

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

**SUSCETIBILIDADE DE *Aspergillus* sp. AOS ÁCIDOS
ORGÂNICOS CONFORME PH E A INFLUÊNCIA
DESTES SOBRE A PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

María de Jesús Alcano González

Santa Maria, RS, Brasil

2014

SUSCETIBILIDADE DE *Aspergillus* sp. AOS ÁCIDOS
ORGÂNICOS CONFORME PH E A INFLUÊNCIA DESTES
SOBRE A PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

María de Jesús Alcano González

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 de Alimentos**

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Alcano González, María de Jesús
SUSCETIBILIDADE DE *Aspergillus* sp. AOS ÁCIDOS
ORGÂNICOS CONFORME PH E A INFLUÊNCIA DESTES SOBRE A
PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A / María de Jesús Alcano
González.-2014.
74 p.; 30cm

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, 2014

1. Dissertação I. Venturini Copetti, Marina II. Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a dissertação de Mestrado

**SUSCETIBILIDADE DE *Aspergillus* sp. AOS ÁCIDOS
ORGÂNICOS CONFORME PH E A INFLUÊNCIA
DESTES SOBRE A PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A**

Elaborada por:
María de Jesús Alcano González

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Marina Venturini Copetti, Dr^a (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)

Sydney Hartz Alves, Dr (UFSM)

Juliane Welke, Dr^a (UFRGS)

Ana Flávia Furian, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 22 de agosto de 2014.

Dedico este trabalho a Deus em primeiro lugar e depois a minha família especialmente ao meu amor Felipe e a minhas sobrinhas Victoria e Isabella, pois eles são a fonte da minha
inspiração

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todo-poderoso;

A minha família especialmente a minha “mami”

A minha orientadora Marina Venturini Copetti e a todos meus companheiros de laboratório que me ajudaram de uma forma incondicional;

Aos meus professores, colegas, funcionários e amigos da UFSM.

Aos meus amados Carlos, Max e Luis;

Ao Professor Carlos Augusto Mallmann e a Fabiana Portela pela ajuda nas análises cromatográficas.

Especialmente agradeço a meus amigos: Ana Paula, Carine, Raquel, Catia, Silvia e Carlos Cavaleiro.

A Fundayacucho pelo financiamento;

Obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

SUSCETIBILIDADE DE *Aspergillus* sp. AOS ÁCIDOS ORGÂNICOS CONFORME PH E A INFLUÊNCIA DESTES SOBRE A PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

AUTORA: María de Jesús Alcano González
ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Marina Venturini Copetti
Santa Maria, 22 de Agosto de 2014.

O desenvolvimento de fungos em alimentos e a subsequente possibilidade de contaminação destes por micotoxinas constituem um problema de saúde pública. Dentre as micotoxinas mais importantes temos a ocratoxina A (OTA), com ação nefrotóxica e propriedades carcinogênicas. Diminuir a contaminação fúngica e conseqüentemente prevenir a formação desta toxina é a medida mais eficiente para reduzir a exposição dos seres humanos através da dieta. O uso de ácidos orgânicos como conservante em alimentos representa uma alternativa frente a este problema. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos ácidos acético, cítrico e sórbico sobre o crescimento de espécies do gênero *Aspergillus* em meio de cultura sob diferentes valores de pH, além de determinar a influência destes ácidos orgânicos na produção de OTA. Para avaliar a suscetibilidade dos isolados aos ácidos testados foi utilizado um arranjo fatorial com nove cepas de *Aspergillus*, quatro níveis de pH (4,5; 5,0; 5,5; e 6,0) e três tipos de ácidos nas concentrações: ácido acético (0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 mM), ácido cítrico (0; 50; 100; 200; 400 e 800mM) e ácido sórbico (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 mM). Os experimentos foram conduzidos em triplicata, incubados por seis dias. As concentrações inibitórias (CI) foram as menores concentrações de ácido testadas onde não houve crescimento fúngico. Para determinar a influência destes ácidos na produção de micotoxinas, utilizou-se um arranjo fatorial com dois fungos ocratoxigênicos (*A. carbonarius* e *A. niger*), dois valores de pH (4,5 e 5,0), sendo as concentrações de ácido as mesmas utilizadas para o ensaio de suscetibilidade. O experimento foi conduzido em duplicata, incubando-se por sete dias à 25 °C e determinando-se as CI para cada isolado selecionado-se para a análise de OTA os controles e duas concentrações abaixo da CI (ou seja, 0; 25 e 50% da CI). A quantificação da OTA foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Houve diferença quanto à sensibilidade das espécies testadas para os ácidos avaliados. *A. carbonarius*, *A. parasiticus* e *A. flavus* foram mais sensíveis aos ácidos acético e sórbico e os mais resistentes foram *A. niger* e *A. tubingensis* quando comparados com os demais isolados. Por outro lado, o ácido cítrico não exibiu poder antifúngico importante. Foi verificada uma relação direta entre os valores de pH e a concentração inibitória observou-se, de maneira geral, que a cada acréscimo de 0,5 no valor de pH dobram as concentrações de ácido acético e sórbico necessárias para inibir o crescimento de um mesmo isolado. Também foi observado que dosagens sub-letais de ácido sórbico além de não impedirem o crescimento fúngico podem estimular a produção de OTA em isolados de *A. carbonarius* e *A. niger*. Demonstra-se assim a importância de se considerar tanto o pH quanto as espécies fúngicas predominantes no produto ao se calcular a dosagens destes ácidos a ser aplicada para garantir a estabilidade dos alimentos frente à deterioração fúngica e segurança toxicológica.

Palavras-chave: Micotoxina, ácido acético, ácido sórbico, ácido cítrico, CLAE.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduation Program on Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

SUSCEPTIBILITY OF *Aspergillus* sp. TO ORGANIC ACIDS ACCORDING TO PH AND THEIR INFLUENCE ON OCHRATOXIN PRODUCTION

AUTHOR: MARÍA DE JESÚS ALCANO GONZÁLEZ
ADVISOR: MARINA VENTURINI COPETTI

August 22nd, 2014, Santa Maria, RS, Brazil

Fungal growth on food and subsequent contamination with mycotoxins is a public health problem. Ochratoxin A (OTA) is a important mycotoxin, with nephrotoxic effects and carcinogenic properties. Decreasing the fungal contamination and consequently preventing toxin development is the most efficient action to reduce human exposure through the diet. The use of organic acids as preservatives in foods is an excellent alternative. The aim of this study was to investigate the influence of acetic, citric and sorbic acid on the growth of *Aspergillus* species at different acidic pH values, and the influence of these organic acids on OTA production. To evaluate the susceptibility of the isolates in the analyzed acids a factorial arrangement was used with nine fungi, four pH levels (4.5, 5.0, 5.5, and 6.0) and three types of acids in different concentrations: acetic acid (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 and 800mm), citric acid (0, 50, 100, 200, 400 and 800mm) and sorbic acid (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 and 32mm). The experiments were incubated for six days and conducted in triplicate. The inhibitory concentrations (IC) were the lowest acid concentration tested where the fungi was not able to grow. To determine the influence of these acids on mycotoxin production, a factorial arrangement was used with two fungi (*A. carbonarius* and *A. niger*) and two pH (4.5 and 5.0). The acid concentrations were the same as those used in the susceptibility experiments. The experiment was carried out in duplicate by incubation for seven days at 25°C for the determination of IC for each isolate. Controls and two concentrations below the IC (0, 25 and 50% IC) were selected for the analysis of OTA. OTA quantification was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Differences were found on the sensitivity of the species tested between the analyzed acids. *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. carbonarius* were more sensitive to acetic and sorbic acids whereas *A. niger* and *A. tubingensis* were the most resistant. A direct correlation between pH and the inhibitory concentration was observed. Generally, for every increase in pH by 0.5 the level of acetic acid and sorbic acid required to inhibit the growth of the same isolate doubled. In the other side, citric acid did not show an important antifungal power. It was also observed that sub-lethal dosages of sorbic acid did not prevent fungal growth, and in addition can stimulate the production of ochratoxin A on *A. carbonarius* and *A. niger* isolates. The result shows the importance of considering both the pH and the predominant fungal species in the product, when calculating the acid dosages for prevention of fungal food spoilage.

Keywords: Mycotoxin, acetic acid, sorbic acid, citric acid, HPLC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Limites máximos (mg/kg ou mg/L) do ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio, permitidos em alimentos.	23
Tabela 2- Isolados do gênero <i>Aspergillus</i> utilizados nos experimentos, conforme identificação, origem e capacidade de produzir ocratoxina A.	28
Tabela 3- Variação na porcentagem de moléculas não dissociadas de cada ácido orgânico em função do pH.	34
Tabela 4- Concentração de ácido cítrico necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero <i>Aspergillus</i> e estimativa de moléculas não dissociadas no pH alcançado após a adição do ácido.	35
Tabela 5- Concentração de moléculas ácido cítrico não dissociado, segundo o pH, para cada uma das concentrações testadas nos experimentos.	37
Tabela 6- Concentração de ácido acético necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero <i>Aspergillus</i> e estimativa de moléculas não dissociadas no pH alcançado após a adição do ácido.	38
Tabela 7- Concentração de moléculas de ácido acético não dissociado, segundo o pH, para cada uma das concentrações testadas nos experimentos.	40
Tabela 8- Estimativa da concentração inibitória mínima (CIM) calculada de ácido acético não dissociado para isolados do gênero <i>Aspergillus</i> conforme o pH.	41
Tabela 9- Estimativa da concentração inibitória mínima (calculada) de ácido acético necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero <i>Aspergillus</i> .	43
Tabela 10- Concentração de ácido sórbico necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero <i>Aspergillus</i> e estimativa de moléculas não dissociadas no pH alcançado após a adição do ácido.	44

Tabela 11- Concentração de moléculas de ácido sórbico não dissociado, segundo o pH, para cada uma das concentrações testadas nos experimentos	46
Tabela 12- Estimativa da concentração inibitória mínima (CIM) calculada de ácido sórbico não dissociado para isolados do gênero <i>Aspergillus</i> conforme o pH.	47
Tabela 13- Estimativa da concentração inibitória mínima (calculada) de ácido sórbico para isolados do gênero <i>Aspergillus</i> .	48
Tabela 14- Área segundo a concentração de ocratoxina A usados para a construção da curva de calibração.	50
Tabela 15- Relação entre as variáveis espécie fúngica, pH e concentração de ácido cítrico na produção de ocratoxina A, de acordo com a análise de variância.	53
Tabela 16- Relação entre as variáveis espécie fúngica, pH e concentração de ácido acético na produção de ocratoxina A, de acordo com a análise de variância.	54
Tabela 17- Concentração inibitória, de ácido sórbico, para os fungos <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus niger</i> quando cultivados em meio de cultura YES.	55
Tabela 18- Relação entre as variáveis espécie fúngica, pH e concentração de ácido sórbico na produção de ocratoxina A, de acordo com a análise de variância.	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Deterioração dos alimentos ocasionada por fungos filamentosos	15
2.2 Ocorrência e detecção da ocratoxina A em alimentos	17
2.3 Fungos produtores de ocratoxina A	18
2.4 Toxicidade da ocratoxina A e riscos para a saúde	19
2.5 Aspectos regulatórios e legislação para micotoxinas.....	19
2.6 Controle da deterioração dos alimentos com ácidos orgânicos	20
2.6.1 Ácido Acético.....	21
2.6.2 Ácido Cítrico	21
2.6.3 Ácido Sórbico.....	21
2.7 Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos	24
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Locação dos experimentos.....	28
4.2 Materiais	28
4.2.1 Isolados.....	28
4.2.2 Ácidos orgânicos	29
4.3 Multiplicação dos fungos	29
4.4 Preparação do inóculo	29
4.5 Concentrações de ácido testadas	29
4.6 Avaliação da suscetibilidade fúngica aos ácidos orgânicos	30
4.6.1 Sem controle do pH	30
4.6.2 Com ajuste de pH	30
4.7 Cálculo da fração dissociada e não dissociada do ácido	31
4.8 Determinação da influência dos ácidos orgânicos sobre a produção de ocratoxina A em diferentes condições de pH.....	31
4.8.1 Extração	32
4.8.2 Parâmetros de CLAE.....	32
4.8.3 Curva padrão	33

4.9 Análise estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Cálculo da fração dissociada e não dissociada do ácido para os pH testados	34
5.2 Avaliação da suscetibilidade fúngica aos ácidos orgânicos	34
5.2.1.1 Ácido cítrico, sem controle do pH.....	34
5.2.1.2 Ácido cítrico, com ajuste de pH	35
5.2.2.1 Ácido acético, sem controle do pH.....	37
5.2.2.2 Ácido acético, com ajuste de pH	38
5.2.3.1 Ácido sórbico, sem controle do pH	43
5.2.3.2 Ácido sórbico, com ajuste de pH.....	44
5.3 Determinação da influência dos ácidos orgânicos em diferentes condições de pH sobre a produção de ocratoxina A	50
5.3.1 Curva padrão	50
5.3.2 Ácido cítrico	51
5.3.3 Ácido acético	53
5.3.4 Ácido sórbico.....	55
6. CONCLUSÃO.....	60
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
8. BIBLIOGRAFIA	63

1. INTRODUÇÃO

Os fungos estão presentes em toda a cadeia produtiva dos alimentos, e o desenvolvimento destes micro-organismos pode acontecer tanto nas etapas de produção e processamento primário, quanto na estocagem (KUIPER-GOODMAN, 1994).

A contaminação por fungos nos alimentos resulta em perdas de qualidade, alterando a cor, odor, sabor e aspecto (ANDERSEN; THRANE, 2006). Em geral as hifas se desenvolvem profundamente na massa dos alimentos, embora em geral as colônias somente sejam observadas visualmente na superfície. Isto se deve ao maior aporte de oxigênio que permite a formação de esporos fúngicos, sendo estes os responsáveis pela coloração da colônia, uma vez que em geral as hifas são hialinas (FRISVAD; SAMSON, 1991).

Além das perdas de qualidade dos alimentos pela contaminação fúngica um fator importante que deve ser levado em consideração é a possibilidade destes fungos, formarem micotoxinas (VAN EGMOND; SPEIJERS, 1999).

O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas exhibe uma grande relevância sobre a saúde pública mundial (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MARAGOS, 2009). Provocando a rejeição das *commodities* contaminadas, o que afeta a economia de países exportadores. Existe um grande número de micotoxinas conhecidas, sendo as mais relevantes as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos (desoxinivalenol, nivalenol e HT2-toxina), zearalenona e fumonisinas (CHARMELEY et al., 1994). Dentre estas, a ocratoxina A representa um perigo para a saúde da população já que pode ser encontrada em inúmeras matérias-primas destacando-se a presença desta em produtos alimentícios como: cereais, café, cacau, frutas secas e vinho (JEFCA, 2001).

Na atualidade são procuradas estratégias de produção e conservação de alimentos que permitam evitar, prevenir ou reduzir a contaminação fúngica e, conseqüentemente a contaminação com micotoxinas. Uma das estratégias de conservação mais destacadas é a aplicação de conservantes, estes são usados para prevenir ou retardar a deterioração química ou biológica dos alimentos, aumentando substancialmente a sua vida útil. Eles retardam ou interrompem as perdas nutricionais devido a alterações microbiológicas, enzimáticas ou químicas dos alimentos. Estes também podem reduzir os riscos relacionados ao consumo, de alimentos contaminados com toxinas microbianas ou micro-organismos patogênicos e perdas econômicas devido à deterioração (DAVIDSON, 1997). No entanto, na prática, a maioria das

estratégias de conservação dos alimentos estão focadas no controle da deterioração ocasionada por bactérias, deixando aos fungos praticamente sem competidores e em condições facilmente superáveis por estes.

Por outro lado, a demanda dos consumidores por produtos naturais tem aumentado significativamente, o que implica na diminuição ou eliminação do uso de conservantes sintetizados quimicamente pela indústria de alimentos (BRUL; COOTE, 1999). Desta maneira os ácidos orgânicos, também conhecidos como ácidos fracos, constituem na maioria dos casos uma importante alternativa para o controle da deterioração fúngica e bacteriana, dado que a maioria destes ácidos são obtidos a partir de plantas e do metabolismo microbiano (CURRIE, 1917; LUCK, 1976).

Em função do status de muitos dos ácidos orgânicos de GRAS (*Generally Recognized as Safe* = Geralmente Reconhecido como Seguro) pela “American Food and Drug Administration” (FDA), o uso deles como aditivos para o controle da contaminação microbiana em alimentos e matérias primas para humanos e animais tem se destacado (RICKE et al., 2003). Porém, é de conhecimento que a eficiência antimicrobiana dos ácidos orgânicos é dependente de uma grande série de fatores como constante de dissociação do ácido; atividade de água, temperatura de estocagem dos alimentos, etc (CHAVEERACH et al., 2002), o coeficiente de partição do ácido ($c\text{Log}P_{\text{oct}}$) (STRAFORD et al., 2009). O pH é o fator mais importante que deve ser levado em consideração dado que dependendo do pH o ácidos orgânicos serão efetivos no controle da deterioração dos alimentos ou não (LUND et al., 1987).

