

Efeito de diferentes concentrações de conservantes sobre o crescimento *in vitro* de bactérias veiculadas por alimentos

Effect of different preservatives concentrations on the *in vitro* growth of bacteria carried by food

RIALA6/1189

Ana Maria Queijeiro LÓPEZ^{1*}, Sheyla Ferreira LIMA-COELHO¹, Giselda Macena LIRA²

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

¹Laboratório Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), UFAL.

²Faculdade de Nutrição (FANUT), UFAL.

Recebido: 07.11.2008 – Aceito para publicação: 10.04.2009

RESUMO

Alguns micro-organismos causadores de infecções e veiculados por alimentos industrializados são removidos dos mesmos por tratamento térmico ou acidificação, enquanto outros são de difícil eliminação e requerem o uso de conservantes. Assim, acidificou-se meio de cultura TSA (Trypticase-Soja-Agar) com ácido cítrico (pH 3,5 e 5) e acrescentou-se ao mesmo quantidades específicas de metabissulfito de sódio (MBS), benzoato de sódio (BS) e sorbato de potássio (SP). Após inoculação com suspensões aquosas (100 µL = 10⁴ células) de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*, e incubação por 24-72 h, mensurou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos cultivos, visando obter a concentração mínima de cada conservante capaz de inibir (CIM) os isolados estudados *in vitro* e fornecer subsídios para sua utilização industrial em quantidades apropriadas. *B. cereus* foi o isolado mais suscetível a MBS, BS e SP (respectivamente 75, 275 e 750 mg.L⁻¹), seguido por *E. coli* (respectivamente 75, 350 e 1000 mg.L⁻¹). Os isolados de *Salmonella* foram os mais resistentes, sendo seu crescimento completamente inibido por 1000 mg BS.L⁻¹, mas apenas reduzido por 1250 mg SP.L⁻¹. MBS inibiu totalmente *S. Typhimurium* a 75 mg.L⁻¹ e *S. Enteritidis* a 200 mg.L⁻¹.

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

ABSTRACT

Some microorganisms that cause infections are served by processed foods, being removed from them by heat treatment or acidification, while others are difficult to remove and require the use of preservatives. Thus, in the culture medium TSA (trypticase-soya-agar, acidified with citric acid (pH 3.5 and 5.0)), it was added specific quantities of sodium metabisulphite (MBS), sodium benzoate (SB) and potassium sorbate (PS). After inoculation with aqueous suspensions (100 µL = 10⁴ cells) from *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*, and incubation for 24-72 h, the number of colony-forming units (CFU) in the cultures was measured to obtain the minimum concentration of each preservative capable of inhibiting (MIC) *in vitro* the studied isolates, and provide subsidies for their industrial use in appropriate quantities. *B. cereus* was the isolate more susceptible to MBS, BS and PS (respectively 75, 275 and 750 mg.L⁻¹), followed by *E. coli* (respectively 75, 350 and 1000 mg.L⁻¹). Isolates of *Salmonella* were the most resistant, and their growth were completely inhibited by 1000 mg BS.L⁻¹, but only reduced by 1250 mg PS.L⁻¹. MBS completely inhibited *S. Typhimurium* to 75 mg.L⁻¹ and *S. Enteritidis* to 200 mg.L⁻¹.

Key words. sodium benzoate, potassium sorbate, sodium metabisulphite, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*.

INTRODUÇÃO

O preparo ou armazenamento inadequado de alimentos pode levar consumidores a apresentarem desde pequenos desconfortos intestinais até doenças graves, devido a contaminação por micro-organismos patogênicos. Para a indústria, o problema é agravado, já que muitas vezes isso resulta em grandes perdas financeiras¹, por comprometer seriamente a imagem do produto, e possíveis exportações^{1,2}.

As bactérias patogênicas causam distúrbios não só pela sua capacidade invasiva, mas também pela produção de toxinas^{3,4}. Algumas delas são facilmente removidas por tratamento térmico, outras são termorresistentes, como cianobactérias, tiobacilos, bacilos e clostrídios, que apresentam temperatura de crescimento em torno de 45°C, podendo a máxima ultrapassar os 70°C, sendo de difícil eliminação³.

Não se pode ter certeza que alimentos ácidos estejam livres de bactérias patogênicas, uma vez que algumas linhagens podem sobreviver em pH 2,5 por 2 h ou mais^{5,6}. Na última década, várias surtos causados por *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Cryptosporidium* e vírus Norwalk foram associados ao consumo de suco de fruta não pasteurizado^{6,7,8,9}. Mas sucos pasteurizados também são alvo de bactérias ácidotermófilas, como *Alicyclobacillus acitoterrestis*¹⁰.

