirribonucleico mitocondrial (DNAMt)²³, o que conduz à apoptose celular (comum nas doenças neurodegenerativas). Exposição dérmica, ingestão ou inalação do ácido benzoico ou BS têm causado urticária, asma, rinites ou choques anafiláticos^{24,25}. Em 2007, a agência britânica de padronização dos alimentos comprovou que hiperatividade e declínio da inteligência (QI rebaixado em 5,5 pontos) em crianças britânicas devia-se ao alto consumo da combinação BS-corantes artificiais²⁶, especialmente em refrigerantes, proibindo seu uso.

Por sua vez, o dióxido de enxofre nas formas líquida, gasosa e anidrida (SO_2 , SO_3 , HSO_3 , e S_2O_5) e seus derivados (sais de sódio, potássio ou cálcio) – antibacterianos, fungistáticos, antioxidantes e quelantes, liberam sulfitos que reagem com ligações dissulfeto e tiosulfonatos. Assim, inativam enzimas, o grupo heme de várias delas e suas coenzimas, e convertem citosina em uracila,

5-metilcitosina em timina, além de decompor tiamina. A atividade de suas formas combinadas depende de sua estabilidade frente a processos digestivos^{24,25}. Nos alimentos e limites legalmente definidos^{19,20,25,26} não afetam a maioria das pessoas, porém, asmáticos²⁷⁻³² e pacientes em nutrição parenteral³³ podem ser afetados, com reações ocorrendo de 10 a 20 min após sua ingestão (broncoconstrição, broncoespasmo, anafilaxia, hipotensão, náuseas, urticária, angioedema, rubor, diarreia e parestesias). Por isso, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa) proibiram seu uso para manutenção de cor e consistência de frutas, vegetais crus e alimentos ricos em vitamina B1, visto que podem fornecer um falso aspecto de frescor³⁴. No Reino Unido e Canadá, são permitidos respectivamente em carnes embutidas (até o limite de 450 mg.Kg⁻¹) e aves domésticas²⁹.

Já os sorbatos, devido à sua baixa toxicidade, são recomendados e utilizados mundialmente³⁵. Nas vinícolas, são usados como inibidor da fermentação secundária, reduzindo os níveis de sulfitos ao inibirem sulfidrilases, desidrogenases e fumarases²².

Diante do exposto, ensaios rápidos para determinação da concentração inibitória mínima de conservantes sobre fungos termorresistentes, contribuem para a elaboração de protocolos de sua utilização em alimentos específicos, visando reduzir sua ingestão inadequada. O propósito do presente trabalho foi determinar a concentração mínima de metabisulfito de sódio (MBS), BS e SP capaz de inibir *in vitro* o crescimento micelial e a germinação de esporos de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia da 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, em tubos contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e as culturas foram repicadas para o mesmo tipo de meio, preparado conforme descrito por Silva et al.³⁶, sendo este acidificado com ácido cítrico (pH 3,5) após sua autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min), e posterior depósito em placas de Petri esterilizadas. O material foi incubado por 24 h (30 ± 2 °C, escuro).

■ Efeito de conservantes sobre o crescimento micelial

O meio BDA, distribuído em diferentes frascos, foi acrescido de distintas quantias de conservantes, gerando várias concentrações dos mesmos (0, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600, 700, 800, 900 e 1000 mg.L⁻¹). A seleção de tais concentrações baseou-se em citações da literatura específica, e limites máximos abrangidos pela legislação^{19, 20, 25, 26, 37} visando aplicação em diferentes alimentos processados. Em seguida, os frascos foram autoclavados e os meios acidificados conforme acima descrito, sendo posteriormente vertidos em placas de Petri esterilizadas. Após sua solidificação, depositou-se centralmente sobre eles discos de micélio (~ 5mm θ) de colônias de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* (10 dias a 28 \pm 2°C, no escuro, em meio BDA acidificado). As culturas foram incubadas a 28 \pm 2°C, no escuro. O crescimento micelial foi mensurado após 2, 7, 15, 22 e 30 dias de incubação, com o auxílio de um paquímetro (mm).