Porém é de conhecimento que para determinar a efetividade de um determinado conservante deverão ser feitos testes de suscetibilidade dos diversos micro-organismos contaminantes de alimentos a fim de determinar as concentrações necessárias para controlar o crescimento destes. Apesar do amplo uso dos ácidos orgânicos como conservantes não foram encontradas metodologias padronizadas para a determinação das concentrações inibitórias de ácidos orgânicos necessária para o controle da deterioração fúngica ou bacteriana, diferentemente da área de micologia médica onde os testes são amplamente regulamentados por diversos protocolos.

Outro aspecto que tem sido estudado com pouco rigor é a influência dos ácidos orgânicos na produção de toxinas, havendo indícios que o ácido sórbico utilizado em dosagens sub-letais poderia estimular ao metabolismo fúngico, elevando a produção de toxinas por algumas espécies. Sendo extremamente necessário continuar as pesquisas nesta área com o propósito de garantir a segurança alimentar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Deterioração dos alimentos ocasionada por fungos filamentosos

Um grande número de pesquisas têm comprovado a participação constante e marcante de fungos ao longo da cadeia produtiva de alimentos, que por serem mais versáteis que as bactérias na superação de condições de estresse como aquelas induzidas por baixa umidade e pH, conseguem deteriorar uma ampla variedade de produtos tanto nas etapas de produção e processamento primário, quanto na estocagem (KUIPER-GOODMAN, 1994). Dentre os principais gêneros de fungos que causam deterioração em alimentos temos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (PITT; HOCKING, 2009).

A deterioração por fungos filamentosos pode ocasionar a alteração na textura e/ou sabor dos alimentos devido à secreção de uma ampla variedade de enzimas e outros produtos oriundos de seu metabolismo, e em alguns casos a formação de micotoxinas (VAN EGMOND; SPEIJERS, 1999).

Embora tenha havido grande progresso no estudo de aspectos de deterioração dos alimentos causada por bactérias, o papel de fungos e leveduras não foi estudado com igual rigor. Até algumas décadas atrás os fungos presentes em alimentos eram tratados simplesmente como “bolores” e o reconhecimento de um determinado gênero ou espécie era geralmente considerado desnecessário (WILLIAMS et al., 2006).

Entretanto, o que modificou substancialmente a atitude do homem frente à contaminação fúngica dos alimentos foi a descoberta de que muitos dos fungos contaminantes de alimentos eram capazes de produzir substâncias tóxicas, as micotoxinas (VAAMONDE et al., 2003). Essa modificação da atitude do homem frente aos riscos que representa a ingestão de alimentos contaminados por fungos se tornou ainda mais acentuada desde a descoberta da aflatoxina, em 1960 (PITT, 1996).

De acordo com uma definição de Pitt; Hocking (2009), as micotoxinas são metabólitos fúngicos cuja ingestão, inalação ou absorção cutânea reduz o desempenho, ocasiona doença ou causa a morte de animais, aves e seres humanos. A gravidade dos seus efeitos depende, entre outros fatores, da sua toxicidade, do grau e do tempo de exposição, da idade e do estado nutricional do indivíduo.

As micotoxinas ocorrem nos alimentos e rações, e são produzidas sob condições específicas, no campo, no período pós-colheita, durante armazenamento, processamento e distribuição. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), estima-se que 25% das culturas possam estar contaminadas com micotoxinas, gerando perdas na produção agrária, custos veterinários e de saúde, sendo praticamente impossível quantificar com exatidão as perdas econômicas ocasionadas pelas mesmas (ALMEIDA et al., 2007; KRŠKA, 2009).

O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas tem sido correlacionado com várias patologias humanas, tendo os rins, o fígado e o sistema imunológico como os principais alvos dessas doenças, apresentando uma grande relevância sobre a saúde pública mundial (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MARAGOS, 2009).

É de entendimento que as micotoxinas não são um problema restrito apenas a países em desenvolvimento, devido ao comércio mundial com circulação de produtos alimentícios entre os continentes. Porém atinge majoritariamente os países produtores, afetando o agronegócio, restringindo as exportações e comprometendo dramaticamente a produção agrícola (CHARMELEY et al., 1994).

Já são conhecidas na atualidade mais de quatrocentas micotoxinas, produzidas por aproximadamente uma centena de fungos. Porém são cinco as micotoxinas consideradas econômica e toxicologicamente importantes: aflatoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*; ocratoxinas produzidas por *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e espécies análogas, tricotecenos (desoxinivalenol, nivalenol e HT2-toxina), zearalenona e fumonisinas estas últimas produzidas por diversas espécies de *Fusarium* (CHARMELEY et al., 1994).

A ocratoxina A é um composto cristalino incolor; cuja denominação segundo a IUPAC (União Internacional da Química Pura e Aplicada) é (R)-N-((5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil)-L-fenilalanina (HARRIS; MANTLE, 2001; BENNETT, 2003). O que confere a toxicidade deste composto químico é a molécula de cloro que possui na sua estrutura (BULLERMAN, 2003; BAYMAN; BAKER, 2006). E esta molécula é incorporada nos últimos passos da biossíntese por uma cloroperoxidase embora exista muita informação sobre as várias propriedades tóxicas de ocratoxina A, ao contrário de outras micotoxinas importantes, não se sabe muito sobre a sua via biossintética (HARRIS; MANTLE, 2001).

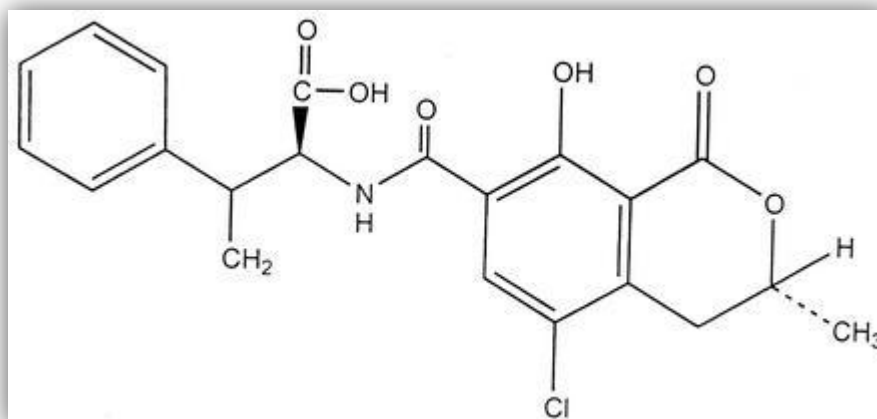


Figura 1-Estrutura da Ocratoxina A.
Fonte: Bennett, (2003).

2.2 Ocorrência e detecção da ocratoxina A em alimentos

Para a detecção da ocratoxina A, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de fluorescência é a técnica mais utilizada devido à fluorescência natural desta toxina (VARGAS et al., 2005).

A ocratoxina A tem sido detectada em inúmeras matérias-primas vegetais, tanto no Brasil quanto no exterior, havendo restrições crescentes com relação à sua presença em alimentos (ALMEIDA et al., 2007).

Dentre essas matérias primas, tem-se o trigo, cevada, aveia, centeio (MAGNOLI et al., 2007), especiarias (PATEL et al., 1996), produtos de milho (SEKIYAMA et al., 2005), vinho e suco de uva (ZIMMERLI; DICK 1996), cacau (COPETTI et al., 2010) e café (PRADO et al., 2000; PATERSON et al., 2014).

As principais fontes de exposição humana à ocratoxina A através da dieta vêm do consumo de cereais (58%), vinho (21%), suco de uva (7%), café (5%) e carne de suínos (3%) (JEFCA, 2001).

2.3 Fungos produtores de ocratoxina A

A ocratoxina A foi descrita pela primeira vez por Merwe (1965), como um metabólito de *Aspergillus ochraceus* e posteriormente, foi detectada como metabólito de diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Há mais de 20 espécies do gênero *Aspergillus* produtoras de ocratoxina; no entanto, poucas delas são conhecidas como fonte de contaminação de ocratoxina A em alimentos (SAMSON et al., 2004).

Em regiões tropicais, espécies de *Aspergillus* são as principais responsáveis pela contaminação dos alimentos pela ocratoxina A, e em regiões de clima temperado, predomina a produção por *Penicillium verrucosum* (PITT; HOCKING, 2009). Dentre as espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A temos na section *Nigri* *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus lacticoffeatus* e *Aspergillus sclerotioniger* (SAMSON et al., 2004); na section *Circumdati* temos *Aspergillus flocculosus*, *Aspergillus neopetromyces*, *Aspergillus muricatus*, *Aspergillus roseoglobulosus*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus cretensis*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus pseudoelegans*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus persii* e *Aspergillus petrakii* e na section *Flavi*, *Aspergillus alliaceus* (FRISVAD et al., 2004; PITT; HOCKING, 2009).

O gênero *Aspergillus* possui ampla importância na microbiologia alimentar, como produtor de metabólitos úteis onde é utilizado na produção de enzimas (amilases, lipases e maltases), ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido glucônico) e álcool (etanol).

Muitos dos isolados de *A. niger* foram classificados com status de GRAS pela “Food and Drug Administration” do Governo dos Estados Unidos da América, no entanto a descoberta de Abarca et al. (1994) que isolados de *A. niger* podiam produzir ocratoxina gerou uma grande preocupação na indústria biotecnológica. Porém esta controvérsia ficou esclarecida quando foram analisadas as cepas utilizadas industrialmente e todas foram incapazes de produzir a referida toxina (Schuster et al., 2002).

As porcentagens de cepas de *A. niger* ocratoxigênicas diferem entre os relatos de autores. Varga et al. (2000) reportaram que cerca de 6% de cepas de *A. niger* isoladas de café verde eram produtoras de ocratoxina A. Já em estudos posteriores mais amplos Perrone et al. (2007) demonstraram que 10 a 15% dos isolados de *A. niger* possuíam esta capacidade. Por outro lado *A. carbonarius*, outra espécie da section *Nigri*, mostra um maior potencial ocratoxigênico quando comparado com *A. niger*, tanto na porcentagem de espécies produtoras

(95 a 100%) quanto nos valores de ocratoxina A produzidos (SAMSON et al., 2007; PERRONE et al., 2007).

2.4 Toxicidade da ocratoxina A e riscos para a saúde

A ocratoxina A é considerada nefrotóxica com propriedades carcinogênicas, imunossupressoras e teratogênicas; é suspeita de provocar o desenvolvimento de tumores no trato urinário e danos ao rim, sendo classificada pelo IARC (1993) como um possível carcinógeno para humanos (classe 2B); no entanto a genotoxicidade da ocratoxina A permanece ainda em controvérsia (EFSA, 2006).

Os principais efeitos tóxicos da ocratoxina A parecem estar relacionados à capacidade de inibir a síntese proteica, competindo com a fenilalanina na reação catalisada pela fenilalanil tRNA sintetase e outros sistemas que exigem esse aminoácido. Além disso tem sido relatado o aumento da peroxidação lipídica, levando a um maior dano celular e mitocondrial (DIRHEIMER, 1996).

Dentre as propriedades mais importantes da ocratoxina A encontra-se a sua elevada afinidade pelas proteínas do plasma. Esta união é fundamental para a persistência da toxina no sangue e, por conseguinte, pela toxicidade. A percentagem de toxina ligada às proteínas é muito elevada na maioria dos casos, o que significa que, em quase todas as espécies estudadas, incluindo o homem, a fração livre é inferior a 0,2% (DELACRUZ; BACH, 1990; GALTIER, 1991).

Uma correlação entre a carcinogenicidade e exposição à ocratoxina A não foi estabelecida em humanos. No entanto, a correlação tem sido descrita entre alta exposição à ocratoxina A e a etiologia de NEB (Nefropatia Endêmica dos Bálcãs). Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez no final de 1950; sendo classificada como uma doença endêmica que ocorre geralmente em regiões rurais de Croácia, Bósnia, Herzegovina, Sérvia, Romênia e Bulgária, a doença consiste em uma insuficiência renal crônica bilateral e frequentemente associada com uroteliomas e carcinoma renal (BOZIC et al., 1995).

2.5 Aspectos regulatórios e legislação para micotoxinas

Em virtude dos riscos associados à saúde associados a ingestão de micotoxinas, instituições e organizações nacionais e internacionais, como a Comissão Europeia,

Organização Mundial de Saúde e a FAO, têm estabelecido limites regulatórios em produtos alimentícios para as principais classes de micotoxinas (BERG, 2003; KRŠKA, 2009).

Recentemente foi promulgada no Brasil a RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, que estabeleceu o limite máximo tolerado (LMT) para 11 micotoxinas em diferentes tipos de alimentos, prevendo a redução nos LMT de algumas micotoxinas até 2016 e inclusão de um número maior de alimentos. Nesta regulação acima mencionada o LMT estabelecido para ocratoxina A foi de 20 µg/kg em cereais (BRASIL, 2011). Nos anos anteriores a esta regulação, não existia no Brasil limite estabelecido para ocratoxina A, deixando a população desprotegida quanto à ingestão desta toxina.

2.6 Controle da deterioração dos alimentos com ácidos orgânicos

Ressalta-se que a redução da contaminação fúngica e, conseqüentemente, prevenção da formação da ocratoxina A nas etapas de produção é a medida mais eficiente para minimizar a exposição dos seres humanos através da dieta desta toxina isso devido a inexistência de métodos capazes de eliminá-la adequadamente depois que esta se encontra contaminando os alimentos (KUIPER-GOODMAN, 1994).

Dentre as estratégias para evitar a contaminação fúngica e ao mesmo tempo prevenir a produção de micotoxinas, destaca-se o uso de conservantes sintetizados quimicamente. Por outro lado, existe uma demanda crescente dos consumidores por alimentos isentos deste tipo de conservantes (BÉGIN; VAN CALSTEREN, 1999), restando poucas alternativas para controlar este problema. Os ácidos orgânicos representam uma alternativa ante esta necessidade, dado que estes na sua maioria são obtidos a partir de plantas e micro-organismos. Estes são agentes conservantes comumente empregados em alimentos, em função de sua classificação de GRAS, o uso deles como aditivos empregados para o controle da contaminação microbiana em alimentos e matérias primas para humanos e animais tem se destacado (RICKE et al., 2003).

Na categoria de GRAS encontram-se vários ácidos destacando os ácidos acético e cítrico, estes podem ser adicionados em doses denominadas “*quantum satis*”. Os ácidos incluídos nesta categoria foram avaliados toxicologicamente pelo Joint FAO/WHO *Expert Committee on Food Additives* (JECFA), que estabeleceram uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) "não especificada", o que significa que o seu uso está limitado à quantidade necessária

para atender às Boas Práticas de Fabricação (BPF), ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário (BRASIL, 2002).

2.6.1 Ácido Acético

O ácido acético é um dos compostos químicos mais conhecidos pela humanidade (GONZALEZ et al., 2005), sendo amplamente utilizado como aditivo (conservante ou acidulante) (SMULDERS; GREER, 1998). Este ácido também pode aumentar a eficiência de outros aditivos além de potencializar o sabor das substâncias presentes naturalmente nos alimentos, particularmente no pão, pickles, molhos para salada e maionese.

2.6.2 Ácido Cítrico

O ácido cítrico é um ácido produzido comercialmente pela primeira vez na Inglaterra a partir de limões. O suco de limão permaneceu como a principal fonte comercial de produção de ácido cítrico, até 1919, mas quando Currie (1917) descobriu que *A. niger* tinha a capacidade de produzir ácido cítrico abundantemente quando cultivado em meio nutritivo com uma elevada concentração de açúcares e sais minerais isto estabeleceu a base para a produção industrial do ácido cítrico utilizando *A. niger*.

O ácido cítrico é utilizado como acidulante em sucos, geleias e compotas, também é um realçador de sabor azedo de certos alimentos feitos a partir de frutas como goiaba, manga, amoras, cerejas, pêssegos doces, ameixas doces, etc. (STOPS et al., 2006).

2.6.3 Ácido Sórbico

O ácido sórbico foi isolado pela primeira vez das bagas verdes da planta '*Sorbus aucuparia*' por A. W. Hoffmann em 1859. (LÜCK, 1976). Mas foi em 1870 que a estrutura química do ácido tornou-se conhecida. Este ácido possui uma IDA determinada; já que é uma substância que mesmo possuindo baixa toxicidade pode causar efeitos tóxicos ao organismo quando for utilizado em altas concentrações (FERRANDA et al., 2000).

No Brasil, a adição direta ou indireta de sorbatos, como conservantes de alimentos está autorizada por várias legislações, sendo o limite máximo estabelecido de ácido sórbico e/ou seus sais de 6.000 mg/kg para a proteína texturizada de soja (em base seca), enquanto o limite mínimo (100mg/L) é estabelecido para refrigerantes e refrescos, incluindo os preparados a partir de xaropes (BRASIL, 1988; 1998; 1999a; 1999b; 1999c; 2001a; 2001b; 2005a; 2005b; 2005c; 2007a; 2007b; 2008; 2009; 2011; 2013a; 2013b). A organização Mundial da Saúde -

OMS, estipula a IDA de ácido sórbico em 25 mg/Kg de peso corpóreo (WHO, 1997). Na Tabela 1 são apresentados os limites máximos estabelecidos por diferentes órgãos reguladores para o uso em alimentos.

Tabela 1- Limites máximos (mg/Kg ou mg/L) do ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio, permitidos em alimentos.

