CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS POR ADITIVOS QUÍMICOS

Os produtos alimentícios de qualidade microbiológica duvidosa não somente fazem correr riscos sanitários aos consumidores como também têm conseqüências extremamente nefastas para seu fabricante, tais como ações legais, influência negativa na imagem da marca, recolhimento dos produtos das prateleiras, etc. Os preservativos ou agentes antimicrobianos desempenham um importante papel na estabilização de alimentos. A crescente demanda por alimentos processados, de conveniência e de prateleira, tornou imperativo o uso de preservativos químicos. Alguns deles, como sulfitos, nitratos e o próprio sal, já são usados há séculos. A escolha de um agente antimicrobiano deve estar baseada em um conhecimento do espectro antimicrobiano do preservativo, ou seja, a substância química e propriedades físicas do alimento, as condições de armazenamento e controle, e a garantia de uma alta qualidade inicial do alimento preservado.

A CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS

Centenas de gêneros e espécies de microrganismos, provenientes do solo, da água, do ar, de utensílios, do trato intestinal do homem e de animais, dentre outros, podem contaminar os alimentos. Os microrganismos encontrados em alimentos podem ser classificados em três categorias. Os microrganismos deterioradores promovem alterações químicas que comprometem a qualidade do alimento. Geralmente, a deterioração está associada a alterações sensoriais (aparência, odor, sabor, textura), resultantes da atividade metabólica dos microrganismos, que utilizam compostos do alimento como fonte de energia. Os microrganismos patogênicos promovem o desenvolvimento de infecções ou intoxicações no indivíduo que consumir o alimento contaminado. Por fim, há os que promovem reações químicas específicas que produzem alterações desejáveis em alimentos, modificando suas características sensoriais; é o caso dos microrganismos utilizados na produção de alimentos fermentados, como queijos, vinhos e pães, entre outros.

Os microrganismos contaminantes geralmente não estão presentes em tecidos vivos saudáveis; no entanto, invadem os tecidos quando ocorrem injúrias mecânicas ou desintegração de tecidos, como no processamento.

Alimentos comercialmente esterilizados e acondicionados em embalagens metálicas ou de vidro podem sofrer deterioração microbiológica se o tratamento térmico for insuficiente ou quando ocorrerem falhas na hermeticidade da embalagem, de forma a permitir a entrada de microrganismos. Para produtos pasteurizados, as alterações microbiológicas dependem das características do alimento, como meio de cultura, da carga microbiana sobrevivente ao tratamento térmico, de contaminações após o processamento, e da temperatura de estocagem.

De acordo com sua estabilidade, os alimentos podem ser classificados em perecíveis, semi perecíveis e não perecíveis. Os ***perecíveis*** são alimentos que se alteram rapidamente, a menos que sejam

submetidos a processos de conservação. Geralmente, requerem baixas temperaturas de estocagem para melhor estabilidade. Nos alimentos perecíveis, as alterações microbiológicas geralmente antecedem às demais, sendo muitas vezes perceptíveis sensorialmente pelo consumidor. Esses alimentos apresentam vida útil de apenas alguns dias quando refrigerados, e de alguns meses quando congelados. Exemplos: leite, carnes frescas, frutas e hortaliças *in natura*. Os ***semi perecíveis*** têm sua estabilidade aumentada em decorrência de determinadas técnicas de processamento. A estabilidade pode ser estendida para cerca de 30 a 90 dias, quando mantidos sob refrigeração. Exemplos: produtos cárneos defumados, queijos curados. Finalmente, os ***não perecíveis*** podem ser estocados a temperatura ambiente por um período de tempo prolongado, sem que haja crescimento microbiano suficiente para se caracterizar a deterioração. Reduções no valor comercial de tais produtos podem ocorrer devido a alterações físicas e químicas, após uma prolongada estocagem. Exemplos: cereais, grãos, produtos desidratados e enlatados.

O crescimento microbiano em alimentos pode resultar em alterações químicas que, por sua vez, podem acarretar alterações sensoriais, caracterizando um processo de deterioração. As alterações químicas dos principais componentes dos alimentos, promovidas por microrganismos, são apresentadas sumariamente a seguir.

Carboidratos - Os microrganismos utilizam os carboidratos como fonte de energia para seu desenvolvimento. O metabolismo desses nutrientes pode ocorrer segundo dois mecanismos básicos: em presença de oxigênio, pela utilização de carboidratos por microrganismos aeróbios, ou na ausência de oxigênio, pela utilização dos compostos por microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos, acumulando produtos que afetam sensorialmente o alimento. Os açúcares mais simples são preferencialmente utilizados pelos microrganismos, poucas sendo as espécies capazes de hidrolisar polissacarídeos. O metabolismo de monossacarídeos em anaerobiose gera como produto intermediário o ácido pirúvico que, dependendo das condições nutricionais do meio, é convertido a diferentes compostos, como ácido lático, etanol e ácido acético.

Proteínas - Não atravessam a membrana celular de microrganismos que, para utilizá-las, secretam enzimas que as hidrolisam a peptídeos e aminoácidos. A degradação de aminoácidos resulta na formação de compostos de odor desagradável, como as aminas biogênicas, caracterizando a chamada putrefação, facilmente detectável. As aminas biogênicas ocorrem em vários tipos de produtos, como pescados, carnes, leite e derivados, cerveja, uva e vinho. Nos pescados, a formação de aminas biogênicas (como a trimetilamina) tem recebido atenção especial, graças à sua correlação com a deterioração dessa classe de produtos. A degradação de proteínas, além de alterar o aroma, pode resultar em modificações na textura do produto, como o amolecimento dos tecidos.

Lipídios - Algumas bactérias produzem lípases que catalisam reações de hidrólise de triglicerídeos, produzindo ácidos graxos livres, muitos dos quais, especialmente os de baixo peso molecular, conferem odor desagradável ao produto, caracterizando a rancidez hidrolítica.

Vários fatores afetam a velocidade das alterações microbiológicas, ou seja, a capacidade de sobrevivência ou crescimento dos microrganismos presentes em um alimento. Entre esses fatores, existem os que se relacionam com as características do próprio alimento (fatores intrínsecos) e os associados ao ambiente (fatores extrínsecos). Os fatores intrínsecos são, principalmente, a atividade de água, o pH, a composição química e o potencial redox, enquanto que os extrínsecos são a temperatura, a umidade relativa e a composição gasosa do ambiente.

Atividade de água (A_w) - Controlar a água presente nos alimentos é uma das técnicas mais antigas para a preservação dos alimentos. Somente é considerada a água disponível para crescimento de microrganismos e reações de deterioração, também conhecida como "água livre". Existem várias formas de se controlar a "água livre": pode ser removida por secagem, solidificada por congelamento ou indisponibilizada pela adição de eletrólitos, como o NaCl, ou não-eletrólitos, como a sacarose. Os microrganismos não conseguem desenvolver-se se não houver "água livre" no alimento, e o alimento toma-se, então, estável contra a deterioração microbiana.

Nos alimentos a água existe sob duas formas: água livre e água combinada. Ainda não existe uma definição formal sobre o que pode ser considerado como "água combinada", mas uma de suas propriedades mais importantes é que ela não é congelável. Outras propriedades são a sua baixa pressão de vapor, alta energia de ligação, não disponibilidade como solvente, reduzida mobilidade molecular e propriedades dielétricas diferentes das da água livre.

O grau de disponibilidade de água em um alimento pode ser expresso como atividade de água (A_w) e define-se como a relação entre a fugacidade da água no alimento (f) e a fugacidade da água pura em uma mesma temperatura (f_o).

$$A_w = f / f_o$$

Para baixas pressões e temperaturas pode-se escrever essa equação da seguinte forma, que é a mais comum:

$$A_w = P / P_o$$

em que P é a pressão de vapor da água no alimento, e P_o é a pressão de vapor da água pura.

No equilíbrio, existe uma relação entre a A_w de um alimento e a umi-

dade relativa no equilíbrio (U.R.E.) do ar (expressa como porcentagem) no ambiente fechado em que esse se encontra e, portanto, é sempre 100 vezes maior que o valor de A_w

$$A_w = \% \text{ U.R.E.} / 100$$

A relação entre a U.R.E. e a A_w permite prever quais alimentos irão ganhar ou perder umidade, quando forem expostos a um ar com determinada umidade. O grau em que a água interage com os componentes químicos presentes e contribui para a textura do alimento é definido como teor de umidade (g de água/100g de sólidos) e seu estado termodinâmico é definido pelo potencial químico na equação:

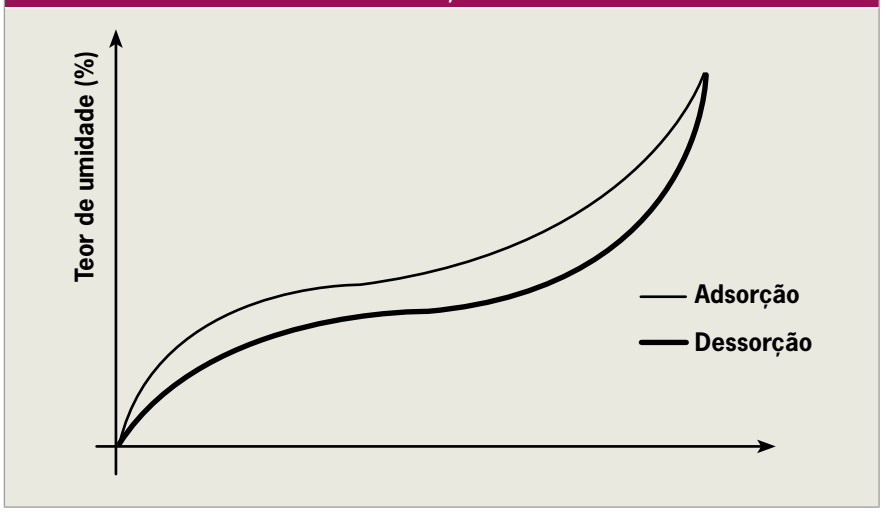
$$\mu_1 = \mu_0 + RT \ln A_W$$

em que: μ_1 = potencial químico da água, μ_0 = potencial químico no estado padrão, R = constante dos gases, T = temperatura absoluta, Aw = atividade de água termodinâmica.

