

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS

Camila Brombilla Moro

**SENSIBILIDADE DE FUNGOS DETERIORANTES DE PRODUTOS DE
PANIFICAÇÃO À CONSERVANTES**

**Santa Maria, RS
2019**

Camila Brombilla Moro

**SENSIBILIDADE DE FUNGOS DETERIORANTES DE PRODUTOS DE
PANIFICAÇÃO À CONSERVANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Venturini Copetti

Santa Maria, RS
2019

Moro, Camila Brombilla

SENSIBILIDADE DE FUNGOS DETERIORANTES DE PRODUTOS DE
PANIFICAÇÃO À CONSERVANTES / Camila Brombilla Moro.-
2019.

52 p.; 30 cm

Orientadora: Marina Venturini Copetti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2019

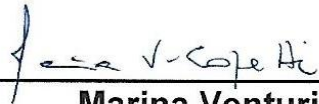
1. Ácidos orgânicos 2. Conservantes 3. Fungos
deteriorantes 4. pH 5. Deterioração de alimentos I.
Venturini Copetti, Marina II. Título.

Camila Brombilla Moro


**SENSIBILIDADE DE FUNGOS DETERIORANTES DE PRODUTOS DE
PANIFICAÇÃO À CONSERVANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

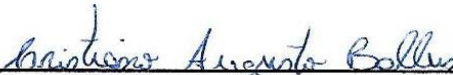
Aprovada em 12 de julho de 2019:



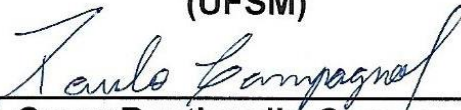
Marina Venturini Copetti, Dra.
(UFSM)
(Presidente/Orientador)



Meg da Silva Fernandes, Dra.
(Alimentarius Consultoria em Alimentos)



Cristiano Augusto Ballus, Dr.
(UFSM)



Paulo Cezar Bastianello Campagnol, Dr.
(UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha nenê Ana Clara e a todos que torceram verdadeiramente para o meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tornar tudo possível e me dar forças de seguir;

À minha amável avó, Maria, que sempre me incentivou e apoiou quanto aos meus estudos, assim como meu avô Izidro;

Ao meu amor, Edegar, pelo companheirismo de sempre;

Ao meu avô, Odacyr Brombilla (*in memoriam*), que em sua passagem me ensinou o valor dos estudos;

À minha orientadora Marina Venturini Copetti e a todo grupo de pesquisa do laboratório: Marcelo, Angélica, Gilson, Andrieli, Jéssica, que desde o início me auxiliaram. E ainda, Fernanda e Dihandra;

A todos meus amigos que estiveram presentes, pela parceria e compreensão de minha ausência;

Aos professores, colegas e funcionários da UFSM;

Aos meus pais, Sandra e Leandro, por me ensinarem através do exemplo, a manter o foco e determinação para a busca de meus objetivos;

Gratidão!

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento.”

(Provérbios 3:13)

RESUMO

SENSIBILIDADE DE FUNGOS DETERIORANTES DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO À CONSERVANTES

AUTORA: Camila Brombilla Moro

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a. Marina Venturini Copetti

Atualmente a perda econômica devido ao descarte de alimentos deteriorados por fungos é grande, e o uso de ácidos orgânicos como conservante em alimentos representa uma alternativa de controle para este problema. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos ácidos acético, sórbico e propiônico sobre o crescimento de espécies fúngicas em meio de cultura, em diferentes condições de pH, dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Hyphopichia* isolados de produtos de panificação e ainda uma cepa de *Penicillium roqueforti* (IMI 217568) originalmente isolada de queijo Stilton. Para avaliar a sensibilidade desses fungos a ácidos orgânicos comumente usados por indústrias de panificação para controle fúngico, foram cultivados 12 isolados em meio de cultura com quatro níveis de pH (4,5; 5,0; 5,5 e 6,0) e três ácidos orgânicos: ácido acético (0; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 mM), ácido sórbico (0; 1; 2; 4; 8; 16; 32 mM) e ácido propiônico (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1.024 mM). Os experimentos foram conduzidos em duplicata e incubados por sete dias para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM). Houve diferença quanto à sensibilidade das espécies testadas para os ácidos avaliados. O gênero *Aspergillus* foi o mais sensível ao ser confrontado com o ácido acético, *Hyphopichia* foi mais sensível quando submetido ao ácido sórbico e para o ácido propiônico, *Aspergillus* e *Hyphopichia* se comportaram de forma semelhante. O gênero *Penicillium* foi o mais resistente em relação aos outros fungos testados quando expostos a esses ácidos. Além disso foi observada diferença na concentração de inibição de uma cepa de *Penicillium roqueforti* oriunda de queijo em relação às outras três isoladas de produtos de panificação deteriorados. Esta cepa de queijo se comportou de maneira similar às cepas de *Penicillium paneum*. Também foi verificado que houve uma relação direta entre os valores de pH e a concentração inibitória. Em geral a cada acréscimo de 0,5 no valor de pH, dobram as concentrações de ácido necessárias para inibir o crescimento do isolado. Esses resultados demonstraram a importância de considerar o pH e as espécies fúngicas presentes no produto ao calcular a dosagem dos ácidos orgânicos para a aplicação a fim de garantir o aumento da vida útil frente à deterioração fúngica.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos. Conservantes. Fungos deteriorantes. pH.

Deterioração de alimentos.

ABSTRACT

SENSITIVITY OF FUNGI DETERIORING FROM CONSERVATIVE BAKERY PRODUCTS

AUTHOR: Camila Brombilla Moro

ADVISOR: Prof.^a Dr^a Marina Venturini Copetti

Currently, economic losses due to the disposal of fungal-spoiled foods are large, and the use of organic acids as a preservative in food represents a control alternative to this problem. The objective of this work was to evaluate the influence of acetic, sorbic and propionic acids on the growth of fungal species in culture media, under different pH conditions. The genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Hyphopichia* isolated from bakery products and a *Penicillium roqueforti* strain (IMI 217568) originally isolated from Stilton cheese were accessed. To evaluate their sensitivity to organic acids commonly employed in bakeries for fungal control, 12 isolates were cultivated in culture medium with four pH levels (4.5, 5.0, 5.5 and 6.0) and three organic acids: acetic acid (0; 25 ; 50; 100; 200; 400 and 800 mM), sorbic acid (0; 1; 2; 4; 8; 16 and 32 mM) and propionic acid (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 , 128, 256, 512 and 1,024 mM). The experiments were conducted in duplicate and incubated for seven days to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC). Differences were observed in the sensitivity of the species tested to the acids evaluated. The genus *Aspergillus* was the most sensitive when confronted with acetic acid; *Hyphopichia* was the more sensitive when submitted to sorbic acid; and for propionic acid, *Aspergillus* and *Hyphopichia* behaved similarly. The genus *Penicillium* was the most resistant in relation to the other fungi tested when exposed to these acids. In addition, a difference was observed in the inhibitory concentration of the cheese-derived *Penicillium roqueforti* strain when compared to the other three fungal strains isolated from spoiled bakery products. This cheese strain, had sensitivity similar to the one observed in *Penicillium paneum* strains. It was also observed a direct relationship between pH values and inhibitory concentration. In general, each pH increase of 0.5, doubled the acid concentrations necessary to inhibit the growth of a fungal isolate. These results demonstrated the importance of considering the pH and fungal species inducing losses in bakery products of industries when deciding the dosage of organic acids to be applied in order to ensure the increase the product stability against fungal deterioration.

Keywords: Organic acids. Preservatives. Fungi. pH. Food spoilage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Concentração inibitória mínima (mM) do ácido acético para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.	29
Figura 2 - Estimativa da concentração inibitória mínima (mM) da fração não dissociada do ácido acético para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.....	29
Figura 3 - Concentração inibitória mínima (mM) do ácido sórbico para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH	31
Figura 4 - Estimativa da concentração inibitória mínima (mM) da fração não dissociada do ácido sórbico para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.....	31
Figura 5 - Concentração Inibitória Mínima (mM) do ácido propiônico para isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH	34
Figura 6 - Concentração Inibitória Mínima (mM) não dissociada estimada para o ácido propiônico frente aos isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.....	34
Figura 7 - Concentração total de ácido acético, em ppm, necessária para a inibição de fungos deteriorantes de pães	41
Figura 8 - Concentração total de ácido sórbico, em ppm, necessária para a inibição de fungos deteriorantes de pães	42
Figura 9 - Concentração total de ácido propiônico, em ppm, necessária para a inibição de fungos deteriorantes de pães.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Código das cepas utilizadas no experimento	22
Tabela 2 – Variação na porcentagem de moléculas não dissociadas em relação ao pH	27
Tabela 3 – Concentração de ácido total e não dissociado nas principais concentrações testadas para o ácido acético.	29
Tabela 4 – Concentração de ácido total e não dissociado nas principais concentrações testadas para o ácido sórbico.	31
Tabela 5 – Concentração de ácido total e não dissociado nas principais concentrações testadas para o ácido propiônico.	34
Tabela 6 – Valores de pH dos diferentes tipos de pães analisados e estimativa da porcentagem de moléculas não dissociadas e concentração inibitória mínima (CIM)	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 DETERIORAÇÃO FÚNGICA EM ALIMENTOS	15
3.1.1 Deterioração de pães.....	15
3.2 CONTROLE DA DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS ATRAVÉS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	17
3.2.1 Ácido acético	17
3.2.2 Ácido sórbico	17
3.2.3 Ácido propiônico	19
3.3 AÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 DETERMINAÇÃO DO pH DAS AMOSTRAS DE PÃO	22
4.2 ISOLADOS FÚNGICOS	22
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	23
4.3.1 Preparo dos isolados	23
4.3.2 Propagação dos fungos	23
4.3.3 Preparação do inóculo	24
4.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	24
4.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS ÁCIDOS ORGÂNICOS	24
4.6 CÁLCULO DA FRAÇÃO DISSOCIADA E NÃO DISSOCIADA DO ÁCIDO.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 ESTIMATIVA DA FRAÇÃO NÃO DISSOCIADA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA OS PH ANALISADOS	27
5.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS ÁCIDOS ORGÂNICOS UTILIZADOS EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO	28
5.2.1 Ácido acético	28
5.2.2 Ácido sórbico	30
5.2.3 Ácido propiônico	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44

1 INTRODUÇÃO

Os fungos podem estar presentes em todas as fases da cadeia produtiva de alimentos e são capazes de contaminar estes produtos desde o campo, no cultivo, colheita, armazenamento, processamento e até na estocagem do produto final. Para evitar o desenvolvimento desses micro-organismos é importante levar em consideração os fatores como a umidade, atividade de água, temperatura, presença de gases, pH e presença de insetos (MOHAPATRA et al., 2017).

A contaminação e subsequente deterioração fúngica de alimentos resultam em perdas econômicas devido ao descarte ocasionado pela diminuição da qualidade, que podem ser devido a alterações da cor, odor, sabor e aspecto do produto (SCHMIDT et al., 2016; LEMOS et al., 2018).

Para evitar mais perdas em alimentos, tem-se utilizado estratégias para retardar a deterioração, consequentemente aumentando a vida útil do produto, sendo destacado o emprego de conservantes. Os ácidos orgânicos e seus sais são amplamente utilizados devido a sua eficácia antifúngica e baixa toxicidade. Os mais utilizados são o sorbato, o benzoato e o propionato, ou os inorgânicos como o sulfito ou nitrito, sendo eles lipofílicos fracos e mais eficazes em valores baixos de pH, próximos de 5,5. Apenas os PARABENOS (ésteres de alquila de ácido para-hidrobencóico) possuem atividade suficiente como antimicrobianos em valores variados de pH (GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016).

Em sua maioria, esses ácidos possuem o status GRAS (“*generally recognized as safe*”) pela Food and Drug Administration (FDA), que significa geralmente reconhecidos como seguros, sendo frequentemente empregados no controle de contaminação microbiana em alimentos e matérias-primas (GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016).

Entre os ácidos orgânicos utilizados durante o processamento de pães, está o ácido propiônico e seus sais e o ácido sórbico e seus sais (GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016). O propionato de cálcio e ácido sórbico são muito utilizados para a conservação de pães pré-embalados e fatiados (QUATTRINI, 2018).

Diversos fatores devem ser observados na escolha de um conservante como o pH do alimento, estado físico, composição e microbiota, se deteriorantes ou patogênicos (GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016). Sabe-se que a eficácia dos ácidos orgânicos é grandemente influenciada pela constante de dissociação e principalmente

pelo pH do substrato, uma vez que, por serem ácidos fracos, não se dissociam completamente em água (THERON e LUES, 2007). Os ácidos orgânicos quando utilizados como conservantes de alimentos ficam em equilíbrio e são dependentes do pH do meio. A principal atividade antimicrobiana do ácido é atribuída às moléculas não dissociadas que, em geral, são altamente lipofílicas, característica que possibilita sua entrada na célula dos micro-organismos. A maior porcentagem de moléculas não dissociadas acontece em valores de pH baixo, próximas ao valor de pKa do ácido (LUND et al., 1987).

Acredita-se que a fração não dissociada possa atravessar a membrana plasmática e entrar na célula fúngica. Quando em contato com o pH interno do micro-organismo, mais elevado, a porção não dissociada, dissocia-se liberando ânions e prótons carregados que não seriam capazes de transpassar essa membrana plasmática se já estivessem dissociados (LUND et al., 1987).