ALIMENTOS	BRASIL ^a	UNIÃO EUROPEIA ^{b,*}	EUA ^c	CODEX ALIMENTARIUS ^d
Amargos e aperitivos	500	-	500	500
Bombons, chocolates e similares	1000	-	1500	1500
Cobertura e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	1000	1000	1000	1000
Coco ralada	1000	-	1000	1000
Creme vegetal e margarinas	2000	2000	1000	1000
Doces em pastas	1000	1000	1000	1000
Frutas cristalizadas, glaceadas e secas	1000	1000	1000	1000
Geleias de frutas	1000	1000	100	1000
Leite de côco	1500	-	1000	1000
Maionese	1000	1000	1000	1000
Massas semi-prontas, recheadas ou não, para o preparo de produtos forneáveis, doces ou salgadas	2000 **	-	-	-
Molhos	1000	2000	1000	1000
Néctares de frutas	1000	3000	1000	1000
Picles e azeitonas	1000	-	1000	1000
Pizzas, pastéis, empadas, polentas pré-embaladas e com umidade superior a 15%	2000 **	-	-	-
Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes	100 ***	-	1000	1000
Produtos de frutas	1500	1000	1000	1000
Produtos de confeitaria e panificação	1000	2000	1000	1000
Produtos cárneos (somente nos revestimentos de embutidos maturados e cozidos, salames e mortadelas)	200	<i>quantum satis</i>	-	-
Proteína texturizada de soja (exclusivamente) no produto que deverá ser pré-hidratado para fins industriais (exceto a utilizada em produtos cárneos)	6000 ****	-	-	-
Queijos	1000	1000	1000	1000
Queijo ralado	2000	1000	3000	3000
Refrescos e refrigerantes	100	-	500	500
Sangria	400	-	500	500
Sidras	500	-	500	500
Sucos de frutas	1000	500	1000	1000
Vinhos	200	200	200	200
Xaropes para refrescos	100 ***	-	1000	1000

^aResolução CNS/MS nº 4, de 24 de novembro de 1988; Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 8, de 6 de março de 2013; Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 5, de 4 de fevereiro de 2013; Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 23 de 15 fevereiro de 2005 ^bRegulamento (EU) nº 1129 da Comissão de 11 de novembro de 2011;

^cFood and Agriculture Organization of the United Nations (FDA, 2013); ^dNorma General del Codex para los Aditivos Alimentarios (GSFA, Codex Stan 192-1995). *Autoriza apenas o uso de ácido sórbico, sorbato de potássio e sorbato de cálcio. ** Sobre o peso do produto final. *** No produto a ser consumido. **** Na base seca.

Tfouni; Toledo (2002) utilizando CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) realizaram um estudo visando avaliar a presença de ácido sórbico em alguns alimentos consumidos comum no Brasil. Os autores compararam os valores recomendados pelas legislações vigentes na data do estudo e obtiveram os seguintes resultados: para margarina, suco de frutas, queijo “petit suisse” a legislação recomenda o uso máximo de 1.000 mg/kg, no entanto os pesquisadores encontraram concentrações que variavam de não detectáveis (nd) a 803 mg/kg, nd a 450 mg/kg, 155 a 367 mg/kg respectivamente. No caso do iogurte, a legislação recomenda 600 mg/kg e foram encontrados níveis de 126 a 213 mg/kg. Os pesquisadores concluíram que a utilização de sorbatos é significativamente menor que o nível máximo permitido pela legislação.

Em outro estudo, Machado et al. (2007) também com utilização de CLAE, determinaram o uso de ácido sórbico em vinhos e cidras fermentadas. Os níveis encontrados variaram de 91,0 a 309,5 mg/L. O valor médio encontrado foi de 171,2 mg/L, sendo que em seis amostras (17%) de vinho tinto, os níveis de ácido sórbico estavam acima do permitido pela legislação brasileira de 200 mg/L.

Outros pesquisadores que abordaram o tema referente ao conteúdo de ácido sórbico em alimentos consumidos no Brasil foram Trombete et al. (2012), onde os teores encontrados de ácido sórbico variaram de nd até 1.285 mg/kg, sendo que dez amostras (33,3%), estavam acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira de 1.000 mg/Kg.

2.7 Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos, também denominados ácidos fracos, não se dissociam completamente em água (THERON; LUES, 2007). É de conhecimento que a principal atividade antimicrobiana do ácido seja atribuída às moléculas não dissociadas, que em geral, são altamente lipofílicas, favorecendo sua entrada nas células dos micro-organismos. A quantidade de moléculas de ácido não dissociado é altamente influenciada pela constante de dissociação do ácido e o pH do meio, sendo que a maior porcentagem de moléculas não dissociadas acontecerá em valores de pH perto ao valor de pK_a do ácido (LUND et al., 1987). Desta forma, que o pH é o fator mais importante que deverá ser considerado para determinação da efetividade dos ácidos orgânicos no controle da deterioração microbiana dos alimentos.

Além do pH, a eficiência antimicrobiana dos ácidos orgânicos é também dependente de uma série de fatores como atividade de água (CHAVEERACH et al., 2002; HUANG et al.,

2010), temperatura de estocagem dos alimentos (uma temperatura de 25° C pode estar correlacionada o aumento na fluidez das membranas celulares, permitindo a difusão mais rápida dos conservantes para o citoplasma das células microbianas (CHIKTHIMMAH, LABORDE; BEELMAN, 2003)) e lipofilicidade (ácidos orgânicos mais lipofílicos terão maior poder antimicrobiano dado que a habilidade de um composto cruzar a bicamada lipídica da célula depende em grande parte de sua solubilidade em lipídios (STRAFORD et al., 2009).

Há diferentes teorias buscando explicar a inibição do crescimento dos microorganismos por ação dos ácidos orgânicos. Dentro dessas teorias destacam-se as seguintes: ruptura da membrana plasmática (FREESE et al., 1973; STRATFORD; ANSLOW, 1998), inibição das reações metabólicas essenciais (KREBS et al., 1983), alteração da homeostase do pH intracelular (SALMOND et al., 1984.; BRACEY et al., 1998) e acúmulo de ânions tóxicos (EKLUND, 1985). No entanto, o mecanismo de ação mais difundido e aceito é a denominada “teoria clássica de inibição dos ácidos orgânicos” proposto por Cramer et al. (1977) e Krebs et al. (1983) que relataram como mecanismo de ação a inibição de reações metabólicas devido a diminuição do pH interno (pH_i) da célula.

A “teoria clássica de inibição dos ácidos orgânicos” fundamenta-se no princípio de que as moléculas de ácido não dissociado são lipofílicas e passam facilmente através da membrana plasmática por difusão; no citoplasma, com o pH próximo a 7,00 as moléculas de ácido são dissociadas em ânions carregados e prótons. Por estarem desprotonadas depois que estão dentro da célula, não podem atravessar a bicamada lipídica e se acumulam no citoplasma, diminuindo assim o pH_i, (SALMOND et al., 1984) acidificando-o e inibindo o metabolismo, em particular, as enzimas da glicólise. Assim a ação antimicrobiana é provavelmente devido à acumulação de íons e prótons no interior da célula (BRUL; COOTE, 1999) o que é refletido numa inibição do metabolismo, particularmente das enzimas glicolíticas (STRAFORD; ANSLOW, 1998). Também tem sido dito que alguns ácidos como o ácido sórbico utiliza outros mecanismos de inibição simultaneamente à introdução de prótons no citoplasma celular, por exemplo, atuando diretamente na membrana celular ou atuando como um inibidor específico do metabolismo (STRAFORD; ANSLOW, 1998).

Também tem sido proposto que todos os ácidos orgânicos inibem os microorganismos de uma forma similar, embora existam pesquisas que apontem o contrário. Em um estudo realizado por Stratford; Anslow (1996), os autores relataram uma inesperada similaridade entre a ação do ácido sórbico e a ação de um desacoplador (2,4-dinitrofenol). Esta evidência sugeriu que a inibição de *Saccharomyces cerevisiae* por ácido sórbico não é consistente com a teoria tradicional.

Em uma pesquisa conduzida no Brasil, Copetti et al. (2012), observaram menor acumulação de ocratoxina A em amêndoas de cacau com pH mais baixo. Partindo-se desta observação, foram realizados experimentos laboratoriais para verificar os efeitos dos principais ácidos orgânicos presentes na etapa fermentativa sobre o crescimento fúngico e produção de ocratoxina A. Foi estudado o efeito de substituição total da sacarose do meio por uma concentração constante de ácidos orgânicos: láctico, cítrico e acético em diferentes condições de pH (4,20; 4,80; 5,50; 5,80; 7,80) para verificar-se a capacidade do fungo de utilizar os ácidos orgânicos como única fonte de carbono e também a substituição parcial, de maneira a se verificar apenas o efeito tóxico de cada ácido. Observou-se o efeito inibitório no crescimento fúngico causado pelo ácido acético em todos os pH testados, tanto em presença quanto na ausência da sacarose. Porém, no caso do ácido cítrico e do ácido láctico houve maior inibição do crescimento fúngico em valores de pH altos, apenas na ausência de sacarose, o que vai contra à teoria tradicional de ação dos ácidos orgânicos.

Assim, Copetti et al. (2012) sugeriram que a diferença da inibição do crescimento fúngico por parte dos ácidos cítrico e láctico deve-se mais a uma restrição de energia, do que propriamente pela toxicidade exercida pelo ácido. No caso do ácido acético, o comportamento de menor crescimento em menor pH foi condizente com a teoria clássica de inibição dos ácidos orgânicos, muito embora os autores acreditem que o acúmulo de ânions tóxicos proposto por Eklund (1985) tenha um papel relevante para a toxicidade e/ou tolerância ao ácido pela metabolização do ânion pelos fungos (por exemplo citrato e lactato que entrariam na rota energética).

Os pesquisadores observaram certa redução na produção de ocratoxina A, porém não se pode precisar se isto se deveu à ação do ácido ou ao menor aporte de sacarose no meio. Além disso, os autores não procuraram determinar em que concentrações destes ácidos haveria inibição do crescimento dos fungos e se a inibição da síntese de OTA ocorreria nas condições testadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a influência dos ácidos acético, cítrico e sórbico sobre o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* e a produção de ocratoxina A em diferentes valores de pH, visando-se fornecer dados para uma melhor conservação de produtos alimentícios por ácidos orgânicos.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a suscetibilidade de *Aspergillus* spp. ao ácido acético, cítrico e sórbico em diferentes valores de pH;

- Determinar a influência de doses sub-inibitórias dos ácidos acético, cítrico e sórbico, na produção de ocratoxina A em isolados de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locação dos experimentos

Os experimentos referentes ao crescimento fúngico na presença dos ácidos orgânicos foram realizados no Laboratório de Micologia de Alimentos, Prédio 43, sala 4311 e as análises de para determinação de ocratoxina A foram realizados no Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, Prédio 44, 3º andar, ambos alocados no Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – RS.

4.2 Materiais

4.2.1 Isolados

Para o estudo foram utilizados isolados dos fungos filamentosos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Tabela 2); disponibilizados pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizado em Campinas - SP na Avenida Brasil, N° 2880 - Jardim Chapadão. Os fungos foram previamente identificados de acordo com a metodologia descrita por Pitt e Hocking (2009) e sua identidade foi confirmada através da análise de perfil de metabólitos secundários utilizando a metodologia descrita por Smedsgaard (1997). O isolado ATCC 2384 foi cedido pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), da UFSM.

Tabela 2-Isolados do gênero *Aspergillus* utilizados nos experimentos, conforme identificação, origem e capacidade de produzir ocratoxina A.

Cepa	Identificação	Section	Localização	Substrato	Produção de ocratoxina
ITAL 792cc	<i>A. carbonarius</i>	<i>Nigri</i>	Brasil	Cacau	Positivo
ITAL 1375cc	<i>A. carbonarius</i>	<i>Nigri</i>	Brasil	Cacau	Positivo
ITAL 325F	<i>A. luchuensis</i>	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas secas	Negativo
ITAL 331F	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	Brasil	Cacau	Positivo
ITAL 1240cc	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	Brasil	Cacau	Positivo
ITAL 500F	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	México	Frutas secas	Negativo
ITAL 277F	<i>A. tubingensis</i>	<i>Nigri</i>	Espanha	Frutas secas	Negativo
ATCC 2384	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	-	-	Negativo
ITAL 79cc	<i>A. parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	Brasil	Cacau	Negativo

4.2.2 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos testados foram ácido acético (Impex 99,7%), ácido cítrico (Impex 99,5%) e ácido sórbico (Vetec 99%).

4.3 Multiplicação dos fungos

Os fungos foram propagados e conservados em tubos com aproximadamente 10 mL do meio de cultura Agar Czapek Extrato de Levedura Autolizada (CYA); contendo por litro de água destilada: 1 g K_2HPO_4 , 5 g de extrato de levedura, 20 g de Agar, 30 g de sacarose, 3 g de $NaNO_3$, 0,5 g de KCl, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,005 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,01 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ autoclavados a 121°C durante 15 minutos, incubados a uma temperatura de 25°C +/-1°C durante seis dias.

4.4 Preparação do inóculo

A suspensão de conídios foi preparada adicionando-se 10mL de uma solução estéril de Tween 80 a uma concentração de 0,01% em cada um dos tubos previamente inoculados, em seguida foi realizada a raspagem da superfície com uma alça estéril, passando pelo vortex e filtrando com gaze estéril para remover as hifas e conidióforos. Os conídios foram contados utilizando uma câmara de Neubauer, ajustando a concentração do inóculo em 10^5 conídios/mL quando necessário (STRATFORD et al., 2009).

4.5 Concentrações de ácido testadas

Para a escolha das doses testadas, foram consideradas as recomendações das regulações brasileiras e internacionais, tais como: BRASIL, 1988; 1998; 1999a; 1999b; 1999c; 2001a; 2001b; 2005a; 2005b; 2005c; 2007a; 2007b; 2008; 2009; 2011; 2013a; 2013b e o Codex alimentarius (CODEX STAN, 1995). Visando-se verificar se os valores toxicologicamente seguros estabelecidos pelas mesmas são adequadas para o controle fúngico nos diferentes valores de pH.

4.6 Avaliação da suscetibilidade fúngica aos ácidos orgânicos

4.6.1 Sem controle do pH

Com a finalidade de determinar unicamente o efeito do ácido orgânico no desenvolvimento fúngico, foi utilizado um arranjo fatorial com nove isolados das espécies [*A. carbonarius* (ITAL 792cc e ITAL 1375cc), *A. luchuensis* (ITAL 325F), *A. niger* (ITAL 1240cc, ITAL 331F e ITAL 500F), *A. tubingensis* (ITAL 277F), *A. flavus* (ATCC 2384) *A. parasiticus* (ITAL 79cc)], três tipos de ácidos em diferentes concentrações: ácido acético (0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 mM), cítrico (0; 50; 100; 200; 400 e 800 mM) e o ácido sórbico (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16,32 mM). Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Para o desenvolvimento do ensaio, foi utilizado um meio de cultura base, contendo por litro de água destilada: 10g de extrato de malte e 20g de extrato de levedura, autoclavado a 121°C durante por 15 minutos. Assim que o meio atingiu 45°C, agregou-se cada um dos ácidos na concentração a ser testada, procedendo-se, imediatamente, a determinação do pH. Na sequência, 4mL foi transferido para tubos de ensaio estéreis (LEON et al., 2012).

Paralelamente, utilizou-se um controle negativo, ou seja, meio de cultura sem a presença dos ácidos e com o pH ajustado com ácido tartárico (5 M) ou hidróxido de potássio (5 M) aos valores obtidos após a adição de cada um dos ácidos testados em cada uma das concentrações testadas, de maneira a excluir a incapacidade do fungo crescer nos valores de pH alcançados após a adição dos ácidos orgânicos .

Todos os tubos foram inoculados com 10 µl do inóculo previamente preparado, incubados por seis dias à 25°C. Decorrido o período de incubação, foram avaliados visualmente através de uma escala dicotômica (cresceu ou não cresceu). Onde a concentração inibitória é a concentração de ácido testada onde não houve crescimento fúngico.

4.6.2 Com ajuste de pH

Para avaliar a influencia do pH sobre a atividade antifúngica dos ácidos orgânicos e do pH no desenvolvimento dos fungos, foi utilizado um arranjo fatorial contendo: nove isolados fúngicos (Tabela 2), quatro níveis de pH (4,5; 5,0; 5,5 e 6,0) e 3 tipos de ácidos em diferentes concentrações: ácido acético (0; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 mM), cítrico (0; 50; 100; 200; 400 e 800 mM) e ácido sórbico (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 mM). Os experimentos foram

conduzidos em triplicata. O meio de cultura utilizado foi o mesmo descrito anteriormente no item 4.6.1

Após a adição do ácido nas concentrações desejadas, o pH final do meio foi ajustado de maneira asséptica com uma solução estéril de KOH (5M) ou ácido tartárico (5M). Na sequência, 4mL desta mistura foi transferida para tubos de ensaio estéreis. Paralelamente utilizou-se um controle negativo, ou seja meio de cultura sem a presença dos ácidos e com o pH ajustado com ácido tartárico ou KOH dependendo do caso.

Todos os tubos foram inoculados com 10µl do inóculo previamente preparado, incubados à 25°C e mantidos pelo período de seis dias.