A força que promove as reações químicas com água em um alimento é proporcional ao potencial químico da água existente nele. Pela formulação ou processamento, a atividade de água em um alimento pode ser variada ou controlada. O principal fator na estabilidade de um alimento não é, portanto, o teor de umidade deste, mas sim a disponibilidade da água para o crescimento de microrganismos e reações químicas.

Ambos os conceitos se relacionam, e essa relação é expressa em termos de isotermas de sorção (adsorção e dessorção). Geralmente, para um mesmo alimento, uma isoterma de adsorção apresenta valores inferiores aos da isoterma de dessorção, fenômeno conhecido como histerese. A Figura 1 apresenta uma isoterma de sorção típica, que indica a relação entre teor de umidade e atividade de água. Cada produto possui uma isoterma de sorção característica, não necessariamente com comportamento senoidal, como os autores costumam apresentar de forma genérica.

FIGURA 1 - ISOTERMAS DE SORÇÃO E O EFEITO DE HISTERESE



Os valores de A_w variam de 0 a 1. Na maior parte dos alimentos frescos, a A_w é superior a 0,95. A adição de solutos reduz a pressão parcial de vapor de água do alimento, resultando em redução da A_w; essa redução varia de acordo com o soluto adicionado e sua concentração. A A_w de um alimento pode ser ainda reduzida por remoção de água (desidratação) ou por congelamento.

A A_w intracelular das bactérias é ligeiramente menor do que a do meio externo, o que promove uma pressão de turgidez, que deve ser mantida, independentemente de variações da pressão osmótica do meio. Quando a A_w do meio externo é reduzida, as células são submetidas a um choque osmótico, perdendo água rapidamente. Em geral, as células microbianas reagem à perda temporária de turgidez, resultante do choque osmótico, aumentando seus níveis internos de solutos até superar a concentração externa. Essa regulação ocorre por meio dos chamados solutos compatíveis, moléculas orgânicas de baixo peso molecular e hidrossolúveis a altas concentrações. Os solutos compatíveis não interferem com o metabolismo celular, em contraste com solutos tóxicos; pertencem a diversas classes químicas, como aminoácidos (prolina, glicina e betaína), cátions (K^+), açúcares e polióis. Existem sistemas de transporte específicos na membrana citoplasmática que permitem o acúmulo controlado desses compostos. Esse acúmulo de solutos compatíveis, necessário quando as células estão em ambientes com A_w reduzida, requer muita energia, constituindo, portanto, um obstáculo ao crescimento.

Em ambientes de baixa A_w, as células microbianas consomem muita energia, quer para excluir solutos do seu ambiente interno, quer para desenvolver suas atividades metabólicas na presença de alta concentração de solutos. Como conseqüência, os microrganismos podem ter suas taxas de crescimento reduzidas, ou mesmo morrer, em situações extremas.

Diferentes microrganismos têm diferentes graus de tolerância a baixas atividades de água. Apesar de o nível de atividade de água para inibir efetivamente a atividade de microrganismos ser afetado por vários outros fatores (natureza dos solutos, pH, presença de conservadores químicos, natureza da flora microbiana), aceita-se como regra geral que o crescimento de bactérias é inibido a valores de A_w inferiores a 0,90; há exceções a essa regra como, por exemplo, as bactérias halofílicas, que podem crescer a A_w de até 0,76, e *Staphylococcus aureus*, que, sob condições aeróbias, pode chegar a crescer a 0,86. Alguns fungos podem crescer a atividades de água limite de até 0,60, o que faz com que esses microrganismos sejam de grande importância em alimentos desidratados. Valores de A_w inferiores a 0,60 não possibilitam deterioração

microbiana, pois não permitem crescimento de microrganismos, embora eles ainda possam sobreviver.

De acordo com a suscetibilidade a alterações microbiológicas, os alimentos podem ser classificados em:

•Alimentos de alta umidade (A_w > 0,85), muito propensos a deteriorações microbiológicas em geral. O limite inferior de atividade de água (0,85) foi estabelecido com base na atividade de água mínima requerida para crescimento de *Staphylococcus aureus*, a bactéria patogênica mais tolerante nesse aspecto.

•Alimentos de umidade intermediária (0,60 < A_w < 0,85), que podem sofrer deterioração por microrganismos xerofílicos e osmofílicos.

•Alimentos de baixa umidade (A_w < 0,60), nos quais não há crescimento de microrganismos, embora eles possam sobreviver.

Os valores ótimos e mínimos de A_w para crescimento microbiano nem sempre coincidem com aqueles válidos para produção de metabólitos.

A atividade de água afeta não apenas as taxas de alterações microbiológicas como, também, influenciam alterações químicas. A Figura 2 mostra que as reações têm sua velocidade relativa reduzida com a diminuição da A_w, até que em uma A_w abaixo de 0,2 todas as reações estejam praticamente inibidas, com exceção da oxidação de lipídios. A oxidação de lipídios passa por um mínimo, depois sofre uma rápida elevação. É importante notar que a Figura 2 serve apenas como indicação de comportamento provável das reações em um determinado alimento. Para se conhecer o comportamento real dessas reações, é necessário que sejam realizadas experiências para efetivamente se levantarem essas curvas.

Os fungos são os microrganismos mais resistentes à diminuição da atividade de água, sendo os principais responsáveis pela deterioração de alimentos na faixa de A_w de 0,61 - 0,70. Isto se deve ao fato de que nessa faixa não há competição de bactérias. Na Tabela 1, está colocada a atividade de água mínima para crescimento e para produção de toxinas de alguns microrganismos.

O pH – O pH é definido como:

$$pH = log\frac{1}{[H^+]} = -\log[H^+]$$

Assim, a redução de uma unidade no pH representa um aumento de dez vezes na concentração de H^+.

O pH interno de uma célula microbiana deve ser mantido dentro de limites estreitos. Em geral, valores de pH próximos à neutralidade são os mais favoráveis ao crescimento microbiano. Se o microrganismo estiver em um ambiente ácido, haverá um fluxo passivo de prótons para o interior da célula; o microrganismo consumirá então energia para transportar ativamente esses prótons para o exterior da célula. Se o fluxo de prótons para dentro e fora da célula tornar-se incontrolado, o pH interno pode mudar a tal grau, que ocorra inibição da síntese de componentes celulares e da capacidade de divisão das células.

A maioria dos microrganismos associados a alimentos cresce na faixa de pH de 5 a 8. Considerando-se que uma faixa de pH de três unidades representa uma diferença de mil vezes na concentração externa de íons H^+, a capacidade de crescimento microbiano dentro dessa faixa reflete uma grande capacidade de excluir ou reter esses íons e controlar seu pH interno.

Cada espécie tem sua faixa ótima de pH citoplasmático e uma capacidade diferente de regulação desse pH. Em geral, bolores e leveduras são mais tolerantes a ambientes de baixo pH do que as bactérias, sendo freqüentemente associados à deterioração de produtos de alta acidez, como sucos de frutas e bebidas carbonatadas. Os alimentos são geralmente classificados quanto ao pH em:

•Muito ácidos (pH < 4,0), como suco de abacaxi, suco de maracujá, refrigerantes, picles.

•Ácidos (4,0 <pH < 4,5), como derivados de tomate, suco de algumas frutas (ex.: caju).

•Pouco ácidos (pH > 4,5), como carne, leite, ovos.

Essa classificação baseia-se no pH mínimo para crescimento e produção de toxina por *Clostridium botulinum* (4,5) e no pH mínimo para crescimento da maioria das bactérias (4,0). Cada espécie microbiana tem uma faixa ótima de pH citoplasmático, e cada qual exibe uma capacidade diferente de regulação deste pH, mostrando assim diferentes tolerâncias a mudanças no pH externo. A faixa de pH externo limite para o crescimento de bactérias é de 4,0 a 9,0; para leveduras, essa faixa é de 1,5 a 8,0; para bolores, 1,5 a 11,0. Portanto, a faixa de pH dos alimentos muito ácidos inibe o crescimento de bactérias, mas ainda permite o desenvolvimento de fungos.