Sabe-se que as matrizes alimentícias são complexas, e podem tamponar o pH de alimentos como é o caso dos pães. Apesar de ser de amplo conhecimento a grande influência do pH do substrato sobre a ação antimicrobiana de ácidos orgânicos, poucos são os trabalhos avaliando a ação antifúngica de ácidos orgânicos usados como conservantes em valores fixos de pH, proposta deste estudo, frente a fungos deteriorantes de produtos de panificação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a influência de ácidos orgânicos sobre o crescimento de fungos, isolados de produtos de panificação deteriorados, em diferentes valores de pH.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a existência de variação na sensibilidade de espécies deteriorantes de pães aos principais ácidos orgânicos usados como conservantes na indústria de panificação;
- Determinar a concentração inibitória mínima de isolados de *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Aspergillus pseudoglaucus*, *Aspergillus montevidensis*, e *Hyphopichia burtonii* ao ácido acético, sórbico e propiônico em meio de cultura líquido em diferentes valores de pH.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DETERIORAÇÃO FÚNGICA EM ALIMENTOS

Sabe-se que os fungos estão amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser encontrados no solo, na água e no ar. Esses micro-organismos possuem algumas formas de multiplicação e disseminação, como a esporulação, brotamento, fragmentação e divisão, fato que colabora para sua dispersão e contaminação nos locais onde se instalam (PITT e HOCKING, 2009). Dessa forma, podem contaminar os grãos na lavoura e se manter presentes nos derivados ao longo de toda cadeia produtiva, processamento e armazenamento de produtos alimentícios.

Ainda, a contaminação fúngica também pode ocorrer na indústria, visto que alguns fatores podem facilitar a disseminação de fungos nas instalações industriais como a comunicação entre as diferentes seções, maus hábitos de funcionários e ventilação inadequada do local (GARCIA et al., 2019a). Após a contaminação dos alimentos, quando os micro-organismos conseguem superar barreiras tecnológicas, a deterioração do produto é uma consequência da sua multiplicação fúngica, o que causa grandes perdas econômicas e ainda pode representar risco à saúde do consumidor devido a sua capacidade toxigênica (PITT e HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2004).

3.1.1 Deterioração de pães

A deterioração por fungos geralmente é o principal fator limitante da vida útil do pão, causando grandes perdas econômicas em consequência do descarte precoce desses produtos (PITT e HOCKING, 2009; SANTOS et al., 2016; FLEURAT-LESSARD, 2017). Os produtos de panificação normalmente são colonizados pelos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Rhizopus* (DAL BELLO et al., 2007; QUATTRINI et al. 2018; GARCIA et al., 2019b).

Na indústria de panificação, sabe-se que as principais fontes de contaminação que levam a deterioração causada por fungos são as matérias-primas, principalmente a farinha, por conter um número considerável de esporos fúngicos (POISSON, 1975; ROGERS e HESSELTINE, 1978; PITT e HOCKING, 2009; ANDRADE e SALUSTIANO, 2008).

As micropartículas de farinha contaminada podem ficar sobrevoando o ar das indústrias e padarias e se depositarem sobre os pães já assados, contaminando o produto pronto (ANDRADE e SALUSTIANO, 2008). Essa contaminação fúngica acontece normalmente durante o resfriamento, fatiamento ou embalagem (LEGAN, 1993; VILJOEN e VON HOLY, 1997; BURFOOT et al., 2000; AANTREKKER et al., 2003; SANTOS et al., 2016; GARCIA et al., 2019a).

Santos et al. (2016) e Garcia et al. (2019a) estudaram a contaminação fúngica do ar interno da indústria, das matérias-primas, e de pães mofados e descobriram que *P. citrinum*, *P. paneum* e *P. roqueforti* eram os principais responsáveis pela deterioração, além de estarem presentes nas matérias-primas (farinha de trigo, farinha de centeio) e no ar ambiente de processamento (corte e embalagem).

Zhang et al. (2016) verificaram que na crosta do pão a temperatura aumenta mais rapidamente que no centro. Em vista disso, a inativação dos micro-organismos presentes no interior do produto necessitaria de um tempo mais longo. Garcia et al. (2019a), em um estudo realizado a partir do cozimento de pães a 160 °C, 190 °C e 220 °C, verificaram que cepas de *P. paneum* e *P. roqueforti* inoculadas artificialmente durante a formação da massa não foram detectadas no pão após o assamento, indicando que a contaminação pós-assamento é provavelmente responsável pela subsequente deterioração fúngica do produto.

Por outro lado, Garcia et al. (2019b) indicaram que existe uma baixa correlação entre o índice de adequação às boas práticas com a contaminação fúngica do ar em padarias. Assim, apesar da avaliação das condições higiênico-sanitárias do estabelecimento ser de extrema importância para a garantia da qualidade dos alimentos preparados, os parâmetros previstos na legislação brasileira para avaliação das Boas Práticas de Fabricação não parece ser uma ferramenta adequada para a determinação do risco de contaminação fúngica em produtos processados.

Em virtude do grande número de partículas fúngicas presentes no ar dos locais de produção, condições climáticas propícias (principalmente umidade relativa elevada e temperaturas moderadas) e falhas no layout das instalações de indústrias de panificação, o uso de conservantes segue sendo de grande relevância para prolongar a vida útil de alimentos com umidade intermediária. Sendo assim, deve ser escolhida a melhor substância de acordo com as características do produto, desde que não prejudique a saúde dos consumidores.

3.2 CONTROLE DA DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS ATRAVÉS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

3.2.1 Ácido acético

O ácido acético é um composto químico muito conhecido pela humanidade desde os tempos mais antigos, onde o consumo de vinho era muito elevado devido a má qualidade das águas. Quando a acidificação do vinho acontecia em excesso, o chamavam de vinagre, que derivado do latim significa *vinum egre* ou vinho azedo. Apesar desse ácido ocorrer naturalmente em pequenas quantidades em algumas frutas, na atualidade, os vinagres são obtidos por via biotecnológica através da ação de bactérias ácido acéticas, e contém normalmente entre 4 e 8% de ácido acético (GURTLER e MAI, 2014).

Atualmente, o ácido acético é amplamente utilizado nas indústrias como conservante ou acidulante, podendo também potencializar a eficácia de outros aditivos como os utilizados em pães, além de intensificar o sabor dos alimentos como nos molhos para salada, maionese e conservas (SMULDERS e GREER, 1998; STRATFORD e EKLUND, 2003; GURTLER e MAI, 2014; SUREKHA e REDDY, 2014; GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016).

Em geral, os ácidos orgânicos possuem o status GRAS. Dessa forma podem ser usados em quantidades *quantum satis*, que significa quantidade necessária para obter o efeito tecnológico desejado, desde que não altere as características do produto, como indica a RDC 45 (BRASIL, 2010). O ácido acético é um dos ácidos orgânicos que não possui limite previsto pela legislação para a utilização na formulação de um produto alimentício, porém seu sabor e aroma característicos podem proporcionar alterações sensoriais adversas nos alimentos quando utilizado em doses altas (TANIGUCHI et al., 1998). Assim, é importante que sua utilização seja feita de acordo com as concentrações de ácido necessárias para controlar a deterioração sem que comprometa a aceitação do produto pelo consumidor.

3.2.2 Ácido sórbico

Esse ácido foi isolado pela primeira vez em 1859 de bagas verdes da planta *Sorbus aucuparia* e em 1870 tornou-se conhecida a estrutura química do ácido, porém

seu potencial antimicrobiano foi descoberto 80 anos após seu primeiro isolamento, ou seja, apenas em 1939 (THOMAS e DELVES-BROUGHTON, 2014; SORBATO, 2019).

Alguns ácidos orgânicos, como o ácido sórbico, possuem valor de ingestão diária aceitável (IDA) definida, pois podem causar efeitos tóxicos quando utilizados em grande quantidade, mesmo sendo um agente de baixa toxicidade (FERRANDA et al., 2000). Dessa forma, é importante ter prudência na definição das concentrações a serem empregadas pois há evidências de que o uso de concentrações indevidas do ácido sórbico e seus sais pode representar risco para a saúde dos consumidores (MARIN et al., 2003).

O ácido sórbico e seus sais, como o sorbato de potássio, de sódio ou de cálcio são muito utilizados em produtos alimentícios como conservantes. É o caso dos laticínios como em queijos, produtos cárneos, em alguns legumes, molhos, condimentos, geleias, produtos de padaria como bolos e pães e bebidas como sucos, refrigerante e vinho (THOMAS e DELVES-BROUGHTON, 2014). O uso de sorbatos para a conservação desses alimentos no Brasil é aprovada por várias legislações (BRASIL, 1988; 1998; 1999a; 1999b; 1999c; 2001a; 2001b; 2005a; 2005b; 2005c; 2007a; 2007b; 2008; 2009; 2011; 2013a; 2013b; 2017).

A deterioração dos produtos de panificação pode ser melhor controlada usando sorbato ao invés de propionato, e ainda, o sorbato causa menos efeito no sabor. Porém, em produtos de panificação, o ácido sórbico deve ser adicionado após o cozimento, em forma de spray na superfície do panificado, devido a sua influência contra as leveduras do fermento se adicionado junto a massa (Brasil, 1988; GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016). Além disso, em temperaturas acima de 60° C, o ácido sórbico começa a evaporar, sendo assim, devendo ser aplicado após as fases de aquecimento dos produtos (CONSERVANTES, 2011).

O sorbato afeta o ciclo de desenvolvimento dos fungos, desde a germinação dos esporos até o crescimento micelial (THOMAS e DELVES-BROUGHTON, 2014). Esses conservantes são mais eficazes quando utilizados em produtos que possuem o pH ligeiramente ácido (5,5 - 6,0) e agem contra um grande número de microorganismos, sendo mais abrangente que os benzoatos e propionatos. Com o aumento da acidez, aumenta-se também a eficácia dos sorbatos. Em pH inferior a 6,0 possuem a maior eficácia, atuam até pH 6,5, e são relativamente ineficazes em pH superior a 7,0 (SORBATO, 2019).

Devido a sua ampla utilização, a Organização Mundial da Saúde (OMS)

estipula a IDA de 25 mg/kg de peso corpóreo de ácido sórbico (WHO, 1997). Em produtos de panificação, possui como limite de uso de 2000 ppm estabelecido pela União Europeia para pães (COMUNIDADE EUROPEIA, 2011). Já a Resolução n° 383, de 05 de agosto de 1999 da ANVISA impõe o limite de 1000 ppm, onde se baseia no *Codex Alimentarius* (2012), que estabelece o mesmo valor (BRASIL, 1999).

3.2.3 Ácido propiônico

Até os dias atuais, a produção do ácido propiônico utilizado comercialmente é realizada por rotas petroquímicas (BOYAVAL e CORRE, 1995; WANG et al., 2015; LIU et al., 2016). Porém, o uso de reagentes tóxicos, demanda elevada de energia, alto custo e a escassez da matéria-prima são nocivos ao meio ambiente (ZÁRATE e CHAIA, 2012). Devido a essas causas e também pela alta demanda motivada pela aplicação no ramo alimentício, começou a ser estudado a produção do ácido propiônico através de mecanismos mais sustentáveis e biotecnológicos, como o método de controle fermentativo (STOWERS et al., 2014; ZHUGE et al., 2014; ZHUGE et al., 2015; LIU et al., 2016).

Bactérias como *Selenomonas ruminantium* (EATON e GABELMAN, 1995), e algumas espécies do gênero *Propionibacterium*, podem produzir ácido propiônico, como *P. acidipropionici* (WANG et al., 2017), *P. microaerophilum* (KOUSSÉMON et al., 2003), *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (WANG et al., 2015), *P. jensenii* (GUAN et al., 2016). As propionibactérias utilizam açúcares, lactato e glicerol como substrato (WANG et al., 2013; LIU et al., 2016; YANG et al., 2018).

O ácido propiônico e os seus sais, como o propionato de cálcio e de potássio são principalmente utilizados em produtos de panificação para evitar o crescimento de bactérias e fungos em pães e bolos. Ao contrário do ácido sórbico, podem ser aplicados diretamente na massa do pão, pois não possuem ação contra as leveduras do fermento (KAGLIWAL et al., 2014).

Os propionatos possuem limite de uso de 1000 a 3000 ppm para pães, dependendo das características do produto (COMUNIDADE EUROPEIA, 2011). Entretanto, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a RDC n° 45, de 03 de novembro de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) limita esses compostos em *quantum satis*, que é a quantidade necessária para obter o efeito tecnológico desejado desde que não altere a identidade

e a genuinidade do produto (GURTLER & MAI, 2014; YANG et al., 2018; KAGLIWAL et al., 2014).

O propionato de cálcio é eficaz quando utilizado em pães industrializados, porém algumas espécies fúngicas apresentam resistência, mesmo em altas concentrações do conservante, como o *Penicillium roqueforti*, que pode apresentar uma fase lag estendida, seguida de multiplicação (SUHR e NIELSEN, 2004; HARRIS et al., 1986).

3.3 AÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são apontados como ácidos fracos por não se dissociar totalmente em água (THERON e LUES, 2007). Sua ação antimicrobiana é designada a sua fração de moléculas não dissociadas, geralmente lipofílicas que beneficiam a sua entrada nas células dos micro-organismos. O pH é o aspecto mais importante no efeito dos ácidos orgânicos no controle da deterioração, visto que a dissociação de um ácido é influenciada pelo pH do meio e pela constante de dissociação. Quanto mais perto o pH estiver do valor de pKa do ácido, mais moléculas na forma não dissociada estarão presentes (LUND et al., 1987).

