

Vol. 3 -- Fasc. 4

Junho de 1948

Departamento de Indústria, Inspeção e Conservação de Produtos Alimentícios
de Origem Animal

Diretor: Prof. Paschoal Mucciolo

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Diretor: Prof. Ernesto de Souza Campos

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

PENICILIOSE EM QUEIJOS

(PENICILLIOSIS IN CHEESE)

OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SOBRE A AÇÃO DO ETIL-MERCURI-TIOSALICILATO DE SÓDIO (MERTHIOLATE) NA PROFILAXIA DAS ALTERAÇÕES PRODUZIDAS PELO "PENICILLIUM SP" (**)

PRELIMINARY OBSERVATIONS UPON THE ACTION OF THE SODIUM ETHYL-MERCURI-THIOSALICILATE (MERTHIOLATE) IN PREVENTING ALTERATIONS PRODUCED BY THE "PENICILLIUM SP."

P. Mucciolo

C. S. Lacaz

P. Assis Ribeiro

Livre Docente

Assistente

2 estampas (6 figuras)

Quasi todos os produtos alimentícios estão sujeitos à contaminação por bolores quando mantidos por muito tempo em más condições de conservação. Nas contaminações maciças, os cogumelos modificam os caracteres físicos, químicos e organoléuticos dos alimentos, o que justifica a conduta do veterinário-inspetor em afastar do consumo público produtos assim alterados. Quando as contaminações são discretas, não chegando a comprometer a salubridade dos alimentos, o próprio consumidor incumbe-se de rejeitá-los, devido à repugnância que os mesmos lhe despertam.

Não há até o momento, para a maioria dos cogumelos banais de contaminação, qualquer base científica que elucide sobre sua possível nocividade para a saúde humana, quando ingeridos com os alimentos. Nessa ordem de idéias, convém referir que as experiências realizadas no Colégio Estadual de Dakota do Sul, nas Universidades de Purdue e de Illinois por diversos investigadores (JOHNSON, JOHNSON e WRIGTH, SIMONSEN, ROUKE e CARRICK) citados no editorial do Jour. Am. Vet. Med. Ass. de Novembro de 1946, não conseguiram demonstrar qualquer efeito deletério para a saúde de bovinos, ovinos, suínos e aves alimentados, por longo tempo, com alimentos mofados.

No caso do leite e derivados, normalmente são encontrados certos cogumelos, como o *Oospora lactis*, cuja presença no leite azêdo, no creme e em outros laticínios foi verificada por MACY e ANDERSON e

(**) Apresentado ao IV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, 22-28/1/1948.

posteriormente por ELLIKER. Outros cogumelos (*Penicillium roqueforti*, *P. camemberti* e *P. gorgonzola*) são propositadamente incorporados à massa de queijos com o objetivo de se obterem fermentações especiais, conferindo-lhes assim, em resultado, textura e sabor peculiares, que caracterizam tais tipos de produtos. Entretanto, existindo no ambiente esporos de cogumelos largamente distribuídos, são encontrados nos laticínios bolores absolutamente indesejáveis, quase sempre devido à falta de higiene na manipulação dos produtos, como mostraram ALMEIDA, LACAZ e RIBEIRO do VALE ou porque, como refere MALLMAN, a própria matéria prima traz a contaminação para a fábrica.

E' verdade que nem todos os alimentos oferecem idênticas condições para o desenvolvimento de cogumelos; alguns, como os queijos, apresentam substâncias nutritivas mais satisfatórias enquanto outros, como a manteiga e o creme, quer pelo fraco teor em lactose e umidade, quer pela elevada taxa de gordura e sal (cloreto de sódio), não favorecem tal crescimento (HAMMER). Mesmo assim, a quantidade de filamentos micelianos presentes no creme e na manteiga constitue índice para se aferir da qualidade desses alimentos, dispondo o analista de testes especiais, como os de WILDMAN, ELLIKER, M. B. B. (methylene-blue-borax) cujos resultados são expressos em percentagem de campos examinados que mostraram micélios (BÜLLER SOUTO e al., ELLIKER e HERRALL, ELLIKER). Realmente, como observou LEGGATT, a presença de bolores e leveduras na manteiga indica a necessidade de melhorar as condições sanitárias de fabricação.

Dentre os muitos fatores que condicionam o aparecimento de cogumelos nos laticínios, como na generalidade dos alimentos, destacam-se: umidade, temperatura, idade, acidez, taxa de sal, obscuridade, aeração.