Composição química - O crescimento bacteriano exige a disponibilidade de nutrientes essenciais, tais como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, ferro e outros mi-

FIGURA 2 - TAXAS GENERALIZADAS DE REAÇÕES DE DETERIORIZAÇÃO EM ALIMENTOS

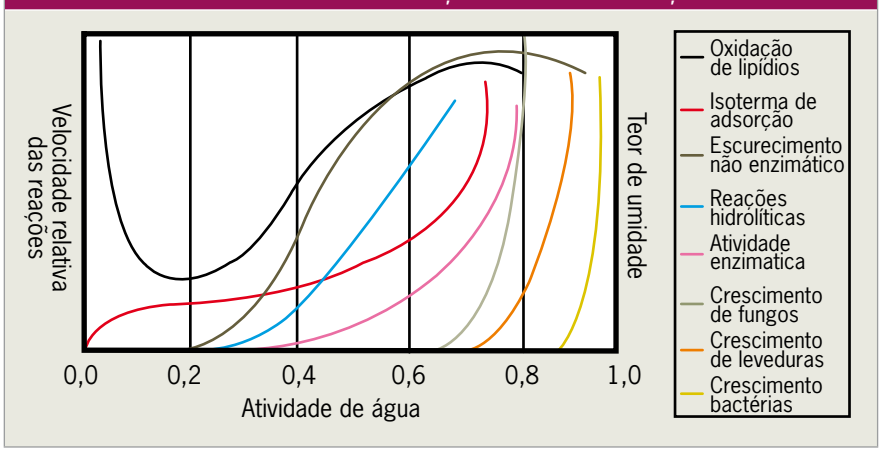


TABELA 1 - ATIVIDADE DE ÁGUA MÍNIMA PARA CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ALGUMAS TOXINAS

	Aw mínima	
Microrganismo	**Crescimento**	**Produção de toxina**
Bacillus cereus	0,95	
	0,93	
Clostridium botulium	0,93 (A)	0,95 (A)
	0,95 (A)	0,94 (A)
	0,93 (B)	0,94 (B)
	0,94 (B)	
	0,95 (E)	0,97 (E)
	0,97 (E)	
Clostridium perfringers	0,93 - 0,95	
Salmonella spp.	0,93	
	0,94 - 0,95	
	0,92	
Staphylococcus aureus	0,86	<0,90 (enterotoxina A)
		0,87 (enterotoxina A)
		0,97 (enterotoxina B)
Vibrio parahaemolyticus	0,94	
Aspergillus clavatus	0,85	0,99 (patulina)
Aspergillus flavus	0,78	0,84 (aflatoxina)
	0,80	0,83 - 0,87
Aspergillus ochraceus	0,81	0,88 (ácido penicílico)
	0,76	0,80
		0,81
Aspergillus ochraceus	0,83	0,85 (ocratoxina)
	0,77	0,83 - 0,87
Aspergillus parasiticus	0,82	0,87 (aflatoxina)
Byssochclamys nívea	0,84	
Penicillium cyclopium	0,87	0,97 (ácido penicílico)
	0,82	
Penicillium cyclopium	0,81	0,87 - 0,90 (ocratoxina)
	0,82	
	0,83	
Penicillium expansum	0,83 - 0,85	0,99 (patulina)
	0,83	
Penicillium islandicum	0,83	
Penicillium martensil	0,83	0,99 (ácido penicílico)
	0,79	
Penicillium patulum	0,83 - 0,85	0,95 (patulina)
	0,81	
Penicillium viridicatum	0,83	0,83 - 0,86 (ocratoxina)
Stachybotrys atra	0,94	0,94 (stacibotrina)
Trichothecium roseum	0,90	

nerais, com os quais as bactérias podem sintetizar precursores de macromoléculas orgânicas e vitaminas ou, quando incapazes da síntese de um precursor essencial, este deve estar presente no meio de crescimento. As bactérias são grandemente diversificadas em relação aos seus requerimentos nutricionais, sendo que para praticamente qualquer substância há um microrganismo capaz de metabolizá-la como nutriente. A disponibilidade de nutrientes diminui à medida que a população aumenta de tamanho; enquanto houver um mínimo de nutrientes a população continuará a crescer.

Várias classes de nutrientes podem ser utilizadas pelos microrganismos. Como fontes de energia, são geralmente utilizados carboidratos (especialmente açúcares mais simples), álcoois e aminoácidos. Alguns microrganismos utilizam carboidratos mais complexos, como celulose e amido, convertendo-os a açúcares mais simples. Os lipídios podem ser utilizados como fonte de energia por um número muito limitado de microrganismos. A principal fonte de nitrogênio são os aminoácidos, embora outros compostos nitrogenados, como nucleotídeos, peptídeos e proteínas, possam ser também utilizados. A concentração dos nutrientes indispensáveis pode, até certo ponto, determinar a velocidade do crescimento microbiano, segundo a equação de Monod, que indica que, quando $S >> K_s$, o microrganismo crescerá a uma velocidade muito próxima à sua velocidade máxima.

$$\mu = \frac{\mu_m S}{S + K_s}$$

Sendo:

μ = velocidade de crescimento específico;

μ_m = velocidade máxima de crescimento específico;

S = concentração do nutriente limitante;

K_s = constante de saturação.

Potencial redox **-** Os processos de oxidação e redução estão relacionados com transferências (perda e ganho, respectivamente) de elétrons entre compostos químicos. Quando ocorre uma transferência de elétrons de um composto para outro, estabelece-se uma diferença de potencial que pode ser medida instrumentalmente. A tendência de um meio em receber ou ceder elétrons é denominada potencial redox (E_h), medido por meio de um eletrodo de metal inerte (geralmente platina) submerso no meio. Se o equilíbrio dos diversos pares redox presentes favorece o estado oxidado, a amostra tende a receber elétrons do eletrodo, criando um potencial positivo, que indica um meio oxidante. Quando o equilíbrio for inverso, a amostra tende a ceder elétrons ao eletrodo, que registra um potencial negativo, indicando um meio redutor. O potencial redox medido nos alimentos resulta da interação de fatores, como pares redox presentes, proporção entre os grupos oxidantes e redutores, pH, capacidade de equilíbrio, disponibilidade de oxigênio e a própria atividade microbiana.

O potencial redox exerce um efeito seletivo na microflora do alimento. Apesar de o crescimento microbiano ser possível em uma ampla faixa de potenciais redox (-100mV a +500mV), os microrganismos se enquadram convenientemente em faixas mais estreitas, baseadas na sua resposta ao oxigênio. Assim, microrganismos aeróbios requerem para multiplicação a presença de O_2 e um alto potencial redox, geralmente entre +350mV e +500mV. Incluem-se aí muitas bactérias, especialmente as deterioradoras e algumas espécies patogênicas (ex.: *Bacillus cereus)*. Microrganismos anaeróbios requerem baixos valores de E_h, geralmente abaixo de -150mV. Incluem-se nesse grupo algumas espécies de bactérias patogênicas (ex.: *Clostridium botulinum)* e bactérias deterioradoras. Algumas bactérias

NEUTRÓFILAS, ACIDÓFILAS E ALCALINÓFILAS

A maioria das espécies bacterianas pode crescer em meios cujo pH esteja entre 5 e 9, faixa na qual encontra-se a maior parte dos ambientes naturais. A maioria das bactérias não cresce em valores de pH com uma unidade acima ou abaixo do seu pH ótimo. Quanto à tolerância ao pH, as bactérias podem ser classificadas em três categorias:

• **Neutrófilas:** espécies que crescem em faixas de pH entre 5,4 a 8,5. A maioria das bactérias apresenta um crescimento ótimo em ambientes cujo pH se aproxima da neutralidade. A maioria das bactérias patogênicas está incluída nessa categoria.

• **Acidófilas:** espécies que crescem em faixas de pH extremamente baixos, entre 0,1 e 5,4. A bactéria acidófila *Helicobacter pylori* pode colonizar a parede estomacal. Algumas bactérias que oxidam enxofre a ácido sulfúrico podem gerar e tolerar condições em torno de pH 1.

• **Alcalinófilas:** espécies que crescem em faixas de pH entre 8,5 e 11,5. A bactéria *Vibrio cholerae* apresenta um crescimento ótimo em pH 9. A bactéria oportunista *Alcaligenes faecalis* pode criar e tolerar condições alcalinas com pH 9 ou maior.

Nenhuma espécie bacteriana pode tolerar a faixa inteira de pH, em qualquer uma dessas categorias, e muitas espécies toleram faixas de valores de pH que se sobrepõem entre uma categoria e outra.

AERÓBICAS, MICROAERÓFILAS E ANAERÓBICAS

A capacidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio divide as bactérias em cinco grupos:

1. Aeróbicas estritas ou obrigatórias: crescem apenas onde há disponibilidade de oxigênio, como por exemplo, as bactérias do gênero *Pseudomonas*.

2. Microaerófilas: requerem uma quantidade reduzida de oxigênio; altas concentrações de oxigênio lhes é tóxico. As bactérias microaerófilas sobrevivem em ambientes com alta concentração de dióxido de carbono e baixas concentrações de oxigênio, como por exemplo, as bactérias do gênero *Campylobacter*.

3. Anaeróbicas facultativas: utilizam oxigênio em seu metabolismo energético, mas também podem crescer na ausência de oxigênio. As bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus spp* são encontradas no trato intestinal e urinário onde há pouca disponibilidade de oxigênio.

4. Anaeróbicas aerotolerantes: toleram a presença de oxigênio, sem utilizá-lo em seu metabolismo. Por exemplo, a bactéria *Lactobacillus acidophillus*.

5. Anaeróbicas estritas ou obrigatórias: não crescem na presença de oxigênio; o oxigênio lhes é tóxico. Essas bactérias são mortas pelos efeitos tóxicos do superóxido O2- e pelo peróxido de hidrogênio são formados por enzimas oxidativas na presença de oxigênio. São exemplos de bactérias anaeróbias estritas as do solo dos gêneros *Clostridium*, *Nitrobacter* e *Nitrosomonas*.

Nas bactérias aeróbias estritas e na maioria das anaeróbias facultativas, o radical superóxido O2- é convertido em oxigênio molecular (O2) e em peróxido de hidrogênio (H2O2) pela enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio é convertido em oxigênio molecular e água pela enzima catalase. Algumas espécies de bactérias anaeróbias facultativas e de aerotolerantes não possuem a enzima catalase.

aeróbias crescem melhor em meio levemente reduzido, sendo denominadas microaerófilas (ex.: gêneros *Lactobacillus, Streptococcus)*. Outras espécies crescem bem tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, sendo denominadas anaeróbias facultativas (ex.: bactérias da família *Enterobacteriaceae*). Quanto aos fungos, a maioria dos bolores de importância em alimentos é aeróbia, enquanto as leveduras são predominantemente aeróbias ou anaeróbias facultativas.