Os experimentos seguiram delineamentos totalmente casualizados, com três réplicas por tratamento (micro-organismo X concentração de conservante), totalizando 144 placas para cada ensaio de cada conservante, sendo estes testes repetidos em três ocasiões. Após análise de variância, as médias foram comparadas entre si conforme teste de Tuckey ao nível de 5%.

■ Efeito de conservantes sobre a germinação de esporos

De tubos contendo um volume total de 30 mL de meio BDA acidificado (pH 3,5) estéril com diferentes concentrações de metabisulfito (MBS = 0, 100, e 200 mg.L⁻¹) e BS (0, 350 e 600 mg.L⁻¹), foram colhidas alíquotas de cerca de 0,5 mL e depositadas homogeneamente sobre a superfície de lâminas de microscopia previamente deslipidizadas, cuidando-se para que o filme não atingisse as extremidades. Para testar a germinação de esporos dos fungos *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* em tréplicas de lâminas de cada uma das 3 concentrações de cada conservante, em 5 diferentes intervalos de tempo, utilizaram-se 135 lâminas por aditivo testado, sendo esse ensaio repetido em três ocasiões.

Assim, suspensões de esporos dos fungos testados foram obtidas através da lavagem, sob condições assépticas, de culturas em meio BDA acidificado (30 dias de incubação a 28 \pm 2°C, no

escuro) com uma solução aquosa (Tween 20 0,1%) estéril. Estas foram filtradas em dupla camada de gaze também esterilizada, e as contagens dos esporos foram efetuadas com o auxílio de Câmara de Neubauer, sob microscópio óptico, após colher-se alíquotas (100 μ L) das suspensões e adicionar-se a elas igual volume de solução de lactofenol de algodão azul (20g de ácido fênico, 20 mL de ácido láctico, 20 mL de glicerina, 20 mL de água destilada e 0,1 g de azul-anilina). Por meio desse teste, foram considerados viáveis apenas os esporos que se coram em azul³⁸. Após constatar-se a viabilidade de 98-100%, a concentração da suspensão aquosa de cada fungo foi ajustada para 10⁶ esporos viáveis.mL⁻¹. Esta, então, foi submetida por 5 min a uma temperatura de 80 \pm 2°C (Banho Maria), tratamento este selecionado com base em vários estudos³⁹⁻⁴⁸ sob o rompimento da dormência de ascósporos dessas espécies por choque térmico.

Tais pesquisas concluíram que a taxa de ativação de ascósporos de *B. nivea* e *N. fischeri* a uma determinada temperatura é influenciada pela concentração de sólidos solúveis no meio de aquecimento, sendo menor o intervalo requerido para ativação em substratos com menos sólidos solúveis. Também foi observado que ascósporos gerados em culturas incubadas a temperaturas amenas (25°C) requerem menor tempo de ativação que aqueles gerados em cultivos incubados sob temperaturas mais altas.

Portanto, considerando-se que as suspensões de ascósporos utilizadas no presente estudo foram preparadas com solução aquosa de Tween 20 0,1% (baixa concentração de sólidos solúveis), e a partir de culturas incubadas por 30 dias a cerca de 28 °C, optou-se por padronizar o intervalo de ativação para as três espécies estudadas em 5 min a 80°C.

Alíquotas de 50 μ L das suspensões de ascósporos ajustadas foram depositadas no centro das lâminas previamente preparadas com filmes de conservantes. Essas lâminas foram incubadas (28°C \pm 2°C, escuro) sobre suportes triangulares dentro de placas de Petri (revestidas ao fundo com papel de filtro embebido em água destilada estéril) e, a intervalos de 0, 6, 12, 24 e 48 h após a inoculação, foram coradas com solução de algodão azul-lactofenol. Em seguida, sob microscópio óptico, efetuou-se a contagem de 100 esporos viáveis por lâmina, avaliando-se o percentual de germinação dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