Outro fator significativo é a lipofilicidade do ácido, ou seja, habilidade do ácido ser dissolvido em gorduras. Ácidos com essa propriedade se tornam mais efetivos pois conseguem passar a camada lipídica das células com mais facilidade (STRATFORD et al., 2009).

Existem algumas teorias a respeito da inibição do crescimento dos micro-organismos como a ação diretamente na membrana celular ou atuando na ruptura da membrana plasmática (FREESE et al., 1973; STRATFORD e ANSLOW, 1998), a inibição das reações metabólicas, que pode promover uma destruição dos grupos funcionais essenciais da enzima (KREBS et al., 1983), stress e alteração da estabilidade do pH intracelular (SALMOND et al., 1984; BRACEY et al., 1998) e acúmulo de ânions tóxicos, possivelmente inibidores de reações metabólicas (EKLUND, 1985).

A teoria da inibição dos ácidos orgânicos, que é mais aceita, relata que a ação de inibição das reações metabólicas é devido a diminuição do pH interno da célula. Esse conceito foi proposto por Cramer et al. (1977) e Krebs et al. (1983). Nessa teoria, a fração não dissociada do ácido consegue permear mais facilmente na membrana

citoplasmática do micro-organismo, quando encontra um pH mais alcalino no citoplasma, dissocia-se, e devido ao estado desprotonado das moléculas, não é possível atravessar a camada lipídica e acabam se acumulando no citoplasma tornando-o mais ácido e inativando o micro-organismo devido ao acúmulo de prótons no interior da célula (SALMOND et al., 1984; BRUL e COOTE, 1999; GURTLER e MAI, 2014).

Alguns ácidos orgânicos são tricarboxílicos e possuem três constantes de dissociação (pK_1 , pK_2 e pK_3). Outros ácidos podem ser dicarboxílicos e possuir duas constantes de dissociação (pK_1 e pK_2). Já os ácidos estudados neste trabalho, acético, sórbico e propiônico são monocarboxílicos, possuindo apenas uma constante de dissociação (pK_1) (GURTLER e MAI, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DETERMINAÇÃO DO PH DAS AMOSTRAS DE PÃO

Para a determinação do pH em amostras de pão, foram adicionados em um béquer 10 g de pão e 90 mL de água destilada e homogeneizado. Ao introduzir o eletrodo do equipamento medidor de pH (mPA 210) foi possível obter os valores de pH dos pães, sendo essa análise feita em 22 amostras de 9 formulações diferentes de pães, entre eles pão de forma zero, pão integral, de centeio, multi cereais, pão de linho, pão de forma, pão de leite e pão de manteiga. Essas amostras foram cedidas por uma indústria de pães localizada na cidade de Santa Maria – RS.

4.2 ISOLADOS FÚNGICOS

Para esse estudo foram utilizadas as cepas descritas na tabela abaixo (Tabela 1). Os fungos foram previamente isolados de produtos de panificação deteriorados e identificados de acordo com a metodologia descrita por Pitt (2000) e Frisvad et al. (2004). A cepa IMI 217568 foi comprada em uma coleção, isolada de queijo Stilton, sendo este um queijo azul e o fungo isolado não é deteriorante desse produto.

Tabela 1 - Código das cepas utilizadas no experimento

Cepa	Espécie	Material de isolamento
IMI 217568	<i>Penicillium roqueforti</i>	Queijo Stilton
PR 06	<i>Penicillium roqueforti</i>	Pão deteriorado
PR 11	<i>Penicillium roqueforti</i>	Pão deteriorado
PR 67	<i>Penicillium roqueforti</i>	Pão deteriorado
LMQA 03	<i>Penicillium paneum</i>	Pão deteriorado
LMQA 05	<i>Penicillium paneum</i>	Pão deteriorado
AP 04	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	Panetone deteriorado
AP 05	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	Panetone deteriorado
AM 35	<i>Aspergillus montevicensis</i>	Panetone deteriorado
AMA 02	<i>Aspergillus montevicensis</i>	Panetone deteriorado
HB 08	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Pão deteriorado
HB 17	<i>Hyphopichia burtonii</i>	Pão deteriorado

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.3.1 Preparo dos isolados

Os isolados fúngicos utilizados nos estudos foram previamente liofilizados em quantidade suficiente para realizar todo experimento, afim de evitar alteração nas características originais decorrentes de sucessivos repiques. Para isso, os isolados dos gêneros *Penicillium* e *Hyphopichia* foram cultivados durante 7 dias em Ágar Extrato de Malte (MEA), sendo composto de 20 g de ágar, 30 g de extrato de levedura, 1 g de peptona, 20 g de glicose, 1 mL de traços e 1000 mL de água destilada, em temperatura de 25 °C. Para os isolados do gênero *Aspergillus* foi utilizado Ágar Extrato de Levedura com 20% de Sacarose (CY20S) composto de 15 g de ágar, 5 g de extrato de levedura, 200 g de sacarose, 10 mL de [Czapek], 1 g de K₂HPO₄ e 1000 mL de água destilada, com tempo de incubação de 14 dias a 25 °C.

Após o período de cultivo, para o gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, aos tubos contendo as culturas foram adicionados 2,5 mL de cada uma das soluções de 14% de sacarose e 10% de peptona formando uma suspensão. Após serem submetidos a uma adequada homogeneização, 50 µL desta suspensão foram distribuídos em fitas de papel filtro, as quais posteriormente foram transferidas para tubos de vidro, ambos previamente esterilizados e congelados até o momento da liofilização.

Para liofilização de isolados do gênero *Hyphopichia*, foi utilizado solução de leite em pó 10% suplementada com glutamato monossódico 5% reconstituído em água destilada. Parte da colônia fúngica foi raspada do tubo de cultivo com auxílio de uma alça de inoculação e disposta na solução láctea, congelando-se até momento da liofilização.

4.3.2 Propagação dos fungos

Previamente à realização dos experimentos, os isolados dos gêneros *Penicillium* e *Hyphopichia* foram cultivados durante 7 dias em tubos inclinados contendo 5 mL de MEA em temperatura de 25 °C. Para o gênero *Aspergillus* foram utilizados tubos inclinados de CY20S durante 14 dias a 25 °C, inoculando-se a partir do material liofilizado.

4.3.3 Preparação do inóculo

Para o preparo da suspensão fúngica, adicionou-se nos tubos com meio de cultura e o fungo previamente crescido, 10 mL de solução estéril contendo 0,01% de Tween 80. Para facilitar a remoção dos esporos, utilizou-se uma alça de inoculação estéril, raspando-se a superfície do meio de cultivo. A partir desta suspensão inicial, foram realizadas as diluições necessárias para a padronização da suspensão em 10^5 conídios por mL, contadas na câmara de Neubauer (STRATFORD et al., 2009; ALCANO et al., 2016).

4.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos testados foram o ácido acético ($C_2H_4O_2$), nas concentrações de 0, 25, 50, 100, 200, 400, 600 e 800 mM ou 0, 1501, 3002, 6005, 12010, 24020, 36030, 48040 ppm (Vetec 99,7%), ácido sórbico ($C_6H_8O_2$) nas concentrações 0, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 mM ou 0, 112,13, 224, 448,5, 897, 1794, 3588 ppm (Vetec 99,0%) e ácido propiônico ($C_3H_6O_2$) nas concentrações 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1.024 mM ou 0, 74,08, 148, 296, 592, 1185, 2370, 4741, 9482, 18964, 37928, 75857 ppm (Neon 99,5%).

Foram consideradas algumas legislações brasileiras e internacionais para a determinação das doses testadas, tais como: BRASIL, 1999; 2007a; 2007b; 2010; 2017, Regulamento 1129/2011 (UE, 2011) e o *Codex alimentarius* (CODEX, 2016), pretendendo observar se esses valores estabelecidos são suficientes para o controle fúngico nos diferentes valores de pH.

4.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração testada de um composto antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um micro-organismo. Testes sobre CIM estão bem estabelecidos e são comumente utilizados para determinar a susceptibilidade microbiológica aos antimicrobianos (BEBEAR e ROBERTSON, 1996).

Para verificar o efeito dos ácidos orgânicos no crescimento fúngico em diferentes valores de pH, foi utilizado o meio de cultura base contendo 10 g de extrato

de malte, 20 g de extrato de levedura e 1000 mL de água destilada para as espécies de *P. roqueforti*, *P. paneum* e *H. burtonii*. Para as espécies de *A. pseudoglaucus* e *A. montevidensis* foi utilizado o mesmo meio líquido, porém com adição de 150 g de glicerol, pelo fato de serem fungos xerofílicos.

Os meios foram elaborados em dupla concentração, ou seja, com a metade do valor de água destilada indicado para que, quando fosse adicionado o ácido orgânico e feito o ajuste do pH, a quantidade de líquido não provocasse a diluição dos nutrientes presentes no meio de cultura. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos em frascos com 25 mL em dupla concentração e após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se o ácido, seguido da adequação do pH, feita em 4 níveis para os fungos isolados de pães, sendo eles: 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0. Quando ajustados, foi utilizado soluções estéreis de NaOH 0,5 M, 1 M e 5 M ou HCl 1 M e 3 M, sendo logo após completados até o valor de 50 mL nos frascos para que a concentração do meio fosse normalizada.

Por fim, transferiu-se 4 mL do meio para dois tubos de ensaio estéreis (duplicata), e adicionou-se 10 µL da suspensão fúngica (10^5 conídios/mL) para os tubos de rosca contendo a solução com meio de cultura e o ácido analisado. A leitura dos resultados ocorreu 5 dias após a incubação em estufa à 25 °C e o resultado foi considerado pelo aspecto visível, em escala dicotômica (positivo ou negativo para o crescimento fúngico). O experimento total foi realizado em triplicata e a metodologia utilizada foi baseada em um estudo realizado por Alcano et al. (2016), contendo algumas adaptações (LEON et al., 2012; ALCANO et al., 2016).

Simultaneamente, cada espécie fúngica foi cultivada em ausência do ácido orgânico (controle negativo) sendo o pH ajustado com NaOH (0,5 M; 1 M ou 5 M) e HCl (1 M ou 3M) nos mesmos níveis testados nos experimentos, para que pudesse ser descartado a hipótese dos fungos serem inibidos apenas com a alteração do pH do meio.

4.6 CÁLCULO DA FRAÇÃO DISSOCIADA E NÃO DISSOCIADA DO ÁCIDO

Para cada concentração e pH testado, a porção de ácido não dissociado foi calculada utilizando a fórmula proposta por Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Sendo que o pK_a é a constante de dissociação do ácido; $[A^-]$ é a concentração de moléculas do ácido dissociado e $[HA]$ corresponde à concentração total de ácido não dissociado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTIMATIVA DA FRAÇÃO NÃO DISSOCIADA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA OS PH ANALISADOS

Os ácidos orgânicos se dissociam parcialmente em água (THERON e LUES, 2007), e a quantidade dessas moléculas é influenciada pelo pH do meio e pela constante de dissociação do ácido (pKa) (LUND et al., 1987). Atribui-se a atividade antimicrobiana de um ácido orgânico à fração não dissociada. Com base nesses dois parâmetros, foi estimada a quantidade em porcentagem de ácido não dissociado que estaria presente no meio, em função de seus diferentes valores de pH, descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Variação na porcentagem de moléculas não dissociadas em relação ao pH

Ácido	Fórmula química	pKa	Moléculas não dissociadas *			
			pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0
Acético	C ₂ H ₄ O ₂	4,74	64,0%	36,0%	15,0%	5,0%
Sórbico	C ₆ H ₈ O ₂	4,76	64,1%	36,1%	15,0%	5,0%
Propiônico	C ₃ H ₆ O ₂	4,87	70,0%	42,9%	19,0%	6,9%

* Valores calculados utilizando a equação de Henderson-Hasselbach

Os valores obtidos através da equação de Henderson-Hasselbalch mostram que há uma diminuição nas moléculas de ácido não dissociado à medida que o pH aumenta, devido aos ácidos orgânicos não se dissociarem completamente (LUND et al., 1987). Desta forma o pH do meio é o fator mais importante quando se trata do controle da deterioração fúngica com o uso destes compostos.

Em pH mais alto a capacidade de dissociação dos ácidos é maior, sendo esperado um controle menos efetivo dos micro-organismos tomando como base a teoria da inibição dos ácidos orgânicos proposta por Cramer et al. (1977) e Krebs et al. (1983). Sendo assim, haveria um aumento na quantidade necessária de ácidos para inibir o crescimento dos isolados fúngicos com o aumento dos valores de pH.

5.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE FÚNGICA AOS ÁCIDOS ORGÂNICOS UTILIZADOS EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO

Foi possível observar que ocorreu variação na inibição do crescimento fúngico entre os diferentes gêneros testados, para os três ácidos estudados (Figuras 1-6).

Há uma ampla variação na concentração inibitória mínima de cada ácido em função do pH quando observada a fração total do ácido (Figuras 1, 3 e 5). No entanto esses dados indicam que, quando se considera a quantidade do ácido adicionado, a concentração inibitória permanece aproximadamente constante (Figuras 2, 4 e 6). Isso acontece porque há uma diminuição na quantidade de moléculas de ácido não dissociadas à medida que o pH aumenta (ALCANO et al., 2016).

5.2.1 Ácido acético

O efeito inibitório do ácido acético nos diferentes isolados fúngicos é apresentado na Figura 1, nos diferentes valores de pH do substrato. Já a Figura 2 foi construída considerando-se apenas a concentração inibitória mínima das moléculas não dissociadas do ácido acético, calculadas através da equação de Henderson-Hasselbalch (Tabela 3).