Temperatura - A temperatura é o fator extrínseco de maior importância sobre a multiplicação de microrganismos. Tem uma grande influência sobre o crescimento dos microrganismos, porque todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas que, por sua vez, são afetadas pela variação da temperatura. Há microrganismos que toleram uma faixa maior de variação de temperatura; outros, entretanto, não são tolerantes. Por exemplo, a variação para *Bacillus subtilis* é de 8 a 53ºC, uma variação de 45ºC; para *Neisseria gonorrhoeae* é de 30 a 40ºC, uma variação de apenas 10ºC. Geralmente, em temperaturas mais favoráveis para o crescimento, o número de divisões celulares por hora, chamado de taxa de crescimento, dobra para cada aumento de temperatura a 10ºC. Esse tipo de comportamento do crescimento bacteriano é similar ao da maioria das reações catalisadas por enzimas, evidenciando que o crescimento é resultado de uma série de reações enzimáticas, que tem o auge de sua atividade dentro de um valor de temperatura específico. A temperatura na qual uma espécie de microrganismo cresce mais rapidamente é a temperatura ótima de crescimento.

As temperaturas de crescimento mais importantes para qualquer microrganismo são a mínima, a ótima e a máxima. A temperatura ótima não é a temperatura mediana entre as temperaturas máxima e mínima. A temperatura ótima é a que fica mais próxima do limite superior da variação de temperatura, isto porque a velocidade das reações enzimáticas aumenta de acordo com o aumento da temperatura, até alcançar um ponto em que as enzimas são danificadas pelo calor e as células param de crescer. Os microrganismos podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com as faixas de temperaturas nas quais podem sobreviver e crescer. As categorias estão sumariamente descritas na Tabela 2.

TABELA 2 - CATEGORIAS DE MICRORGANISMOS SEGUNDO O REQUERIMENTO DE TEMPERATURA PARA O CRESCIMENTO

Categoria	Temperatura para crescimento (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Psicrófilos	<0	10 - 15	<20
Psicrotróficos	0	15 - 30	>25
Mesófilos	10 - 15	30 - 40	<45
Termófilos	45	50 - 85	>100

Os termófilos mais importantes em alimentos pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium,* incluindo microrganismos deterioradores e patogênicos. Os mesófilos, por apresentarem crescimento ótimo numa faixa próxima à temperatura ambiente, constituem-se na maioria dos microrganismos de importância em alimentos, incluindo a maior parte dos patógenos. Os psicrófilos apresentam crescimento ótimo a baixas temperaturas (entre 10°C e 15°C), podendo crescer a 0ºC ou menos. Já os psicrotróficos, embora apresentem crescimento ótimo na mesma faixa de temperatura dos mesófilos, são capazes de crescer a temperaturas próximas a 0ºC. Os psicrotróficos constituem-se num grave problema quando se trata de alimentos refrigerados, já que continuam a crescer sob refrigeração, embora não às mesmas taxas que sob temperatura ambiente. Os bolores são geralmente capazes de crescer em faixas de temperatura mais amplas do que as bactérias, sendo que muitos crescem em alimentos refrigerados. Já as leveduras não são muito tolerantes a altas temperaturas, crescendo preferencialmente nas faixas mesófila e psicrófila.

Umidade relativa (UR) - Os conceitos de atividade de água e umidade relativa estão intimamente relacionados. A atividade de água pode ser expressa como umidade relativa do produto (A_w x 100). Quando um alimento está em equilíbrio com o ambiente, sua A_w se iguala à umidade relativa do ambiente. Assim, os alimentos tendem a absorver umidade do ambiente se estocados em ambientes com UR superior à sua A_w; por outro lado, perderão umidade se estocados em ambiente com UR inferior à sua A_w. No caso de absorverem umidade, sua A_w será aumentada, favorecendo o crescimento microbiano.

Composição gasosa do ambiente - A composição gasosa do ambiente que circunda um alimento afeta o tipo de microrganismo nele predominante. A presença de altas concentrações de O_2 favorece o crescimento de microrganismos aeróbios, enquanto baixas concentrações desse gás favorecem a predominância de anaeróbios. Além disso, o CO_2 tem conhecidos efeitos inibidores sobre o crescimento microbiano. O aumento da vida de prateleira de alimentos decorrente de acondicionamento a vácuo ou sob atmosfera modificada é uma aplicação do efeito da composição gasosa sobre o crescimento microbiano.

OS ADITIVOS QUÍMICOS: CONSERVANTES TRADICIONAIS

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 20% dos alimentos produzidos são perdidos por deterioração. Sal e açúcar são exemplos de substâncias que eram e ainda são uti-

lizadas para conservar os alimentos. Quando os alimentos não podem ser submetidos a processos físicos e/ou biológicos de conservação, que serão mencionados mais adiante, é necessário o uso de conservantes.

Os conservantes químicos são de especial importância em países tropicais, onde a deterioração de alguns alimentos é acentuada pelo grau de umidade e temperaturas próximas ao ótimo do desenvolvimento microbiano. A importância dos conservantes aumenta também quando há falta de instalações adequadas de armazenamento e o transporte do produto é deficiente, ou onde as distâncias entre os centros produtores e consumidores são grandes.

Os conservantes químicos são aditivos que impedem ou retardam as alterações provocadas por microrganismos. A ação antimicrobiana dos conservantes baseia-se em efeitos sobre um ou mais dos seguintes componentes/atividades: DNA, membrana plasmática, parede celular, síntese protéica, atividade enzimática, transporte de nutrientes.

A escolha adequada de um conservante deve ser feita com base em alguns fatores, tais como o tipo de microrganismo a ser inibido, a facilidade de manuseio, o impacto no paladar, o custo e a sua eficácia. A eficácia de um conservante pode ser influenciada pela presença de outros inibidores do crescimento de microrganismos como sal, vinagre e açúcar, pelo pH e composição do produto, pelo teor de água do alimento e pelo nível inicial de contaminação, seja do alimento ou ambiental (ligados às condições de processo e às instalações).

Não existe conservante que seja eficaz para todos os tipos de alimentos. O número de conservantes permitidos é bastante reduzido e não sofreu alterações nos últimos anos. A definição de conservantes alimentícios é bastante simples: são substâncias que prolongam o tempo de conservação dos gêneros alimentícios, protegendo os mesmos de alterações decorrentes de microrganismos ou enzimas. A legislação

MESÓFILAS, PSICRÓFILAS E TERMÓFILAS

As diferentes espécies bacterianas diferem no espectro de temperatura na qual podem crescer. Quanto à temperatura de crescimento, as bactérias foram agrupadas em quatro categorias:

1. Mesófilas: apresentam crescimento ótimo em temperaturas variando entre 25°C e 40°C, ou seja, a faixa de temperatura mais comum na superfície da Terra e nos organismos animais. A maioria dos patógenos humanos apresentam crescimento ótimo em temperaturas próximas de 37°C. Bactérias termodúricas geralmente vivem como mesófilas, mas podem suportar temperaturas elevadas por curtos períodos de tempo. Se houver aquecimento inadequado no processo de aquecimento de alimentos enlatados tais bactérias podem sobreviver e deteriorar o produto.

2. Psicrófilas obrigatórias: requerem baixas temperaturas para seu crescimento; o crescimento ótimo se dá abaixo de 15°C. Algumas espécies marinhas toleram temperaturas negativas, uma vez que a água do mar permanece líquida em temperaturas abaixo de 0°C. Tais organismos morrem quando expostos à temperatura ambiente. Sua adaptação a baixas temperaturas é devido ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados em suas membranas. Estas moléculas permanecem fluidas em temperaturas nas quais membranas contendo ácidos graxos saturados não são funcionais. A bactéria *Bacillus globisporus* não cresce em temperaturas acima de 20°C.

3. Psicrófilas facultativas: apresentam crescimento ótimo em temperaturas abaixo de 20°C, mas podem crescer, embora mais lentamente, em temperaturas de refrigerador e têm alta probabilidade de contaminar e estragar produtos resfriados, tais como alimentos e sangue.

4. Termófilas: bactérias cujas taxas de crescimento ótimo estão entre 50°C e 60°C; são encontradas em pilhas de adubo orgânico. Algumas espécies toleram temperaturas de até 110 °C em fontes termais. As enzimas dos organismos termófilos apresentam propriedades de termo-estabilidade que lhes permitem atingir um pico de atividade entre 60°C e 80°C. Dentro dessa categoria encontram-se os organismos termófilos obrigatórios que só crescem em temperaturas acima de 37°C e os termófilos facultativos que podem crescer em temperaturas abaixo de 37°C. A bactéria *Bacillus stearothermophillus* cresce otimamente entre 65°C e 75°C, mas pode apresentar um pequeno crescimento e deteriorar alimentos em temperaturas em torno de 30°C. Os esporos dessa bactéria são utilizados para controlar o funcionamento de autoclaves em laboratórios de microbiologia. Dentre os termófilos obrigatórios encontram-se as bactérias hipertermófilas, que apresentam crescimento ótimo em temperaturas em torno e acima dos 85°C. Há apenas três gêneros de bactérias hipertermófilas: *Aquifex*, *Thermocrinis* e *Thermotoga*. A bactéria *Thermotoga* marítima habita solos oceânicos aquecidos a 85°C por atividade vulcânica. Não se conhecem microrganismos eucarióticos termófilos ou hipertermófilos. As enzimas dos organismos hipertermófilos - enzimas hipertermofílicas - apresentam propriedades de estrutura e função excepcionais de alta termo-estabilidade e atividade ótima em temperaturas acima de 70°C. Algumas dessas enzimas são ativas em temperaturas que atingem 115°C. Tanto enzimas termofílicas quanto hipertermofílicas não funcionam adequadamente sob temperaturas abaixo de 40°C.