■ Efeito de conservantes sobre o crescimento micelial

Nos meios em que as concentrações dos conservantes não foram eficientes, as colônias atingiram o diâmetro total das placas de Petri (90 mm) aos 15 dias de incubação ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro). Por outro lado, a partir de algumas concentrações dos conservantes, o crescimento fúngico foi totalmente paralisado. As Tabelas 1 e 2, portanto, expõem dados do crescimento micelial de *B. fulva*, *T. flavus* e *N. fischeri* apenas diante das concentrações que começaram a inibi-lo e daquelas que primeiro foram totalmente inibitórias. Conforme a análise estatística, observa-se que até o 7º dia de incubação *B. fulva* já teve seu crescimento retardado por concentrações de 150 mg MBS.L⁻¹, 500 mg BS.L⁻¹ e 400 mg SP.L⁻¹. Já o fungo *T. flavus*, sob o efeito de 100 mg MBS.L⁻¹, 250 mg BS.L⁻¹ e 800 mg SP.L⁻¹, cresceu mais lentamente até o 15º dia de incubação. No mesmo intervalo, o desenvolvimento micelial de *N. fischeri* já foi atrasado na presença de 80 mg MBS.L⁻¹, 500 mg BS.L⁻¹ e 700 mg SP.L⁻¹. Contudo, o micélio dos fungos testados só foi totalmente inibido por concentrações maiores de MBS, BS e SP.

Quando comparados a *N. fischeri* (Tabela 2), *B. fulva* e *T. flavus* (Tabela 1) apresentaram maior resistência vegetativa frente ao aditivo MBS, visto que o crescimento micelial do primeiro foi totalmente inibido a 100 mg.L⁻¹, enquanto para atingir-se o mesmo efeito com os demais foi necessário o uso de 200 mg.L⁻¹ de tal conservante. Nielsen⁴⁸, utilizando impedância microbiológica, já demonstrara que três variedades de *N. fischeri* são completamente inibidas por 300 mg.L⁻¹ de dióxido de enxofre em suco de frutas, especialmente quando as temperaturas de incubação e pH são mais baixas (18°C e pH 3,5). *In vitro*, demonstrou-se que o crescimento de *N. fischeri* em meio CYA (Czapeck - autolisado de levedura – Agar, pH 3,5)⁴⁹, é retardado por SP e BS a 75 mg.L⁻¹, mas totalmente inibido por 200 mg.L⁻¹ de SO₂. Estudos de Beuchat⁵⁰ também já haviam demonstrado que 50 mg.mL⁻¹ de SO₂ em meio BDA são suficientes para inibir completamente o desenvolvimento de colônias de *B. nivea*, enquanto esse crescimento e a produção de patulina após 25 dias de incubação em suco de maçã⁵¹, a 21, 30 e 37 °C, foram significativamente retardados/inibidos por 75 mg.L⁻¹ de SO₂, 150 mg.L⁻¹ de SP e 500 mg.L⁻¹ de BS.

Por outro lado, no presente estudo, BS e SP só foram capazes de inibir totalmente o crescimento *in vitro* de *B. fulva* e *N. fischeri* (Tabelas 1 e 2) respectivamente a

600 mg.L⁻¹ e 800 mg.L⁻¹, enquanto o crescimento de *T. flavus* (Tabela 1) foi inibido totalmente nas condições estudadas por 350 mg.L⁻¹ de BS e concentrações de SP superiores a 900 mg.L⁻¹.

Portanto, no caso de MBS, a concentração inibitória à cepa de *N. fischeri* utilizada no presente trabalho parece relativamente menor do que aquela mencionada por alguns autores. Por outro lado, as concentrações de BS e SP necessárias à inibição dos três fungos aqui estudados foram superiores às citadas em várias pesquisas. Isso reforça a teoria de que a interação do substrato (meio) com outras variáveis, como temperatura de ativação e incubação, variedade e espécie de fungo termorresistente, e concentração do aditivo, devem ser consideradas para o controle da deterioração de alimentos em maior grau.