Para o ácido acético, foi observado comportamento similar na sensibilidade entre isolados da mesma espécie. Da mesma forma, entre as espécies de um mesmo gênero, as cepas obtiveram resultados semelhantes em relação as avaliadas neste experimento, nos intervalos de concentrações testados, estando as diferenças evidenciadas entre os gêneros avaliados.

O gênero mais resistente foi o *Penicillium*. As duas espécies *P. roqueforti* e *P. paneum* foram inibidas igualmente, independente das cepas testadas (PR 06, PR 11, PR 67, IMI 217568, LMQA 03 e LMQA 05). Para o ácido acético, em pH 6,0 os seis isolados foram inibidos na concentração de 800 mM e em pH 5,5 a 600 mM. Nos pH mais baixos, os isolados foram inibidos com menores concentrações do ácido, sendo 400 em pH 5,0 e 200 em pH 4,5, respectivamente. Pode-se notar que em pH 6,0, dos 800 mM de ácido adicionado apenas 40,2 mM estavam na forma não dissociada, já no pH mais baixo testado, 4,5, dos 200 mM, 128 mM estavam na forma não dissociada.

Figura 1 - Concentração inibitória mínima (mM) do ácido acético para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.

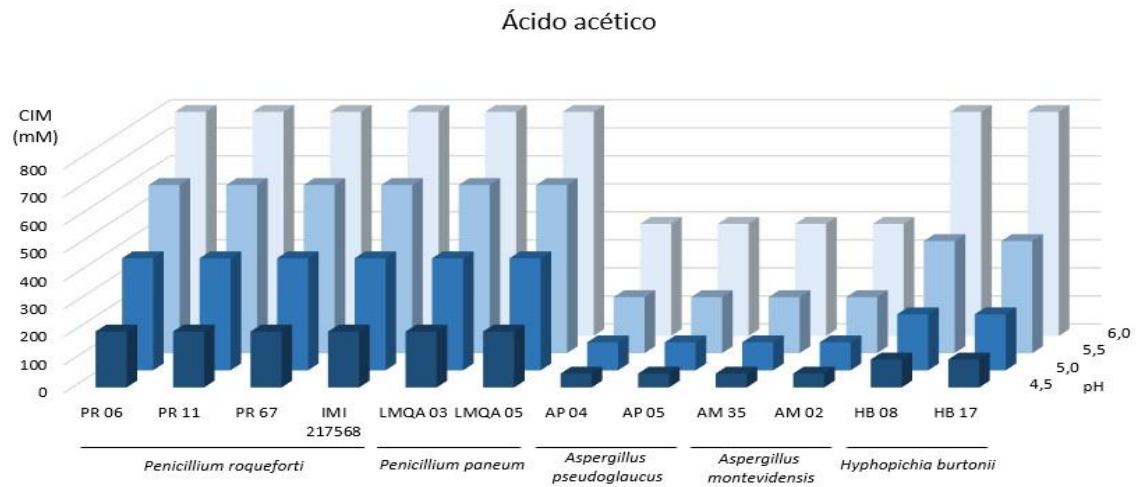


Figura 2 – Estimativa da concentração inibitória mínima (mM) da fração não dissociada do ácido acético para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.

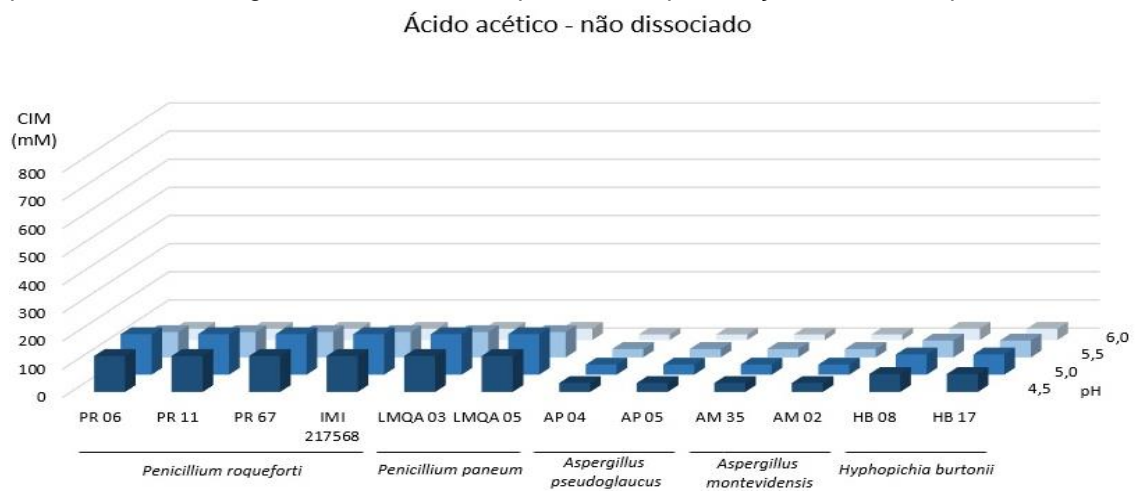


Tabela 3 – Concentração de ácido total e não dissociado nas principais concentrações testadas para o ácido acético.

ÁCIDO ACÉTICO					
Concentração Total (mM)	Concentração Não Dissociada estimada (mM)				
	pH	4,5	5,0	5,5	6,0
50		32,0	18,0	7,50	2,51
100		64,0	36,0	15,0	5,02
200		128	72,0	30,0	10,0
400		256	144	60,0	20,1
600		384	216	90,0	30,1
800		512	288	120	40,2

O gênero *Hyphopichia* (HB 08 e HB 17) foi inibido com 400 mM e 800 mM, para pH 5,5 e 6,0 respectivamente. As duas espécies de *Aspergillus* (AP 04, AP 05, AM 35 e AMA 02) se mostraram mais sensíveis, inibidas a 400 mM em pH 6,0, sendo a metade do valor necessário para a inibição de *Penicillium* sp.(PR 06, PR 11, PR 67, IMI 217568, LMQA 03 e LMQA 05), e para pH 4,5, foi inibida a 50 mM, estando 32 mM na fração não dissociada.

Em estudo realizado por Quattrini et al. (2018), com finalidade de retardar a deterioração fúngica em pães, o pesquisador testou *Aspergillus niger* e *P. roqueforti*, em relação ao ácido acético a concentração inibitória mínima encontrada foi de $8,2 \pm 3,4$ e $25,0 \pm 5,5$ mM respectivamente em pH 4,5, estando bem abaixo dos valores encontrados em nosso estudo.

Moon et al. (2018) estudou o crescimento de *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxina frente a alguns ácidos orgânicos. Na concentração de 0,5 %, o ácido acético inibiu totalmente o crescimento desse fungo. Já na aplicação de 0,1% de ácido acético, o crescimento dos fungos foi de 98,4%.

Alcano et al. (2016) realizou um trabalho com ácidos orgânicos para a inibição de alguns gêneros de *Aspergillus* em várias faixas de pH. Em relação ao ácido acético, os isolados mais resistentes foram *A. niger*, *A. luchensis* e *A. tubingensis*, sendo inibidas a 100 mM, 200 mM, 400 mM e 800 mM nos pH 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 respectivamente. Já os isolados de *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. parasiticus* foram mais sensíveis, sendo inibidos a 50 mM, 100 mM, 200 mM e 400 mM nesses mesmos valores de pH. Os resultados observados neste estudo são semelhantes aos nossos, visto que algumas espécies do gênero *Aspergillus* se comportaram de forma equivalente.

5.2.2 Ácido sórbico

Na Figura 3, estão representados os valores referentes à concentração inibitória mínima de ácido sórbico frente aos isolados fúngicos deteriorantes de pães avaliados neste experimento, considerando-se diferentes valores de pH. Na Figura 4 são apresentadas as concentrações inibitórias levando-se em consideração apenas a porcentagem de moléculas não dissociadas do ácido sórbico esperada, calculadas através da equação de Henderson-Hasselbalch (Tabela 4).

Figura 3 - Concentração inibitória mínima (mM) do ácido sórbico para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.

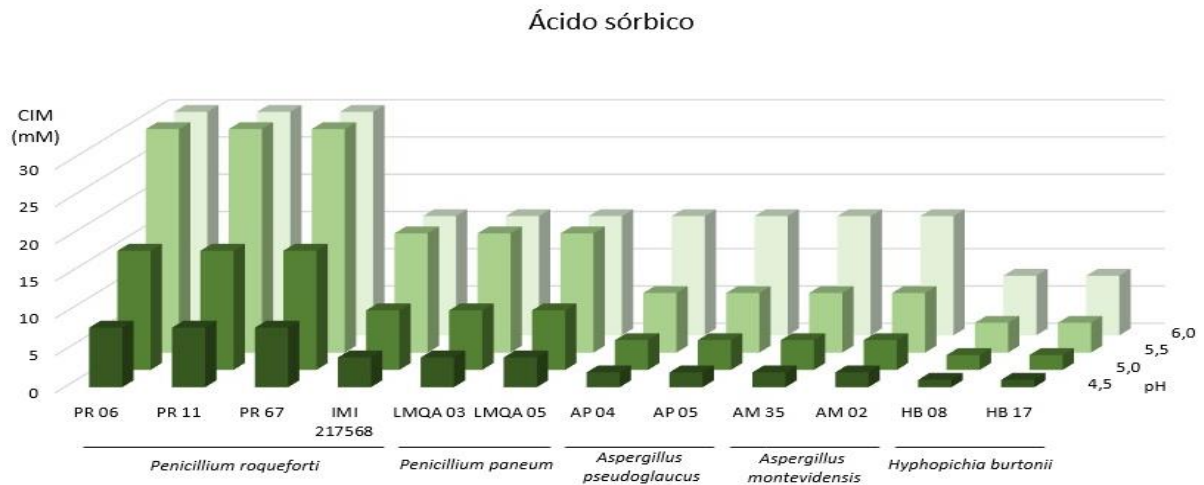


Figura 4 – Estimativa da concentração inibitória mínima (mM) da fração não dissociada do ácido sórbico para os isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.

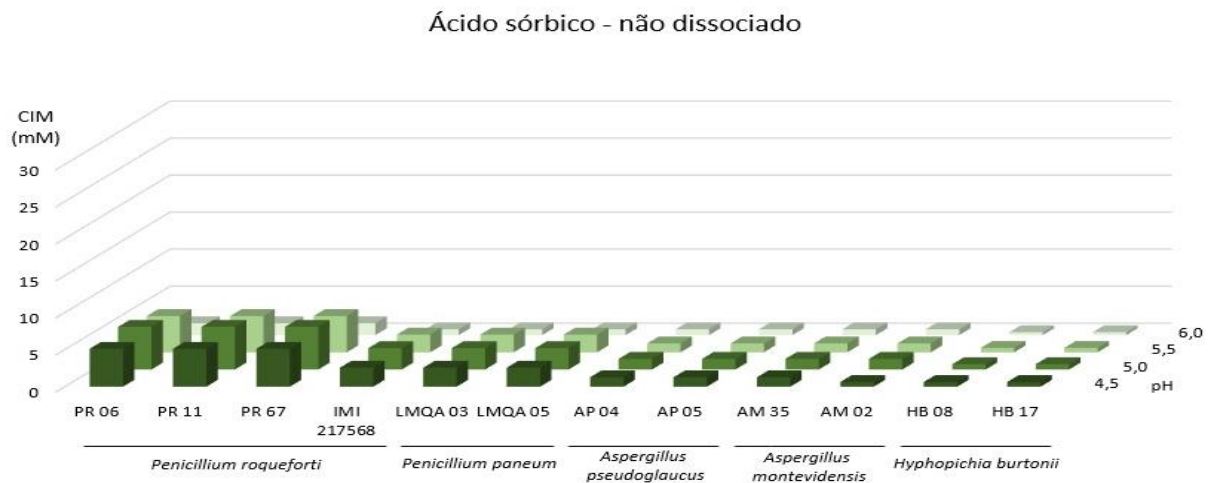


Tabela 4 – Concentração de ácido total e não dissociado nas principais concentrações testadas para o ácido sórbico.

ÁCIDO SÓRBICO					
Concentração Total (mM)	Concentração Não Dissociada estimada (mM)				
	pH	4,5	5,0	5,5	6,0
1		0,64	0,36	0,15	0,05
2		1,28	0,72	0,30	0,10
4		2,57	1,44	0,60	0,20
8		5,13	2,89	1,20	0,40
16		10,3	5,77	2,41	0,80
32		20,5	11,5	4,90	1,61

Para o ácido sórbico, observou-se diferença na sensibilidade entre cepas de *Penicillium* visto que um isolado de *P. roqueforti* (IMI 217568) se diferenciou das três demais (PR 06, PR 11 e PR 67) ainda se igualou aos dois isolados de *P. paneum* (LMQA 03 e LMQA 05). Essa distinção ocorrida entre as diferentes cepas desta mesma espécie pode ser em virtude do seu habitat de origem ou mesmo devido à pressão de seleção sofrida pelos isolados, visto que são rotineiramente expostos a este conservante. Para esse ácido, *P. roqueforti* foi a espécie mais resistente (PR 06, PR 11 e PR 67) e *H. burtonii* a mais sensível (HB 08 e HB 17).

Três cepas de *P. roqueforti* foram inibidas a 32 mM em pH 6,0 (PR 06, PR 11 e PR 67). Uma cepa de *P. roqueforti* (IMI 217568), duas cepas de *P. paneum* (LMQA 03 e LMQA 05) e todos os isolados do gênero *Aspergillus*, *A. montevicensis* (AM 35 e AMA 02) e *A. pseudoglaucus* (AP 04 e AP 05) foram inibidas com 16 mM, equivalente a 0,8 mM de ácido não dissociado, porém em pH 5,5, houve variação nas quantidades entre o gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Para *H. burtonii*, 8 mM desse ácido inibiu em pH 6,0, equivalente a 0,4 mM não dissociado.