Nenhuma espécie bacteriana pode tolerar a faixa inteira de temperatura em qualquer uma dessas categorias e muitas espécies toleram faixas de temperatura que se sobrepõem entre uma categoria e outra. Nenhum psicrófilo sobrevive no corpo humano.

européia menciona junto com os conservantes (E200-E297), os antioxidantes (E300-E399) e a irradiação (ionização) dos alimentos. Os antioxidantes também são substâncias que prolongam o tempo de conservação dos gêneros alimentícios, porém, protegendo os mesmos das alterações provocadas pela oxidação tais como a rancidez das matérias graxas e as modificações de cor.

O conservante mais antigo é o cloreto de sódio. Ele foi usado durante séculos para prevenir a deterioração de alimentos. Peixes, carnes e vegetais foram preservados com sal. Hoje, o sal é usado principalmente em conjunto ou combinação com outros métodos de processamento. A atividade antimicrobiana do sal esta relacionada com sua habilidade em reduzir a atividade de água (A_w), e isto influencia o crescimento microbiano. O sal tem as seguintes características: produz um efeito osmótico, limita a solubilidade do oxigênio, modifica o pH; os íons de sódio e cloro são tóxicos, e o sal contribui para a perda de íons de magnésio. O uso de cloreto de sódio é limitado pelo seu efeito direto no paladar dos alimentos.

A classe de conservantes mais utilizada é a dos ácidos orgânicos e seus derivados (sais, ésteres, etc.), embora outras classes sejam, também, amplamente utilizadas, como a de sulfitos e a dos nitritos/nitratos.

Os ácidos

Os ácidos como aditivos alimentícios servem a um duplo propósito, como acidulantes e como conservantes. O ácido fosfórico é usado em refrigerantes para reduzir o pH. O ácido acético é usado para prover o sabor azedinho em maionese e molhos de salada. Uma função semelhante em uma variedade de outros alimentos é obtida através de ácidos orgânicos, tais como os ácidos cítrico, tartárico, málico, láctico, succínico, adípico e fumárico. As propriedades de alguns desses ácidos estão listadas na Tabela 3.

Os ácidos orgânicos constituem a classe de conservantes mais utilizada em alimentos. São compostos que inibem o crescimento tanto de bactérias quanto de fungos, além de existirem relatos sobre a inibição da germinação e do crescimento de esporos de bactérias.

Em solução, os ácidos ocorrem em equilíbrio entre os estados dissociado e não dissociado, em função do pH. Com a redução do pH, a concentração de ácidos não dissociados aumenta. O pK é definido como o valor de pH no qual as concentrações das formas dissociada e não dissociada de um ácido são iguais. Assim, abaixo do pK, predomina a forma não dissociada, enquanto acima do pK, a forma dissociada é predominante.

Os ácidos orgânicos são geralmente fracos, ou seja, tem baixo pK. Sua atividade antimicrobiana depende não apenas da concentração de íons H+, mas, também, do efeito inibitório do ácido não dissociado, que geralmente é hidrofóbico, o que favorece sua penetração através das membranas plasmáticas. Dentro da célula, em pH mais alto, a molécula se dissocia, liberando ânions e prótons que não podem atravessar

TABELA 3 – PROPRIEDADES DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

	Ácido Acético	Ácido adípico	Ácido cítrico	Ácido fumárico	Glucona delta lactona	Ácido láctico	Ácido málico		Ácido tartárico
Estrutura	CH_3COOH	COOH | CH_2 | CH_2 | CH_2 | CH_2 | COOH	COOH | CH_2 | HO-C—COOH | CH_2 | COOH	HOOCCH ‖ HCCOOH	O=C | HCOH | HOCH | HCOH | HC | CH_2OH O	CH_3 | H—C—OH | COOH	COOH | OH—C—H | CH_2 | COOH		COOH | H—C—OH | HO-C—H | COOH
Fórmula empírica	$C_2H_4O_2$	$C_6H_{10}O_4$	$C_6H_8O_7$	$C_4H_4O_4$	$C_6H_{10}O_6$	$C_3H_6O_3$	$C_4H_6O_5$	H_3PO_4	$C_4H_6O_6$
Fórmula física	Líquido Oleoso	Cristalina	Cristalina	Cristalina	Cristalina	Solução aquosa 85%	Cristalina	Solução aquosa 85%	Cristalina
Peso molecular	60,05	146,14	192,12	116,07	178,14	90,08	134,09	82,00	150,09
Peso equivalente	60,05	73,07	64,04	58,04	178,14	90,08	67,05	27,33	75,05
Sol. em água (g/100mL sol.)	∞	1,4	181,00	0,63	59,0	∞	144,0	∞	147,0
Constantes de ionização									
K_1	8×10^{-5}	$3,7 \times 10^{-5}$	$8,2 \times 10^{-4}$	1×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-4}$ (gluconic acid)	$1,37 \times 10^{-4}$	4×10^{-4}	$7,52 \times 10^{-3}$	$1,04 \times 10^{-3}$
K_2		$2,4 \times 10^{6}$	$1,77 \times 10^{-5}$	3×10^{-5}			9×10^{-6}	$6,23 \times 10^{-8}$	$5,55 \times 10^{-5}$
K_3			$3,9 \times 10^{-6}$				3×10^{-13}		

de volta a membrana plasmática, ficando acumuladas na célula. Assim, o efeito antimicrobiano de ácidos fracos é, geralmente, favorecido por baixo pH, que favorece o estado não dissociado da molécula.

A inibição do crescimento microbiano por ácidos fracos tem sido atribuída a várias causas: rompimento de membranas, estresse associado ao pH intracelular e acúmulo de ânions tóxicos.

A maior vantagem do uso de ácidos orgânicos como conservantes é a melhor aceitação, que pode resultar do aumento de acidez em alguns produtos. Por outro lado, sua principal limitação é pelo fato de serem efetivos apenas a baixos valores de pH, o que compromete sua aplicação em alimentos de baixa acidez. Em contraste, alguns ésteres de ácidos orgânicos (como os ésteres do ácido para-hidroxibenzóico, ou parabenos) são efetivos em um espectro de pH mais amplo, o que possibilita seu uso em produtos de baixa acidez, nos quais os ésteres tem encontrado aplicação crescente. Na maioria das aplicações, os ácidos orgânicos são predominantemente biostáticos e não biocidas. São utilizados, principalmente, para inibir o crescimento de bolores e leveduras, embora possam, também, apresentar alguma atividade contra bactérias.

Os ácidos orgânicos de maior atividade antimicrobiana são o propiônico, o sórbico e o benzóico, sendo, geralmente, aplicados a alimentos em níveis de centenas a milhares de mg/kg. O ácido acético é bem menos efetivo, sendo geralmente aplicado em concentrações muito maiores. Os ácidos cítricos e lácticos, ainda menos efetivos, são geralmente usados mais com a função de acidulantes ou aromatizantes do que propriamente como conservantes.

O ácido acético.

A ação preservativa do ácido acético na forma de vinagre foi reconhecida desde a mais remota antiguidade. O ácido acético e seus compostos não têm somente ação preservativa, mas funcionam como seqüestrantes, acidulantes e agentes flavorizantes. É um ácido natural que se forma no vinagre mediante a ação da bactéria *Acetobacter*. Os sais de sódio e cálcio: diacetato de sódio e cálcio, e ácido dihidroacético são alguns dos antimicrobianos mais velhos, utilizados em alimentos. Apenas a *Acetobacter*, as bactérias láticas e as bactérias butírico ácidas são tolerantes ao ácido acético. Inibe bem as *Bacillus, Clostridium, Listeria, Salmonella, Staphylococcus aureus, Pseudomonas, E. coli* e *Campylobacter*. Os fungos são mais resistentes do que as bactérias; os fungos sensíveis são os *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* e *Sacharomyces*.

O ácido acético também é usado para estabilizar a acidez dos alimentos e como diluente para certas substâncias corantes. A dosagem recomendada é de 0,1 a 5%.

O ácido benzóico.

Foram os primeiros conservantes permitidos pelo FDA. Em função de seu baixo custo, o ácido benzóico e seus sais (Na e K) são os conservantes alimentícios mais usados. Seus sais são inibidores das enzimas digestivas pepsinas e tripsinas. Ocorre de forma natural em muitos tipos de bagas, ameixas e algumas especiarias. Embora o ácido benzóico não dissociado seja o agente antimicrobiano mais efetivo, usa-se preferencialmente o benzoato de sódio, porque o ácido benzóico é pouco solúvel em água (0,27% a 18°C) e o benzoato de sódio é mais solúvel (66,0 g/100 ml a 20°C). Como todos os conservantes orgânicos, sua eficiência depende do pH; com um pK_a de 4,2, apresenta eficiência ótima para uma faixa de pH de 2,5 a 4,0; perde boa parte de sua eficiência em pH>4,5. Quanto mais baixo o pH do alimento a ser conservado, menor é a concentração de ácido benzóico necessária para a ação conservante. Esse bactericida e fungicida, efetivo somente em meio levemente ácido, é usado em muitos casos em combinação com outros conservantes. Ao contrário do ácido sórbico é ativo contra os lactobacilos o que impede seu uso em produtos fermentados, como iogurtes, por exemplo.