■ Efeito de conservantes sobre a germinação de esporos

Exceto pela presença dos conservantes, o fato dos testes terem sido conduzidos sobre filme de meio de cultura com atividade de água mínima necessária⁴³ (e em câmara úmida), a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (ao abrigo da luz) por 30 dias, por si só garantiria a capacidade máxima de germinação dos ascósporos estudados após o choque térmico (80°C a 5min).

Ainda que a maior concentração de MBS (200 mg.L⁻¹) testada não tenha reduzido a germinação dos três fungos na mesma proporção que o BS a 600 mg.L⁻¹ (Tabela 3), esta foi bastante eficiente, declinando tal parâmetro em cerca de 81,8-94,2 % quando medido 48 h após a inoculação das suspensões de esporos de culturas com 30 dias de idade sobre os filmes de meio nas lâminas.

As concentrações de MBS e de BS capazes de inibir acentuadamente a germinação dos ascósporos de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* foram as mesmas que bloquearam totalmente seu crescimento micelial *in vitro* (Tabelas 1 e 2), indicando que provavelmente os poucos tubos germinativos formados tiveram seu vigor suficientemente interrompido para não permitir o desenvolvimento de colônias.

Segundo Beuchat⁵⁰, 300 mg.L⁻¹ de SO₂ e 400 mg.L⁻¹ de SP, inibiram totalmente a germinação de ascósporos de *B. nivea* em suco de uva armazenado por 60 dias. Tal autor também demonstrou que a concentração de 100 mg.L⁻¹ de SP, durante a ativação térmica nesse suco, apresentou inclusive um efeito estimulador da quebra de dormência

Tabela 1. Crescimento médio de *Byssoschlamys fulva* e *Talaromyces flavus* em meio BDA (pH 3,5) contendo diferentes concentrações de metabisulfito de sódio (MBS= 100, 150 e 200 mg.L-1), benzoato de sódio (BS= 250, 300, 350, 500, 550 e 600 mg.L-1) e sorbato de potássio (SP= 400, 700, 800, 900 e 1000 mg.L-1), durante 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro). Inoculo inicial = disco de micélio de cultura com $\theta \sim 5$ mm.

Diâmetro das Colônias de <i>Byssoschlamys fulva</i> (mm) sobre diferentes Concentrações de Conservantes ± Desvio Padrão												
Dias	Controle (0 mg.L-1)	MBS 100 mg.L-1	MBS 150 mg.L-1	MBS 200 mg.L-1	MBS 250 mg.L-1	MBS 300 mg.L-1	MBS 350 mg.L-1	MBS 400 mg.L-1	MBS 500 mg.L-1	MBS 550 mg.L-1	BS 600 mg.L-1	SP 800 mg.L-1
0	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a
2	10,8 ± 1,0 a	6,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	12,5 ± 0,6 a	6,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	10,7 ± 1,1 a	8,0 ± 1,0 b	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c
7	71,2 ± 3,1 a	59,9 ± 8,6 b	11,6 ± 2,2 f	5,0 ± 0 g	50,8 ± 2,5 c	15,3 ± 0,5 f	5,0 ± 0 g	39,3 ± 1,2 d	24,3 ± 2,9 e	5,0 ± 0 g	5,0 ± 0 g	5,0 ± 0 g
15	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a	24,5 ± 3,0 c	5,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a	50,5 ± 6,7 b	5,0 ± 0 d	5,0 ± 0 d	5,0 ± 0 d
22	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	31,3 ± 1,5 b	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c
30	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	39,1 ± 5,8 b	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c