Quattrini et al. (2018) teve o ácido sórbico como o inibidor mais forte entre os testados, sendo $0,4 \pm 0,1$ mM para *A. niger* e $0,2 \pm 0,0$ mM para *P. Roqueforti* em pH 4,5. Esses valores se encontram muito abaixo dos resultados constatados no presente trabalho, além disso, esses autores encontraram valores superiores de inibição para *A. niger* do que para *P. roqueforti*, já no nosso estudo foi possível perceber que as cepas de *P. roqueforti* foram mais resistentes em todos os pH testados em relação aos outros gêneros, inclusive *Aspergillus*, porém não foram feitos testes com *A. niger*, apenas utilizamos cepas de *A. pseudoglaucus* e *A. montevicensis*.

O ácido sórbico se mostrou duas vezes mais efetivo contra o crescimento fúngico em relação a outros 13 compostos testados. Em concentração de 0,05 %, esse ácido se mostrou um potente inibidor, sendo que a taxa de crescimento de *A. flavus* foi de somente 3,6% (MOON et al., 2018).

Os resultados obtidos por Alcano et al. (2016), utilizando os pH 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 para *A. niger* e *Aspergillus tubigenesis* foi de 8 mM, 16 mM, 32 mM e 64 mM de ácido sórbico, respectivamente. Para a cepa de *Aspergillus luchuensis* as concentrações foram de 4 mM, 8 mM, 16 mM e 32 mM e por fim as cepas de *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foram de 2 mM, 4 mM, 8 mM e 16 mM para os mesmos pH. Em relação aos ácidos orgânicos testados, os mesmos autores verificaram que a resistência de todos os isolados fúngicos era

muito maior para o ácido acético do que para o ácido sórbico. Isso corrobora com estudos como o de Stratford et al. (2009) que encontraram uma resistência 30 vezes maior em razão molar para o ácido acético do que ao ácido sórbico.

Nossos estudos mostraram que os *P. roqueforti* (PR 06, PR 11 e PR 67), *A. pseudoglaucus* (AP 04 e AP 05) e *A. montevicensis* (AM02 e AM35) isolados de pães deteriorados foram cerca de 25 vezes mais sensíveis ao ácido sórbico que ao ácido acético, enquanto que os *P. paneum* (LMQA 03 e LMQA 05) foram 50 vezes mais sensíveis e para *H. burtonii* (HB 08 e HB 17) esta diferença de eficácia foi de 100 vezes.

5.2.3 Ácido propiônico

Os resultados referentes à concentração inibitória mínima do ácido propiônico frente a isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação em diferentes pH são apresentados na Figura 5. Já na Figura 6 pode ser observada a estimativa da concentração inibitória mínima deste ácido ao se considerar apenas sua fração não dissociada nos diferentes valores de pH, calculadas através da equação de Henderson-Hasselbalch (Tabela 5).

Por fim, para o ácido propiônico, todos os isolados de *Penicillium* se comportaram da mesma forma (PR 06, PR 11, PR 67, IMI 217568, LMQA 03 e LMQA 05), semelhante ao ocorrido com ácido acético, porém esse gênero foi inibido a 512 mM em pH 6,0, equivalente a 35,74 mM de ácido não dissociado. As cepas de *Aspergillus* (AP 04, AP 05, AM 35 e AMA 02) e *Hyphopichia* (HB 08 e HB 17) se igualaram e a inibição ocorreu em 256 mM para o pH 6,0, correspondente a 17,86 mM da fração não dissociada.

No trabalho realizado por Moon et al. (2018), em concentrações de 0,5% de ácido propiônico no meio de crescimento, não foi constatado crescimento fúngico e para concentrações de 0,1 e 0,05%, as taxas de crescimento foram de 54,3% e 105,5% para *A. flavus*. Para Quattrini et al. (2018), o ácido propiônico obteve a concentração inibitória mínima de $1,3 \pm 0,2$ e $12,0 \pm 0,0$ mM para as cepas de *A. niger* e *P. roqueforti* respectivamente.

Figura 5 - Concentração Inibitória Mínima (mM) do ácido propiônico para isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.

Ácido propiônico

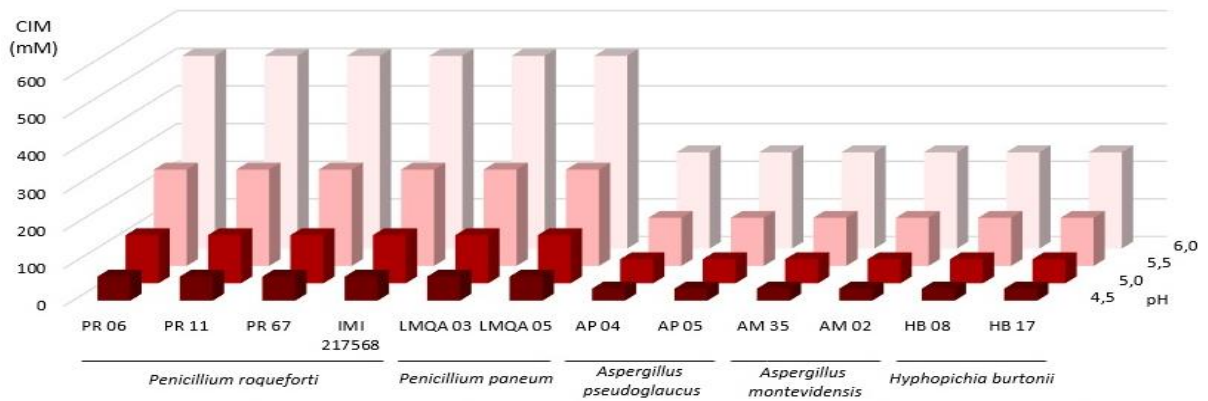


Figura 6 - Concentração Inibitória Mínima (mM) não dissociada estimada para o ácido propiônico frente aos isolados fúngicos deteriorantes de produtos de panificação conforme o pH.

Ácido propiônico

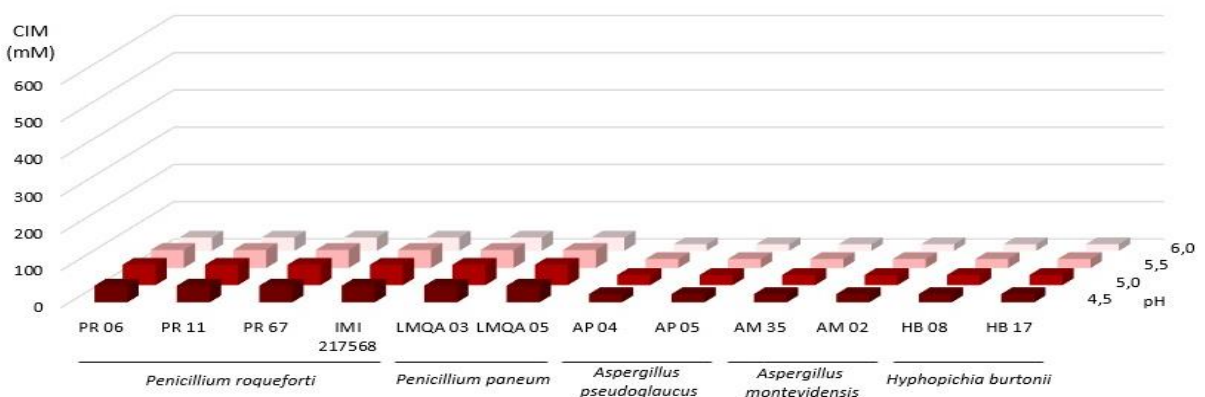


Tabela 5 – Concentração de ácido total e não dissociado nas principais concentrações testadas para o ácido propiônico.

ÁCIDO PROPIÔNICO

Concentração Total (mM)	Concentração Não Dissociada estimada (mM)				
	pH	4,5	5,0	5,5	6,0
16		11,2	6,87	3,04	1,12
32		22,4	13,7	6,08	2,23
64		44,8	27,5	12,2	4,47
128		89,6	54,9	24,3	8,93
256		179	109	48,6	17,9
512		358	219	97,3	35,7

Vale destacar que em geral, os gêneros fúngicos se comportaram de forma semelhante perante a inibição através de cada um dos ácidos, porém o ácido sórbico para o gênero *Penicillium* foi exceção nesse trabalho, visto que uma cepa de *P. roqueforti* se comportou similar às cepas de *P. paneum*, sendo mais sensível que as demais de *P. roqueforti*. Alcano et al. (2016), observou diferenças na sensibilidade entre as espécies analisadas, mas as cepas da mesma espécie não diferiram entre si. Já nesse trabalho um dos isolados de *P. roqueforti* não foi inibido nas mesmas concentrações quando em contato com o ácido sórbico. Esse isolado é oriundo de uma coleção de cultura e foi originalmente isolado de queijo Stilton e isso demonstra que alguns isolados fúngicos da mesma espécie podem ter diferença na sensibilidade devido à resistência adquirida ao longo do seu habitat.

Como já comentado anteriormente, a resistência do *P. roqueforti* foi observada em todos os ácidos testados neste trabalho. Quattrini et al. (2018) encontrou o ácido sórbico como o mais forte, seguido do propiônico e por fim o acético, exatamente como resultou nosso trabalho. Entretanto, a concentração inibitória mínima foi maior para *A. niger* do que para *P. roqueforti* apenas para o ácido sórbico (0,4 mM e 0,2 mM respectivamente), no ácido propiônico (1,3 mM; 12 mM respectivamente) e ácido acético (8,2 mM e 25 mM respectivamente) *A. niger* se demonstrou mais susceptível à ação dos ácidos. Porém, em nosso estudo foi necessário quantidades maiores de ácidos para fazer a inibição desses fungos.

Sendo assim, houve variação nas quantidades necessárias para a inibição dos fungos entre os ácidos acético, sórbico e propiônico para os diferentes gêneros; sendo o *P. roqueforti* o mais resistente frente aos três ácidos testados. Isso pode acontecer devido esses micro-organismos poderem se multiplicar após apresentar uma fase lag estendida (SUHR e NIELSEN, 2004; HARRIS et al., 1986). Porém, em geral, entre as diferentes cepas utilizadas das mesmas espécies não ocorreu diferenças na resistência, exceto apenas para uma cepa de *P. roqueforti* que se diferenciou das demais frente ao ácido sórbico, e ainda, dentre os gêneros testados, grande parte seguiu o mesmo sentido, a não ser *P. paneum* que diferiu também das outras três cepas de *P. roqueforti* também no ácido sórbico. Sabe-se que esta espécie apresenta resistência a concentrações de 0,3% de propionato de cálcio, o que significa uma alta concentração, sendo o principal conservante utilizado na indústria de panificação (HARRIS et al., 1986; SUHR & NIELSE, 2004).

Independente do ácido orgânico avaliado, a concentração inibitória mínima foi

mais baixa em valores mais baixos de pH, demonstrando a importância das moléculas não dissociadas para a atividade antifúngica destes compostos. Gerez et al. (2017) estudaram a inibição do crescimento de *Aspergillus niger* por propionato de cálcio e sorbato de potássio, observando uma relação direta entre os valores de pH e a concentração dessas substâncias.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, em geral, a cada aumento de 0,5 no valor de pH, a concentração utilizada do ácido necessitou ser dobrada para que ocorresse a inibição do fungo em questão, dados que corroboram com Alcano et al. (2016).

Em pH mais alto a capacidade de dissociação dos ácidos é menor, sendo menos efetivo no controle dos micro-organismos. Sendo assim, houve um aumento na quantidade necessária dos ácidos para inibir o crescimento dos isolados com o aumento dos valores de pH. No entanto, esses dados indicam que, quando se considera a quantidade do ácido adicionado, a concentração inibitória permanece aproximadamente constante pois a quantidade de moléculas de ácido não dissociadas diminui à medida que o pH aumenta (STRATFORD et al., 2009).

Assim como nos estudos de Guynot et al. (2002) e Kalai et al. (2017) onde também foi provado que a atividade de ácidos orgânicos para a inibição do crescimento fúngico depende do pH do meio, no presente estudo, em valores de pH de 4,5 e 5,0 foi observada que ocorreu a ação mais efetiva dos ácidos estudados, pois em valores de pH mais baixos foi utilizado uma menor quantidade de ácido para controlar o crescimento das cepas utilizadas nesta pesquisa. Inclusive, foi possível verificar que o ácido sórbico tem maior eficácia antifúngica em relação ao ácido propiônico e ácido acético, visto que em quantidades menores de ácido sórbico pode-se controlar o crescimento fúngico nas mesmas condições, mesmo o ácido acético e ácido sórbico apresentarem pKa semelhante 4,74 e 4,76.

No estado não dissociado, o efeito dos ácidos orgânicos está ligado à sua afinidade pelos lipídios, assim, o ácido é capaz de passar naturalmente pela membrana celular e essas moléculas se acumulam dentro do citoplasma, que por sua vez possui valores de pH próximos à neutralidade. Dentro do citoplasma, as moléculas são dissociadas em ânions e prótons carregados e não é mais possível passar pela camada lipídica, causando a redução do pH interno, inibindo o metabolismo, enzimas e causando perda de viabilidade e destruição celular (SALMOND, KROLL & BOOTH, 1984; GEREZ et al., 2017).