Decorrido o período de incubação, foram avaliados visualmente seguindo uma escala dicotômica (cresceu ou não cresceu).

4.7 Cálculo da fração dissociada e não dissociada do ácido

Para cada uma das concentrações testadas, tanto no item 4.6.1 como no 4.6.2, foi calculada a porção de ácido não dissociado mediante a fórmula proposta por Henderson–Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A]}{[HA]}\right)$$

Onde: pK_a é a constante de dissociação do ácido; $[A]$ é a concentração de moléculas de ácido dissociado e $[HA]$ corresponde a concentração total de ácido não dissociado.

4.8 Determinação da influência dos ácidos orgânicos sobre a produção de ocratoxina A em diferentes condições de pH

Com o propósito de analisar o efeito dos ácidos orgânicos em diferentes condições de pH sobre a produção de ocratoxina A, foram selecionadas duas espécies produtoras de ocratoxina A (*A. carbonarius* ITAL 792cc e *A. niger* ITAL 331F); 2 níveis de pH (4,50; 5,00) e 3 tipos de ácidos em diferentes concentrações: ácido sórbico (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 mM) ácido acético (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 mM) e ácido cítrico (0; 50; 100; 200; 400 e 800 mM) usando o mesmo procedimento descrito anteriormente no ponto 4.6.2, porém

alterando-se o meio de cultura. O meio utilizado foi YES (Extrato de Levedura e Sacarose), contendo por litro de água destilada: 10g de extrato de malte, 20g de extrato de levedura e 150g de sacarose, recomendado por Lund; Frisvad (2003) para a produção de ocratoxina. Também foram modificados o volume de meio de cultura nos tubos (2 mL) e o período de incubação (7 dias).

Passados os sete dias de incubação foram selecionados para a análise de ocratoxina A os controles negativos e os tubos das duas concentrações abaixo da concentração testada onde não houve crescimento fúngico (concentração inibitória); essas concentrações correspondem a 25% e 50% da concentração inibitória. No caso de não haver inibição do crescimento nas concentrações utilizadas, serão selecionadas as duas maiores concentrações testadas e o controle.

4.8.1 Extração

A extração da ocratoxina A foi realizada de acordo a metodologia descrita por Bayman et al. (2002), com modificações. Foram adicionados 2 mL de clorofórmio (marca Vetec 99,8%) em cada tubo com o cultivo, seguido de agitação em vortex por 30 segundos, depois o conteúdo foi centrifugado durante 10 minutos a 3.000 RPM. O extrato de clorofórmio foi transferido para um tubo limpo e mantido na temperatura ambiente *over night* para completa evaporação do solvente. Na sequência foi adicionado 1mL de fase móvel composta por ácido acético: acetonitrila: metanol (40: 30: 30; v/v/v) ao extrato seco. A suspensão foi colocada em banho de ultrassom durante 25min e filtrada através de um filtro de seringa PES (Polyethersulfone) de 0,22 µm. O extrato filtrado foi submetido à análise cromatográfica.

4.8.2 Parâmetros de CLAE

Para a determinação da ocratoxina A foi utilizado um cromatógrafo líquido Agilent Technologies (Modelo 1200) equipado com injetor automático e detector de fluorescência ajustado à 330nm de excitação e 475nm de emissão. A coluna usada foi uma Lichoroschart Rp-18 (5 µm, 150 x 4,6 mm), à temperatura de 40 °C. A fase móvel utilizada era composta por ácido acético: acetonitrila: metanol (40: 30: 30, v/v/v) com uma vazão de 1 mL/min. O volume de injeção utilizado tanto para os extratos fúngicos quanto para a construção da curva padrão foi 1 µL.

4.8.3 Curva padrão

Para a construção da curva de calibração (área dos picos *versus* concentração de ocratoxina A) foram diluídos 11,37µg de padrão de ocratoxina A (marca Biopure) em 1mL de metanol, onde partindo desta concentração inicial foram feitas as seguintes diluições seriadas: 5,68; 2,84; 1,42; 0,71 e 0,35µl/mL. Depois 1µl de cada diluição foi injetado no cromatógrafo, mantendo as condições cromatográficas descritas anteriormente e procedeu-se a construção da curva.

A concentração da ocratoxina A no extrato foi determinada pela interpolação da área do pico resultante no gráfico da curva de calibração.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises de ocratoxina A foram submetidos à análise de variância (ANOVA) multifatorial 2x2x3 complementada pelo teste de Bonferroni para ajuste das comparações múltiplas ao nível de 5% de confiança, a partir do programa utilizado foi o SPSS® versão 21.0 7.0 for Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cálculo da fração dissociada e não dissociada do ácido para os pH testados

A Tabela 3 evidencia-se uma notável diminuição da quantidade de moléculas de ácido não dissociado na medida em que aumentou o pH (KWON; RICKE, 1998). Esta observação é importante já que é esta forma não dissociada do ácido é a principal responsável pela atividade antimicrobiana (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2003). Demonstra-se que a maior porcentagem de moléculas não dissociadas dos ácidos acético e sórbico se encontram nos valores de pH perto de seus valores de pK_a , (LUND et al., 1987), valores de pH nos quais espera-se o maior poder antifúngico destes ácidos.

Tabela 3- Variação na porcentagem de moléculas não dissociadas de cada ácido orgânico em função do pH.

Ácido	Fórmula química	pK_a	Moléculas não dissociadas ^a			
			pH 4,50	pH 5,00	pH 5,50	pH 6,00
Acético	$C_2H_4O_2$	a= 4,76	64,0%	36,0%	15,0%	5,50%
Cítrico	$C_6H_8O_7$	a= 3,09; b=4,74; c= 5,41	52,3%	36,0%	20,1%	8,70%
Sórbico	$C_6H_8O_2$	a=4,76	64,0%	36,0%	15,0%	5,50%

^a Valores calculados utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch.
a, b e c= correspondem ao pK_a de cada grupo carboxílico do ácido.

5.2 Avaliação da suscetibilidade fúngica aos ácidos orgânicos

5.2.1.1 Ácido cítrico, sem controle do pH

O ácido cítrico apresentou uma concentração inibitória de 800 mM, para a maior parte dos isolados utilizados neste experimento, com exceção de *A. flavus* (ATCC 2384) que foi resistente a todas as concentrações testadas (Tabela 4).

Tabela 4- Concentração de ácido cítrico necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero *Aspergillus* e estimativa de moléculas não dissociadas no pH alcançado após a adição do ácido.

Fungo	ÁCIDO CÍTRICO		
	pH (final)	Concentração inibitória (mM)	Moléculas não dissociadas (mM)
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 1375cc)	1,85	800	786
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 792cc)	1,85	800	786
<i>A. luchuensis</i> (ITAL 325F)	1,85	800	786
<i>A. niger</i> (ITAL 331F)	1,85	800	786
<i>A. niger</i> (ITAL 1240cc)	1,85	800	786
<i>A. niger</i> (ITAL 500F)	1,85	800	786
<i>A. tubingensis</i> (ITAL 277F)	1,85	800	786
<i>A. flavus</i> (ATCC 2384)	1,85	>800	>786
<i>A. parasiticus</i> (ITAL 79cc)	1,85	800	786

pH inicial do meio de cultura=6,64 ±0,02.

5.2.1.2 Ácido cítrico, com ajuste de pH

Na Figura 2 pode ser observado o efeito do ácido cítrico sobre o crescimento de diferentes isolados de *Aspergillus* sp.

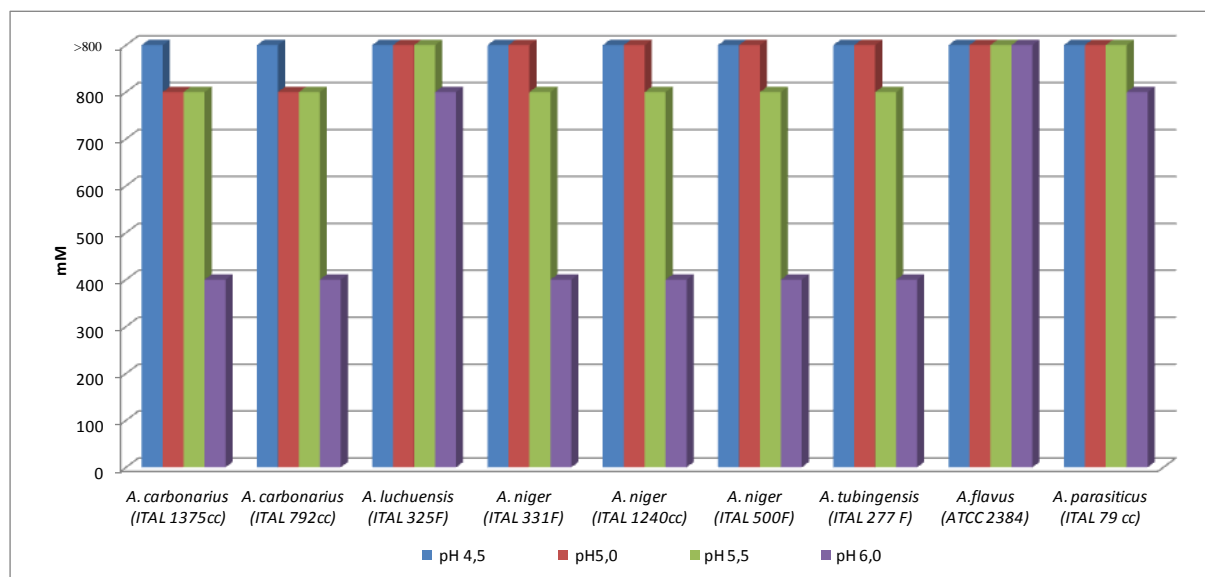


Figura 2- Concentração Inibitória do ácido cítrico frente a isolados do gênero *Aspergillus* em diferentes pH.

No pH 4,50 o ácido cítrico não exerceu atividade de controle do crescimento fúngico de nenhum dos isolados avaliados neste estudo nas concentrações testadas. No pH 5,00 só foi capaz de controlar o crescimento fúngico dos isolados pertencente as espécies de *A. carbonarius*, sendo necessário para isto uma concentração inibitória de 800 mM.

Já no pH 5,50 o ácido mostrou certo poder antifúngico controlando um maior número de isolados, englobando as espécies *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. tubingensis* com uma concentração inibitória de 800mM; embora não tenha apresentado ação inibitória neste pH para os isolados de *A. luchuensis* e *A. parasiticus*.

No pH 6,00, o ácido cítrico mostrou-se com maior poder antifúngico, pois as concentrações inibitórias necessárias para exercer o controle do crescimento dos isolados diminuíram (400mM para o controle de *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. tubingensis*, e 800 mM para *A. luchuensis* e *A. parasiticus*). O isolado de *A. flavus* mostrou-se tolerante a todas as concentrações testadas em todos os valores de pH avaliados.

As observações de que a eficiência antifúngica do ácido cítrico tende a ser maior quanto maior o pH do substrato são totalmente contraditórias com o a teoria clássica dos ácidos orgânicos, onde sempre é destacado maior efeito antifúngico em valores mais baixos de pH (KREBS et al., 1983).

Conforme apresentado na Tabela 5, em valores de pH mais baixos, a quantidade de moléculas não dissociadas é maior, sendo estas as moléculas capazes de atravessar membrana celular do micro-organismo(LUND et al., 1987; STRAFORD et al., 2009). Uma vez atingido o citoplasma, que possui pH maior, o ácido cítrico se dissociaria no ânion citrato. Como é amplamente conhecido, o citrato é um intermediário no metabolismo dos ácidos tricarbóxicos, visto de uma forma simples a oxidação do citrato vai gerar energia para a célula fúngica (GLUSKER, 1980), este fato pode explicar por que não houve inibição do crescimento nas concentrações testadas nos pH 4,5 e 5,0.

Embora o ácido cítrico tenha apresentado uma ação antifúngica bastante limitada, principalmente nos pH baixos (4,50 e 5,00), este ácido mostrou certa atividade antifúngica no pH 6 sobre a maioria dos fungos utilizados neste estudo.

Sabe-se que o ácido cítrico é usado principalmente como agente antioxidante, dispersante e acidificante. A acidez do ácido cítrico é devida aos três grupos carboxílicos (COOH), que podem perder um elétron em soluções, liberando três moles de íons hidrogênio (H^+) por cada mol de molécula. Como consequência, forma-se um íon citrato, sendo este um bom controlador de pH de soluções ácidas, podendo também formar sais com muitos íons metálicos (OHISHI et al., 2003).

A partir do pH 5,50 o ácido cítrico começa a ter certo poder antifúngico o qual poderia ser atribuído ao poder quelante do ácido. O ácido cítrico possui a capacidade de reter íons magnésio e cálcio (BRUL; COOTE 1999), além do potássio e o molibdênio. A maioria destes íons são essenciais para o crescimento fúngico (LILLY, 1965). O ácido cítrico tem sido efetivo no controle de *Clostridium botulinum* devido à atividade quelante retendo o cálcio do meio (LUND et al., 1987).

Tabela 5- Concentração de ácido cítrico não dissociado, segundo o pH, para cada uma das concentrações testadas nos experimentos.

ÁCIDO CÍTRICO						
pH	Concentração total (mM)	Concentração de ácido não dissociado (mM) ^a				
		50	100	200	400	800
4,50		26,2	52,3	104,6	209,3	418,6
5,00		18,3	36,6	73,2	146,4	292,8
5,50		10,1	20,1	40,2	80,5	161,0
6,00		4,40	8,70	17,4	34,8	69,6

^a Valores calculados utilizando a equação de Henderson–Hasselbalch.

5.2.2.1 Ácido acético, sem controle do pH

Na Tabela 6 são apresentadas as concentrações de ácido acético requeridas para inibir as espécies de *Aspergillus* testadas, bem como a quantidade de moléculas não dissociadas do ácido no pH alcançado após a adição do ácido.

Observou-se que existe variação quanto a suscetibilidade das espécies testadas frente ao ácido acético. As espécies *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. parasiticus* foram as mais sensíveis, inibidas em concentrações de 25 mM, enquanto que para inibição de *A. niger*, *A. luchuensis* e *A. tubingensis* foram necessárias concentrações de 50 mM.

Tabela 6- Concentração de ácido acético necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero *Aspergillus* e estimativa de moléculas não dissociadas no pH alcançado após a adição do ácido.

Fungo	ÁCIDO ACÉTICO		
	pH (final)	Concentração inibitória (mM)	Moléculas não dissociadas (mM)
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 1375cc)	4,72	25,0	13,5
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 792cc)	4,72	25,0	13,5
<i>A. luchuensis</i> (ITAL 325F)	4,30	50,0	34,8
<i>A. niger</i> (ITAL 331F)	4,30	50,0	34,8
<i>A. niger</i> (ITAL 1240cc)	4,30	50,0	34,8
<i>A. niger</i> (ITAL 500F)	4,30	50,0	34,8
<i>A. tubingensis</i> (ITAL 277F)	4,30	50,0	34,8
<i>A. flavus</i> (ATCC 2384)	4,72	25,0	13,5
<i>A. parasiticus</i> (ITAL 79cc)	4,72	25,0	13,5

pH inicial do meio 6,70±0,02.

Com base em nossos resultados, percebe-se que a suscetibilidade dos isolados de *Aspergillus* ao ácido acético é variável dentro da sessão *Nigri*, e parece ser espécie específica. Com relação à sessão *Flavi*, embora ambos isolados testados tenham apresentado mesmo perfil de sensibilidade, estudos complementares com um maior número de espécies e isolados se fazem necessários.

5.2.2.2 Ácido acético, com ajuste de pH

Da mesma forma que observado no experimento anterior, foi possível visualizar a existência de variação quanto à suscetibilidade ao ácido acético dos isolados testados nos diferentes valores de pH, permanecendo o mesmo padrão de suscetibilidade entre os fungos independente do pH avaliado. Na Figura 3 visualiza-se os perfis de suscetibilidade dos isolados testados quando expostos a diferentes concentrações de ácido acético em condições controladas de pH.

Foi verificada uma relação direta entre os valores de pH e a concentração inibitória, ou seja, quanto maior o pH do substrato, maiores foram as concentrações de acético necessárias para inibir o desenvolvimento de cada isolado testado. De uma maneira geral, a cada acréscimo de 0,5 no valor de pH dobraram as concentrações de ácido acético necessárias para

inibir um mesmo isolado. Esta informação é de grande relevância para a indústria alimentícia, considerando de que os alimentos são misturas complexas e que pode ocorrer um tamponamento do pH provocado por seus constituintes o que influenciaria a concentração do ácido acético necessária para prevenir a deterioração do mesmo por *Aspergillus* spp. Em alimentos de origem animal, as moléculas mais importantes neste sentido são as proteínas, enquanto que em alimentos de origem vegetal, são os ácidos policarboxílicos e, em menor grau, os fosfatos de proteína (FENNEMA, 1993).