Diâmetro das Colônias de <i>Talaromyces flavus</i> (mm) sobre diferentes Concentrações de Conservantes ± Desvio Padrão												
Dias	Controle (0 mg.L-1)	MBS 100 mg.L-1	MBS 150 mg.L-1	MBS 200 mg.L-1	MBS 250 mg.L-1	MBS 300 mg.L-1	MBS 350 mg.L-1	MBS 400 mg.L-1	MBS 500 mg.L-1	MBS 550 mg.L-1	BS 600 mg.L-1	SP 1000 mg.L-1
0	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a
2	12,5 ± 0,3 a	9,0 ± 3,2 a	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	9,7 ± 0,9 ab	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c
7	52,8 ± 9,1 a	34,3 ± 18,7 b	12,8 ± 0,6 c	5,0 ± 0 e	15,3 ± 0,5 d	6,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	30,8 ± 2,6 b	6,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e
15	80,5 ± 3,3 a	60,6 ± 8,1 b	33,0 ± 1,7 d	5,0 ± 0 f	32,5 ± 3,3 d	12,8 ± 0,6 e	5,0 ± 0 f	43,9 ± 1,8 c	31,3 ± 1,5 d	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f
22	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	47,8 ± 4,1 c	5,0 ± 0 f	58,0 ± 10,0 bc	15,3 ± 1,1 e	5,0 ± 0 f	66,8 ± 4,7 b	31,5 ± 0,7 d	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f
30	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	63,9 ± 11,6 b	5,0 ± 0 e	90,0 ± 0 a	18,0 ± 2,0 d	5,0 ± 0 e	90,0 ± 0 a	49,0 ± 2,3 c	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e

Obs: Médias seguidas pela mesma letra em linhas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Crescimento médio de *Neosartorya fischeri* em meio BDA (pH 3,5) contendo diferentes concentrações de metabisulfito de sódio (MBS= 80 e 100 mg.L⁻¹), benzoato de sódio (BS= 500, 550 e 600 mg.L⁻¹) e sorbato de potássio (SP= 700 e 800 mg.L⁻¹), durante 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro). Inóculo inicial = disco de micélio de cultura com 0~ 5mm.

Diâmetro das Colônias de <i>Neosartorya fischeri</i> (mm) sobre diferentes Concentrações de Conservantes ± Desvio Padrão								
Dias	Controle (0 mg.L ⁻¹)	MBS 80 mg.L ⁻¹	MBS 100 mg.L ⁻¹	BS 500 mg.L ⁻¹	BS 550 mg.L ⁻¹	BS 600 mg.L ⁻¹	SP 700 mg.L ⁻¹	SP 800 mg.L ⁻¹
0	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a
2	13,8 ± 0,4 a	6,0 ± 0 b	5,0 ± 0 b	6,5 ± 0,3 b	5,0 ± 0 b	5,0 ± 0 b	7,2 ± 0,2 b	5,0 ± 0 b
7	67,2 ± 4,6 a	50,8 ± 2,5 b	5,0 ± 0 d	12,8 ± 0,6 c	6,0 ± 0 d	5,0 ± 0 d	13,5 ± 0,7 c	5,0 ± 0 d
15	78,0 ± 5,8 a	63,9 ± 11,6 b	5,0 ± 0 e	33,0 ± 1,7 c	12,5 ± 1,0 d	5,0 ± 0 e	36,2 ± 2,9 c	5,0 ± 0 d
22	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 d	65,2 ± 6,6 b	24,3 ± 2,9 c	5,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 d
30	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 d	77,5 ± 6,3 b	31,3 ± 1,5 c	5,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 d

Obs: Médias seguidas pela mesma letra em linhas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

de ascósporos de *B. nivea*, e BS, mesmo em concentração tão alta quanto 1000 mg.mL⁻¹, não foi capaz de impedir a germinação dos mesmos. Outro estudo de Beuchat⁵² demonstrou o efeito de BS e SP (500 e 1000 mg.L⁻¹) na inativação de conídios de *A. flavus* e ascósporos de *B. nivea*, gerados a partir de culturas respectivamente com 20 dias (a 25°C e 80% de umidade relativa) e 35 dias (30°C e 60% de umidade relativa), sendo quantificado o número de colônias oriundas dos mesmos em meio contendo diferentes concentrações de sacarose (0-60%) e conservantes, e submetidas respectivamente a 52 e 80°C por até 80 min (antes da solidificação). Constatou-se que o aumento da sacarose, com redução da atividade de água, aumentou a tolerância ao calor, embora a presença de SP e BS, especialmente a 1000 mg.L⁻¹, tenha reduzido acentuadamente o tempo requerido para inativar a população em 90%. Não houve diferença estatística para o efeito dos dois conservantes sob iguais concentrações, mas na ausência de tratamento térmico, nem mesmo a maior concentração dos mesmos reduziu a formação de colônias por *A. flavus*, sugerindo o efeito sinérgico entre tratamento térmico e aditivos químicos.