Estudos com ácido sórbico na inibição do metabolismo das leveduras, concluíram que na membrana ocorre a ação primária (REINHARD & RADLER, 1981), esses danos nas membranas podem ser a quebra celular, ação nas proteínas da membrana ou vazamentos causados pelo aumento da fluidez da membrana. Dessa forma é possível compreender o fato de que além de possuir maior controle da deterioração em comparação ao propionato, ele possui efeito inibitório na levedura do fermento, dessa forma, esses produtos são pulverizados após o cozimento. Já o propionato pode ser utilizado em produtos levedados e adicionado antes de seu cozimento, porém, em geral, o uso do sorbato em produtos de panificação pode dar menos efeito no sabor (GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016).

De acordo com essa teoria, os ácidos com valores semelhantes de pKa deveriam ter concentrações inibitórias também semelhantes, fato que não ocorreu no presente estudo. Porém, alguns ácidos, além da sua ação de acidificação citoplasmática, podem atuar diretamente na membrana celular como um inibidor específico do metabolismo e inibir a introdução de prótons no citoplasma celular, o que poderia ajudar a explicar a diferença na sensibilidade dos isolados fúngicos aos ácidos acético e sórbico, já que possuem o valor de pKa muito próximos (STRATFORD & ANSLOW, 1998).

Para Stratford et al. (2009), que estudaram a capacidade da mudança interna do pH das células fúngicas tratadas com ácido sórbico e ácido acético, o efeito sobre o pH interno na concentração inibitória é grande para o ácido acético, mas diminui à medida que o tamanho do ácido aumenta. Isso faz sentido visto que o ácido com maior concentração utilizada foi o ácido acético, seguindo temos o propiônico e por fim o sórbico com maior estrutura. Além disso, esse mesmo autor relaciona a mudança do pH interno com a hidrofobicidade de cada ácido, o coeficiente de partição lipofílico, para o ácido acético esse valor é -0,194, para o ácido propiônico 0,335 e ácido sórbico 1,514. Quanto maior o valor de lipofilicidade, mais solúvel a camada lipídica o ácido será, o que facilita a passagem da fração não dissociada pela membrana da célula que após a passagem se dissociará e terá ação contra o fungo.

Quando os ácidos foram adicionados em quantidades equimolares, de fato se observou a acidificação citoplasmática semelhantes, inclusive para outros ácidos alifáticos com pKa similar, como o propiônico, justificando a teoria conservadora do ácido fraco. Porém, quando na concentração alta de ácido acético necessária para inibir o crescimento, o pH interno foi de 4,7, o que propõe que a inibição pelo ácido

acético foi devido a redução do pH citoplasmático a um nível inibitório (STRATFORD et al., 2009).

Ainda segundo o estudo de Stratford et al. (2009), para o ácido sórbico, o pH foi menos afetado não sendo possível fazer a inibição dos fungos. Stratford e Anslow (1997) observaram que a inibição não depende de uma estrutura química específica e que sua eficácia como inibidor está ligada a hidrofobicidade.

Adicionalmente, o que também pode determinar a toxicidade dos ácidos e tolerância dos fungos por esses é o acúmulo de ânions tóxicos (EKLUND, 1985), o que também indicou um estudo utilizando ácidos orgânicos fracos como acético, láctico e cítrico em diferentes valores de pH sobre o crescimento e produção de ocratoxina A por *A. carbonarius* e *A. niger* em meios cultura realizado por Copetti et al. (2012). Resultados semelhantes foram encontrados por Alcano et al. (2016), que investigou a influência dos ácidos acético e sórbico sobre o crescimento de espécies de *Aspergillus* em diferentes valores de pH.

Alcano et al. (2016) concluíram que as concentrações de ácido acético foram até 50 vezes maiores que do ácido sórbico para a inibição fúngica. Stratford et al. (2009), observaram que as concentrações de ácido sórbico, em geral eram 30 vezes maiores ao ácido acético em relação ao ácido sórbico, estudando *Paecilomyces variotii* concluíram que o mesmo possuía maior resistência ao ácido acético e foi moderadamente sensível ao ácido sórbico resultando em 58 vezes mais resistência ao ácido acético do que o ácido sórbico, enquanto *Aspergillus phoenicis* foi apenas 14 vezes mais resistente. Nesse estudo foi observado que necessitou de 25 vezes mais ácido acético para a inibição nos mesmos valores de pH, exceto quando se tratou de *H. burtonii*, onde foi utilizado 100 vezes mais.

Não existem conservantes antimicrobianos com atividade suficiente em valores variados de pH, com exceção dos PARABENOS. Os ácidos orgânicos e seus sais, inibem adequadamente micro-organismos em pH 4 em concentrações de 2 a 6 mM, já para os acidulantes, são necessários níveis acima de 400 mM, como é o caso do ácido acético, porém possuem sabor forte e quando utilizados em grandes quantidades podem comprometer a palatabilidade do produto. Um método que pode ser utilizado é a combinação de acidulantes e ácidos orgânicos fracos ou seus sais a fim de intensificar contra a atividade antimicrobiana (GARCÍA-GARCÍA e SEARLE, 2016; DAGNAS et al., 2015), visto que muitos gêneros alimentícios possuem acidez intermediária.

Na Tabela 6 são apresentados os valores de pH dos diferentes pães analisados.

Tabela 6 – Valores de pH dos diferentes tipos de pães analisados e estimativa da porcentagem de moléculas não dissociadas e concentração inibitória mínima (CIM).

Tipo de pão	n	pH ($\bar{x} + dp$)	Ácido	% ácido não dissociado	CIM (ppm)
Pão caseiro	2	5,18 ± 0,04	Acético	27	28824
			Sórbico	27,5	2511
			Propiônico	33	13274
Pão de centeio integral	2	5,40 ± 0,02	Acético	18	33628
			Sórbico	19	3230
			Propiônico	23	17068
Pão de centeio linha integral light	3	5,36 ± 0,01	Acético	20,3	32427
			Sórbico	20	3050
			Propiônico	24,5	16120
Pão de forma sabor manteiga	3	5,27 ± 0,1	Acético	23	31226
			Sórbico	23,5	2870
			Propiônico	28,5	15171
Pão de forma sem lactose	4	5,22 ± 0,01	Acético	25	28824
			Sórbico	26	2510
			Propiônico	31	13274
Pão de forma zero	2	5,49 ± 0	Acético	15	36030
			Sórbico	16	3588
			Propiônico	19	18964
Pão de leite	2	5,22 ± 0,15	Acético	25	28824
			Sórbico	26	2509
			Propiônico	31	13272
Pão multi cereais linha integral light	2	5,36 ± 0,01	Acético	20,3	32427
			Sórbico	20	3050
			Propiônico	24,5	16120
Pão preto integral	2	5,39 ± 0	Acético	19	33628
			Sórbico	19	3229
			Propiônico	23	17067

n= número de amostras analisadas, \bar{x} = média, dp= desvio padrão, CIM= Concentração Inibitória Mínima.

Oliveira et al. (2011), encontrou um pH de 5,5 para o pão de forma, 5,36 no pão de forma de manteiga e 5,41 no pão de forma zero (com redução de açúcar e gordura trans), esses valores são semelhantes aos resultados obtidos neste trabalho, onde nos 9 pães com diferentes formulações, foi encontrado valores de pH entre 5,18 e 5,49. Nessas faixas de pH os ácidos orgânicos testados estariam em uma faixa de 15 a 33% de moléculas não dissociadas, dependendo do ácido. Tendo em vista que é essa fração não dissociada dos ácidos que terá efeito antifúngico, a porcentagem

encontrada nesses valores de pH é relativamente baixa para que se possa ter a inibição desses micro-organismos em menores quantidades de ácidos.

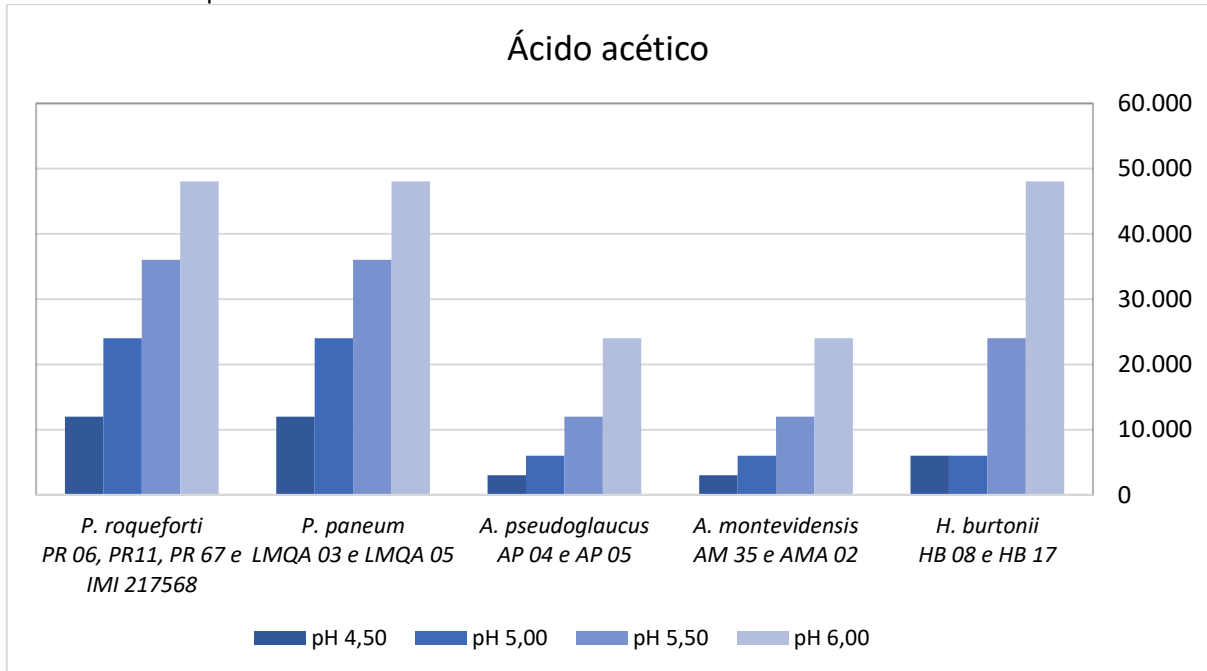
Nesse estudo, é importante destacar que o pão mais susceptível a deterioração foi o pão de forma zero, devido ser o valor mais alto de pH (5,49). Para a inibição de *P. roqueforti* foram necessários 600 mM de ácido acético, 32 mM de ácido sórbico ou 256 mM de ácido propiônico; para *A. pseudoglaucus* e *A. montevicensis* foram necessários 200 mM de ácido acético, 8 mM de ácido sórbico ou 128 mM de ácido propiônico para ambas as espécies desse gênero e ainda 400 mM de ácido acético, 4 mM de ácido sórbico e 128 mM de ácido propiônico para *H. burtonii*. Considerando que somente 15% das moléculas não estão dissociadas, embora sejam aplicados 32 mM do ácido sórbico para *P. roqueforti*, sendo o mais resistente, apenas 4,8 mM do ácido estaria agindo. No caso do ácido acético, dos 600 mM empregados, apenas 90 mM estariam ativos e ainda, para o ácido propiônico foram adicionados 256 mM sendo que 19% das moléculas eram não dissociadas, resultando em 61,44 mM.

Nas indústrias, normalmente são utilizadas combinações desses ácidos para a prevenção da deterioração causada por fungos, como o ácido acético, que devido a possuir pH muito ácido, pode ser utilizado na massa para aumentar a acidez e assim proporcionar melhores condições para outro ácido atuar, como o propiônico, devido a sua adição possivelmente ser feita na massa.

Porém, se levado em consideração a utilização desses ácidos isolados e ainda, se *in situ* esses micro-organismos possuírem comportamento semelhante aos observado *in vitro*, podemos perceber que entre os diferentes tipos de pães, devido a alteração dos valores de pH causados pelos ingredientes, a quantidade de ácido também deve ser diferenciada para cada tipo de pão.

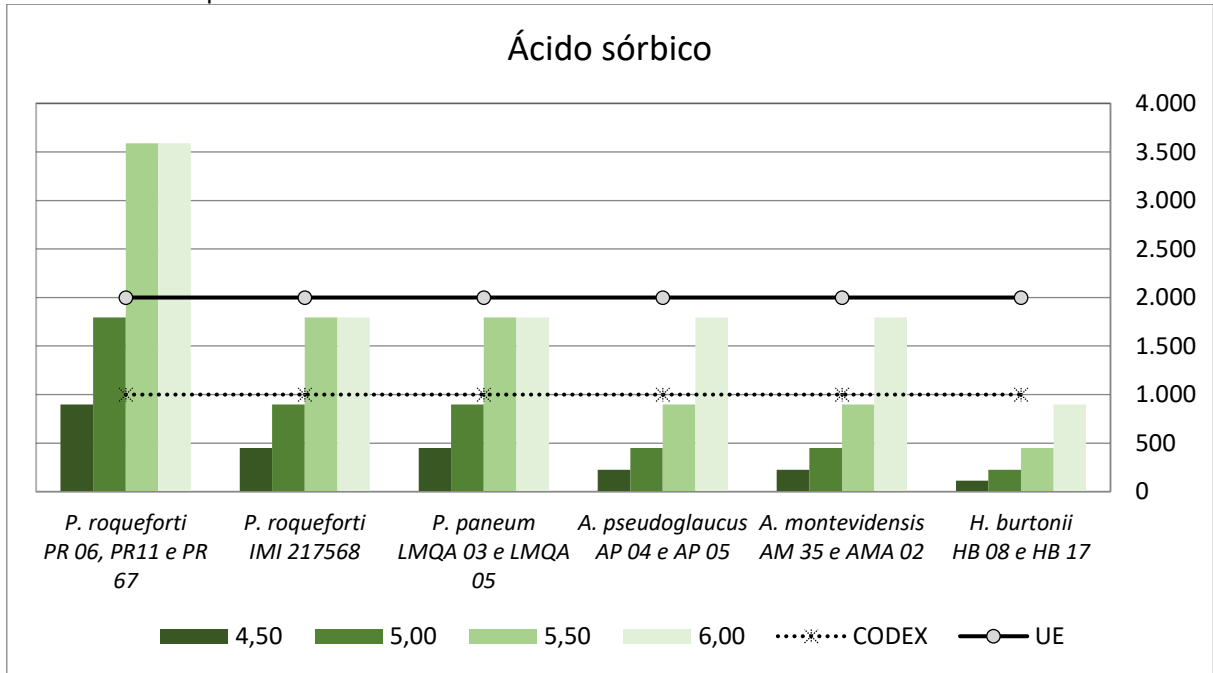
Segundo a RDC 45 da ANVISA (BRASIL, 2010), o ácido acético possui a denominação *quantum satis*, ou seja, não possui uma concentração máxima para sua utilização, desde que não descaracterize o produto. Na Figura 7 é possível verificar a quantidade de ácido em ppm que foi necessário adicionar para obter a inibição fúngica em cada pH para o ácido acético.