A umidade é imprescindível e daí proliferarem os bolores muito mais facilmente nos produtos que retêm grande teor de água. E' assim que, como diz MALLMAN, a umidade é essencial para a germinação dos esporos e condição favorável no particular é a formação de um filme de umidade na superfície do alimento e seus envoltórios.

ADAMS e PARFITT, de suas experiências, concluíram que a quantidade de micélios na manteiga estava na razão inversa da idade e da temperatura de conservação do creme usado como matéria prima. A idênticas conclusões, quanto à influência da temperatura sobre a proliferação micótica, chegaram REID, EDMONDSON e ARBUCKLE e MACY e ANDERSON verificando, entretanto, êstes últimos autores, que as temperaturas baixas só têm efeito inibidor permanente quando o pH

fôr baixo. E' claro que falam em t ermos gerais porque   sabido que os *Penicillium* crescem bem a temperaturas baixas.

Segundo MACY e ANDERSON o gr au de acidez n o tem por si s o efeito not avel s obre a exuber ncia do crescimento dos mofos. Contudo, das experi ncias de ELLIKER depreende-se que a prolifera o dos bolores   inibida pela acidez elevada, opini o esta que   compartilhada por JACOBS.

Quanto   taxa de sal (cloreto de s dio), as concentra es elevadas dificultam ou mesmo impedem o desenvolvimento da flora mic tica. MACY e ANDERSON observaram que em culturas de agar-s o o crescimento de *Oospora lactis* era afetado quando o teor salino ultrapassava 1% e era inteiramente impedido numa concentra o a 10%, enquanto nas culturas em leiteiro a a o impedi ente come ava a manifestar-se quando a propor o de sal atingia 2,5%.

A obscuridade   favor vel aos cogumelos, indubitavelmente devido, em parte,   falta de radia o ultra-violeta e, em parte, ao maior teor de umidade dos locais n o ensolarados.

As condi es de aerobiose s o mais propicias ao desenvolvimento dos bolores, se bem que algumas esp cies se adaptam perfeitamente  s de semi-anaerobiose. A quantidade de mofos encontrada em cada amostra de creme examinada no trabalho executado por ADAMS e PARFITT foi diretamente proporcional   superf cie de exposi o. As experi ncias j  citadas de ELLIKER evidenciaram que a aus ncia de ar inibe o crescimento de *Oospora lactis*. Tambem GOLDING, procurando verificar as exig ncias em oxig nio de tr s amostras de *Penicillium roqueforti*, concluiu que uma redu o significativa no crescimento era obtida em atmosferas com as maiores dilui es desse elemento.

E' claro que, sendo muitas as fontes de onde p dem provir as contamina es, imp em-se rigorosas medidas de combate aos cogumelos, devendo os laticinistas, como aconselha MACY, fixar sua aten o s obre todos os detalhes das opera es, desde a sa da do leite da fazenda at  o produto j  industrializado atingir o consumo.

Esquematizando as medidas profil ticas tendentes a diminuir ou mesmo impedir a contamina o de alimentos por cogumelos, ALMEIDA, LACAZ e RIBEIRO DO VALE preconizam as seguintes normas:

- a) assegurar esterilidade relativa ao ambiente onde se trabalha, mantendo as paredes, f rros e assoalhos bem limpos e s cos.
- b) exercer severa vigil ncia e contr le s obre as pessoas que preparam os produtos, assim como os visitantes;
- c) praticar limpeza cuidadosa dos utens lios empregados na manufatura;

- d) praticar a pasteurização dos produtos;
- e) limitar o crescimento dos cogumelos por meio de substâncias antisséticas.”

Os prejuízos econômicos decorrentes da presença de bolores nos derivados do leite são incalculáveis porque a contaminação, comprometendo a qualidade, acarreta a retirada de grande quantidade de alimentos do consumo, seja pela ação das autoridades sanitárias, seja pela aversão que o público sente por produtos assim alterados. Considerando-se o extraordinário poder de disseminação e as poucas exigências quanto aos meios de cultura, facilmente podem ser avaliadas as proporções que assumem as invasões das indústrias de produtos alimentícios por cogumelos.

ALTERAÇÕES EM QUEIJOS

Em meados de 1947, queijos dos tipos Minas e Cheddar produzidos pela Fábrica Escola de Laticínios “Cândido Tostes”, em Juiz de Fora, apresentaram-se com alterações, até então ali desconhecidas, consistindo de pequenos pontos arroxeados, às vezes confluindo em manchas maiores, de bordos irregulares e com a parte central mais intensamente escrada, cobrindo assim áreas apreciáveis do produto.