Em estudos realizados por Iha et al.⁹ no Estado de São Paulo, verificou-se a presença de coliformes a 45°C em suco de laranja pasteurizado. Sugai et al.¹¹ também constataram que, em decorrência do tempo de armazenamento, o número de células de bactérias mesofílicas e de fungos filamentosos ou leveduriformes aumentou em amostras de suco de laranja. Já no caso de leite tratado por temperatura extremamente elevada (UHT – ultra-high temperature), também foi demonstrada a contaminação por diferentes bactérias, inclusive *Bacillus cereus*¹².

Assim, em alguns alimentos, como sucos, geleias, bolos, queijos, carnes, o uso de conservantes tem sido uma boa solução para inviabilizar a multiplicação bacteriana, seja agindo diretamente sobre elas ou potencializando o efeito de algum antibiótico. A enterocina EJ97 produzida por *Enterococcus faecalis* EJ97, por exemplo, tem efeito bactericida contra cepas INRA P53-2 de *B. macroides*/*B. maroccanus* isoladas de purê vegetal deteriorado. Essa atividade é menor em pH 5,0 e muito baixa em pH 9,0, mas potencializada por nitrito de sódio, benzoato de

sódio (BS), lactato de sódio e tri-polifosfato de sódio¹³. Alguns desses aditivos, contudo, são mais eficientes contra fungos, sendo pouco indicados para o controle bacteriano. Dentre as bactérias sensíveis estão os coliformes, as salmonelas, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*³.

Banks e Board⁴ e Wibowo et al.⁵ relataram que baixas concentrações de dióxido de enxofre (SO₂), variando de 100 a 200 mg.L⁻¹, têm efeito bacteriostático contra *Acetobacter* spp. e bactérias produtoras de ácido láctico em pH ácido, enquanto concentrações maiores desse produto têm efeito bactericida. O crescimento de salmonelas e outras enterobactérias foi inibido em molho inglês⁴ quando utilizou-se 600 mg.L⁻¹ de SO₂, e o de bactérias lácticas foi inibido por concentrações de 1-10 mg.L⁻¹ desse mesmo produto em derivados de frutas⁵ com pH ≤ 3,5.

Salienta-se que quando usados em quantidades excessivas, os conservantes podem ocasionar riscos à saúde humana, variando desde pequenas intolerâncias até casos de urticária, asma, renites, ou mesmo de choque anafiláticos^{14, 15, 16, 17, 18, 19}.

A fim de fornecer subsídios para minimizar o uso de quantidades inadequadas de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, a ingestão imprópria dos mesmos pela população, determinou-se neste estudo a concentração mínima de metabisulfito de sódio (MBS), benzoato de sódio (BS) e sorbato de potássio (SP) necessária para inibir (CIM) *in vitro* o crescimento de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*.

MATERIAL E MÉTODOS

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

■ Micro-organismos

As cepas de *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* foram isoladas de alimentos e gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Maria Cristina Delgado da Silva, do Lab. de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Nutrição /UFAL. Esse material foi reinoculado em meio Agar Nutriente (AN) Oxoid®, previamente esterilizado, solidificado e inclinado em tubos, e após 48 h de incubação

a 30 ± 2 °C no abrigo de luz, o mesmo foi armazenado a 6 ± 2 °C para posterior utilização.

À medida que os experimentos foram realizados, as culturas mantidas sob refrigeração foram ativadas. Para isso, foram primeiramente repicadas no mesmo tipo de meio contido em placas de Petri esterilizadas, e incubadas por 24 h a 30 ± 2 °C no escuro.

■ Meio com conservante

Em frascos *Erlenmeyer* (500 mL), depositou-se a quantidade do meio TSA (Trypticase-Soja-Agar) indicada pelo fabricante (Oxoid®) para o preparo de 250 mL de meio, e acrescentou-se apenas 240 mL de água destilada estéril fervente, submetendo-se o material a aquecimento sob agitação para a completa homogeneização.