Figura 7 - Concentração total de ácido acético, em ppm, necessária para a inibição de fungos deteriorantes de pães.



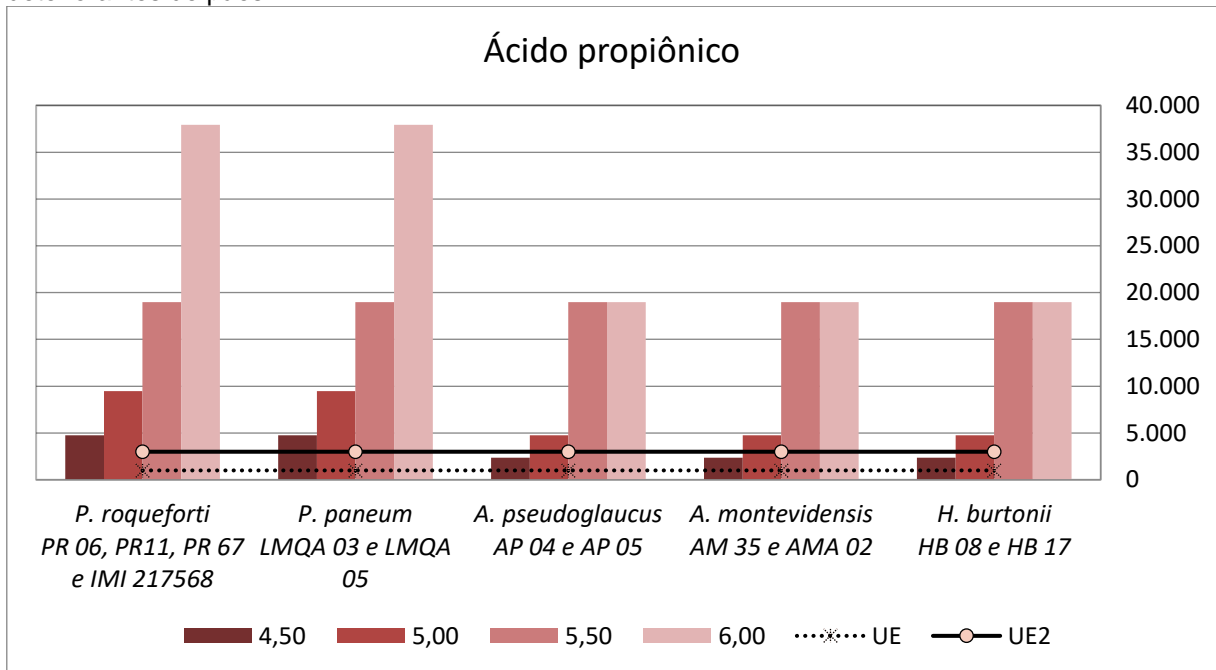
Segundo o *Codex Alimentarius* (2012) a dose máxima recomendada para produtos de panificação é de 1000 ppm para sorbatos, sendo a mesma quantificação que a Resolução nº 383 da ANVISA, o que equivale a 8,92 Mm (BRASIL, 1999). Porém a Comunidade Europeia (2011) é mais flexível, com um máximo permitido para pães é de 2000 ppm, o que é equivalente à 17,84 mM. Desse modo, considerando apenas a ação antifúngica do ácido sórbico, o efetivo controle do *P. roqueforti* somente seria alcançado se fosse utilizada a dose máxima permitida em pH 5,0 pois em meio mais ácido a quantidade de moléculas não dissociadas são maiores e em pH 5,5 este máximo de 2000 ppm seria extrapolado, como mostra a Figura 8. Em contrapartida, para as outras espécies fúngicas testadas, a inibição seria garantida com esses níveis de conservantes.

Figura 8 – Concentração total de ácido sórbico, em ppm, necessária para a inibição de fungos deteriorantes de pães.



Para o ácido propiônico, em pH 5,5, foram necessários 256 mM para a inibição de *P. roqueforti*, sendo que apenas 19% do ácido estaria na forma não dissociada (48,64 mM). Na legislação europeia (COMUNIDADE EUROPEIA, 2011), o máximo permitido é de 1000 a 3000 ppm, dependendo da formulação do pão em questão. Já a FAO e a RDC 45 da ANVISA (BRASIL, 2010), esses compostos não possuem limite máximo para sua utilização desde que não altere as características do produto onde aplicado. Levando em consideração 3000 ppm, que representa 40,49 mM, nenhum dos pH testados inibiu *P. roqueforti* em concentrações dentro do permitido pela legislação pois em pH 4,5, o menor testado foi necessário 64 mM, o que já ultrapassa o limite máximo, equivalendo a 4.741 ppm, como representado na Figura 9.

Figura 9 - Concentração total de ácido propiônico, em ppm, necessária para a inibição de fungos deteriorantes de pães.



Para as demais cepas testadas, a concentração de 128 mM foi suficiente para pH 5,5, porém também estaria fora do limite máximo. Entre os quatro níveis de pH, apenas em 4,5 seria possível inibir dentro dos limites estabelecidos, sendo 32 mM de ácido propiônico.

Há evidente resistência do *P. roqueforti* a estes três ácidos, e segundo esse estudo, os valores necessários para inibição fúngica, seriam superiores ao máximo permitido pela legislação em relação a essa espécie. Para os demais isolados analisados essas quantidades não seriam preocupantes, porém, existem estudos que comprovam que as doses inferiores à inibição podem potencializar a produção de micotoxinas (ALCANO et al., 2016), fato relevante pois além dos fungos analisados serem deteriorantes, o *P. roqueforti* pode produzir roquefortina A, B e C, ácido micofenólico e toxina PR (SUHR & NIELSEN, 2004; RUNDBERGET et al., 2004; RABHA & JHA, 2018).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse estudo foi possível observar variação na capacidade antifúngica dos conservantes testados. Porém, em geral, não foi observada variação na suscetibilidade de isolados fúngicos oriundos de produtos de panificação deteriorados pertencentes a uma mesma espécie.

Em relação aos fungos, observou-se que o gênero *Penicillium*, em especial *P. roqueforti*, foi mais resistente frente a todos os ácidos orgânicos testados.

O ácido sórbico apresentou maior atividade antifúngica e o ácido acético a menor, sendo necessárias altas concentrações deste ácido para que o crescimento fúngico fosse inibido. Para o ácido acético, *Hyphopichia* sp. foi mais resistente que *Aspergillus* sp; para ácido sórbico, *Hyphopichia* sp. foi mais sensível, e para o ácido propiônico foram inibidos nas mesmas concentrações.

Não houve diferença na suscetibilidade de *A. pseudoglaucus* e *A. montevicensis* ao serem confrontadas com os diferentes ácidos orgânicos avaliados (ácidos acético, propiônico e sórbico). Já para *Penicillium* sp., houve diferença visto que para o ácido sórbico as cepas de *P. roqueforti* isoladas de pães deteriorados foram mais resistentes que as de *P. paneum*, e o isolado de *P. roqueforti* oriundo de coleção de cultura, originalmente isolado de queijo.

Avaliando a legislação, a concentração inibitória do ácido sórbico foi efetiva dentro dos limites estipulados pela UE para os isolados estudados, exceto para as três cepas de *P. roqueforti* em pH 5,5 e 6,0. Se forem considerados os valores máximos recomendados pelo *Codex alimentarius*, o gênero *Penicillium* seria capaz de se desenvolver nos valores de pH 5,5 e 6,0; e o gênero *Aspergillus*, apenas no pH 6,0. Para o ácido propiônico, se considerados 3.000 ppm de acordo com a legislação europeia, apenas o gênero *Aspergillus* e *Hyphopichia* no pH 4,5 seriam inibidos, e se considerar 1.000 ppm do *Codex*, nenhum dos isolados seria inibido.

Para o ácido acético não há limites (*quantum satis*), porém as concentrações inibitórias necessárias poderiam afetar sensorialmente o produto; além de tecnologicamente, visto que poderá inibir as leveduras fermentativas.

Estudos avaliando o efeito combinado destes ácidos seriam relevantes para a área, assim como aqueles conduzidos em matriz alimentícia ou meios de cultura simulando a matriz complexa dos produtos de panificação.

BIBLIOGRAFIA

AANTREKKER, E. D. D; BOOM, R. M; ZWIETERING, M. H; SCHOTHORST, M. Quantifying recontamination through factory environments-a review. **International Journal of Food Microbiology**. v 80. p 117-130. 2 ed. 2003.

ALCANO, M. J; JAHN, R. C; SCHERER, C. D; WIGMANN, E. F; MORAES, V. M; GARCIA, M. V; MALLMANN, C. A., COPETTI, M. V. Susceptibility of *Aspergillus* spp. to acetic and sorbic acids based on pH and effect of sub-inhibitory doses of sorbic acid on ochratoxin A production. **Food Research International**. v 81. p 25-30. 2016.

ANDRADE, J. N; SALUSTIANO, V. C. Qualidade microbiológica do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos. **Higiene na Indústria de alimentos**. Saraiva: São Paulo. p 305-331. 2008.

BEBEAR, C; ROBERTSON, J. Determination of minimal inhibitory concentration. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma (Second Edition). **Diagnostic Procedures**. p 189-197. 1996.

BOYAVAL, P; CORRE, C. Production of propionic acid. v 75. p 453-461. 1995.

BRACEY, D; HOLYOAK, C; COOTE, P. Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH?. **Journal of Applied Microbiology**. v 85. n 6. p 1056-1066. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 1004 de 11 de dezembro de 1998. Aprova a atribuição de função de aditivo, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria carne s produtos cárneos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540 – SVS/MS de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, nº 04, de 24 de novembro de 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 383, de 5 de agosto de 1999a. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos: produtos de panificação e biscoitos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 387, de 5 de agosto de 1999b. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 5: balas, confeito, bombons, chocolates e similares.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 388, de 5 de agosto de 1999c. Aprova o uso de aditivos alimentares estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimento: sobremesa.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 33, de 9 de março de 2001a. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos: sopas e caldos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 34, de 9 de março de 2001b. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos: preparações culinárias industriais.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005a. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos: óleos e gorduras. Subcategoria: creme vegetal e margarina.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 24, de 16 de fevereiro de 2005b. Aprova o uso dos aditivos alimentares, estabelecendo suas funções, limites e veículos para suplementos vitamínicos e minerais.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 25, de 15 de fevereiro de 2005c. Aprova o uso dos aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e limites máximos para a categoria de alimentos: produtos proteicos. Subcategoria: bebidas não alcoólicas a base de soja.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007a. Atribuição de aditivos e seus limites máximos para a categoria de alimentos: bebidas não alcoólicas. Subcategoria: bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 60, de 5 de setembro de 2007b. Atribuição de aditivos e seus limites máximos para a categoria de alimentos: cereais e produtos de ou a base de cereais.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 64, de 17 de setembro de 2008. Atribuição de aditivos e seus limites máximos para a categoria de alimentos petiscos (snacks) subcategoria aperitivos a base de batatas, cereais, farinha ou amido (derivados de raízes e tubérculos, legumes e leguminosas) e sementes oleaginosas e nozes processadas, com cobertura ou não.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 28, de 26 de maio de 2009. Aprova a lista de aditivos alimentares com suas respectivas funções e limites máximos para geleias (de frutas, de vegetais, de mocotó e com informação nutricional complementar de baixo ou reduzido valor energético).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 56, de 4 de novembro de 2011. Aprova o uso de aditivos alimentares com suas respectivas funções e limites máximos para queijos petit suisse comercializados

no país.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 5 de 4 de fevereiro de 2013a. Aprova o uso de aditivos alimentares com suas respectivas funções e limites máximos para bebidas alcoólicas (exceto as fermentadas).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Diretório Colegiado RDC nº 8, de 6 de março de 2013b. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 386, regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções de 05 de agosto de 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 234, regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções de 09 de agosto de 2002.

BRUL, S; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**. v 15. n 50. p 1-17. 1999.

BURFOOT, D; BROWN, K; XU, Y; REAVELL, S. V. HALL, K. Localised air delivery systems in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**. v 11. p 410-418. 11 ed. 2000.