Rajashekhara et al.⁵³, por outro lado, descreveram o uso de 1000 mg.L⁻¹ de BS e SP ou uma combinação de ambos (500 mg.L⁻¹ cada um) para reduzir o tempo necessário da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* em sucos de manga e uva, visto que sem o uso dos mesmos o tratamento (85°C por 120 min) é longo o suficiente para alterar as características organolépticas e composição das polpas. Em suco de manga, a taxa de morte térmica foi respectivamente reduzida para 44, 35 e 29 min sob tais tratamentos, enquanto para suco de uva esse parâmetro diminuiu respectivamente para 32, 13 e 14 min, isto é, o efeito combinado dos dois conservantes (500 mg.L⁻¹ de cada) foi considerado relevante para o processamento industrial desses sucos.

Portanto, ainda que concentrações de MBS e BS (200 e 600 mg.L⁻¹ respectivamente) menores do que aquelas citadas na literatura como inibidoras da germinação de *N. fischeri* e de outros fungos tenham sido detectadas, mais uma vez fica clara a relevância de se considerar a complexidade das propriedades físico-químicas dos alimentos a serem tratados com aquelas dos aditivos químicos e tratamentos a serem efetuados, de forma a racionalizar-se seu uso para cada caso.

Tabela 3. Percentual de germinação de esporos (média) de *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* em filme de BDA (pH 3,5) contendo diferentes concentrações de metabisulfito de sódio (MBS= 0, 100 e 200 mg.L⁻¹) e benzoato de sódio (BS= 0, 350 e 600 mg.L⁻¹), a partir de culturas com 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro) e 48 h sob as mesmas condições.

Conservantes (mg.L ⁻¹)	% Germinação (Média) de Esporos			
	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>Byssochlamys fulva</i>				
CONTROLE (0)	24,33 a	25,33 a	81,00 a	96,00 a
BS (350)	4,33 c	8,00 c	17,33 b	59,00 b
BS (600)	0,67 c	1,67 d	2,00 d	2,67 d
MBS (100)	13,67 b	15,00 b	77,67 a	85,33 a
MBS (200)	3,33 c	6,00 c	10,67 c	17,33 c
<i>Neosartorya fischeri</i>				
CONTROLE (0)	28,67 a	36,33 a	86,33 a	91,67 a
BS (350)	3,67 b	8,33 b	29,67 b	67,33 b
BS (600)	0,00 b	0,33 c	2,00 c	1,67 e
MBS (100)	2,00 b	4,33 c	8,67 c	27,33 c
MBS (200)	0,67 b	2,67 c	5,67 c	7,33 d
<i>Talaromyces flavus</i>				
CONTROLE (0)	34,33 a	45,33 a	88,33 a	98,00 a
BS (350)	1,33 c	2,33 c	2,67 c	5,33 b
BS (600)	0,00 c	0,00 c	0,33 c	0,67 b
MBS (100)	9,33 b	28,00 b	64,67 b	87,67 a
MBS (200)	0,33 c	1,67 c	3,33 c	5,67 b

Obs: Médias seguidas pela mesma letra em colunas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Com relação aos fungos termorresistentes, conservantes e condições de incubação estudados neste trabalho, o metabisulfito de sódio apresentou a melhor eficácia em termos de concentração quanto ao binômio inibição de crescimento micelial (100%) até 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro) e germinação de esporos (81,8-94,2 %) após 48 h de inoculação.