Em seguida, tais meios foram autoclavados (120°C , 1 atm, 20 min) e, após resfriamento até $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$, mensurou-se o pH dos mesmos, ajustando-se este com ácido cítrico, para 3,5 e 5,0. Adicionou-se aos meios, então, em condições assépticas, 10 mL de solução aquosa de conservante, filtrada através de seringa acoplada a membrana Sartorius ($\theta = 47$ mm; $0,22 \mu\text{m}$), e completou-se assim o volume de cada um para 250 mL. Tal solução foi preparada dissolvendo-se o conservante em água destilada.

Os conservantes e respectivas concentrações finais nos meios com dois diferentes pHs foram os seguintes: **a) MBS:** 0, 10, 50, 75, 100, 200 e 300 mg.L^{-1} ; **b) BS:** 0, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 750 e 1000 mg.L^{-1} ; **c) SP:** 0, 250, 500, 750, 1000 e 1250 mg.L^{-1} . Após homogeneização do conservante no meio, o mesmo foi vertido em placas de Petri esterilizadas e aguardou-se sua solidificação para posterior inoculação (item anterior), e avaliação do efeito antimicrobiano conforme método descrito por Tosi et al.²⁰ As concentrações máximas testadas referem-se àquelas utilizadas na indústria e preconizadas na legislação.

Os experimentos seguiram delineamentos totalmente casualizados, com três réplicas por tratamento (micro-organismo X pH X cada concentração de conservante), totalizando 168 placas para cada ensaio do MBS, 216 placas para o ensaio do BS e 144 placas para o ensaio com SP, sendo cada um desses testes repetido em três ocasiões. Os dados foram submetidos à Análise de Variância através do teste F, e as médias dos tratamentos independentes comparadas através do teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). O programa utilizado para o

processamento e análise estatística foi o SAS (*Statistical Analysis System*), versão 9.1.²¹

■ Inoculação e ensaios no meio com conservante

Culturas ativadas dos isolados em meio TSA (24 h) foram lavadas com 10 mL de água estéril, e cada suspensão de células foi recuperada individualmente em tubo estéril. Uma alíquota de 1 mL de cada suspensão bacteriana foi adicionada a 9 mL de água estéril e novas diluições foram efetuadas (10^{-2} ou 10^{-3}), procedendo-se a contagem das células com auxílio de Câmara de Neubauer. A partir dessas contagens, efetuou-se uma diluição final de cada suspensão dos micro-organismos para 10^5 células. mL^{-1} , coletando-se das mesmas 100 μL (10^4 células) para inoculação nas placas contendo TSA (pH 3,5 e 5,0) com conservante. Esse inóculo foi homogeneizado sobre a superfície do meio com auxílio de uma alça de Drigalski, e as culturas foram incubadas a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24, 48 e 72 h, no abrigo da luz. O controle de cada ensaio correspondeu ao meio TSA (pH 3,5 e 5,0) sem conservante (concentração 0 mg.L^{-1}), também inoculado.

A cada intervalo de tempo, efetuou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) das culturas. Quando esse número ultrapassou 270 colônias, foi descrito como abundante (Ab).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há vários relatos de sobrevivência de bactérias em pH ácido, principalmente para *E. coli*⁷ e *Salmonella* sp. em suco de maçã (pH 3,0 - 4,0)⁶, porém, este último não tem sido bem descrito em meio de cultura. No presente estudo, entretanto, não foi observado desenvolvimento de qualquer dos isolados em meio com pH 3,5, contendo este ou não conservante, mesmo após 30 dias de incubação.

Com relação aos meios onde o pH foi corrigido para 5,0, os resultados constam nas Tabelas 1-4.

No caso de *E. coli* (Tabela 1), *B. cereus* (Tabela 2) e *S. Typhimurium* (Tabela 3), verificou-se que o MBS foi o conservante que apresentou a menor CIM (75 mg.L^{-1}), mesmo após 72 h de incubação. *S. Enteritidis* (Tabela 4), entretanto, foi mais tolerante a tal produto, requerendo pelo menos 200 mg.L^{-1} do mesmo para ser totalmente inibida.

Brenan et al.²² demonstraram que a CIM de MBS frente a uma cepa Gram negativa de *Pseudomonadaceae* presente em cogumelos fatiados para conserva foi de 2000 mg.L^{-1} *in vitro*, isto é, quase 27 vezes maior do que a requerida para inibir o isolado de *E. coli* aqui estudado.