CODEX ALIMENTARIUS. Norma general para los aditivos alimentarios. 2016. Disponível em: http://www.fao.org/gsfonline/docs/CXS_192s.pdf. Acesso em: 16 fev. 2018.

CODEX STAN 192-1995. Codex alimentarius normativa GSFA. (Codex General Standard for Food Additives). Disponível em www.codexalimentarius.net. Acesso em: 1 mar. 2019.

COMUNIDADE EUROPEIA (2011). Regulamento 1129/2011 de 11 de novembro de 2011 que altera o anexo do Regulamento 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. Disponível em: http://www.consulai.com/newsletter/18/pdf/R_CE_1129_2011.pdf. Acesso em: 16 fev. 2018.

CONSERVANTES. Dossiê conservantes. Food Ingredients Brasil. n. 18. 2011. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/186.pdf>. Acesso: 6 de fevereiro de 2019.

COPETTI, M., IAMANAKA, B., MORORÓ, R., PEREIRA, J., FRISVAD, J., TANIWAKI, M. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**. v 155. p 158-164. 2012

CRAMER, J., PRESTEGARD, J. Studies of pH/induced transport of carboxylic acids across phospholipids vesicle membranes. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications. v 75. p 295-301. 1977.

DAGNAS, S; GAUVRY, E; ONNO, B; MEMBRE, J. Quantifying Effect of Lactic, Acetic, and Propionic Acids on Growth of Molds Isolated from Spoiled Bakery Products. **Journal of Food Protection**, v 78. n 9. p 1689–1698. 2015.

DAL BELLO, F; CLARKE, C. I; RYAN L. A. M; ULMER, H; SCHOBER, T. J; STRÖM, K; SJÖGREN, J; VAN SINDEREN, D; SCHNÜRER, J; ARENDT, E. K. Improving the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. **Journal of Cereal Science**. v 45. p 309-318. 2007.

EATON, D. C; GABELMAN, A. Fed-batch and continuous fermentation of *Selenomonas ruminantium* for natural propionic, acetic and succinic acids. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v 15. p 32-38. 1995.

EKLUND, T. The effect of sorbic acid and esters of para- hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. **Journal of General Microbiology**. v 131. p 73–76. 1985.

FERRANDA, C., FRANÇOISE, M., FRITSCHB, P., CASSANDC, P., SAINT DE BLANQUATA, P. Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid-amine reaction products. **Food Additives and Contaminants**. v 17. n 11. p 895-901. 2000.

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins – An update. **Journal of Stored Products Research**. v 71. p 22-40. 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. U.S. **Departament of Health and Human Services**. 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/gras/>>. acesso em: 3 de fevereiro de 2019.

FREESE, E; SHEU, C; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**. v 241. p 21–325. 1973.

GARCIA, M. V; BREGÃO, A. S. PARUSSOLO, G. BERNARDI, A. O. STEFANELLO, A; COPETTI, M. V. Incidence of spoilage fungi in the air of bakeries with different hygienic status. *International Journal of Food Microbiology*. v 290. p 254-261. 2019a.

GARCIA, M. V; PIA, A. K. R; FREIRE, L; COPETTI, M. V; SANT'ANA, A. S. Effect of temperature on inactivation kinetics of three strains of *Penicillium paneum* and *P. roqueforti* during bread baking. *Food Control*. v 96. p 456-462. 2019b.

GARCIA-GARCIA, R., SEARLE, S. S. Reference Module in Food Science: **Encyclopedia of Food and Health**. p 505–509. 2016.

GEREZ, C. L; BUSTOS, A. B; VALDEZ, G. F. Antifungal and antiochratoxigenic properties of chemical preservatives in/of bread. **Journal of Food Technology and Preservation**.1 (1). 2017

GUAN, N; LI, J; SHIN, H. D; DU, G; CHEN, J; LIU L. Metabolic engineering of acid resistance elements to improve acid resistance and propionic acid production of

Propionibacterium jensenii. **Biotechnology and Bioengineering**. v 113. p 1294-1304. 2016.

GURTLER, J. B. MAI, T. L. Traditional preservatives – Organic Acids reference module in food science. **Encyclopedia of food microbiology**. p 119-130. 2 ed. 2014

GUYNOT, M.E. RAMOS, A. J; SALA, D; SANCHIS, V; MARÍN, S. Combined effects of weak acid preservatives, pH and water activity on growth of *Eurotium* species on a sponge cake International Journal of Food Microbiology. v 76. Issues 1–2, 5. p 39-46. 2002.

HARRIS, N. D; KARAHADIAN, C; LINDSAY, R.C. Musty aroma compounds produced by selected molds and actinomycetes on agar and whole wheat bread. **Journal of Food Protection**. v 49. p 964-970. 1986.

KAGLIWAL, L. D. JADHAV, S. B. SINGHAL, R. S. KULKARNI, P. R. Permitted preservatives – propionic acid. Reference module in food science. **Encyclopedia of food microbiology**. p 99-101. 2 ed. 2014.

KALAI, S; ANZALA, L; BENSOUSSAN, M. DANTIGNY, P. Modelling the effect of temperature, pH, water activity, and organic acids on the germination time of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* conidia. **International Journal of Food Microbiology**. v 240. p 124-130. 2017.

KOUSSÉMON, M; COMBET-BLANC, Y; OLLIVIER, B. Glucose fermentation by Propionibacterium microaerophilum: effect of pH on metabolism and **bioenergetic**. **Current Microbiology**. v 46. p 141-145. 2003.

KREBS, H., WIGGINS, D., STUBS, M., SOLS, A., BEDOYA, F. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. **Biochemical Journal**, v. 214. p 657-663. 1983.

LEGAN, J. D. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v 32. p 33-53. 1-3 ed. 1993.

LEMOES, J. G; GARCIA, M. V; MELLO, R. O. COPETTI, M. V. Consumers complaints about moldy foods in a Brazilian website. **Food Control**. v 92. p 380-385. 2018.

LEON, A; SERNA, C; QUINTERO, E; GAMBA, R., DE ANTONI, G; GIANNUZZI, L. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. **Food Control**, v. 24, p.177-183. 2012.

LIU, Z; GE, Y; XU, J; GAO, C; MA, C; XU, P. Efficient production of propionic acid through high density culture with recycling cells of Propionibacterium acidipropionici. **Bioresource Technology**. v 216, p 856-861. 2016.

LUND, B., GEORGE, S., FRANKLIN, J. Inhibition of type A and type B (proteolytic) *Clostridium botulinum* by sorbic acid. **Applied and Environmental Microbiology**. v 53. p 935-941. 1987.

MARIN, S; ABELLANA, M; RUBINAT, M; SANCHIS, V; RAMOS, A. Efficacy of sorbates on the control of the growth of Eurotium species in bakery products with near

neutral pH. **International Journal of Food Microbiology**. v 87. p 251-258. 2003.

MOHAPATRA, D; KUMAR, S; KOTWALIWALE, N; SINGH, K. K. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. **Industrial Crops and Products**. v 108. p 162-182. 2017.

MOON, Y; KIM, H; CHUN, H. S. LEE, S. Organic acids suppress aflatoxin production via lowering expression of aflatoxin biosynthesis-related genes in *Aspergillus flavus*. **Food Control**. v 88. p 207-216. 2018.

OLIVEIRA, N. M. A. L; MACIEL J. F; LIMA A. S; SALVINO É. M; MACIEL C. E. P; OLIVEIRA, D. P. M. N; FARIAS, L. R. G. Características físico-químicas e sensoriais de pão de forma enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e carbonato de cálcio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v 70. p 16-22. 2011.

PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. **Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization**. Sydney. p 197. 2000.

PITT, J., HOCKING, A. Fungi and Food Spoilage. 3.ed. London, New York: Springer Dordrecht, Heidelberg. 2009.

POISSON, J. La microflore des farines. **La Meuni He Française**. v 314, p 10-19. 1975.

QUATTRINI, M; LIANG, N; FORTINA, M. G; XIANG, S; CURTIS, J. M; GÄNZLE, M. Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. **International Journal of Food Microbiology**. In Press, Corrected Proof. 2018.

RABHA, J; JHA, D. K. Metabolic Diversity of *Penicillium*. Chapter 12. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Gauhati University, Guwahati, Assam, India. **Stored Products Research**. v 71. p 22-40. 2017.

REINHARD, L; RADLER, F. The action of sorbic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. Effect on growth and on the aerobic and anaerobic metabolism of glucose. **Zeitschrift fur Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung**. v 172. p 278–283. 1981.

ROGERS, R. F; HESSELTINE, C. W. Microflora of wheat and wheat flour from six areas of the United States. **Cereal Chemistry**. v 55. p 889-898. 1978.
RUNDBERGET, T. SKAAR, I; FLÅØYEN, A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium*mycotoxins in food wastes. **International Journal of Food Microbiology**. v 90. Issue 2. p 181-188. 2004.

SALMOND, C., KROLL, R., & BOOTH, I. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**. v 130. p 2845–2850. 1984.

SAMSON, R. A; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: New taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**. v 49, 1-251. 2004

SAMSON, R. A; FRISVAD, J. C; HOEKSTRA, E. S. Introduction to food and fungi carried by air. 7th edition, **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Utrecht. 2004.

SANTOS, J. L. P; BERNARDI, A. O; MORASSI, L. L. P; SILVA, B. S; COPETTI, M. V; SANT'ANA A. S. Incidence, populations, and diversity of fungi from raw materials, final products and air of processing environment of multigrain whole meal bread. **Food Research International**. v 87. p 103-108. 2016.

SCHMIDT, M; HORSTMANN, S; COLLI, L. DE; DANAHER, M; SPEER, M; ZANNINI, E; ARENDT, E. K. Impact of fungal contamination of wheat on grain quality criteria. **Journal of Cereal Science**. v 69. p 95-103. 2016.

SMULDERS, F., GREER, G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: Prospects and controversies. In: **International Journal of Food Microbiology**. v 44. p 149-169. 1998.

SORBATOS: Os sorbatos na conservação de alimentos. **Aditivos e ingredientes**. Disponível em http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201601/2016010628577001453487283.pdf. acesso 5 de fevereiro de 2019.

STOWERS, C. C; COX, B.M; RODRIGUEZ, B. A. Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v 41. p 837-852. 2014.

STRATFORD, M., ANSLOW, P. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "weak acid" preservative. **Letters in Applied Microbiology**. v 27. p 203-206. 1998.

STRATFORD, M., EKLUND, T. Organic acids and esters. In: RUSSELL, N., GOULD, G., (Eds.), **Food Preservatives**, 2 ed. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

STRATFORD, M; PLUMRIDGE, A; NEBE-VON - CARON, G; ARCHER, D. B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**. v 136. n 1. p 37-43. 2009.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**. v 95. n 1. p 67-78. 2004.

SUREKHA, M; REDDY, S. M. Preservatives: Classification and Properties. Encyclopedia of Food Microbiology. **Reference Module in Food Science**. p 69-75. 2 ed. 2014.

TANIGUCHI. M., NAKAZAWA, H., TAKEDA, O., KANEKO, T., HOSHINO, K., TANAKA, T. Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co-culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*. In: **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v 62. p 1522-1527. 1998.

THERON, M., LUES, J. Organic acids and meat preservation: A review. **Food Reviews International**. v 23. p 141-158. 2007.

THOMAS, L; DELVES-BROUGHTON, JOSS. Permitted preservatives – sorbic acid.

Reference module in food science. **Encyclopedia of food microbiology**. p 102-107. 2 ed. 2014.

VILJOEN, C. R.; VON HOLY, A. Microbial populations associated with commercial bread production. **Journal of Basic Microbiology**. v 37. p 439-444. 6 ed. 1997.

WANG, X; SALVACHÚA, D; SÀNCHEZ, V; NOGUÉ, I; MICHENER, W. E; BRATIS, A. D. DORGAN, J. R. BECKHAM, G. T. Propionic acid production from corn stover hydrolysate by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnology for Biofuels**. v 10. p 200. 2017.

WANG, Z. SUN, J. ZHANG, A. YANG S. T. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, Wiley, Hoboken. **Propionic acid fermentation**. p 331-349. 2013.

WANG, Z; AMMAR, E. M; ZHANG, A; WANG, L; LIN, M; YANG, S. T. Engineering *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for enhanced propionic acid fermentation: effects of overexpressing propionyl-CoA: succinate CoA transferase. **Metabolic Engineering**. v 27. p 46-56. 2015.

WHO- World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. In WHO Technical Report Series, n.868, 1997. Disponível em: [HTTP://whqlibdoc.who.int/trs/Who_trs_868.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/Who_trs_868.pdf).

YANG, H; WANG, Z; LIN, M; YANG, S. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**. v 250. p 1-9. 2018.

ZÁRATE, G.; CHAIA, A. P. Influence of lactose and lactate on growth and β -galactosidase activity of potential probiotic *Propionibacterium acidipropionici*. **Anaerobe**. v 18. n 1. p. 25-30. 2012.

ZHANG, L; TAAL, M; BOOM, R. M; REEN, X. D; SCHUTYSER, M. A. I. Viability of *Lactobacillus plantarum* P8 in bread during baking and storage. **The 20th international drying symposium**. 2016.

ZHUGE, X; LIU, L; SHIN, H; LI, J; DU, G; CHEN, J. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy. **Bioresource Technology**. v 152. p 519-525. 2014.

ZHUGE, X; LIU, L; SHIN, H; LI, J; DU, G; CHEN, J. Improved propionic acid production with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by an oxidation-reduction potential-shift control strategy. **Bioresource Technology**. v 175. p 606-612. 2015.