Por conferir um gosto forte e apimentado, o que corresponde a um impacto sensorial negativo, seu uso é restringido a certos produtos; seus maiores mercados como conservante alimentício são bebidas a base de frutas, sidra, bebidas carbonatadas e pepinos em conserva. Também é usado em saladas de fruta, geléias, doces, margarinas, balas, tortas de fruta, molhos, etc. A dosagem habitual é de 0,05 a 0,1 %.

Embora não apresentem efeitos tóxicos agudos ou sub-crônicos, o ácido benzóico e seus sais apresentaram em estudos de toxicidade crônica possíveis efeitos clastogênicos e teratogênicos. Isto levou a Comissão Científica Alimentar da CEE a determinar uma DDA (ADI) *temporária* de 5mg/kg de peso corporal. Em casos raros e isolados, foram observadas reações de intolerância tais como urticária e asma.

O ácido láctico.

O ácido láctico e seus sais, os lactatos de sódio ou de potássio, atuam como agentes bacteriostáticos que aumentam o tempo de latência dos microrganismos e/ou diminuem sua taxa de crescimento. Agem diretamente sobre o metabolismo bacteriano por acidificação intracelular, interferindo na transferência transmembranária de prótons, inibindo o mecanismo de retroação e tendo ação quelante nos cátions divalentes essenciais ao crescimento de patógenos. De outro lado, os lactatos abaixam a atividade da água, o que contribui a bloquear o desenvolvimento bacteriano, aumentando assim o tempo de conservação. Numerosos estudos mostraram recentemente o efeito inibidor dos lactatos contra um certo número de microrganismos patógenos (*Salmonella, Listeria, Staphylococcus, Clostridium*). Eles ainda possuem uma função de exaustor de sabor.

Conservante de alimentos, os lactatos atuam como agente sinérgico dos antioxidantes, acidulantes e saborizantes.A dosagem normalmente usada está na faixa de 0,05 a 2 %.

O ácido p-hidroxibenzóico.

Publicações européias informaram sua utilização como conservante em alimentos a partir de 1932. Devido ao seu gosto desagradável esses produtos não têm mais um papel de destaque como conservantes alimentícios, mas são usados largamente em produtos farmacêuticos e cosméticos como conservantes.

Os parabenos foram um dos primeiros conservantes a serem aceitos pelo FDA; são ésteres de alquila de ácido para-hidrobenzóico. Atuam em uma faixa de pH de 3 a 8, sendo mais ativos em pH baixo. Metil, propil e heptil parabenos são colocados direto no alimento. Etil e butil são autorizados somente em alguns países.

Eles não são voláteis nem higroscópicos. A sua solubilidade em água depende da natureza do grupo alquila; maior é o comprimento de sua cadeia, menor será a solubilidade. Eles diferem do ácido benzóico pelo fato de terem uma atividade antimicrobiana tanto em meio ácido quanto alcalino.

A atividade antimicrobiana dos parabenos é proporcional ao comprimento da cadeia do grupo alquila, característica esta indesejável do ponto de vista de solubilidade em água. Por esta razão, os ésteres de ácido p-hidroxibenzóico de PM menor são os mais utilizados. Já a ligação éster é estável a hidrólise em temperatura de esterilização, característica desejável. Os parabenos são mais ativos contra mofos e leveduras do que contra bactérias, e mais ativos contra as bactérias gram-positivos do que contra as gram-negativos. Eles são muito usados em bolos de frutas, recheios de frutas e doces de confeiteiro em geral. Parabenos de metila e propila são usados em refrigerante. A combinação de vários parabenos pode, às vezes, ser utilizada em produtos do mar, extratos aromáticos ou molhos para saladas.

O ácido propiônico.

Ainda chamado de propanóico pela nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) é um ácido graxo que se apresenta no estado natural, como um dos produtos da digestão da celulose pelas bactérias que residem no rúmen dos animais herbívoros. A fermentação do material vegetal ingerido no rúmen é um processo anaeróbico que converte os carboidratos celulósicos em ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, ácido propiônico e butírico, principalmente). A atividade depende, novamente, do pH na substância a ser preservada, sendo a forma não dissociada a mais ativa (11 a 45 vezes mais do que a dissociada). Apresentam idêntica eficácia contra os microrganismos e são bastante eficazes contra bolores, porém têm pouca ação contra a maioria das bactérias e não apresentam efeito contra as leveduras, nas quantidades recomendadas para uso em alimentos. Os propionatos são bastante usados na indústria de panificação devido a sua pouca atuação contra os fermentos biológicos. Normalmente, usa-se o propionato de cálcio nos produtos salgados e o propionato de sódio nos produtos doces.

Não mostram nenhuma toxicidade aguda nem sub-crônica, porém foram temporariamente interditados na Alemanha e na Áustria como conservantes alimentícios, antes de serem readmitidos em função das Diretivas Européias. A dosagem de ácido propiônico recomendada não é fixada. Não existe limite de concentração nestes produtos e deve então obedecer as BPF (*GMP*); as concentrações são normalmente menores que 0,4%.

O ácido sórbico.

O ácido sórbico é um ácido graxo insaturado (ácido hexa-2,4-dienóico), presente de forma natural em alguns vegetais, mas fabricado para seu uso como aditivo alimentar por síntese química. O ácido sórbico é um ácido monocarboxílico. Sua eficácia como conservante e sua segurança fisiológica foram exaustivamente estudadas. Os sorbatos são aprovados como conservantes alimentícios em quase todos os países do mundo.

Como conservantes, os sorbatos são únicos, tanto em termo de versatilidade, quanto ao largo espectro de microrganismos cujo crescimento eles inibem, a variedade de produtos alimentícios cujo frescor eles protegem, e o efeito quase nulo sobre o sabor de alimentos de pouco gosto ou sabor bastante suave. Outra vantagem no seu uso é a seletividade da ação antimicrobiana exercida pelos sorbatos. Tecnicamente, ele encontra nas células dos microrganismos diversos pontos de ataque, como por exemplo, as enzimas do metabolismo dos carboidratos e do ciclo dos citratos. Ao contrário de seu sal, o sorbato de potássio, o ácido sórbico é dificilmente solúvel em água.

O ácido sórbico e seus sais são fornecidos ao mercado de forma altamente refinada, em pó ou granulado, de cor branca. A forma ácida possui maior poder antimicrobiano e os sais propiciam uma maior solubilidade. Assim, quando usado na forma de sal, a potência em termo de equivalência de peso, cai para cerca de 75%, ou seja, para manter o mesmo poder conservante, serão necessárias quatro partes de sorbato de potássio para substituir três partes de ácido sórbico. Em geral, o ácido sórbico ou o sorbato de potássio são eficazes na maioria dos alimentos em concentrações entre 0,05 e 0,3%. Mesmo quando usado nas maiores concentrações, o efeito no gosto é quase imperceptível. Em princípio, maior é a concentração, mais tempo o crescimento microbiano será inibido. Quando a exposição à contaminação microbiana é maior (produto em embalagens freqüentemente aberto ou produto que por natureza são mais sensíveis aos ataques microbianos) é necessário um maior nível de preservação. Maiores níveis de sorbatos são necessários em produtos de *shelf life* muito longo que possuem um certo teor de umidade ou condições de refrigeração precárias. Em regra geral maiores níveis de sorbatos são necessários quando o teor em umidade é alto, a temperatura ambiente é quente ou a exposição à contaminação é freqüente. Um nível mais baixo é suficiente quando o pH é baixo.

Quando usado em produtos cujo

pH é ligeiramente ácido (pH 5,5-6,0) os sorbatos são os agentes conservantes mais eficazes contra um amplo espectro de deteriorações por microrganismo; nestes casos são nitidamente superiores aos benzoatos e propionatos. A eficácia dos sorbatos aumenta com o aumento da acidez. Acima de um pH 4,0 os sorbatos são mais efetivos que o benzoato de sódio ou o propionato de sódio ou de cálcio. A pH 2,5 até 3,0 os sorbatos são ainda, de certa forma, mais efetivos que o benzoato de sódio como inibidor de leveduras e mofos, e duas vezes mais potente que os propionatos. Os sorbatos apresentam a maior eficiência quando usado com pH inferior a 6,0. Mesmo assim, eles funcionam até pH de 6,5, mas são relativamente ineficientes a partir de pH de 7,0 e superiores.

O crescimento de muitos microrganismos é estimulado por temperaturas mornas ou quentes. Conseqüentemente, uma conservação adequada deve levar o fator temperatura em consideração. Um produto alimentício pode ser esterilizado depois de embalado e colocado para distribuição em prateleira, mesmo assim ele poderá ainda necessitar de refrigeração e conservante se for usado pelo consumidor mais de uma vez, após aberto. Mesmo nos produtos refrigerados, ainda é aconselhável usar um conservante do tipo sorbato para inibir uma potencial contaminação bacteriana.

No setor dos alimentos processados, os principais campos de aplicações são os cremes e margarinas, os molhos e maioneses, os queijos, os produtos de pesca, os produtos cárneos e embutidos diversos, as conservas e verduras ácidas, os produtos derivados de frutas, os produtos de panificação e confeitaria, e os produtos de baixa caloria (pela maior quantidade de água que eles costumam conter, há uma tendência natural em decompor-se mais facilmente).

O organismo humano metaboliza o ácido sórbico da mesma forma que os ácidos graxos insaturados (βoxidação). Esse ácido e seus sais, incluindo o sorbato de cálcio, não mostram nenhum sinal de toxicidade aguda, subaguda e crônica. Por outro lado, o ácido sórbico apresenta somente baixo potencial alergizante.

Ainda existem outros ácidos alimentícios tais como os ácidos cítrico, caprílico, málico, fumárico e outros, porém apresentam baixa atividade antimicrobiana e são mais utilizados como flavorizantes.