Banks e Board⁴, em estudos envolvendo a preservação de salsichas, demonstraram que as bactérias mais sensíveis a MBS foram oito sorovares de *Salmonella*, inibidos em concentrações de 15-109 mg.L⁻¹, seguidos por *E. coli*, inibida por concentrações de 50-195 mg.L⁻¹, *Citrobacter freundii* (65-136 mg.L⁻¹), *Yersinia enterocolitica* (67-98 mg.L⁻¹), *Enterobacter agglomerans* (83-142 mg.L⁻¹), *Serratia marcescens* (190-241 mg.L⁻¹) e *Hafnia alvei* (200-241 mg.L⁻¹). Em estudos de Frank e Patel²³, constatou-se que concentrações de 512 e 1024 mg.L⁻¹ de MBS exibem atividade bactericida respectivamente contra isolados planctônicos das bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*/ *S. lugdunensis* e *S. epidermidis*. A concentração de 720

mg.L⁻¹ desse conservante inibiu o crescimento celular dessas três espécies em biofilme em formação, porém, biofilmes já estabelecidos de *S. aureus*/ *S. lugdunensis*, tratados com MBS por 24 h, sofreram apenas uma redução de 1,5 log₁₀ na contagem de células viáveis. A partir desses resultados com espécies de *Staphylococcus in vitro*, os autores sugeriram o uso de MBS como uma estratégia para inibir a colonização estafilocócica de cateteres, prevenindo as infecções relacionadas ao uso desses. As ações mais prováveis para inibição por sulfitos incluem o rompimento da membrana plasmática, a inativação da replicação do ácido desoxiribonucléico e da síntese ou ação de proteínas/enzimas citoplasmáticas ou ligadas à

Tabela 1. Contagem de *Escherichia coli* (Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L ⁻¹)	Número de UFC.mL ⁻¹ Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	170,55 ± 46,40 ^b	2593,33 ± 102,50 ^b	Ab**a
MBS- 50	70,00 ± 30,80 ^{cd}	275,66 ± 85,90 ^c	342,20 ± 79,80 ^c
MBS- 75	0 ^f	0 ^f	0 ^e
MBS- 100	0 ^f	0 ^f	0 ^e
MBS- 200	0 ^f	0 ^f	0 ^e
MBS- 300	0 ^f	0 ^f	0 ^e
BS- 250	190,00 ± 48,90 ^b	Ab**a	Ab**a
BS- 275	53,33 ± 28,70 ^d	718,90 ± 108,20 ^d	1056,70 ± 89,30 ^b
BS- 300	7,80 ± 6,66 ^e	84,40 ± 28,30 ^e	107,80 ± 74,10 ^d
BS- 350	0 ^f	0 ^f	0 ^e
BS- 400	0 ^f	0 ^f	0 ^e
BS- 500	0 ^f	0 ^f	0 ^e
BS- 750	0 ^f	0 ^f	0 ^e
BS- 1000	0 ^f	0 ^f	0 ^e
SP- 250	201,11 ± 56,66 ^b	Ab**a	Ab**a
SP- 500	153,33 ± 39,70 ^{bc}	Ab**a	Ab**a
SP- 750	91,11 ± 26,20 ^c	802,20 ± 60,80 ^c	1094,40 ± 102,00 ^b
SP- 1000	0 ^f	0 ^f	0 ^e
SP- 1250	0 ^f	0 ^f	0 ^e

* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; ** Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade (p ≤ 0,05), pelo teste de Tukey.

membrana, ou, ainda, a reação com componentes individuais do metabolismo dos micro-organismos.

Por outro lado, a menor concentração de BS eficaz contra a bactéria Gram negativa *E. coli* (Tabela 1) foi de 350 mg.L⁻¹, enquanto que o isolado Gram positivo de *B. cereus* (Tabela 2) foi inibido por concentrações de BS superiores a 250 mg L⁻¹. No caso do SP, foi necessária uma concentração mínima de 1000 mg.L⁻¹ do mesmo para inibição do crescimento da cepa de *E. coli* (Tabela 1), enquanto que nem mesmo uma concentração de 1250 mg.L⁻¹ desse produto foi suficiente para inibição do crescimento dos isolados de *Salmonella* (Tabelas 3 e 4). O crescimento *in vitro* de *B. cereus* (Tabela 2),

entretanto, foi inibido por concentração de SP superior a 500 mg.L⁻¹.

Ostergaard²⁴ verificou que as bactérias Gram negativas *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema socranskii*, isoladas de placas dentais, só foram inibidas *in vitro* por BS quando se utilizou cerca de 3000 mg. L⁻¹ do mesmo. O mesmo autor verificou que nenhuma bactéria Gram positiva dessas placas foi inibida por BS (CIM > 15000 mg.L⁻¹).