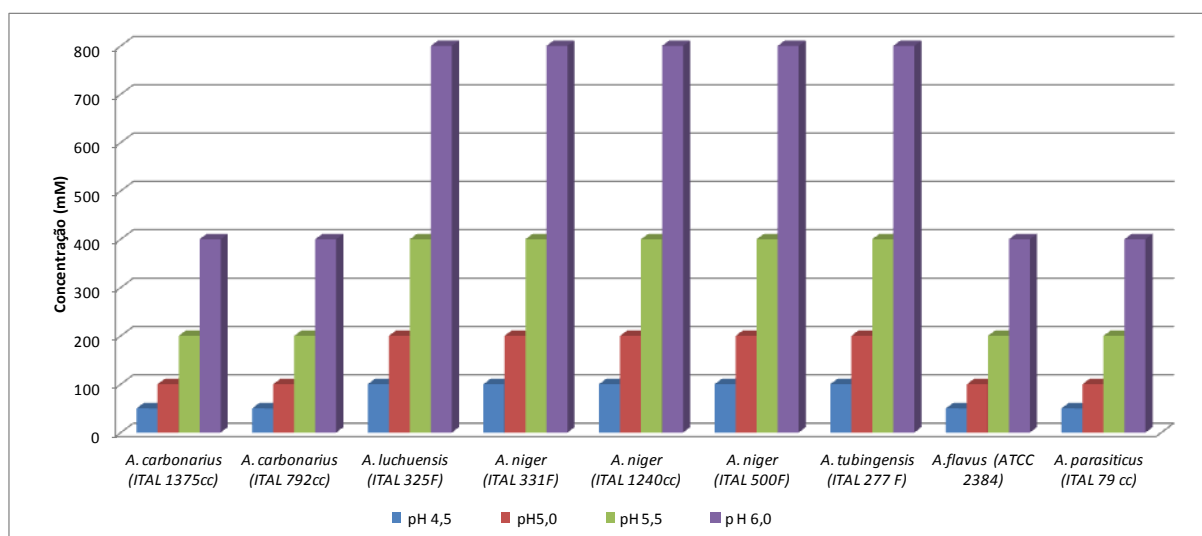


Figura 3-Suscetibilidade de isolados do gênero *Aspergillus* ao ácido acético em diferentes pH.

Verificou-se que houve um aumento nas quantidades de ácido acético necessárias para inibir o crescimento dos fungos na medida em que se aumentou o pH (Figura 3). Assim, quando é aumentado o pH são necessárias maiores concentrações do ácido para obter a mesma quantidade de ácido não dissociado em solução e conseqüentemente o mesmo efeito antimicrobiano devido a capacidade de apenas estas moléculas não dissociadas atravessarem a membrana em virtude da sua lipofilicidade (STRAFORD et al., 2009). Na Tabela 7 apresentam-se os valores das concentrações de ácido acético não dissociado para cada uma das concentrações testadas.

Levando em consideração os resultados obtidos em nossos experimentos, as observações relacionadas na teoria clássica e as informações relativas à dissociação das moléculas do ácido acético também pudemos inferir a faixa das concentrações inibitórias mínimas de ácido não dissociado para as espécies testadas (Tabela 8).

Tabela 7- Concentração de moléculas de ácido acético não dissociado, segundo o pH, para cada uma das concentrações testadas nos experimentos

		ÁCIDO ACÉTICO						
pH	Concentração total (mM)	Concentração de ácido não dissociado (mM)^a						
		12,5	25	50	100	200	400	800
4,50		8,00	16,0	32,0	32,0	128	256	512
5,00		4,50	9,00	18,0	36,0	72,0	144	288
5,50		1,88	3,75	7,50	7,50	30,0	60,0	120
6,00		0,69	1,38	2,75	2,75	11,0	22,0	44,0

^a Valores calculados utilizando a equação de Henderson–Hasselbalch.

Tabela 8- Estimativa da concentração inibitória mínima (CIM) calculada de ácido acético não dissociado para isolados do gênero *Aspergillus* conforme o pH.

ÁCIDO ACÉTICO										
Fungo	pH	Concentração Inibitória de Ácido Não Dissociado (mM)								Variação
		4,50		5,00		5,50		6,00		
		C ^a	NC ^b	C ^a	NC ^b	C ^a	NC ^b	C ^a	NC ^b	
<i>Aspergillus carbonarius</i> (ITAL 1375cc)		16,0	32,0	18,0	36,0	15,0	30,0	11,0	22,0	18,0 <CIM ≤22,0
<i>Aspergillus carbonarius</i> (ITAL 792cc)		16,0	32,0	18,0	36,0	15,0	30,0	11,0	22,0	18,0 <CIM ≤22,0
<i>Aspergillus luchuensis</i> (ITAL 325F)		32,0	64,0	36,0	72,0	30,0	60,0	22,0	44,0	36,0 <CIM ≤44,0
<i>Aspergillus niger</i> (ITAL 331F)		32,0	64,0	36,0	72,0	30,0	60,0	22,0	44,0	36,0 <CIM ≤44,0
<i>Aspergillus niger</i> (ITAL 1240cc)		32,0	64,0	36,0	72,0	30,0	60,0	22,0	44,0	36,0 <CIM ≤44,0
<i>Aspergillus niger</i> (ITAL 500F)		32,0	64,0	36,0	72,0	30,0	60,0	22,0	44,0	36,0 <CIM ≤44,0
<i>Aspergillus tubingensis</i> (ITAL 277F)		32,0	64,0	36,0	72,0	30,0	60,0	22,0	44,0	36,0 <CIM ≤44,0
<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 2384)		16,0	32,0	18,0	36,0	15,0	30,0	11,0	22,0	18,0 <CIM ≤22,0
<i>Aspergillus parasiticus</i> (ITAL 79cc)		16,0	32,0	18,0	36,0	15,0	30,0	11,0	22,0	18,0 <CIM ≤22,0

C^a = maior concentração testada em que houve crescimento fúngico; NC^b = menor concentração testada em que não houve crescimento fúngico..

Straford et al. (2009) também determinaram as CIM de ácido acético não dissociado necessárias para controlar o fungo *A. niger* isolado de refrigerantes. Naquele estudo, as CIM estiveram compreendidas entre 52,13 e 65,19 mM; nossos valores de CIM calculada para o controle deste mesmo fungo foram um pouco inferiores, compreendidos entre 36 e 44 mM.

Para o controle de *A. flavus*, Leon et al. (2012) determinaram CIM de ácido acético não dissociado entre 20,76 e 24,33 mM; enquanto em nossos estudos determinamos CIM compreendidas entre 19 e 22 mM, valores bastantes similares. Os autores Leon et al. (2012) observaram CIM diferentes entre isolados de *A. flavus* onde, correlacionaram a sensibilidade dos isolados ao ácido acético com a capacidade toxigênica, sendo que para inibir os isolados de *A. flavus* não toxigênicos foram necessárias CIM mais altas que para os isolados aflatoxigênicos, no entanto os valores de CIM encontrados por esses pesquisadores sempre estiveram bem próximos entre si. Os isolados usados em nosso estudo são conhecidamente aflatoxigênicos.

As condições dos experimentos dos autores acima mencionados diferem em certa medida das condições sobre as quais foram feitos nossos experimentos, portanto certa variação nos valores de CIM pode ser esperada.

As CIM de ácido acético não dissociado nos permite calcular as CIM necessárias para controlar o crescimento fúngico sob diferentes condições de pH, as quais estão disponibilizadas na Tabela 8.

Resumindo, desde um ponto de vista prático, pode ser dito que a ação mais efetiva do ácido acético sobre a inibição do crescimento fúngico ocorreu nos pH 4,50 e 5,00 pois nesses valores de pH seria necessária menor quantidade deste ácido para controlar o crescimento de todos os isolados utilizados neste estudo (Figura 3). A estimativa da CIM vai nos permitir dar uma contribuição ao uso deste ácido como conservante, pois apesar do ácido acético ser considerado GRAS, este pode imprimir sabores indesejáveis nos alimentos quando utilizado em dosagens altas (TANIGUCHI et al., 1998).

Exemplo disso são as mudanças sensoriais e de aspecto que podem sofrer as carcaças tratadas com ácido acético quando utilizadas concentrações superiores a 1% (174,8 mM) (SMULDERS; GREER, 1998). É importante destacar que as CIM nos pH 4,50 e 5,00 determinadas em nossos experimentos são mais baixas que este valor de 174,8 mM onde os autores antes mencionados observaram mudanças negativas no sabor dos alimentos. Portanto o uso do ácido acético nas CIM de 53,3-69,0 mM no pH 4,50 e 100-122 mM no pH 5,00 constituem uma alternativa para o controle da deterioração fúngica em alimentos com essas

características de pH. Em valores de pH superiores, poderia haver prejuízo ao sabor do alimento ao se utilizarem as doses efetivas para controle fúngico.

Tabela 9- Estimativa da concentração inibitória mínima (calculada) de ácido acético necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero *Aspergillus*.

ÁCIDO ACÉTICO				
Fungo	Concentração inibitória mínima calculada (mM) ^a			
	4,50	5,00	5,50	6,00
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 1375cc)	30,0-34,0	53,0-61,0	127-147	339-393
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 792cc)	30,0-34,0	53,0-61,0	127-147	339-393
<i>A. luchuensis</i> (ITAL 325F)	56,3-69,0	100-122	240-293	642-785
<i>A. niger</i> (ITAL 331F)	56,3-69,0	100-122	240-293	642-785
<i>A. niger</i> (ITAL 1240cc)	56,3-69,0	100-122	240-293	642-785
<i>A. niger</i> (ITAL 500F)	56,3-69,0	100-122	240-293	642-785
<i>A. tubingensis</i> (ITAL 277F)	56,3-69,0	100-122	240-293	642-785
<i>A. flavus</i> (ATCC 2384)	30,0-34,0	53,0-61,0	127-147	339-393
<i>A. parasiticus</i> (ITAL 79cc)	30,0-34,0	53,0-61,0	127-147	339-393

^a Valores calculados utilizando a equação de Henderson–Hasselbalch.

A determinação da CIM do ácido a ser aplicado atende a exigência da indústria que busca fazer uso adequado dos ácidos orgânicos sempre visando garantir a boa qualidade microbiológica dos alimentos, minimizar os custos e ao mesmo tempo não comprometer a aceitabilidade dos produtos elaborados. Uma alternativa ante a necessidade de diminuir as dosagens de ácidos orgânicos que prejudicam o sabor também pode ser o uso de associações de ácidos orgânicos, utilizando-se um que possua maior poder acidulante e outro com bom poder antimicrobiano embora afete sensorialmente o alimento. Leon et al. (2012) demonstraram que existe um efeito sinérgico quando adicionadas misturas dos ácidos láctico e acético para o controle de isolados de *A. flavus*.

5.2.3.1 Ácido sórbico, sem controle do pH

Na Tabela 10 são apresentadas as concentrações de ácido sórbico requeridas para inibir as espécies de *Aspergillus* testadas, bem como a quantidade de moléculas não dissociadas do ácido no pH alcançado após a adição do ácido.

Observou-se que existe variação quanto à suscetibilidade das espécies testadas frente ao ácido sórbico. As espécies *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. parasiticus* foram mais sensíveis, inibidas em concentrações de 4mM, enquanto que para a inibição de *A. luchuensis* foram necessárias concentrações de 8mM. *A. niger* e *A. tubingensis* requereram concentrações de 16 mM, sendo portanto, os mais tolerantes a ação do ácido sórbico.

Tabela 10- Concentração de ácido sórbico necessária para inibir o crescimento de isolados do gênero *Aspergillus* e estimativa de moléculas não dissociadas no pH alcançado após a adição do ácido.

Fungo	ÁCIDO SÓRBICO		
	pH (final)	Concentração inibitória (mM)	Moléculas não dissociadas (mM)
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 1375cc)	5,32	4,00	0,84
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 792cc)	5,32	4,00	0,84
<i>A. luchuensis</i> (ITAL 325F)	4,90	8,00	3,32
<i>A. niger</i> (ITAL 331F)	4,57	16,0	9,84
<i>A. niger</i> (ITAL 1240cc)	4,57	16,0	9,84
<i>A. niger</i> (ITAL 500F)	4,57	16,0	9,84
<i>A. tubingensis</i> (ITAL 277F)	4,57	16,0	9,84
<i>A. flavus</i> (ATCC 2384)	5,32	4,00	0,84
<i>A. parasiticus</i> (ITAL 79cc)	5,32	4,00	0,84

pH inicial do meio 6,70±0,02

5.2.3.2 Ácido sórbico, com ajuste de pH

Da mesma forma que observado no experimento anterior, foi possível detetar variações na suscetibilidade ao ácido sórbico entre os isolados testados nos diferentes valores de pH, permanecendo o mesmo padrão de suscetibilidade independente do pH avaliado.

Na Figura 4 visualizar-se os perfis de suscetibilidade dos isolados testados quando expostos a diferentes concentrações de ácido sórbico em condições controladas de pH. Para inibir o desenvolvimento dos isolados pertencentes às espécies de *A. niger* e *A. tubingensis* foram necessárias concentrações inibitórias mais altas.

A tolerância da ação antifúngica do ácido sórbico já tinha sido documentada por Huang et al., (2010) sendo as espécies de *A. niger*, *Eurotium rubrum*, *Eurotium herbariorum* as mais resistentes a ação do ácido sórbico quando comparado com isolados de *A. flavus* e

Penicillium roqueforti. Em experimentos anteriores Plumridge et al., (2004) tinham atribuído a resistência de *A. niger* ao ácido sórbico a capacidade que esta espécie possui de transformar o ácido sórbico em 1,3-pentadieno, um composto volátil com odor parecido ao da querosene, menos tóxico para o fungo. Esta reação envolve a atividade de duas descarboxilases PadA1 e OhbA1, e um regulador SDRA (STRATFORD et al., 2012) e constitui uma adaptação do fungo para sobreviver.

A resistência dos fungos a compostos químicos é adquirida principalmente no seu ambiente natural onde estão em contato com uma ampla variedade de compostos tóxicos produzidos por outros micro-organismos com os quais estes interagem. Uma característica importante destes mecanismos de resistência dos micro-organismos é que são pleiotrópicos, tendo suficiente flexibilidade para adaptar-se a uma série de mudanças no ambiente onde estes se desenvolvem (KOWLACZKOWSKI; GOFFEAU, 1997). Portanto a resistência aos conservantes pode ser estimulada por concentrações sub-letais destas substâncias (MARÍN et al., 2003).

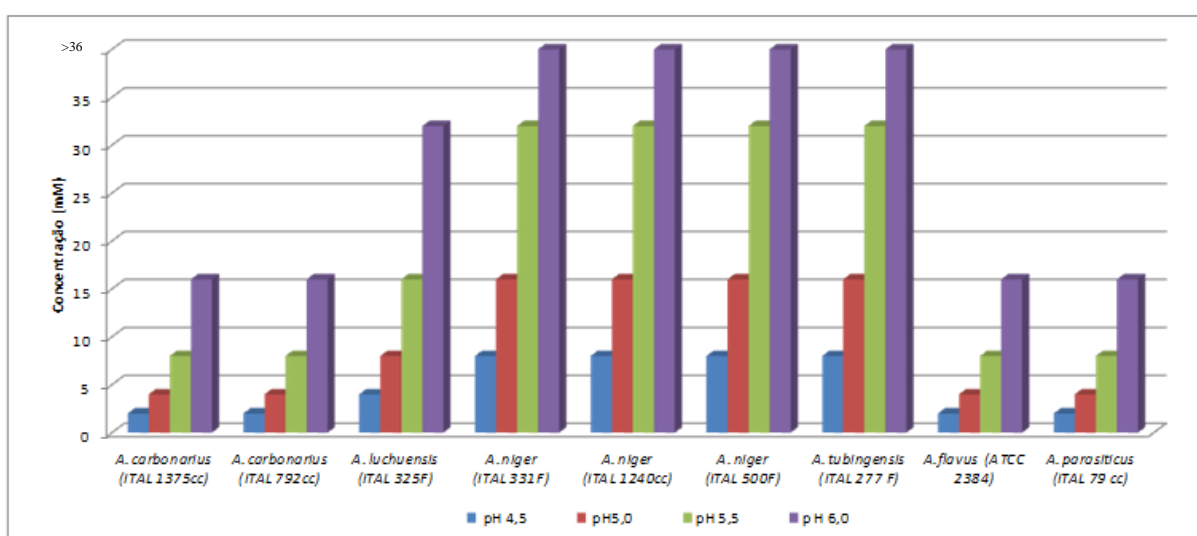


Figura 4- Suscetibilidade de isolados do gênero *Aspergillus* ao ácido sórbico em diferentes pH.

O ácido sórbico mostrou grande poder antifúngico, baseado nas pequenas quantidades de ácido requeridas para exercer o controle quando comparado com o ácido acético. Esta observação possui uma implicação bastante relevante, pois o ácido sórbico, diferentemente de outros ácidos orgânicos, possui uma IDA definida, portanto as quantidades deste ácido utilizadas nos alimentos deverão ser cuidadosamente calculadas para que não extrapolem os valores permitidos nas legislações vigentes.

Tabela 11- Concentração de moléculas de ácido sórbico não dissociado, segundo o pH, para cada uma das concentrações testadas nos experimentos.

		ÁCIDO SÓRBICO						
pH	Concentração total (mM)	Concentração de ácido não dissociado (mM) ^a						
		0,50	1,00	2,00	4,00	8,00	16,0	32,0
4,50		0,32	0,64	1,28	2,56	5,12	10,24	20,48
5,00		0,18	0,36	0,72	1,44	2,88	5,76	11,52
5,50		0,08	0,15	0,30	0,60	1,2	2,4	4,8
6,00		0,03	0,06	0,11	0,22	0,44	0,88	1,76

^a Valores calculados utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch.