Solicitando informações dos técnicos do estabelecimento, conseguimos apurar que o defeito era mais frequente e intenso nos queijos do tipo Minas (parafinado), muito embora outros tipos de massa semi-cozida (Prato e Cheddar) também apresentassem a alteração, porém de modo mais discreto e marcha mais lenta, enquanto se mantinham indenes os queijos de massa cozida (Parmezão). Nos queijos de massa crua tipo Minas as alterações apareciam cerca de uma dezena de dias após a parafinação e nos de massa semi-cozida não parafinados (Cheddar) só após três meses, aproximadamente, de permanência na câmara de cura, tendo sido informados de que, uma vez raspada a parafina dos queijos manchados, o defeito dificilmente voltava a se instalar.

Um exame acurado das salas de fabricação revelou alguns azulejos que apresentavam manchas de cor idêntica às observadas nos queijos. Este fato determinou rigorosa higienização do estabelecimento, incluindo calagem de paredes e fôrros com cal extinta e sulfato de cobre, desinfecção do ambiente com SO_2 e formoldeído, esterilização de vasilhame, instalações, utensílios e, posteriormente, substituição total de prateleiras e até do revestimento das paredes de salas de salga e de cura.

A despeito de tão severas medidas profiláticas, o defeito se bem que em menor escala, continuou a aparecer em queijos já em poder do comércio varejista, o que motivou a devolução de algumas partidas ao estabelecimento industrial de origem.

Chamados a cooperar no caso, recebemos da Fábrica Escola "Cândido Tostes" material para estudo, consistindo em alguns queijos com alteração em diversos grãos, pedaços de azulejos e de parafina também portadores de manchas.

Preocupados, inicialmente, em identificar a natureza das manchas, praticámos cortes histológicos nos queijos e semeaduras em agar-Sabouraud e em meio de Czapek. Colhemos o material dos azulejos, de fragmentos de parafina e dos queijos contaminados e, uma vez semeados, foram os meios deixados à temperatura ambiente. Isolámos então, com facilidade, um bolor do gênero *Penicillium*, (LINK, 1809) espécie não identificada.

Repetimos diversas vezes as mesmas semeaduras e verificamos que o cogumelo isolado pertencia sempre ao gênero *Penicillium*. Com a amostra por nós isolada, fizemos inoculações em fragmentos de queijos e dias depois, alterações experimentais idênticas às encontradas nos outros queijos foram observadas.

A identificação da espécie de *Penicillium* que isolámos não foi tentada, dada a grande dificuldade da referida identificação.

O número de espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* é enorme, razão pela qual deveria ser feito um estudo comparativo, do ponto de vista macro e micromorfológico com outras espécies já bem conhecidas. Por esta razão, resolvemos enviar uma das amostras por nós isolada ao Prof. THOM, autor de preciosa monografia sobre o *Penicillium*, a fim de que êste micologista se encarrégue da identificação específica.

A fotografia 1 mostra o aspecto macroscópico do *Penicillium* isolado dos queijos contaminados.

A colônia do *Penicillium* que isolámos é de coloração esverdeada, apresentando o seu reverso amarelado. Microscopicamente, verificamos a presença de conidióforos típicos do referido gênero.

Entre as alterações de cor dos queijos referidas pelos diversos autores especializados, não encontramos nenhuma que se identifique precisamente ao caso aqui relatado.

FLEISCHMANN, citando as análises efetuadas por ADAMETZ, F. J. HERZ, BARTHEL, GRATZ e outros, de colônias de fungos negros, pardos, vermelhos e amarelos observados com maior frequência na casca de diversos tipos de queijos, não inclui o gênero *Penicillium* na lista de agentes etiológicos. HAMMER, expondo que os bolores encontram

nos queijos ótimo meio de cultura e neles se desenvolvem quando dispõem de condições favoráveis de umidade e temperatura, lembra que a contaminação aparece principalmente na superfície devido à exigência destes organismos em oxigênio. Porém, feitas tais considerações de ordem geral, não faz aquele autor referências especiais aos gêneros de cogumelos responsáveis pelas alterações. Entretanto, ORLA-JENSEN, depois de tecer pormenorizados comentários às alterações de cor da massa de diversos tipos de queijos, esclarece que as manchas coradas da casca podem ser devidas, quer a bactérias, quer a mofos, entre os quais enquadra o *Penicillium casei*. Outros autores como FASCETTI, CECILIA e OLIVER limitam-se apenas a mencionar que o gênero *Penicillium* tem papel preponderante em causar alterações de cor da casca dos queijos, não descendo, contudo a minúcias do fato.