Karabay e Sahin²⁵ verificaram que 36 isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e 29 isolados de *S. aureus* sensíveis a esse antibiótico (MSSA), todos clinicamente relevantes, foram inibidos *in vitro* por

Tabela 2. Contagem de *Bacillus cereus* (Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L ⁻¹)	Número de UFC.mL ⁻¹ Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	128,90 ± 27,10 ^b	Ab**a	Ab**a
MBS- 50	37,70 ± 8,30 ^c	2474,40 ± 103,80 ^b	515,50 ± 70,60 ^b
MBS- 75	0 ^e	0 ^e	0 ^e
MBS- 100	0 ^e	0 ^e	0 ^e
MBS- 200	0 ^e	0 ^e	0 ^e
MBS- 300	0 ^e	0 ^e	0 ^e
BS- 250	0 ^e	21,10 ± 7,80 ^d	44,44 ± 15,80 ^c
BS- 275	0 ^e	0 ^e	0 ^e
BS- 300	0 ^e	0 ^e	0 ^e
BS- 350	0 ^e	0 ^e	0 ^e
BS- 400	0 ^e	0 ^e	0 ^e
BS- 500	0 ^e	0 ^e	0 ^e
BS- 750	0 ^e	0 ^e	0 ^e
BS- 1000	0 ^e	0 ^e	0 ^e
SP- 250	20,00 ± 7,10 ^d	73,33 ± 31,66 ^c	73,33 ± 33,20 ^c
SP- 500	0 ^e	7,80 ± 6,66 ^d	10,00 ± 8,70 ^d
SP- 750	0 ^e	0 ^e	0 ^e
SP- 1000	0 ^e	0 ^e	0 ^e
SP- 1250	0 ^e	0 ^e	0 ^e

* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; ** Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade (p ≤ 0,05), pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Contagem de *Salmonella Typhimurium* (Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L ⁻¹)	Número de UFC.mL ⁻¹ Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	70,00 ± 30,80 ^d	Ab**a	Ab**a
MBS- 50	35,60 ± 20,10 ^e	343,33 ± 62,66 ^d	1456,70 ± 97,50 ^d
MBS- 75	0 ^f	0 ^f	0 ^g
MBS- 100	0 ^f	0 ^f	0 ^g
MBS- 200	0 ^f	0 ^f	0 ^g
MBS- 300	0 ^f	0 ^f	0 ^g
BS- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 275	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 300	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 350	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 400	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 500	342,20 ± 35,70 ^b	2273,30 ± 106,20 ^b	Ab**a
BS- 750	47,80 ± 19,20 ^{de}	106,70 ± 42,70 ^e	1898,90 ± 99,20 ^c
BS- 1000	0 ^f	0 ^f	0 ^g
SP- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 500	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 750	182,20 ± 37,30 ^c	1767,80 ± 82,90 ^c	2326,60 ± 142,90 ^b
SP- 1000	57,80 ± 27,80 ^{de}	473,30 ± 65,70 ^d	817,80 ± 61,20 ^e
SP- 1250	0 ^f	74,40 ± 15,80 ^e	95,60 ± 31,70 ^f

* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; ** Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade (p ≤ 0,05), pelo teste de Tukey.

BS a uma concentração mínima de 32 mg.L⁻¹. Karabay et al.²⁶ também verificaram o efeito do BS contra *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, constatando que 90% das células foram inibidas *in vitro* por concentrações respectivamente de 64 mg.L⁻¹ e 32 mg.L⁻¹, enquanto a morte de 90% dessas populações exigiu o dobro dessas concentrações de BS.

Por outro lado, já foi demonstrado que outras espécies de bactérias Gram positivas, inclusive *Bacillus*, são capazes de degradar o BS^{24, 27, 28}, assim como algumas bactérias lácticas em fermentação de azeitona preta apresentam inclusive crescimento estimulado na presença de concentrações de pelo menos 500 mg.L⁻¹ de SP²⁹.