Os nitritos e nitratos

De sódio e de potássio, são especialmente usados em sal de cura em mistura com cloreto de sódio onde são injetados na forma de solução em pernis, palhetas e outros produtos cárneos. A adição de nitritos e nitratos em carne e derivados está também associada à obtenção de cor, sabor e textura, além de servir como antioxidante. Reagem com o pigmento da carne, a mioglobina, para formar a cor característica da carne curada (nitromioglobina). Apesar do perigo de toxidade pela formação da metahemoglobina e das nitrosaminas, nitratos e nitritos são muito importantes para o preparo de produtos curados, porque ajudam a evitar o crescimento do *Clostridium botuliniun*, fator importante na segurança de produtos cárneos curados.

Acredita-se que tanto os nitratos como os nitritos possuem uma ação antimicrobiana. O nitrito não evita a germinação dos esporos (apenas concentrações muito altas inibem a germinação dos esporos), mas evita o crescimento dos esporos germinados, inibindo a multiplicação das células vegetativas. É mais ativo em anaerobiose. O nitrato, por exemplo, é usado na produção do queijo tipo Gouda para prevenir a formação de gás por bactérias que formam ácido butírico

A maior preocupação quanto ao uso de nitritos vem de possíveis reações das aminas secundárias que poderiam reagir e formar nitrosaminas. As nitrosaminas são poderosos agentes carcinógenos e poderiam também ser mutagênicos bem como teratogênicos. Na realidade, pode se formar quantias muito pequenas de nitrosaminas em certos produtos cárneos curados. Esses níveis estão na faixa dos ppm ou ppb e, como os processos analíticos são difíceis, o quadro de ocorrência de nitrosaminas não estão ainda totalmente claro.

Foram encontradas nitrosaminas, especialmente a dimetilnitrosamina, em amostras de carnes curadas, em concentrações de alguns $\mu g/kg$ (ppb). As nitrosaminas estão normalmente presentes em alimentos como resultado de determinados métodos de processamento que promovem a sua formação. Um exemplo é a atomização (*spray drying*) do leite. Modificações apropriadas no processo podem reduzir drasticamente os níveis de nitrosaminas. Ainda são necessárias muitas pesquisas adicionais para estabelecer o por que das nitrosaminas estarem somente presentes em algumas amostras, bem como a importância toxicológica dessas nitrosaminas nesses níveis. De qualquer forma, ainda não se encontrou nenhuma substituição satisfatória para o nitrito na produção de produtos cárneos curados, como presunto e toucinho. O ADI de nitrito foi fixado em 60mg.

Os sulfitos

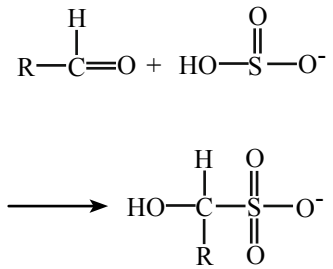
O dióxido de sulfito e os sulfitos foram, por muito tempo, usados como preservativos; ambos servindo como substância antimicrobiana e como antioxidante. O seu uso como conservantes em vinhos, data de antes dos tempos romanos. O dióxido de enxofre é um gás que pode ser usado na forma comprimida, em cilindros. É líquido sob pressão de 3,4 atm e pode ser injetado diretamente em líquidos. Também pode ser usado para preparar soluções em água gelada. Dissolve-se para formar ácido sulfuroso. Ao invés de soluções de dióxido de enxofre, podem ser usados alguns tipos de sulfitos, porque quando dissolvem em água, todos produzem SO_2 ativo.

O sulfito mais amplamente usado é o metabissulfito de potássio. Na prática, um valor de 50% de SO_2 ativo é usado. Quando o dióxido de enxofre

é dissolvido em água, formam-se os seguintes íons:

SO_2 (gás) $\rightarrow SO_2$ (aq)
SO_2 (aq)$^+ \rightarrow H_2O \rightarrow H_2SO_3$
$H_2SO_3 \rightarrow H^+ + HSO_3^-$ ($K_1 = 1{,}7 \times 10^{-2}$)
$HSO_3^- \rightarrow H^+ + SO_3^{2-}$ ($K_2 = 5 \times 10^{-6}$)
$2HSO_3^- \rightarrow S_2O_5^{2-} + H_2O$

Todas estas formas de enxofre são conhecidas como dióxido de enxofre livre. O íon de bissulfito (HSO_3^-) pode reagir com aldeídos, dextrinas, substâncias pécticas, proteínas, ketones e certos açúcares, para formar compostos adicionais.



O ácido sulfuroso inibe a formação de mofos e desenvolvimento de bactérias e, em menor escala, de leveduras. A atividade anticéptica do SO_2 é altamente dependente do pH. Mais baixo o pH, maior será a sua ação anticéptica.

A quantidade de SO_2 que pode ser adicionada aos alimentos é limitada porque a níveis entre 200 e 500ppm, o produto pode desenvolver um cheiro desagradável. O ADI é de 0,7mg/kg de peso corpóreo. Como este limite poderia vir a ser ultrapassado pela ingestão de grandes quantidades de vinho, existem muitos estudos visando a redução de sua utilização na fabricação de vinho. Contudo, embora algum outro componente (como ácido sórbico e ácido ascórbico) possa substituir parcialmente o SO_2, não há nenhuma substituição satisfatória para SO_2 na fabricação de vinho.

O uso de SO_2 não é permitido em alimentos que contêm quantidades significantes de tiamina, porque ele destrói essa vitamina da mesma forma que pode afetar a cor de concentrados de frutas. Nos Estados Unidos, o nível máximo permitido de SO_2 em vinho é de 350ppm. O uso de modernas práticas resultou em níveis mais baixos de SO_2. Em alguns países, ele é usado em produtos cárneos. É também amplamente usado em frutas secas, a níveis de até 2,000ppm. Outras aplicações incluem legumes desidratados e produtos a base de batatas desidratadas. Como o SO_2 é altamente volátil e se perde facilmente na atmosfera, os níveis residuais podem ser muito mais baixos do que as quantias originalmente aplicadas.

Antes de abordar os sistemas de conservação não químicos convém citar uma categoria especial de conservantes: as bacteriocinas. O termo bacteriocinas designa uma classe de compostos formada por um grupo diverso de proteínas e peptídeos sintetizados por bactérias, com atividade contra outros microrganismos.

A nisina (E234), uma das bacteriocinas mais exploradas e estudadas, é um polipeptídeo antibacteriano produzida por *Lactococcus lactis*. É um peptídeo anfifílico (caracterizado pela presença de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas na mesma molécula), cuja atividade resulta da permeabilização de membranas celulares bacterianas, causando refluxo de compostos citoplasmáticos. A nisina foi chamada de antibiótico, mas deve-se evitar o uso deste termo, por não ser usado para propósitos terapêuticos em humanos ou animais. Organismos produtores de nisina encontram-se naturalmente no leite. A nisina pode ser usada para ajudar no processo contra organismos gram-positivos. Como sua efetividade diminui com o aumento de cargas bacterianas, é usada para cobrir práticas anti-higiênicas.

A nisina é um polipeptídeo com peso molecular de 3,500. Contém alguns aminoácidos sulfurados pouco comuns tais como a lantionina e o β-metil lantionina. Não contém nenhum aminoácido aromático e é estável ao aquecer.

O uso de nisina como conservante alimentício é aprovado em muitos países, porém com aplicações alimentícias restritas (sem ação sobre as bactérias Gram-negativos, perda de atividade em torno de pH=4 e abaixo de 20° e imobilização pelas gorduras e outros compostos alimentícios). É uma das raras bacteriocinas de uso autorizado na indústria alimentícia. Tem atividade antimicrobiana (perfuração da membrana citoplásmica) contra a maioria dos microrganismos Gram-positivos, incluindo bactérias esporuladas anaeróbicas. O uso simultâneo da nisina e do ácido sórbico ou de seus sais permite obter um espectro de ação microbiana bem ampla, quase sem falhas. Essa eficácia ainda é incrementada pela adição de agentes complexantes tais como os EDTA, os citratos e os fosfatos.

É usada na conservação de alimentos em geral e especialmente em queijos processados. Dependendo da legislação local, pode ser utilizado também em queijos frescos com a finalidade de bloquear a fermentação lática. Na CEE, esse antibiótico com efeitos conservantes é usado de forma muito prudente nos gêneros alimentícios. A necessidade tecnológica da nisina é somente reconhecida em três ca-

TABELA 4 – FONTES DE SO2 E SEUS RESPECTIVOS CONTEÚDOS DE SO2 ATIVO

Nome químico	Fórmula	Conteúdo de SO2 ativo
Sulfur dioxide	SO2	100%
Sodium sulfite, anhydrous	a2SO3	50,82%
Sodium sulfite, heptahydrate	Na2SO37H2O	25,41%
Sodium hydrogen sulfite	NaHSO3	61,56%
Sodium metabisulfite	Na2S2O5	67,39%
Potassium metabisulfite	K2S2O5	57,63%
Calcium sulfite	CaSO3	64%

tegorias de alimentos. Nos queijos afinados e fundidos é autorizado até 12,5 mg/kg, em creme coalhada e mascarpone, 10 mg/kg, e nos pudins de semolina e tapioca, a razão é de 3 mg/kg.

É efetivamente usado na preservação de queijo processado, como também no tratamento pelo calor de alimentos não ácidos e para estender o *shelf life* de leite esterilizado.