PROFILAXIA DA PENICILIOSE

Conhecido o agente etiológico responsável pelas referidas alterações, impunha-se fazer a profilaxia, que devia visar primeiramente o estabelecimento e respectivas instalações e, por último, os produtos.

A higienização do estabelecimento foi feita, como dissemos atrás, pelos técnicos locais e, ao que soubemos, não podia ter sido mais rigorosa, naturalmente dentro dos recursos postos à sua disposição. Contudo, convém lembrar a título ilustrativo que MALLMAN e MICHAEL, (in Jacobs) desejando prevenir o desenvolvimento de mofos nos frigoríficos de ovos, após exaustiva experiência, obtiveram, em escala comercial, resultados satisfatórios usando vapores de DOWICIDE G. (pentaclorofenato de sódio). Além dos vapores micostáticos, a profilaxia dos bolores pode ser feita à custa de tintas contendo alto teor em óxido de zinco, clorofenois, sulfato de hidroxiquinoleína ou então, como aconselha JACOBS, clorando o óleo de linhaça de tal forma que a tinta fique com 4% de halógeno. O pentaclorofenato de sódio foi também utilizado, com ótimos resultados, por BRIEN e DENNE, adicionado à tinta, na concentração de 2%.

Na purificação de ambientes, o ozona ocupa lugar de destaque, não obstante ser contraindicado para a conservação de alimentos ricos em gordura que facilmente se tornam rançosos em virtude do alto poder de oxidação desse agente. Estas observações, devidas a WATSON, não aconselham o emprego do ozona como fungicida, isto é, na concentração de 0,4 a 2%, para manteiga, creme e queijos gordos por ter aquele autor verificado que tal corpo oxida essas substâncias mais rapidamente do que o próprio oxigênio.

Em 1936 a Westinghouse Lamp., de New Jersey, lançou no mercado lâmpadas especiais para a esterilização de ambientes a que

chamou "Sterilamp" cujas radiações se fazem sentir não só sobre insetos como, principalmente, sobre bactérias, bolores e leveduras.

Os resultados obtidos com essas radiações germicidas foram tão evidentes que hoje a instalação das "Sterilamp" é de uso quasi obrigatório em salas onde se deseja ambiente esteril.

Tendo sido feita a desinfecção do estabelecimento de que nos ocupamos e de suas instalações com os recursos disponíveis no momento resolvemos, diante da ineficácia dos mesmos, dirigir a profilaxia para os produtos.

Muitos compostos foram preconizados com o objetivo de prevenir, por contato direto, o aparecimento de bolores nos alimentos, mas, nos últimos dez anos, as pesquisas nesse sentido se movimentaram em torno do poder fungistático demonstrado pelos ácidos graxos, principalmente do ácido propiônico e seus sais que agora já estão sendo aplicados nas indústrias de panificação e de laticínios (JACOBS), incorporados à massa dos produtos ou impregnando os envoltórios dos alimentos.

O ácido propiônico, o propionato de cálcio e o propionato de sódio foram inicialmente empregados no tratamento dos envoltórios da manteiga, afim de impedir o crescimento de bolores na superfície desse alimento. MACY e OLSON conseguiram acentuada inibição no desenvolvimento de cogumelos, quando as manteigas eram envolvidas em papel pergaminho impregnado com soluções de propionato de sódio ou de cálcio em altas concentrações (até 20%). Esses mesmos AA., em trabalho posterior, observaram que o ácido propiônico era mais eficiente do que seus sais de sódio ou de cálcio, requerendo, para igual ação impediante, soluções de muito mais baixa concentração.

Em 1945, OLSON JR. e MACY verificaram que uma solução a 5% de propionato de cálcio acidificada pelo ácido láctico a pH 5,5 e utilizada para impregnar papel pergaminhado era tão eficiente em preservar de cogumelos a manteiga quanto uma solução não acidificada desse mesmo sal a 10%.

A literatura a respeito da profilaxia dos queijos contra o aparecimento de bolores refere também o emprego do ácido propiônico e seus sais de sódio e cálcio e, ainda neste caso, como observaram IRVINE e SPROULE e INGLE, o ácido propiônico é mais eficiente como micostático que seus sais de cálcio e sódio nas mesmas concentrações.