Da mesma forma que no ácido acético, observou-se uma relação direta entre os valores de pH e a concentração inibitória, ou seja, quanto maior o pH do substrato, maiores foram as concentrações de ácido sórbico necessárias para inibir o desenvolvimento de cada isolado (Figura 4). Marín et al. (2003) determinaram que o ácido sórbico tem uma limitada atividade antifúngica em produtos de panificação com elevado pH (6,00) e que em alguns casos pode estimular o crescimento e a resistência dos fungos. Tal fato vem reforçar a importância de se considerar o pH do substrato quando os ácidos orgânicos forem utilizados como conservantes.

Também levando em consideração as informações relativas à dissociação das moléculas do ácido sórbico (Tabela 11), pudemos determinar os dados referentes às concentrações inibitórias mínimas de ácido sórbico não dissociado (Tabela 12) e, ao mesmo tempo, as CIM de ácido sórbico necessárias para controlar o crescimento fúngico sob diferentes condições de pH.

Na Tabela 13 é disponibilizado o interstício de valores das concentrações inibitórias mínimas calculadas para diferentes pH. Sendo assim nossos valores CIM de ácido sórbico não dissociado de (2,88-4,80mM) para o controle de isolados de *A. niger* são semelhantes com os determinados por Straford et al. (2009) de $2,55 \pm 0,45$ mM.

Tabela 12- Estimativa da concentração inibitória mínima (CIM) calculada de ácido sórbico não dissociado para isolados do gênero *Aspergillus* conforme o pH.

ÁCIDO SÓRBICO										
Fungo	pH	Concentração Inibitória de Ácido Não Dissociado (mM)								Variação
		4,50		5,00		5,50		6,00		
		C ^a	NC ^b	C ^a	NC ^b	C ^a	NC ^b	C ^a	NC ^b	
<i>Aspergillus carbonarius</i> (ITAL 1375cc)		0,64	1,28	0,72	1,44	0,60	1,20	0,44	0,88	0,72 < CIM ≤ 0,88
<i>Aspergillus carbonarius</i> (ITAL 792cc)		0,64	1,28	0,72	1,44	0,64	1,20	0,44	0,88	0,72 < CIM ≤ 0,88
<i>Aspergillus luchuensis</i> (ITAL 325F)		1,28	2,56	1,44	2,88	1,20	2,40	1,76	-	1,76 < CIM ≤ 2,40
<i>Aspergillus niger</i> (ITAL 331F)		2,56	5,12	2,88	5,76	2,40	4,80	1,76	-	2,88 < CIM ≤ 4,80
<i>Aspergillus niger</i> (ITAL 1240cc)		2,56	5,12	2,88	5,76	2,40	4,80	1,76	-	2,88 < CIM ≤ 4,80
<i>Aspergillus niger</i> (ITAL 500F)		2,56	5,12	2,88	5,76	2,40	4,80	1,76	-	2,88 < CIM ≤ 4,80
<i>Aspergillus tubingensis</i> (ITAL 277F)		2,56	5,12	2,88	5,76	2,40	4,80	1,76	-	2,88 < CIM ≤ 4,80
<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 2384)		0,64	1,28	0,72	1,44	0,60	1,20	0,44	0,88	0,72 < CIM ≤ 0,88
<i>Aspergillus parasiticus</i> (ITAL 79cc)		0,64	1,28	0,72	1,44	0,60	1,20	0,44	0,88	0,72 < CIM ≤ 0,88

C^a= maior concentração testada em que houve crescimento fúngico; NC^b= menor concentração testada em que não houve crescimento fúngico.

Tabela 13- Estimativa da concentração inibitória mínima (calculada) de ácido sórbico para isolados do gênero *Aspergillus*.

Fungo	ÁCIDO SÓRBICO			
	Concentração inibitória mínima calculada ^a (mM)			
	4,50	5,00	5,50	6,00
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 1375cc)	1,10-1,40	2,00-2,40	4,90-5,90	13,0-15,7
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 792cc)	1,10-1,40	2,00-2,40	4,90-5,90	13,0-15,7
<i>A. luchuensis</i> (ITAL 325F)	2,80-3,80	4,90-6,70	11,8-16,0	31,6-42,9
<i>A. niger</i> (ITAL 331F)	4,50-7,50	8,00-13,3	19,0-32,0	51,6-85,7
<i>A. niger</i> (ITAL 1240cc)	4,50-7,50	8,00-13,3	19,0-32,0	51,6-85,7
<i>A. niger</i> (ITAL 500F)	4,50-7,50	8,00-13,3	19,0-32,0	51,6-85,7
<i>A. tubingensis</i> (ITAL 277F)	4,50-7,50	8,00-13,3	19,0-32,0	51,6-85,7
<i>A. flavus</i> (ATCC 2384)	1,10-1,40	2,00-2,40	4,90-5,90	13,0-15,7
<i>A. parasiticus</i> (ITAL 79cc)	1,10-1,40	2,00-2,40	4,90-5,90	13,0-15,7

^a Valores calculados utilizando a equação de Henderson–Hasselbalch.

É possível afirmar que o ácido sórbico tem maior poder antifúngico que o ácido acético; pois foram necessárias concentrações de ácido acético até 50 vezes maiores quando comparadas com as concentrações de ácido sórbico utilizadas para exercer o mesmo efeito nas mesmas condições. Resultados semelhantes foram observados por Stratford et al. (2009), que determinaram as CIM de ácido acético e ácido sórbico para cada um dos fungos deterioradores: *Aspergillus phoenicis*, *Penicillium variotii*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium glabrum*, *Trichoderma atroviride* e *A. niger*; sendo que as CIM de ácido acético foram 30 vezes maiores quando comparadas com as CIM de ácido sórbico. Portanto eles sugerem que cada um destes ácidos possui diferentes mecanismos de ação.

Na mesma pesquisa Stratford et al. (2009), comprovaram, através de citometria de fluxo com conídios de *A. niger*, que estes ácidos agem de maneira diferente. Quando adicionado ácido acético em pH 4,00 ocorria um declínio imediato no pH citoplasmático, saindo de valores perto da neutralidade para valores de pH 4,70. No entanto, embora o ácido sórbico tenha causado uma queda rápida, esta foi muito menor; com o pH citoplasmático permanecendo acima de pH 6,30. Assim, os pesquisadores concluíram que enquanto a inibição de *A. niger* por ácido acético ocorre principalmente devido à acidificação citoplasmática, seguindo postulados da teoria clássica, a inibição por ação do ácido sórbico ocorre de uma maneira distinta.

Em pesquisa mais recente Stratford et al. (2013) determinaram que a atividade do ácido sórbico ocorre principalmente em nível de membrana, afetando primariamente as proteínas desta, demonstrando que o ácido sórbico provocou uma inibição da bomba de prótons (H^+ -ATPase) da membrana plasmática. As proteínas transmembranais (inseridas na bicamada lipídica), são responsáveis, na maioria dos casos, pela percepção dos sinais e estímulos, provindos do exterior e pela subsequente transmissão de um sinal intracelular gerador de respostas fisiológicas necessárias para a sobrevivência da própria célula.

A função básica da H^+ - ATPase de membrana citoplasmática de fungos e plantas é criar um gradiente eletroquímico de prótons, através de um sistema de transporte ativo, importante para a captação de nutrientes e para a regulação do pH intracelular (MONTEIRO; SÁ-CORREIA 1998; PORTILLO, 2000).

Demonstra-se assim a importância de considerar o pH, a composição química do alimento e as espécies fúngicas predominantes no produto ao se calcular a concentração dos ácidos acético e sórbico a ser adicionado com o propósito de prolongar a vida útil dos alimentos. Dado que aplicação de concentrações inadequadas especificamente sub-letais podem induzir a tolerância aos ácidos orgânicos (HILL, O'DRISCOLL; BOOTH, 1995).

5.3 Determinação da influência dos ácidos orgânicos em diferentes condições de pH sobre a produção de ocratoxina A

5.3.1 Curva padrão

Os valores das áreas obtidas nos picos dos cromatogramas foram correlacionadas com as concentrações de padrão injetados (Tabela 14), obtendo-se assim a curva de calibração (Figura 5).

O coeficiente de correlação (r^2) da curva padrão foi de 0,9995 indicando uma resposta alta da análise.

Tabela 14- Áreas segundo a concentração de ocratoxina A usados para a construção da curva de calibração.

Área	Concentração da ocratoxina A (mg/L)
193,6	0,35
375,2	0,71
698,3	1,40
1383,0	2,80
2505,1	5,60

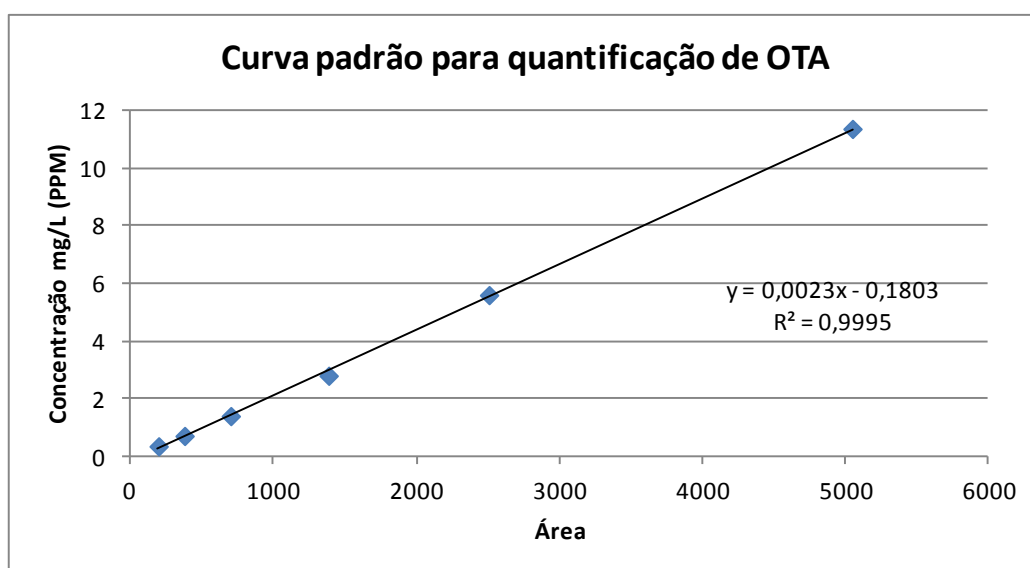


Figura 5. Curva padrão de ocratoxina A.

5.3.2 Ácido cítrico

No caso do ácido cítrico os resultados obtidos no meio de cultura YES foram os mesmos que aqueles obtidos nas análises de determinação da suscetibilidade, no meio de cultura base (Item 5.1.1.1).

Uma vez que o ácido cítrico não exerceu atividade antifúngica para *A. niger* (ITAL 331F) nos valores de pH escolhidos para realizar as análises de ocratoxina A (4,50 e 5,00) não foram encontradas as concentrações inibitórias. Em virtude disto foram selecionados para as análises de ocratoxina A os cultivos oriundos das duas concentrações mais altas testadas.

Só houve inibição do crescimento do fungo *A. carbonarius* (ITAL 792cc) na concentração 800mM no pH 5,00; neste caso foi analisada a quantidade de toxina gerada pelo fungo quando aplicada 0, 25 e 50% da concentração inibitória.

A maior quantidade de toxina foi produzida pelos controles, observando-se diminuição na medida em que era adicionada maior quantidade de ácido (Figura 6 e 7). A redução da produção de ocratoxina A foi consideravelmente importante quando adicionados 50% da concentração inibitória e da concentração máxima (800 mM, nos casos onde não foi encontrada concentração inibitória); sendo significativo estatisticamente unicamente no fungo *A. carbonarius* (ITAL 792cc) ($p < 0,001$). Quanto ao fungo *A. niger* (ITAL 331F), as diferenças não foram significativas.

Além dos efeitos isolados de fungo ($p < 0,001$) e concentração ($p < 0,001$), houve efeito significativo de interação entre fungo e concentração ($p < 0,001$). Independentemente do pH (4,5 e 5,0), para o *A. carbonarius* (ITAL 792cc) (Tabela 15).

Esta é uma observação importante já que o ácido cítrico possui o status de GRAS; este ácido é um produto amplamente utilizado numa gama de alimentos, embora o uso do ácido cítrico segundo as legislações vigentes seja principalmente como acidulante e antioxidante.

Com nossos resultados podemos destacar o ácido cítrico como um possível inibidor da produção de ocratoxina A, com potencial para ser utilizado conjuntamente com outros ácidos orgânicos que apresentem boa atividade antifúngica. Igualmente mais estudos deverão ser feitos para confirmar esta suposição. Não foram achados trabalhos semelhantes para discutir o efeito do ácido cítrico na produção de toxina.

***A. carbonarius* ITAL 792cc
(Ácido Cítrico)**

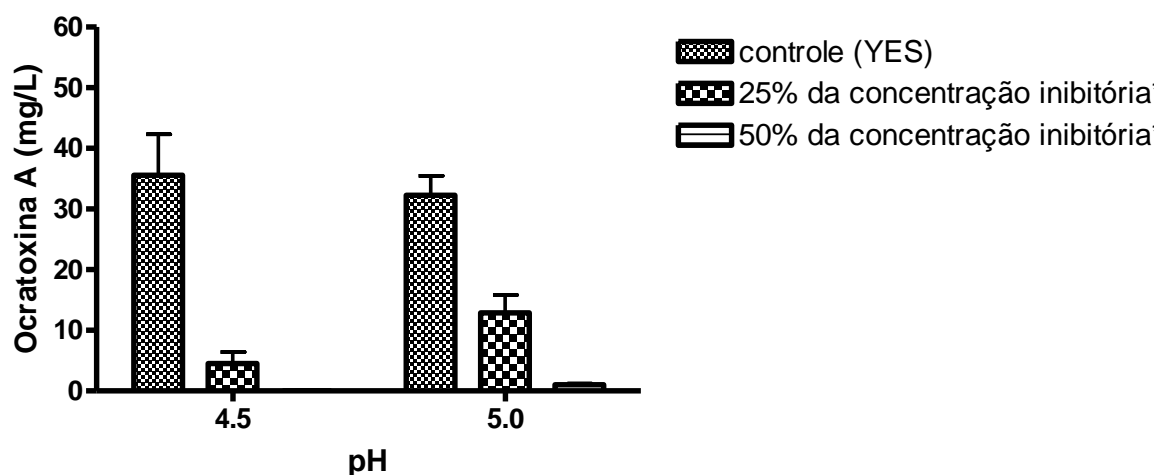


Figura 6. Produção de ocratoxina A em mg/L pelo fungo *A. carbonarius* ITAL 792cc, quando adicionadas concentrações mais baixas que a concentração inibitória de ácido cítrico, nos pH 4,50 e 5,00. (ou maior concentração testada quando não houve inibição fúngica).

***A. niger* ITAL 331cc
(Ácido Cítrico)**

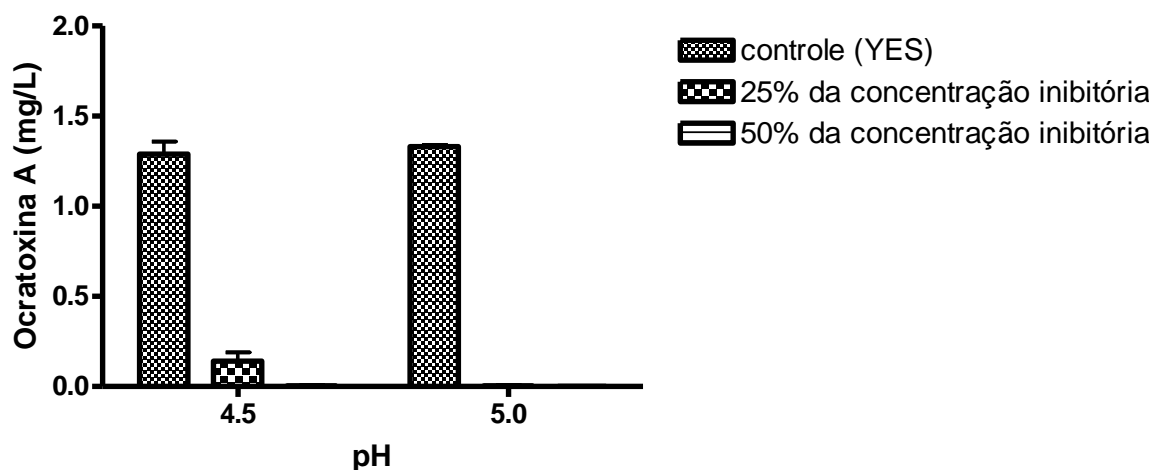


Figura 7. Produção de ocratoxina A em mg/L pelo fungo *A. niger* (ITAL 331F), quando adicionadas concentrações mais baixas que a concentração inibitória de ácido cítrico, nos pHs 4,50 e 5,00 (ou maior concentração testada quando não houve inibição fúngica).

Tabela 15- Relação entre as variáveis espécie fúngica, pH e concentração de ácido cítrico na produção de ocratoxina A, de acordo com a análise de variância.