Crawford²⁷, analisando bactérias esporuladas em amostras de solo, verificou que das 12 cepas de *Bacillus* examinadas, 9 eram *B. brevis*, duas eram *B. sphaericus* e uma correspondia a *B. megaterium*, sendo que todas degradavam *m*-hidroxibenzoato através da mesma via (Figura 1). Essa degradação começa com a hidroxilação da molécula a 2,5-di-hidroxibenzoato (gentisato), o qual é oxidado pela gentisato 1,2-dioxigenase, gerando maleil-piruvato. Este é hidrolizado sem prévia isomerização *cis, cis* a *cis, trans*, rendendo piruvato e ácido maléico. Da mesma forma, a cepa termofílica de *B. stearothermophilus* PK1 utiliza benzoato, 3-hidroxibenzoato e gentisato como única fonte de

Tabela 4. Contagem de *Salmonella Enteritidis* (Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹) após 24, 48 e 72 h de incubação (30 ± 2 °C, escuro) em meio TSA (pH 5,0) acrescido de diferentes concentrações de conservantes

CONSERVANTES * (mg.L ⁻¹)	Número de UFC.mL ⁻¹ Tempo		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	Ab**a	Ab**a	Ab**a
MBS- 10	273,33 ± 31,66 ^b	Ab**a	Ab**a
MBS- 50	187,80 ± 38,00 ^c	Ab**a	Ab**a
MBS- 75	108,90 ± 29,30 ^e	Ab**a	Ab**a
MBS- 100	23,30 ± 11,70 ^{fg}	848,90 ± 53,00 ^c	1268,90 ± 80,10 ^b
MBS- 200	0 ^h	0 ^g	0 ^f
MBS- 300	0 ^h	0 ^g	0 ^f
BS- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 275	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 300	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 350	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 400	Ab**a	Ab**a	Ab**a
BS- 500	211,10 ± 49,10 ^{bc}	2573,30 ± 88,80 ^b	Ab**a
BS- 750	0 ^e	73,30 ± 13,30 ^e	241,10 ± 49,10 ^d
BS- 1000	0 ^h	0 ^g	0 ^f
SP- 250	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 500	Ab**a	Ab**a	Ab**a
SP- 750	168,90 ± 28,90 ^d	2654,40 ± 95,40 ^b	Ab**a
SP- 1000	30,00 ± 13,30 ^f	571,10 ± 69,00 ^d	1057,80 ± 71,60 ^c
SP- 1250	12,20 ± 9,70 ^g	21,10 ± 7,80 ^f	24,40 ± 11,30 ^e

* MBS= Metabissulfito de sódio; BS= Benzoato de sódio; SP= Sorbato de potássio; ** Ab= n° de colônias em 1mL ≥ 2700 (abundante). Valores seguidos de letras distintas dentro de uma mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

carbono e energia, embora não seja capaz de degradar 2- e 4-hidroxibenzoato, 2,3- e 3,4-di-hidroxibenzoato e catecol. A degradação do benzoato ocorre via benzoil-coenzima A (benzoil-CoA) e gentisato, sendo que a enzima induzível benzoil-CoA ligase converte benzoato (mas não o 3-hidroxibenzoato) ao tioéster (coenzima-A). A gentisato 1,2-dioxigenase desse micro-organismo é extremamente dependente da adição de Fe²⁺, sendo inibida na ausência deste ou na presença de agentes quelantes de metais, justificando a importância do Fe²⁺ para a catálise em questão²⁸.

O benzoato, portanto, é utilizado para inibir a oxidação do piruvato em nível do acetato (Acetil-

Coa), fazendo com que *Bacillus* sp. se utilize da via fermentativa produzindo ácido láctico, diminuindo sua eficiência energética e velocidade de reprodução. No presente estudo, o crescimento de *B. cereus* diminuiu de acordo com o aumento da concentração de benzoato até ser totalmente inibido.

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 vigente^{31,32,33,34} sem realizar ensaios que minimizem a concentração de aditivos inseridos em seus produtos. Conforme essa legislação,