Para JOHNS a concentração das soluções dos sais, para se obter resultado positivo, no tratamento de queijos, vai de 8 a 12%. A justificativa desses fatos, parece-nos ser encontrada por OLSON JR. e

MACY que atribuem às moléculas não dissociadas do ácido propiônico o papel mais importante no efeito inibidor do crescimento dos cogumelos.

Um editorial do número de junho de 1942 de *National Butter and Cheese Journal*, comentando o emprego do ácido propiônico e seus sais na proteção dos laticínios contra a invasão dos bolores, quer pelo tratamento dos envólucros, quer pela adição direta à massa na fabricação, prevê a possibilidade de imergir as fatias de queijo por 15 segundos na solução fungistática, afim de dilatar o período necessário à venda nas mercearias.

Devemos referir que com a denominação *Mycoban*, a E. I. Dupont de Nemours Company, lançou no comércio um produto para ser adicionado à massa de pães e bolos, constituído por propionato de sódio ou de cálcio, com a finalidade de inibir o crescimento de bolores.

O propionato de sódio foi empregado por GONZALEZ OCHOA e RUILOBA por via oral, no tratamento da actinomicose, não apresentando qualquer manifestação tóxica. Na prática, os propionatos de sódio e de cálcio têm sido empregados no tratamento das infecções micóticas superficiais da pele. (KEENEY e BROYLES, KEENEY e colaboradores). Nas concentrações de 10 a 20%, o propionato de sódio ou de cálcio exerce sua máxima atividade fungistática.

Diante do que foi sucintamente exposto, seria lógico tentar a aplicação dos propionatos para o caso das alterações que se manifestaram nos queijos produzidos pela Fábrica Escola "Cândido Tostes". Entretanto, as diversas espécies de cogumelos variam decididamente em sua suscetibilidade em face do tratamento pelos propionatos. Dos estudos já citados de OLSON e MACY quanto à tolerância de diversos gêneros de cogumelos ao ácido propiônico e seus sais de sódio e de cálcio, depreende-se que são os *Penicillium* os mais tolerantes à ação fungistática desses compostos. Também OLSON JR. e MACY, trabalhando com muitos gêneros de cogumelos, puderam confirmar que os *Penicillium* são marcadamente mais resistentes ao efeito impediante dos propionatos.

Por outro lado, as concentrações elevadas em que devem ser usados o ácido propiônico e seus sais para se mostrarem eficientes, conduzem a modificações das características organolépticas dos queijos, como foi apontado por diversos autores (IRVINE e SPROULE, JOHNS, F. MILLER).

Foram essas razões, sem dúvida ponderáveis, porque, como refere GLOBE, os fungistáticos devem, como característica primordial, não afetar nem o gosto nem o cheiro dos produtos tratados, que nos levaram a escolher outra substância que, sendo realmente eficiente

em impedir o crescimento do *Penicillium* isolado, não interferisse nas qualidades físico-organoléticas dos queijos.

Nossa atenção voltou-se para o estudo da atividade fungistática do "Merthiolate", após a leitura do trabalho de TURNER e COL. que empreenderam, durante a última guerra, uma série de experiências no sentido de evitar que os instrumentos óticos utilizados pelas forças americanas e inglesas nos países tropicais, sofressem o embolorecimento. Esses autores isolaram desses instrumentos, como fungos contaminantes, o *Penicillium spinulosum*, o *P. citrinum*, o *P. commune*, o *Aspergillus niger*, o *Trichoderma viride* e o *Mucor racemosus*. De todas as substâncias químicas por eles experimentadas, somente o Etilmercuritiosalicilato de sódio, conhecido pela indicação "M. T. S." e preparado na Austrália pelo Prof. V. M. Trikojus, apresentou propriedades favoráveis quanto à ação sobre os diversos fungos contaminantes, quanto à persistência de ação e quanto à ausência de toxicidade para o homem, requisitos que particularmente nos interessam no caso presente.

Devemos referir que este sal já havia sido sintetizado nos Estados Unidos, nos laboratórios de pesquisas da firma Lilly, sendo conhecido no comércio pelo nome de "Merthiolate" (Etilmercuritiosalicilato de sódio — $C_2H_5 \cdot HgS \cdot C_6H_4 \cdot COONa$).

O "Merthiolate" apresenta-se como um pó cristalino, de cor amarelo-clara, encerrando cerca de 49% de mercúrio em combinação orgânica; é francamente solúvel em água e água fisiológica. Suas propriedades germicidas foram estudadas por POWELL e JAMIESON, MARSHALL e outros. É ele largamente utilizado como preservativo de produtos biológicos e quanto ao índice de toxicidade, aproxima-se do antisséptico ideal; como reconhecem TURNER e col. é impossível que, nas concentrações em que atua como fungistático, cause qualquer prejuízo à saúde do homem; de fato, o "Merthiolate" tem largo emprego na clínica, na desinfecção da pele e mucosas, quando em solução aquosa ou tintura a 1:1.000.