Efeitos	Valor- p
Fungo	<0,001
pH	0,482
Concentração	<0,001
Fungo x pH	0,468
Fungo x concentração	<0,001
pH x concentração	0,262
Fungo x pH x concentração	0,243

5.3.3 Ácido acético

No caso do ácido acético as concentrações inibitórias (CI) foram as seguintes: para *A. carbonarius* foram de 50 mM, no pH 4,50 e de 100 mM no pH 5,00. Para *A. niger* foram de 100 mM, no pH 4,50 e 200 mM no pH 5,00. Estes valores coincidem perfeitamente com os obtidos no meio de cultura base (item 5.1.1.2).

Uma vez determinadas as CI, as culturas provenientes dos 25 e 50 % da CI para cada um dos isolados foram selecionadas para as análises de ocratoxina A. Sendo que para *A. carbonarius* no pH 4,5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 12,5 mM e $CI_{50\%}$ = 25 mM e no pH 5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 25mM e $CI_{50\%}$ = 50 mM. E para *A. niger* No pH 4,5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 25 mM e $CI_{50\%}$ = 50 mM e no pH 5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 50 mM e $CI_{50\%}$ = 100 mM.

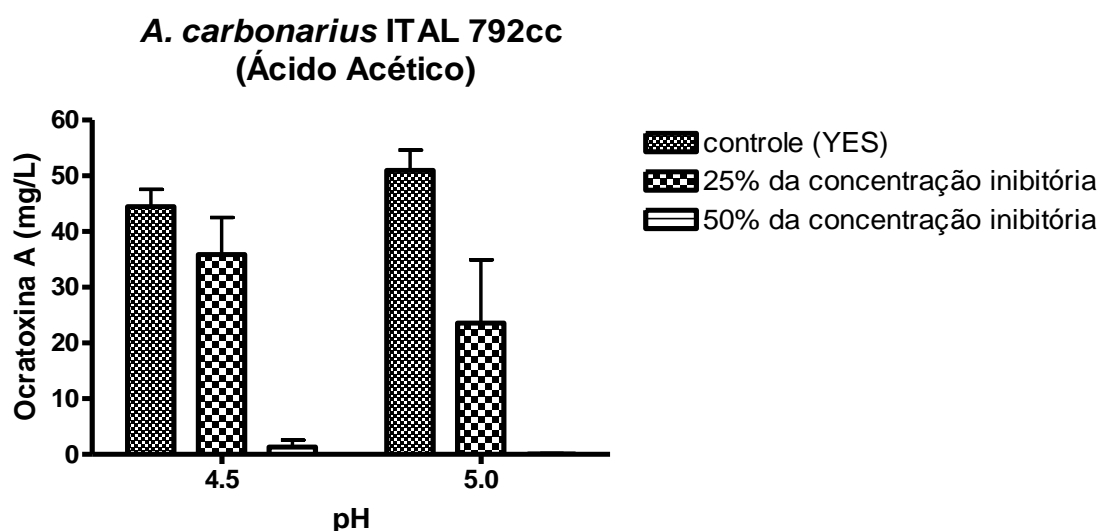


Figura 8. Produção de ocratoxina A em mg/L pelo fungo *A. carbonarius* (ITAL 792cc), quando adicionadas concentrações mais baixas que a concentração inibitória de ácido acético nos pHs 4,50 e 5,00.

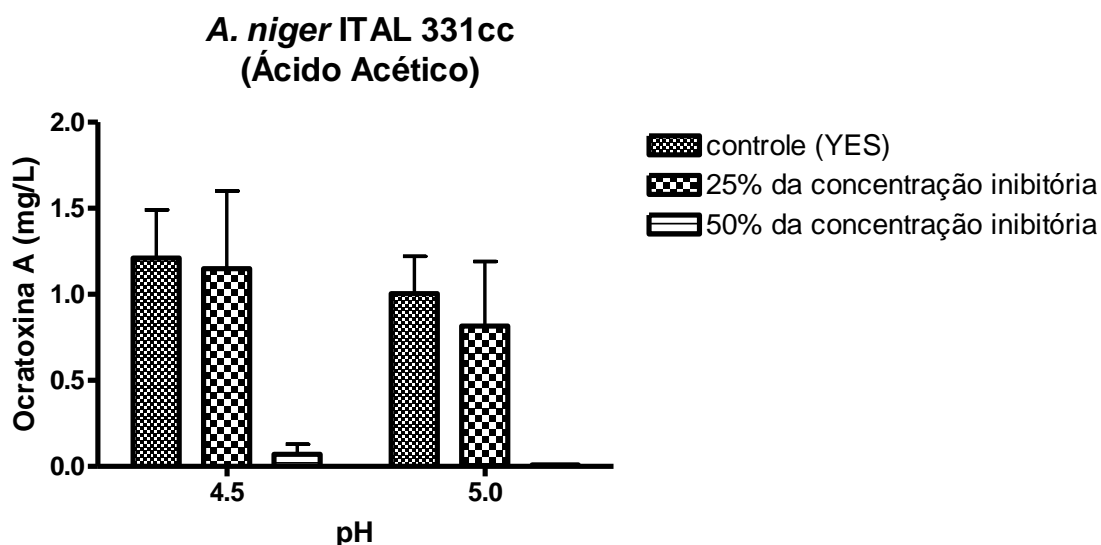


Figura 9. Produção de ocratoxina A em mg/L pelo fungo *A. niger* (ITAL 331F), quando adicionadas concentrações mais baixas que a concentração inibitória total de ácido acético nos pHs 4,50 e 5,00.

Observou-se que a maior produção de toxina correspondeu aos controles em ambos os pH (4,50 e 5,00), para os dois isolados; *A. carbonarius* (ITAL 792cc) (Figura 8) e *A. niger* (ITAL 331F) (Figura 9).

Por outro lado, a produção de ocratoxina A foi consideravelmente reduzida quando foi utilizada o 50% da CI, no entanto, conforme o teste de Bonferroni (post-hoc), independentemente do pH (4,50 ou 5,00), a redução na produção de ocratoxina A com o aumento da concentração do ácido somente ocorreu significativamente ($p < 0,001$) para o fungo *A. carbonarius* (ITAL 792cc) (Tabela 16). Esta redução se deve ao fato que as $CI_{50\%}$ estão bastante próximas das CIM calculadas para ambos os fungos.

Tabela 16- Relação entre as variáveis espécie fúngica, pH e concentração de ácido acético na produção de ocratoxina A, de acordo com a análise de variância.

Efeitos	Valor- ρ
Fungo	<0,001
pH	0,598
Concentração	<0,001
Fungo x pH	0,657
Fungo x concentração	<0,001
PH x concentração	0,289
Fungo x pH x concentração	0,300

Nossos resultados sugerem a efetividade do ácido acético no controle da produção de ocratoxina A, quando utilizado em concentração próxima da CIM, no entanto quando utilizado em concentrações muito abaixo da CIM, o ácido acético não tem influência na produção de ocratoxina A. Da mesma forma que para o ácido cítrico não foram achados estudos semelhantes.

5.3.4 Ácido sórbico

No caso do ácido sórbico as concentrações inibitórias determinadas no meio de cultura YES foram menores que as determinadas no meio de cultura base (Item 5.1.1.3), isso unicamente para o fungo *A. carbonarius*. Acredita-se que isso possa ser atribuído aos requerimentos nutricionais do fungo *A. carbonarius*, visto que o meio de cultura YES é mais rico em nutrientes que o meio base utilizado, o que pode interferir com processos metabólicos e elevar a resistência desta espécie ao ácido sórbico. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17- Concentração inibitória, de ácido sórbico, para os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* quando cultivados em meio de cultura YES.

Fungo	pH	Concentração inibitória (mM)
<i>A. carbonarius</i> (ITAL 792cc)	4,50	4,0
	5,00	8,0
<i>A. niger</i> (ITAL 331F)	4,50	8,0
	5,00	16

Uma vez obtidas as CI foram selecionadas para as análises de ocratoxina A as culturas provenientes dos tubos contendo 25 e 50 % da CI para cada um dos isolados. Tendo sido para *A. carbonarius* no pH 4,5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 1 mM e $CI_{50\%}$ = 2 mM e no pH 5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 2 mM e $CI_{50\%}$ = 4 mM. E para *A. niger* No pH 4,5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 2 mM e $CI_{50\%}$ = 4 mM e no pH 5 $CI_{0\%}$ = controle; $CI_{25\%}$ = 4 mM e $CI_{50\%}$ = 8 mM.

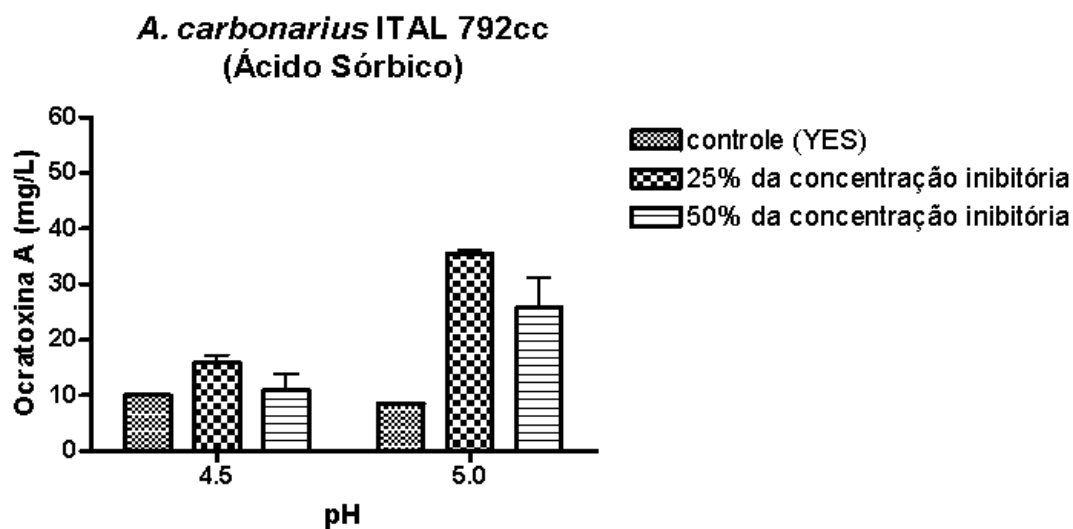


Figura 10. Produção de ocratoxina A em mg/L pelo fungo *A. niger* (ITAL 792cc), quando adicionadas concentrações mais baixas que a concentração inibitória de ácido sórbico nos pHs 4,50 e 5,00.

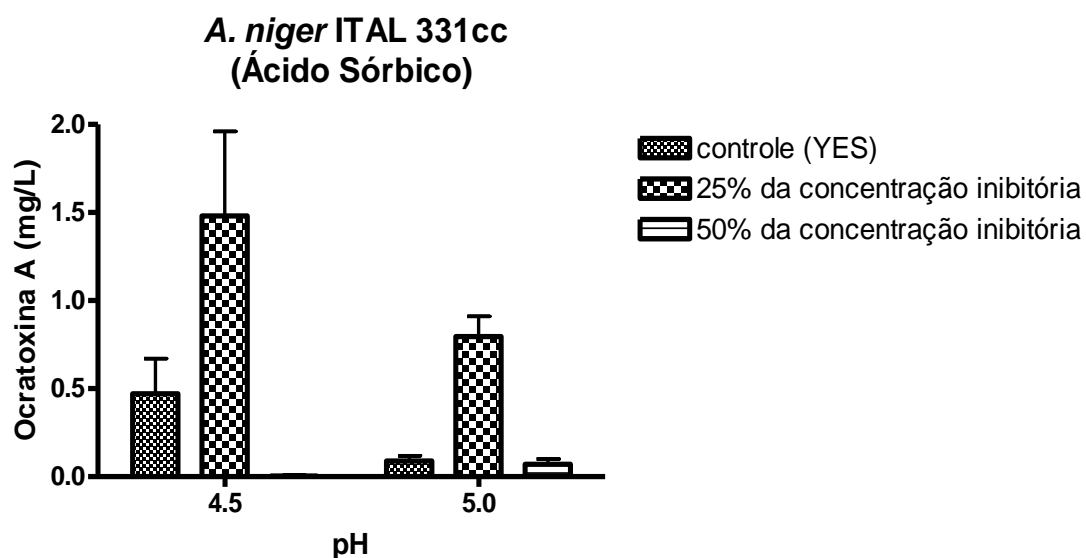


Figura 11. Produção de ocratoxina A em mg/L pelo fungo *A. niger* (ITAL 331F), quando adicionadas concentrações mais baixas que a concentração inibitória de ácido sórbico, nos pHs 4,50 e 5,00.

Em contraste com os resultados obtidos no ácido acético, neste caso os valores máximos de produção de ocratoxina A não foram dados pelos controles, mas obtidos quando utilizado 25% da CI de ácido sórbico, isto aconteceu para ambos isolados (Figura 10 e 11). Porém, só para o fungo *A. carbonarius* a produção de ocratoxina A diferiu significativamente apenas no pH=5,0.

Tabela 18- Relação entre as variáveis espécie fúngica, pH e concentração de ácido sórbico na produção de ocratoxina A, de acordo com a análise de variância.

Efeitos	Valor- ρ
Fungo	<0,001
pH	<0,001
Concentração	<0,001
Fungo x pH	<0,001
Fungo x concentração	<0,001
pH x concentração	0,005
Fungo x pH x concentração	0,005

Houve significância estatística de todos os efeitos quanto ao ácido sórbico. Como houve efeito triplo ($\rho=0,005$), este é o mais importante de ser interpretado o que demonstra a grande necessidade de analisar o pH do alimento onde será utilizado o ácido sórbico, o tipo de contaminação inicial e as CIM necessárias para controlar o tipo de contaminação presente (Tabela 18).

Gareis et al. (1984) encontraram resultados similares quando aplicaram sub-dosagens de ácido sórbico para controlar o crescimento de isolados dos fungos *A. flavus* e *Fusarium acuminatum*, produtores de Aflatoxina B₁ e Toxina T2 respectivamente. Neste estudo sempre a maior produção de ambas as toxinas foi detectada ao serem aplicadas sub-dosagens de ácido sórbico, quando comparadas com o controle (com valores até 9 vezes maiores em alguns casos). Isto foi atribuído ao mecanismo de ação do ácido sórbico, já que este pode afetar o ciclo dos ácidos tricarbóxicos e conseqüentemente elevar dentro a célula fúngica os níveis de acetilcoenzima A, um substrato essencial na biossíntese de aflatoxina B₁ e Toxina T2.

No estudo de Gareis et al. (1984) não foi considerado o pH do meio de cultura e tampouco as concentrações de ácido não dissociado, o que nos impossibilita de fazer comparações adicionais com os dados obtidos em nossos experimentos.

Em outros estudos com várias cepas *Penicillium verrucosum* produtoras de ocratoxina A, Arroyo et al. (2005) determinaram que as sub-dosagens de conservantes como o sorbato de potássio e o propionato de cálcio (12,70mM no pH 6,00) poderiam estimular a produção de ocratoxina; eles também encontraram uma interação altamente significativa entre a concentração do ácido (sub-dosagem), o pH e a atividade de água do meio.

Os autores antes mencionados alertaram do perigo de diminuir as quantidades destes conservantes na fabricação de produtos de umidade intermediária (A_w 0,93) e pH altos, referindo-se especificamente aos produtos de panificação, fato que os dados observados em nossos experimentos também corroboram.

A bibliografia consultada e os resultados de nossos experimentos nos permitem inferir que é indiscutível a eficiência do ácido sórbico e dos seus sais como antifúngico (Straford et al., 2009; Huang et al., 2010). Com os resultados obtidos em nossos experimentos previamente relatados foi possível calcular as CIM de ácido sórbico, as quais indicam que será necessário aplicar dosagens deste conservante entre 4,50-7,50mM em alimentos com pH 4,50; valores entre 8,00-13,3mM em pH 5,00; entre 19,0-32,0mM em pH 5,5; e no pH 6 serão necessárias 51 a 85,7mM para o controle de todas as espécies utilizadas neste estudo (Tabela 13).

Segundo a legislação brasileira os valores máximos recomendados de uso do ácido sórbico varia dentre os 100 e os 6000 mg/Kg ou mg/L (Tabela 1), o que representa cerca de 0,89 e 53,4 mM, respectivamente. Estes valores dependerão do tipo de alimento, sendo os valores mais baixos recomendados pela legislação os para xaropes, refrigerantes, vinhos e sidras, os intermediários correspondem aos produtos de panificação, margarina e queijos, além de outros produtos similares a estes em valores de 1000 mg/kg (8,9mM) e 2000 mg/kg (17,8mM) para as massas semi-prontas e queijo ralado; já o valor máximo recomendado é exclusivamente para uso em proteína texturizada de soja com 6000 mg/kg (53,4 mM).

Também foi encontrada uma pesquisa que investigou as doses de ácido sórbico rotineiramente empregadas pela indústria alimentícia em vários alimentos. Os pesquisadores concluíram que a utilização de sorbatos é consideravelmente menor que o nível máximo permitido pela legislação, com valores em queijos de 3,34-12,0mM, iogurte 1,12-1,89mM, e em margarina de níveis não detectados até 7,14mM (TFOUNI; TOLEDO, 2002). Sendo assim, quando comparamos os valores de CIM de ácido sórbico para os fungos estudados, os valores recomendados pela legislação e o que

verdadeiramente é aplicado pela indústria em alguns alimentos, é possível observar que este ácido é utilizado em alguns casos em concentrações bastante baixas.