Outra substância antibacteriana relacionada é a natamicina (antibiótico com princípio ativo pimaricina). É um polieno antifúngico, isolado pela primeira vez de um filtrado de *Streptomyces natalensis*. A natamicina é efetiva no controle do crescimento de fungos, bolores e leveduras, mas não tem nenhum efeito em bactérias ou vírus. Em indústrias usando o processo de fermentação, pode ser usada para controlar fungos, bolores e leveduras. Apresenta baixa solubilidade, podendo ser usada no tratamento de superfície em alimentos. A natamicina é usada na produção de muitas variedades de queijos e em alguns alimentos sólidos, onde a casca ou a película envolvente não é ingerida como o caso de queijos duros e embutidos cárneos. Nesses alimentos deve ser observada a dose utilizada e garantido que o antibiótico não migrará para o interior do alimento. A dosagem máxima permitida é de 5 mg/kg, não detectável a 2 mm de profundidade, ou seja ausente na massa. A pimaricina é usada em aproximadamente 30 países, porém não é recomendada em queijos ou embutidos no Japão. Na Alemanha seu uso foi sugerido como aditivo em cervejas, vinhos e sucos de frutas, porém a prática não foi implementada por que a substância, ao ser testada, provocava alterações irreversíveis em cepas de leveduras. Os leites fermentados são consumidos em larga escala pela população e também por crianças. Em todo o mundo o uso de aditivos para essa população é bastante rígida e controlada.

A prática de adicionar antibióticos a alimentos "navega contra a maré". Atualmente é senso comum à busca por produtos mais saudáveis e o mais natural possível, usando-se matérias-primas de fontes seguras, tecnologias adequadas, valorização das boas práticas de manufatura e a cadeia do frio (produtos onde o frio pode substituir o uso de mais um aditivo no alimento). Pelo exposto acima, não se recomenda a adição de natamicina como fungistático em leites fermentados por ser um antibiótico e a população alvo não deve adquirir resistência a mais um tipo de medicamento.

MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO FÍSICOS

As técnicas mais importantes de conservação de alimentos baseiam-se, predominantemente, na redução das taxas de alterações microbiológicas, intimamente associadas com a segurança alimentar. Alguns métodos de conservação, como o uso de calor e radiação ionizante, baseiam-se na inativação de microrganismos, enquanto outros têm como princípio o controle de seu crescimento, como é o caso das fermentações e dos métodos baseados em redução de temperatura, pH ou atividade de água.

Para se escolher quais métodos de conservação devem ser aplicados a um dado alimento, assim como os níveis de aplicação de cada um, vários aspectos devem ser considerados, a saber:

- pH e atividade de água do alimento, já que produtos de baixa acidez e/ou alta atividade de água são mais suscetíveis a processos de deterioração.
- Identificação de parâmetros críticos para manter a qualidade e a segurança do alimento (ex.: alto teor de lipídios insaturados; alto teor de vitaminas e/ou pigmentos fotossensíveis; presença de condições favoráveis ao crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores etc.).
- As condições de estocagem e distribuição a que o produto será exposto.

A temperatura é um dos fatores mais importantes na determinação das taxas dos vários tipos de alterações em alimentos. O uso de calor para conservar alimentos tem por objetivo a redução da carga microbiana e a desnaturação de enzimas. Vários tipos de tratamento térmico podem ser aplicados, a depender da termo sensibilidade do alimento e da sua suscetibilidade à deterioração, bem como da estabilidade requerida do produto final. Enquanto a aplicação de calor baseia-se na inativação de microrganismos, o uso de baixas temperaturas tem por objetivo retardar o crescimento microbiano e as reações químicas.

O tratamento térmico, geralmente, tem efeitos adversos sobre as propriedades sensoriais e nutricionais do alimento. Em razão disso, deve ser selecionado o tratamento térmico mais brando capaz de garantir ausência de patógenos e assegurar a vida de prateleira desejada. Um tratamento térmico seguro deve ser selecionado com base no binômio tempo-temperatura requerido para inativar os microrganismos patogênicos e deterioradores mais termo resistentes em um dado alimento, e nas propriedades de transferência de calor do alimento e da embalagem. Os principais tratamentos térmicos são a esterilização, a pasteurização e o branqueamento.

Em sistemas de conservação pelo frio, considera-se que refrigeração e congelamento são as técnicas de conservação que melhor retêm as propriedades sensoriais e nutricionais de um alimento. Quando o frio é usado como método de conservação, é essencial que o alimento seja mantido a temperaturas adequadamente baixas durante o transporte, distribuição e estocagem. Isso representa um grande aumento no custo do processo, devido ao grande consumo de energia para manter a cadeia de frio.

Outra maneira de abordar o

problema da conservação consiste em eliminar ou reduzir o máximo possível um dos fatores intrínsecos que mais afeta a velocidade das alterações microbiológicas, ou seja, a água. Entre os vários processos comumente utilizados deve-se mencionar a desidratação, a secagem convencional por ar aquecido, a liofilização, a atomização, a desidratação osmótica ou, ainda, a concentração.

Após a interdição na CEE, desde 1992, da fumigação por óxido de etileno, várias técnicas de alternativas de inativação microbiológica passaram a ser estudadas. A irradiação conheceu assim forte desenvolvimento. Agora, com as novas diretivas do Parlamento Europeu sobre a obrigação de etiquetagem dos produtos alimentícios ionizados, novas soluções estão entrando em prática, tais como:

- **a desbacterização** com vapor aquecido sob pressão usada em especiarias, plantas medicinais e aromáticas, legumes secos, frutas secas, gomas, chás, leite em pó, cacau, cereais, cogumelos e outros;

- **a descontaminação** de produtos secos por microondas. Esse processo pode ser usado para descontaminar produtos em pó, pastosos, viscosos ou líquidos, antes da embalagem asséptico;

- **o aquecimento ôhmico e indutivo.** O aquecimento ôhmico pode ser utilizado para líquidos que sejam condutores de eletricidade, porém não demais: entre 0,01 Siemens/m e 10 Siemens/m, a 20°C. As aplicações mais interessantes para esse processo são a pasteurização ou esterilização (140 a 150°C) de leite, sucos de frutas, cerveja, vinho bem como produtos de maior viscosidade tais como cremes ou ovos líquidos.

- **as altas pressões (pascalização, ou pasteurização a frio).** As altas pressões hidrostáticas podem ser utilizadas para realizar a descontaminação microbiológica de alimentos acondicionados em embalagem flexível. O processo já é utilizado em geléias e outros preparados à base de frutas, adoçadas ou não, os sucos de frutas, o presunto e outros frios fatiados e embalados, cogumelos silvestres, frutos do mar, etc. Um dos casos mais interessantes é a popular *salsa mexicana* de abacates, a guacamole. Esse purê de abacate que somente pode ser conservado três dias nas receitas convencionais, sem aditivos (as enzimas presentes no abacate escurecem o produto), conserva-se durante trinta dias no frio graças às altas pressões.

- **os campos elétricos pulsados.** Os campos elétricos pulsados permitem uma pasteurização sem tratamento térmico. As principais aplicações são os sucos de frutas, o leite, a cerveja e os ovoprodutos.

- **a pasteurização por luz pulsada.** A luz pulsada é uma tecnologia aplicável a esterilização de superfície de embalagens, a descontaminação de superfície de produtos alimentícios sólidos e a descontaminação de líquidos; sem mudança térmica notável, permite preservar as características organolépticas e nutricionais dos produtos tratados.

Ainda existem outras técnicas alternativas de inativação microbiológicas entre as quais pode-se rapidamente mencionar as descargas de alta voltagem, os campos magnéticos oscilantes, a luz UV e os ultra-sons. As descargas de alta voltagem aplicam-se aos líquidos, porém geram uma eletrólise e a formação de compostos químicos altamente reativos. Os campos magnéticos oscilantes implicam que os produtos sejam acondicionados em bolsas plásticas seladas. A luz UV é amplamente usada em tratamento de água. Nos alimentos suas principais aplicações são nos sucos (especialmente os sucos de maçã e sidra) ou em tratamento de superfície. A inativação microbiana é atingida por uma exposição mínima de 400 J/m^2. Os UV são freqüentemente combinados com outros agentes oxidantes (ozônio, peróxido de hidrogênio). Finalmente, os ultra-sons que utilizam freqüências de ondas superiores a 20.000 vibrações/segundo, parecem ser bastante promissores para a indústria alimentícia, não obstante, é empregada em combinação com outras tecnologias.

CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, a indústria de alimentos tem se adaptado aos crescentes requerimentos do consumidor, que tem se mostrado mais preocupado com a segurança alimentar e mais exigente com relação aos níveis de qualidade dos alimentos.

Muitos métodos de conservação de alimentos têm sido modificados para reduzir a severidade de técnicas mais extremas, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos obtidos e, conseqüentemente, aumentar sua aceitação no mercado consumidor. Além dessas técnicas modificadas, algumas novas tem surgido, basicamente com o mesmo objetivo.

A utilização combinada de diferentes conservantes pode apresentar vantagens. Uma combinação de diferentes compostos pode compensar as deficiências no espectro de ação de cada um, já que nenhum conservante é ativo contra todos os microrganismos. Por exemplo, compostos de grande efetividade contra bolores e leveduras, como ácido sórbico ou benzóico, podem ser combinados a um composto antibacteriano, como o dióxido de enxofre, cujos efeitos antioxidantes e inibidores de enzimas são explorados simultaneamente para inibir o crescimento de bactérias.

A combinação de conservantes pode ter três tipos de efeito: aditivo, quando os efeitos dos compostos individuais são simplesmente adicionados para se obter o efeito da combinação; sinérgico, quando a ação inibitória da combinação é atingida a uma concentração menor que a dos componentes; antagônico, quando a concentração da mistura deve ser maior que a dos compostos individuais. Uma combinação de conservantes com efeito sinérgico permite que se reduza o teor total de conservantes no alimento, além de reduzir efeitos sensoriais indesejáveis.