MARSHALL já havia verificado que o "Merthiolate", quando diluído a 1:10.000 possuía nitido efeito fungistático sobre o crescimento do *Coccidioides immitis*, agente do granuloma coccidioidico e sobre o *Trichophyton interdigitalis*, um dos agentes de dermatofitose. ALMEIDA e col., verificaram que o "Merthiolate", em diluição de 1:20.000, apresentava evidente ação fungistática sobre o crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis*, agente da blastomicose sul-americana.

Esses estudos levaram-nos a ensaiar "in vitro" a ação do "Merthiolate" sobre o *Penicillium* produtor das alterações de queijos fabricados na Fábrica Escola "Cândido Tostes"; com esse objetivo,

semeamos o *Penicillium* em tubos de caldo Sabouraud aos quais previamente adicionamos o "Merthiolate" nas concentrações assinaladas no quadro abaixo.

ACÇÃO DO "MERTHIOLATE" "IN VITRO"

Grão de crescimento	1:100.000	1:75.000	1:50.000	1:20.000	1:10.000	Testemunha
	++	+	—	—	—	++++

Os resultados observados dez dias após a semeadura evidenciaram que o "Merthiolate", mesmo na diluição de 1:50.000, impede "in vitro" o crescimento do *Penicillium*.

CAPACIDADE INIBIDORA DA MESMA CONCENTRAÇÃO DE "MERTHIOLATE" PARA VARIOS COGUMELOS

FUNGOS	Merthiolate a 1/200.000	Merthiolate a 1/100.000	Merthiolate a 1/20.000	Merthiolate a 1/10.000	Testemunha
<i>Aspergillus elevatus</i>	+++	—	—	—	++++
<i>Hormodendrum Pedrosoi</i>	—	—	—	—	++++
<i>Saccharomyces Pastorianus</i>	++	++	++	+	++++
<i>Candida Krusei</i>	++	+	+	—	++++
<i>Penicillium Bertai</i>	—	—	—	—	++++
<i>Sporotrichum Beurmanni</i>	—	—	—	—	++++
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	—	—	—	++++
<i>Aspergillus niger</i>	—	—	—	—	++++
<i>Penicillium</i> sp. (isolado de queijos)	+++	++	—	—	++++
<i>Saccharomyces</i> sp.	++	+	+	±	++++
<i>Debaryomyces globosus</i>	±	—	—	—	++++
<i>Trichophyton Sabouraudi</i>	—	—	—	—	++++
<i>Cephalosporium Recifei</i>	—	—	—	—	++++
<i>Cephalosporium</i> sp.	—	—	—	—	++++
<i>Saccharomyces</i> sp.	++	++	++	+	++++
<i>Rhodotorula</i> sp.	—	—	—	—	++++

Desejando conhecer a título ilustrativo o comportamento de diversos fungos frente ao “Merthiolate”, iniciamos uma série de pesquisas trabalhando com Caldo Sabouraud adicionado do fungistático diluído a 1:200.000, 1:100.000, 1:20.000 e 1:10.000.

Os resultados dessas experiências estão relatados no quadro anterior e mostram que, de um modo geral, os bolores sofrem mais intensamente que as leveduras a ação fungistática do “Merthiolate”, enquanto o *Penicillium* isolado dos queijos mostrou-se insensível à droga nas mais altas diluições, outros bolores em condições idênticas tiveram seu crescimento completamente inibido.

Feitas as observações “in vitro” impunha-se verificar qual o comportamento do fungistático na profilaxia da peniciliose em queijos o que foi feito em laboratório.

Inicialmente, utilizamos queijos logo após a prensagem, sem salga nem tempo de cura que, ou foram imersos numa solução de “Merthiolate” a 1:50.000 em tempos variáveis, ou foram simplesmente pincelados com a solução. Os resultados, depois de 15 dias da inoculação com a amostra do *Penicillium* isolado, são expressos no quadro seguinte:

ACÇÃO DA SOLUÇÃO DE “MERTHIOLATE”

Queijo em contáto com solução de “Merthiolate” a 1:50.000	Gráo de crescimento do <i>Penicillium sp.</i>
Pincelado	+ + +
Imersão por um minuto	+ +
Imersão por 5 minutos	+ (pontos apenas)
Testemunha	+ + + + (crescimento intenso)

A experiência preliminar citada apontou-nos a imersão dos queijos na solução do fungistático, como procedimento mais eficiente na profilaxia da peniciliose.