Considerando o estímulo na produção de ocratoxina A observado em nossos experimentos quando usadas concentrações de ácido sórbico menores às CIM, existem grandes indícios que o uso inadequado destes conservantes pode colocar em risco a saúde dos consumidores, dado que aplicação de concentrações inadequadas especificamente sub-letais podem induzir a tolerância estimulando o crescimento (MARIN et al., 2003) e a produção de toxinas (ARROYO et al., 2005), portanto as quantidades deste ácido utilizadas nos alimentos deverão ser calculadas com muita cautela para garantir inocuidade dos alimentos.

Estudos mais avançados referente ao tema foram feitos por Schmidt-Heydt et al. (2007) os quais determinaram que a biossíntese de ocratoxina A em espécies de *Penicillium verrucosum* é influenciada principalmente por duas condições: uso de concentrações sub-letais de sorbato de potássio e atividade de água intermediária do meio. Estes pesquisadores também sugeriram a existência de dois tipos de reguladores genéticos de ocratoxina A, um que seria ativado em condições normais e outro que seria ativado em condições de estresse, como as anteriormente mencionadas.

Podemos sugerir que existiria a necessidade de estabelecer dentro da legislação uma variação de concentrações mínimas e máximas a serem aplicadas, quando for o caso, dado que ao se estabelecer somente um valor máximo possibilitaria a indústria a utilizar valores mais baixos aos efetivos o que constitui um possível risco para o desenvolvimento fúngico e síntese de toxinas. Porém, mais estudos deverão ser feitos visto que as análises conduzidas em nossos experimentos consideraram principalmente o pH como único fator potencializador do efeito antifúngico e na prática da conservação de alimentos são utilizados uma ampla variedade de parâmetros paralelos que poderão influenciar sobre a efetividade deste ácido no controle microbiano.

6. CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento desta pesquisa foi possível observar que a suscetibilidade dos *Aspergillus* spp. avaliados é variável conforme o ácido orgânico aplicado e sofre forte influência do pH do meio. Observou-se também a existência de diferenças quanto a influência dos ácidos orgânicos testados sobre a produção de ocratoxina A.

A suscetibilidade dos isolados aos ácidos orgânicos não foi correlacionada com o gênero ou com a sessão na qual os mesmos estão alocados, mas o comportamento parece ser o mesmo dentro de uma mesma espécie.

As espécies *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. parasiticus* foram as mais sensíveis aos efeitos tanto do ácido acético quanto do ácido sórbico, embora as concentrações inibitórias do ácido sórbico tenham sido consideravelmente inferiores.

As concentrações inibitórias para todas as espécies avaliadas frente aos ácidos acético e sórbico estiveram diretamente relacionadas ao pH, sendo que a cada acréscimo de 0,5 no valor de pH faz-se necessário dobrar as concentrações de cada ácido para que se obtenha a inibição do crescimento fúngico.

O comportamento dos isolados *Aspergillus* de frente ao ácido cítrico diferiu dos demais ácidos orgânicos testados, sendo que seu poder antifúngico tende a ser maior em valores mais altos de pH.

A. flavus e *A. luchuensis* apresentaram maior tolerância ao ácido cítrico e foram necessárias quantidades altas deste ácido para provocar a inibição de todos os fungos testados. O ácido cítrico apresenta, portanto, ação antifúngica limitada.

Para os ácidos acético e cítrico foi observado um padrão de redução gradativa da produção de ocratoxina A pelo *A. carbonarius* quanto mais próxima a concentração do ácido estivesse da concentração inibitória quando comparado com o controle sem presença de ácido, independente do pH.

Para *A. niger* a redução da produção da ocratoxina A em presença ácido acético somente foi significativa quando aplicada 50% da concentração inibitória. Já para ácido cítrico a redução foi significativa em ambas as doses testadas, quando comparado com o controle sem presença de ácido, independente do pH.

Com relação ao ácido sórbico, houve estímulo significativo à produção de ocratoxina A pelo *A. carbonarius* em presença de ácido sórbico em pH 5.00. Já no pH 4.50 a produção foi estatisticamente similar à encontrada no controle sem presença do ácido.

Houve um acréscimo significativo na quantidade de ocratoxina A produzida por *A. niger* quando em presença de 25% da concentração inibitória de ácido sórbico, independente do pH.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ácidos sórbico e ácido acético representam uma boa alternativa para o controle da deterioração fúngica de alimentos. Por serem mais efetivos em valores baixos de pH, se forem utilizados em alimentos com essas características de pH, as concentrações a serem adicionadas serão consideravelmente menores, aconselhando-se calcular a dose a ser aplicada com base no pH do substrato. Esta atitude pode reduzir a quantidade do conservante a ser aplicada nos alimentos, o que atinge os interesses da população e contribui para a redução dos gastos das indústrias alimentícias. Cuidados também precisam ser tomados com o uso de doses que sejam efetivas no controle do crescimento fúngico, uma vez que o uso de subdosagens poderá, no caso do ácido sórbico, estimular a produção de ocratoxina A.

8. BIBLIOGRAFIA

ABARCA, L., BRAGULAT, G., CASTELLA, F., CABAÑES, F. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger*. var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.7, p.2650-2652, July. 1994.

ALMEIDA, A., ALABURDA, J., SHUNDO, L., RUVIERI, V., NAVAS, S., LAMARDO, L. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 300-303, July. 2007.

ANDERSEN, B., THRANE, U. Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. In: _____ **Advances in Food Mycology**. Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), Springer, New York, 2006.

ARROYO, M., ALDRED, D., MAGAN, N. Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, n.3, p. 223–231, Feb. 2005.

BÁRBOSA-CÁNOVAS, G., FERNÁNDEZ-MOLINA, J., ALZAMORA, S., TAPIA, M., LÓPEZMALO, A., CHANES, J. 2003. General Considerations for preservation of fruits and vegetables. In: Handling and Preservation of Fruits and Vegetables by Combined Methods for Rural Areas. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

BAYMAN, P., BAKER, J. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, v.162, p. 215-223, Sept. 2006.

BAYMAN, P., BAKER, J., DOSTER, M., MICHAELIDES, T., MAHONEY, N. Ochratoxin. Production by *Aspergillus ochraceus* Group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p. 2326-2329. May, 2002.

BENNETT, J., KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p.497-516, July. 2003.

BERG, T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed. **Food Control**, v.14, p. 219-224, June. 2003.

BOZIC, Z., DUANCIC, V., BELICZA, M., KRAUS, O., SKLJAROV, I. Balkan endemic nephropathy: Still a mysterious disease. **European Journal of Epidemiology**, v.11, p. 235-238, Apr. 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, Dec. 1998.

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

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 carnes e produtos cárneos.

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 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 RE nº 234, regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções de 09 de agosto de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União – D.O.U., de 22 de fevereiro de 2011.

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, Sep. 1999.

BULLERMAN, L. Micotoxins In: _____CABALLERO, B., TRUGO; L., FINGLAS, P. (eds.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. London: Academic Press, vol. 6. 2003.

CHARMELEY, L., ROSENBERG, A., TRENHOLM, H. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grain, foods and feedstuffs. In: Miller J.;Trenholm H. (eds). **Micotoxins in Grains**, St. Paul, MN: Eagan Press. 1994

CHAVEERACH, P., KEUZENKAMP, D., URLINGS, H., LIPMAN, L., VAN, K. In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. **Poultry Science**, v. 81, p. 621–628, May. 2002.

CHIKTHIMMAH, N., LABORDE, L., BEELMAN, R. Critical factors affecting the destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider treated with fumaric acid and sodium benzoate. **Journal of Food Science**, v. 68, p.1438–1442, July. 2003.

CODEX STAN 192-1995. Codex alimentarius normativa GSFA. (Codex General Standard for Food Additives). Disponível em www.codexalimentarius.net. Acesso em: dez. 2013.

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, Apr. 2012.

COPETTI, M., PEREIRA, J., IAMANAK, B., PITT, J., TANIWAKI, M. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 67–70, Sept. 2010.

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, Mar. 1977.

CURRIE, J. The citric acid fermentation of *A. niger*. In: **The Journal of Biological Chemistry**, v. 31, p. 15-37, Apr, 1917.

DAVIDSON, P. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTUILLE, T.J. **Food microbiology fundamentals and frontiers**, Washington: ASM Press., 520-526 p.1997.

DELACRUZ, L., BACH, P. The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. **Journal of Biopharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 277-304, Nov, 1990.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n 7, p. 45-48, Aug. 1996.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food (question no efsa-q-2005-154). **The EFSA Journal**, v.365, p.1-56. 2006.

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, jan. 1985.

FENNEMA, O. **Química de los alimentos**. 2 ed. – Zaragoza: Editorial Acribia, 1993.
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, Dez. 2000.

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

FRISVAD, J., FRANK, J., HOUBRAKEN, J., KUIJPERS, A., SAMSON, R. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v.50, p. 23-43, 2004.

FRISVAD, J., SAMSON, R., Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: ARORA, D. K.;MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Eds.), **Handbook of applied mycology, Foods and Feeds**, New York: Marcel Dekker, v.3, 1991.

GALTIER, P. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. In: M CASTEGNARO, R. PLESTINA, G. DIRHEIMER, IN. CHERNOZEMSKY, H. BASRTSCH. **Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours: IARC Science Publications No. 115**, p. 187 - 200, 1991.

GAREIS, M., BAUER, J., VON MONTGELAS, A., GEDEK B. Stimulation of aflatoxin B1 and T-2 toxin production by sorbic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.2, p.416-418, Feb. 1984.

GONZALEZ, A., HIERRO, N., POBLET, M., MAS, A., GUILLAMON, J.M. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. In: **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p. 295–304, July. 2005.

GLUSKER, J. Citrate conformation and chelation: enzymic implications. **Accounts of Chemical Research**, v.13, n.10, p. 345–352, Oct. 1980.

HARRIS, J., MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v.58, p. 709-716, Jan. 2001.

HILL, C., O'DRISCOLL, B., BOOTH, I. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p. 245–254, Dez. 1995.

HUANG, Y., WILSON, M., CHAPMAN, B., HOCKING, A. Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. **Food Microbiology**, v. 27, p. 33–36, Feb. 2010.

HUSSEIN, H., BRASEL, J. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v, 167, p. 101-134, Oct. 2001.

IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, v. 56, p. 571. International Regulation and Control. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 341–355, 1993.

JECFA. (2001). Joint Expert Committee on food additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO food additives, series 47. **FAO Food and Nutrition Paper**, v.74, p.292-322.

KOWLACZKOWSKI, M., GOFFEAU, A. Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. **Pharmacology and Therapeutics**, v.76, p. 219-242. Oct. /Dec. 1997.

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, Sep. 1983.

KRSKA, R. Mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p.1203–1204. 2009.

KWON, Y. RICKE, S.C. Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. In: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3458–3463, sep. 1998.

KUIPER-GOODMAN, T. Prevention of human mycotoxicosis through risk assessment and risk management. In: Miller J., Trenholm H.L. (eds) *Mycotoxins in Grains*, St Paul, Minnesota, USA. Eagan Press. 1994.

LEÓN, 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, Mar. /Apr. 2012.

LILLY, V. Chemical constituents of the fungal cell: elemental constituents and their roles. Chapter 8. In: Ainsworth, G.C., Sussman, A.S. (Eds.), **The Fungi: An Advanced Treatise**, v. 1. New York: Academic Press, 1965.

LÜCK, E. Sorbic acid as a food preservative. **International Flavours and Food Additives**, n.7, p.122-124. 1976.

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, May. 1987.

LUND, F., FRISVAD J. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1117-1123, Nov. 2003

MACHADO, R., TFOUNI, S., VICTORINO, E., TOLEDO, M. Presença dos ácidos benzoico e sórbico em vinhos e sidras produzidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v.27, n 4, p.847-850, out./dez. 2007.

MAGNOLI, C., ASTORECA, A., CHIACCHIERA, S., DALCERO, A. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v.163, p. 249-60, May. 2007.

MARAGOS, C. Recent advances in the development of novel materials for mycotoxin analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1205–1213, Nov. 2009.

MARÍN, 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. 25-258. Dec. 2003.

MERWE, V., STEYNE, P., FOURIE, L., SCOTT, D., THERON, J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produce by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, n. 205, p. 1112-1113, Mar. 1965.

MONTEIRO, G., SÁ-CORREIA I. In vivo activation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1370, p. 310-316, Mar. 1998.

OHISHI, K., KASAI, M., SHIMADA, A., HATAE, K. Effect of Acetic Acid Added to Cooking Water on the Dissolution of Proteins and Activation of Protease in Rice. Agriculture. **Food Chemistry**, v. 51, p.4054-4059, July. 2003.

PATEL, S., HAZEL, C., WINTERTON, A., MORTBY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 833-841, Oct. 1996.

PATERSON, R; LIMA, N; TANIWAKI, M. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, v.61, p. 1–15, July. 2014.

PERRONE, G., SUSCA, A., COZZI, G., EHRLICH, K., VARGA, J., FRISVAD, J., MEIJER, M., NOONIM, P., MAHAKARNCHANAKUL, W., SAMSON, R. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53-66. 2007.

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

PITT, J. et al. **Food mycology**. 3.ed. Washington: Editora, 1996.

PLUMRIDGE, A., HESSE, S., WATSON, A., LOWE, K, STRATFORD, M., ARCHER, D. The weak-acid preservative, sorbic acid, inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 550-552. Jan, 2004.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, n.1, p. 31-42, Mar. 2000.

PRADO, G., OLIVEIRA, M., ABRANTES, F., SANTOS, L., VELOSO, T., BARROSO, R. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p.192-196, mai/ago. 2000.

RICKE, S. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**. v.82, p. 632–639, 2003.

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. June. 1984.

SAMSON, R., HOUBRAKEN, J., KUIJPERS, A., FRANK, J., FRISVAD, J. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45-61. 2004.

SAMSON, R., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J., VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v.59: p, 129-145. 2007.

SEKIYAMA, B., RIBEIRO, A., MACHINSKI, P., MACHINSKI, J. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.289-294, Sep. 2005.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography**, v. 760, p.264–270, Jan. 1997.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J., VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

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, Nov, 1998.

STOPS, F., FELL, J., COLLET, J., MARTINI, L., SHARMA, H., SMITH, A. Citric acid prolongs the gastro-retention of a floating dosage form and increases bioavailability of riboflavin in the fasted state. In: **Journal of Pharmaceutical**, v. 308, p. 14-24, 2006.

STRATFORD, M., PLUMRIDGE, A., NEBE-VON-CARON, G., ARCHER, D. 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, p.37-43, Jun. 2009.

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, Oct. 1998.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 142, p.53-58, Aug. 1996.

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

STRATFORD, M., PLUMRIDGE, A., PLEASANTS, M., NOVODVORSKA, M., BAKER-GLENN, C., PATTENDEN, G., ARCHER, D. Mapping the structural requirements of inducers and substrates for decarboxylation of weak acid preservatives by the food spoilage mould *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 357-83, July. 2012.

STRATFORD, M., NEBE-VON-CARON, G., STEELS, H., NOVODVORSKA, M., UECKERT, J., ARCHER, D. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Jornal Internacional de Microbiologia de Alimentos**, v. 16, p.164-171. 2013.

SCHMIDT-HEYDT, M., BAXTER, E., GEISEN, R., MAGAN, N. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors ochratoxin and ota1pksPV gene expression by *Penicillium verrucosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p. 277-283, 2007.

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, Aug, 1998.

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

TFOUNI, S., TOLEDO, M. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food Control**, v.13, p.117-123, mar, 2002.

TROMBETE, F., FRAGA, M., SALDANHA, T. Avaliação da qualidade química e microbiológica de queijo parmesão ralado comercializado no Rio de Janeiro. **Revista do Instituto de Laticínios. "Cândido Tostes"**, v. 67, n. 385, p.11-16, mar/abr 2012.

VAAMONDE, G., PATRIARCA, A., PINTO, V.F., COMERIA, R., DEGROSSI, C., Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* Section *Flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 79-84, Nov. 2003.

VAN EGMOND, H., SPEIJERS, G. Natural toxins I. mycotoxins. In: VAN DER HEIJDEN, K. YOUNES, M., FISHBEIN, L. MILLER, S. (Eds.), **International Food Safety Handbook, Scienc, International Regulation and Control**. Marcel Dekker Inc, New York, 1999.

VARGAS, E., SANTOS, E., PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v.88, p.773-779, Jun. 2005.

VARGA, J., KEVEI, F., HAMARI, Z., TÓTH, B., TÉREN, J., CROFT, J., KOZAKIEWICZ, Z. 2000. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: SAMSON, R., PITT, J. (eds) **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers Amsterdam.

YANG, H., WILSON, M., CHAPMAN, B., HOCKING, A. D. Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. **Food Microbiology**, v, 27 p. 33–36, Feb, 2010.

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

WILLIAMS, A., NEAVES, P. Other type of spoilage moulds. In: **Food Spoilage Microorganisms** - Woodhead, UK: CRC Press. 2006.

ZIMMERLI, B., DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p.655-668, Sep. 1996.