Foi efetivo (200 mg.L⁻¹) em teores três vezes menores do que aqueles de benzoato de sódio (600 mg.L⁻¹) capazes de atingir percentuais de inibição

de germinação com relação ao controle de cerca de 97,21-99,32%. Além disso, o benzoato de sódio é mais tóxico à saúde humana do que o metabisulfito. Analisando-se as concentrações desses conservantes utilizadas pelas indústrias de alimentos, e citadas na literatura específica, observa-se que ocorre um efeito sinérgico destas com as propriedades físico-químicas do alimento contaminado, com o tratamento térmico aplicado e com o propágulo presente, de forma que se testes, como os que foram o alvo deste trabalho, forem empregados para cada tipo de substrato, as mesmas podem ser reduzidas.

REFERÊNCIAS

1. Leitão MFF. Microbiologia das frutas tropicais e seus produtos. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, SP) Ed. Frutas tropicais: aspectos tecnológicos. Campinas: ITAL; 1978. p. 83-144.
2. Schmidt FL. Deterioração de sucos de frutas em embalagens assépticas. Um “novo” microrganismo desponta: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Bol Inf Fruthotec*. 1995; 2(4): 2.
3. Cunha VAB. Estudo experimental e modelagem do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes em sucos tropicais [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 98 p..
4. Aragão GMF. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango [dissertação de mestrado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1989. 139p..
5. King JDA, Halbrook WU. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. *J Food Sci*. 1987; 52:1252-4.
6. Scott VN, Bernard DT. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from commercial fruit juices. *J Food Protect*. 1987; 50(1):18-20.
7. Spotti E, Casolari A. Indagine sul contenuto di catalasi di muffe gasogene e altri microrganismi. *Ind Conserve*. 1987; 62: 22-4.
8. Dragoni I, Comi G. Presenza di muffe e lieviti in succhi di frutta prodotti industrialmente. *Ind Bevande*. 1985; 14:599-06.
9. Baglioni F, Gumerato HF, Massaguer PR. Occurrence of heat resistant molds in tomato pulp packed aseptically. *Ciênc Tec Alim* 1999; 19(2): 258-63.
10. Hoffmann MVGS. Estudo de resistência térmica de *Byssoschlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 102 p.
11. Olliver M, Smith G. *Byssoschlamys* sp nov. *J Bot Br Foreign*. 1933; 71: 169-97.
12. Olliver M, Rendle TA new problem in fruit preservation: studies on *B. fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. *J Soc Chem Ind*. 1934; 53: 166T.
13. Eiroa MNU, Amstalden VC. Ocorrência de espécies de *Byssoschlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas. *Colet ITAL*. 1985; 15:61-0.
14. Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Oldham JH. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit Rev in Food Sci & Nutr*. 1991; 30(4): 403-39.
15. Frank HK. Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. *J Food Sci*. 1968; 33: 89-00.
16. Pinto AFMA. Doenças de origem microbiana transmitidas por alimentos. [acesso em 18 de novembro de 2004.] Disponível em: http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm.
17. Kubena LE, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE, Huff WE. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Sci*. 1990; 69: 727-35.
18. Araújo JMA. Química de alimentos: teoria e prática. 19. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995.
19. Brasil Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007. Aprova os Regulamentos Técnicos sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 3 de Alimentos: Gelados comestíveis”, sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 13 de Alimentos: Molhos e Condimentos”, e sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16.2: Bebidas Não Alcoólicas, Subcategoria 16.2.2: Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e Não Gaseificadas”, que consta como Anexo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
20. Brasil. Ministério da Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 217, de 29 de julho de 2005. Aprova a Extensão de Uso do Aditivo Dióxido de Enxofre e seus Sais de Cálcio, Sódio e Potássio na Função Conservador em Polpas e Purês de Vegetais de acordo com o Anexo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1º ago. 2005.
21. Srour R. Benzoic acid and derivatives. In: Srour R, ed. *Aromatic intermediates and derivatives*. Paris; 1998. p. A.IV.1–A.IV.17.
22. Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª Ed. São Paulo: Editora Artmed; 2005.
23. Piper PW. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(11-12):1219-27.
24. Nascimento RF, Prata LF, Aquino FWB, Amorim AGN. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciênc Tec Alim*. 2004; 24(1): 32-8.
25. World Health Organization – WHO. Benzoic acid and sodium benzoate. *Conc Int Chem Assess Geneva*. 2000.(Doc 26).
26. Food Standards Agency (FSA). Agency revises advice on certain artificial colours. FSA 11 Sept 2007. [acesso em 24 de Janeiro de 2009]. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2007/sep/foodcolours>.
27. Taylor SL, Bush RK. Sulfitos as food ingredients. *Food Tech*. 1986; 40 (6): 47-2.
28. Taylor SL, Bush RK. Sulfitos as food ingredients. *Food Tech*. 1987; 39 (11): 532-6.
29. Teles Fº PA. Asma Brônquica – tipos: asma por sulfitos. [acesso em 24 de janeiro de 2009]. Disponível em: http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html.
30. Taylor SL. Why sulfite alternatives? *Food Technol*. 1993; 47 (10): 14.
31. National Institute of Health (NIH). Adverse Reactions to Foods. American Academy of Allergy and Immunology Committee on Adverse Reactions to Foods and National Institute of Allergy and Infectious Diseases. U.S. Department of Health and Human Services- Public Health Service. Washington, DC, USA: U.S. Government Printing Office, 1984. Publication n. 84-2442.
32. Peroni DG, Boner AL. Sulfite sensitivity. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25 (8): 680-1
33. Perrin-Ansart MC. Sur les sulfites employés comme conservateurs. *Cah Nutr Diet*. 1989; 24 (4): 291-7.
34. Papazian R. Sulfitos, safe for most, dangerous for some. *FDA Consumer Magaz*. 1996; 30(10): 35.
35. Tfouni SAV, Toledo MCF. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*. 2002; 13:117–23.
36. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos 2ª ed. São Paulo: Varela; 2001.