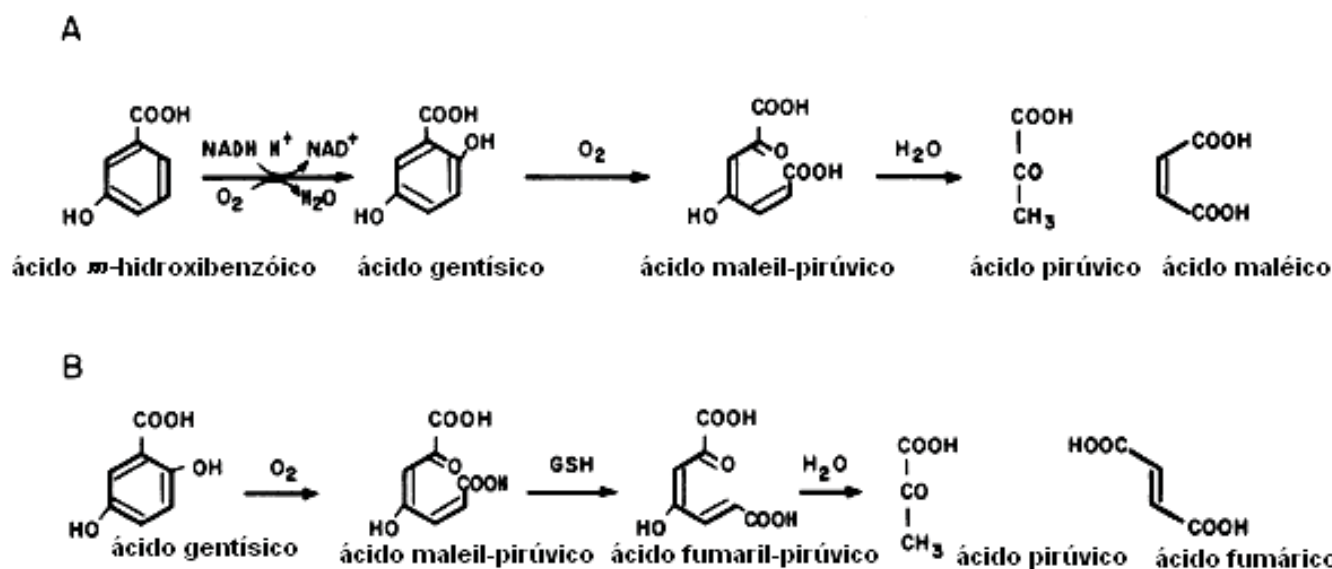


Figura 1. Degradação de gentisato (2,5-di-hidroxibenzoato). A) via de degradação do *m*-hidroxibenzoato por espécies de *Bacillus*, de acordo com Crawford²⁷. B) via de degradação do gentisato, conforme descrito originalmente por Lack³⁰

os valores máximos de MBS variam até 600 mg.L⁻¹, dependendo do alimento em que deve ser adicionado. Já o SP tem seu limite máximo fixado em 2000 mg.L⁻¹, enquanto o BS chega a atingir 3000 mg.L⁻¹, como no caso de leite de coco pasteurizado. Wind e Restaino³² mostraram que o SP em concentrações de 3000 mg.L⁻¹ permitiu o crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* em maioneses. Concentrações mais elevadas de conservantes não podem ser aplicadas, devido a limitações legais e alterações do sabor do produto. Tais estudos indicam que a utilização de ingredientes de elevada qualidade em termos microbiológicos e o fabrico consoante às normas de boas práticas de higiene são critérios fundamentais para evitar a proliferação de leveduras de contaminação.

É importante atentar para esse fato, visando reduzir 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 pela indústria de alimentos. Para tanto, seria ideal o estabelecimento de procedimentos de rotina para testar, em seus laboratórios de controle de qualidade, concentrações menores do que as máximas estabelecidas pela legislação, contra micro-organismos indicadores (coliformes e outros mais específicos para cada alimento).

CONCLUSÃO

Verificou-se que, para os micro-organismos 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*, e em menores concentrações do que o comumente utilizado pelas indústrias. Dentre os micro-organismos testados, o isolado de *Bacillus cereus* foi o mais suscetível aos conservantes estudados, apresentando menores taxas de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

1. Jay JM. Microbiologia dos Alimentos. 6ª ed. Porto Alegre; Artmed; 2005.
2. Góes LMNB, Mendes PP, Mendes ES, Ribeiro CMF, Silva RPP. Uso do metabissulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Acta Sci Biol Sci.* 2006; 28(2): 153-7.
3. Franco DBGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos, 2ª ed. São Paulo; Atheneu; 2005.
4. Banks JG, Board RG. Comparison of methods for examination of free and bound sulphur dioxide in stored British fresh sausage. *J Sci Food & Agric.* 1982; 33: 197-203.
5. Wibowo D, Eschenbruch R, Davis CR, Fleet GH, Lee TH. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine - A review. *Am J Enol Vitic.* 1985; 36: 302.