Com o objetivo de verificar si o tratamento profilático devia ser feito antes ou depois da parafinação para os queijos tipo Minas, habitualmente parafinados na Fábrica Escola “Cândido Tostes”, procedemos à observação constante do quadro seguinte.

INFLUÊNCIA DE AÇÃO DO "MERTHIOLATE" EM QUEIJOS
PARAFINADOS E NÃO PARAFINADOS

Queijo	Concentração da solução de "Merthiolate"	Crescimento observado 10 dias após inoculação com <i>Penicillium sp.</i>
mergulhado por 5 minutos sem parafinagem	1:25.000	—
mergulhado por 5 minutos sem parafinagem	1:50.000	—
mergulhado por 5 minutos após parafinagem	1:25.000	+
mergulhado por 5 minutos após parafinagem	1:50.000	+ + +
mergulhado por 5 minutos e parafinado a seguir	1:25.000	—
mergulhado por 5 minutos e parafinado a seguir	1:50.000	+ + +

O tratamento dos queijos pelo fungistático deve preceder a parafinagem.

Em queijos que devem ser parafinados, a solução do fungistático só é eficiente a 1:25.000 enquanto para os queijos não parafinados a diluição do fungistático pode ser maior (1:50.000).

Desejando indagar si o contato mais demorado dos queijos com a solução do fungistático a 1:50.000 poderia acentuar o poder inibidor, fizemos a experiência do quadro seguinte com fragmentos de um mesmo queijo.

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONTATO COM A SOLUÇÃO DE
"MERTHIOLATE" NO CRESCIMENTO DO *PENICILLIUM SP.*

Queijo	Tempo de contáto com a solução de "Merthiolate"	Gráo de crescimento após 15 dias de inoculação com <i>Penicillium sp.</i>
Amostra 1 . . .	10 minutos	+ + + +
Amostra 2 . . .	20 minutos	+ + +
Amostra 3 . . .	30 minutos	+ (pontos apenas)
Testemunha . .	—	inteiramente recoberto

O resultado deste quadro é bem ilustrado pelas fotografias anexas, revelando que quanto mais longo fôr o prazo de contáto entre o queijo e o fungistático maior proteção é conferida ao produto contra a invasão do bolor que isolámos das alterações. (fig. 3).

Convém lembrar que tanto as experiências "in vitro" como as realizadas em laboratório sôbre queijos, são observações preliminares, que necessitam ser ampliadas, para se concluir, em definitivo, da aplicação prática do "Merthiolate" como agente inibidor da Peniciliose em queijos.

CONCLUSÕES

1 — As alterações de queijos produzidos pela Fábrica Escola de Laticínios "Cândido Tostes" que tivemos oportunidade de examinar foram devidas a um *Penicillium sp.*

2 — Repetidas vezes isolamos êste cogumelo, não só de queijos contaminados, como de parafina e de azulejos; com a amostra isolada reproduzimos experimentalmente com facilidade alterações em tudo idênticas às encontradas naqueles produtos.

3 — Experiências realizadas "in vitro" evidenciaram que o etil-mercuri-tiosalicilato de sódio "Merthiolate" inibe o crescimento do *Penicillium* isolado de queijos até em diluição a 1:50.000.

4 — De dezesseis amostras de fungos estudados "in vitro" os bolores sofreram mais intensamente do que as leveduras, a ação fungistática do "Merthiolate".

5 — Para empreender a profilaxia direta da peniciliose, nossas experiências preliminares indicam:

a — a imersão dos queijos na solução de “Merthiolate” revelou-se o procedimento mais eficiente nas condições de nossas experiências;

b — os queijos a serem parafinados devem receber o tratamento por aquele micostático na concentração de 1:25.000 antes da parafinação;

c — no caso de queijos não parafinados a diluição do fungistático é eficiente mesmo a 1:50.000;

d — o efeito inibidor da solução de “Merthiolate” a 1:50.000 é tanto maior quanto mais longo fôr o tempo de contato com os queijos.