37. Leitão MFF. Conservadores de alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. *Colet ITAL*. 1990; 20 (9):116-27.
38. Sano A, Kurita N, Coelho KIR, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*. 1993;124 (3):157-61.
39. Eicher R, Ludwig H. Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. *Comp Bioch Physiol*. 2002; 131: 595-04.
40. Splittstoesser DF, Nielsen PV, Churey JJ. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. *J Food Prot*. 1993; 56: 599-03.
41. Splittstoesser DF, Splittstoesser CM. Ascospores of *Byssochlamys* compared with those of heat resistant *Aspergillus*. *J Food Sci*. 1977; 42(3): 685-8.
42. Salomão BCM. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 54pp.
43. Slongo AP. Estudo da influência de diferentes fatores na termorresistência do fungo *Neosartorya fischeri* em sucos tropicais. [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 141pp.
44. Slongo AP, Aragão GMF. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. *Braz J Microbiol*. 2006; 37 (3): 312-6.
45. Marcolino VA. Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva [dissertação de mestrado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 70p.
46. Baglioni F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. [dissertação de mestrado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 65p.
47. Delgado DA. Ação esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado para embalagens assépticas. [tese de doutorado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 75p.
48. Nielsen PV. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat-resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. *J Food Sci*. online 2006; 56 (6): 1735-40.
49. Nielsen PV, Beuchat LR, Frisvad JC. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. *J Appl Bacteriol*. 1989; 66(3): 197-07.
50. Beuchat LR. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssochlamys nivea* ascospores. *Mycopathologia*. 1976; 59(3):175-8.
51. Roland JO, Beuchat LR. Biomass and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂ and temperature. *J Food Sci*. 1984; 49(2): 402-6.
52. Beuchat LR. Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds. *Appl Environ Microbiol*. 1981; 41 (2): 472.
53. Rajashekhara E, Suresh ER, Ethira J. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. *Food Microb*. 2000; 17:269-75.