6. De Jonge R, Takumi K, Ritmeester WS, Leusden FM. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH. *J Appl Microbiol*. 2003; 94: 555–60.
7. Ghenghesh KS, Belhaj K, El-Amin WB, El-Nefathi SE, Zalmum A. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli–Libya. *Food Contr*. 2005; 16: 855–8.
8. Gawande PV, Bhagwat AA. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of *Salmonella* spp. *J Appl Microbiol*. 2002; 93: 689–96.
9. Iha MH, Fávoro RMD, Okada MM, Prado SPT, Martins AMB, Oliveira MA, Febronio LHP, Garrido NS. Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2000; 9: 39-44.
10. Wawase KYF, Coelho GLV, Luchese RH. Uso de conservadores ácido benzóico e benzoato de sódio no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja. *Rev Ciênc Vida*. 2008; 28(2): 53-62.
11. Sugai AY, Shigeoka DS, Badolato GG, Tadini CC. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002; 22(3): 233-8.
12. Vidal-Martins AMC, Rossi-Jr OD, Rezende-Lago NC. Microorganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005; 57(3): 396-400.
13. García MT, Lucas R, Abriouel H, Omar NB, Pérez R, Grande MJ, Martínez-Cañhamero M, Gálvez A. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against “*Bacillus macroides*/*Bacillus maroccanus*” isolated from zucchini purée. *J Appl Microbiol*. 2004; 97: 731-7.
14. Teles Fº PA. Asma Brônquica – tipos: asma por sulfitos. Disponível on-line em: http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html.
15. Taylor SL. Why sulfite alternatives? *Food Technol*. 1993; 47 (10): 14.
16. Taylor SL, Bush RK. Sulfites as food ingredients. *Food Tech*. 1986; 40 (6): 47-52.
17. Taylor SL, Bush RK. Sulfites as food ingredients. *Food Tech*. 1987; 39 (11): 532-6.
18. Tfouni SAV, Toledo MCF. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*. 2002; 13:117–23.
19. World Health Organization (WHO). Benzoic acid and sodium benzoate. *Conc Int Chem Assess Geneva*. 2000; Doc 26.
20. Tosi EA, Ré E, Ortega ME, Cazzoli AF. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem*. 2007; 104(3): 1025-9.
21. Statistical analysis system - SAS. SAS user’s guide: statistics [CD-ROM], version 9.1. 6ª ed. Cary: 2003.
22. Brennan M, Le Port G, Pulvirenti A, Gormley R. The effect of sodium metabisulphite on the whiteness and keeping quality of sliced mushrooms. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technol*. 1999; 32(7): 460-3.
23. Frank K, Patel R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. *Diag Microb & Infec Dis*. 2007; 57(4): 355-9.
24. Ostergaard E. Evaluation of the antimicrobial effects of sodium benzoate and dichlorobenzyl alcohol against dental plaque microorganisms: An *in vitro* study. *Acta Odontol Scand*. 1994; 52(6): 335-45.
25. Karabay O, Sahin I. *In vitro* activity of sodium-benzoate against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *West Indian Med J*. 2005; 54(2): 107-9.
26. Karabay O, Kocoglu E, Ince N, Sahan T, Ozdemir D. *In vitro* activity of sodium-benzoate against clinically relevant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *The J Microb*. 2006; 44(1): 129-31.
27. Crawford RL. Degradation of 3-hydroxybenzoate by bacteria of the genus *Bacillus*. *Appl Microb*. 1975; 30(3): 439-44.
28. Kiemer P, Tshisuaka B, Fetzner S, Lingens F. Degradation of benzoate via benzoyl-coenzyme A and gentisate by *Bacillus stearothermophilus* PK1, and purification of gentisate 1,2-dioxygenase. *Biol & Fert of Soils*. 1996; 23(3):307-13.
29. Turanta F, Göksungur Y, Dinçer AH, ÜnütürkA, Güvenç U, Zorlu NEE. Effect of potassium sorbate/sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives. *J Sci Food & Agric*. 1999; 79 (9):1197-202.
30. Lack L. The enzymic oxidation of gentisic acid. *Biochem Biophys Acta*. 1959; 34: 117-23.
31. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 3 de Alimentos: Gelados comestíveis”, que consta como Anexo. *Diário Oficial da União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
32. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 13 de Alimentos: Molhos e Condimentos”, que consta como Anexo. *Diário Oficial da União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
33. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico 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 União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
34. Brasil. Resolução RDC nº 217, de 29 de julho de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. 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 União (DOU)*, Poder Executivo, Brasília, DF, 1º ago. 2005.
35. Wind CE, Restaino L. Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *J Food Prot*. 1995; 58(11): 1257-9.