RESUMO

Os AA., após tecerem comentários acerca da contaminação micótica dos alimentos e, particularmente dos laticínios, passam em revista os principais fatores que condicionam o desenvolvimento de bolores nos produtos. Investigando a causa responsável por alterações apresentadas por queijos produzidos pela Fabrica Escola de Laticínios “Cândido Tostes”, em Juiz de Fôra, isolaram um cogumelo do gênero *Penicillium*, cuja espécie não foi determinada. Com o *Penicillium* isolado os AA. reproduziram experimentalmente as alterações.

A seguir, passam os AA. a referir os diversos meios empregados na prática, no sentido de prevenir a contaminação dos alimentos por bolores. No caso em apreço, tendo sido feita, sem resultados apreciáveis, a higienização do estabelecimento e respectivas instalações, com os recursos disponíveis, os AA. resolveram estudar, experimentalmente a profilaxia da alteração, agindo sobre os produtos.

Não foi tentada a aplicação do ácido propiônico e seus sais de cálcio e sódio porque, como observaram diversos pesquisadores esses compostos, para se mostrarem eficientes devem ser usados em concentrações tais que conduzem a modificações das características orgânicas dos queijos, além de que, o gênero *Penicillium* é marcadamente mais resistente à ação fungistática dos propionatos.

O trabalho de TURNER e col. sugeriu aos AA. a aplicação do “Merthiolate” (etil-mercúrio-tiosalicilato de sódio) na preservação da Peniciliose de queijos. As experiências preliminares “in vitro” revelaram que êsse composto tem nítida ação impediante até em diluição a 1:50.000 sobre o crescimento do *Penicillium* isolado dos queijos.

Quanto ao comportamento em face do “Merthiolate” de desesseis diferentes amostras de fungos, entre as quais o *Penicillium* isolado de queijos, os AA. verificaram que, de modo geral, os bolores sofrem a ação fungistática desse composto mais intensamente que as leveduras.

Passando a ensaiar em laboratório e a título experimental a ação do "Merthiolate" em queijos, os AA. demonstraram que a imersão na solução do fungistático é o procedimento mais eficiente na profilaxia da Peniciliose.

De experiências posteriores resultou que os queijos a serem parafinados devem receber o tratamento pelo fungistático na concentração a 1:25.000 antes da parafinação. No caso dos queijos não serem depois parafinados a diluição do fungistático é eficiente mesmo a 1:50.000. Por último, os AA. verificaram que o efeito inibidor de uma solução de Merthiolate a 1:50.000 é tanto maior quanto mais longo fôr o tempo de contato com os queijos.

SUMMARY

*The AA. revise the outstanding factors that condition growth of fungi in products, after commenting upon mycotic contamination of food, especially milk derivatives. Upon investigating the responsibility of alterations presented by cheese from the "Fábrica Escola de Laticínios Cândido Tostes" in Juiz de Fôra, they were able to isolate a fungus of the *Penicillium* genus, its species having not been determined. The AA. were able to reproduce alterations experimentally with the sample isolated.*

*The AA. proceed to discuss the various ways that practice employs in order to avoid food's contamination by fungi. In this case no results were obtained through hygienization of the establishment and its departments by means at hand. The AA. then made up their minds to study, experimentally, the prophylaxy of the alteration acting upon the products. No use was made of propionic acid or its sodium and calcium salts, because, as been observed by various experimenters, these compounds have to be employed in concentrations such as to determine changes upon the organoleptic characters of cheese. Besides, the genus *Penicillium* has a markedly higher resistance to the fungistatic properties of propionates.*

*The work of Turner and others reminded the AA. the use of "Merthiolate" (ethyl-mercuri-thiosalicilate) in preventing penicilliosis in cheese. Preliminary experiments "in vitro" have shown this compound to have a marked hindering action (when diluted 1:50.000) upon growth of *Penicillium* isolated from cheese.*

*The action of "Merthiolate" was observed upon 16 samples of various fungi, among which the *Penicillium* isolated from cheese; the AA. were able to ascertain that, as a rule, molds suffer the fungistatic effects of this compound more intensely than yeasts do.*

Upon essaying in laboratory, with experimental purposes, the action of "Merthiolate" upon cheese, the AA. prove that immersion in a solution of this compound is by far the most efficient prophylactic method bearing reference to penicilliosis. Experiments made afterwards show that have to be treated by "Merthiolate" in concentrations of 1:25.000 before receiving paraffin; the dilution may be weakened even to 1:50.000. The inhibitory effect of this weakened solution is the stronger in direct rate to the time in which it is kept in contact with the cheese.

Practical use of sodium ethyl-mercuri-thiosalicilate (Merthiolate) in prophylaxy of cheese molding in creameris will be the subject of another work.

BIBLIOGRAFIA

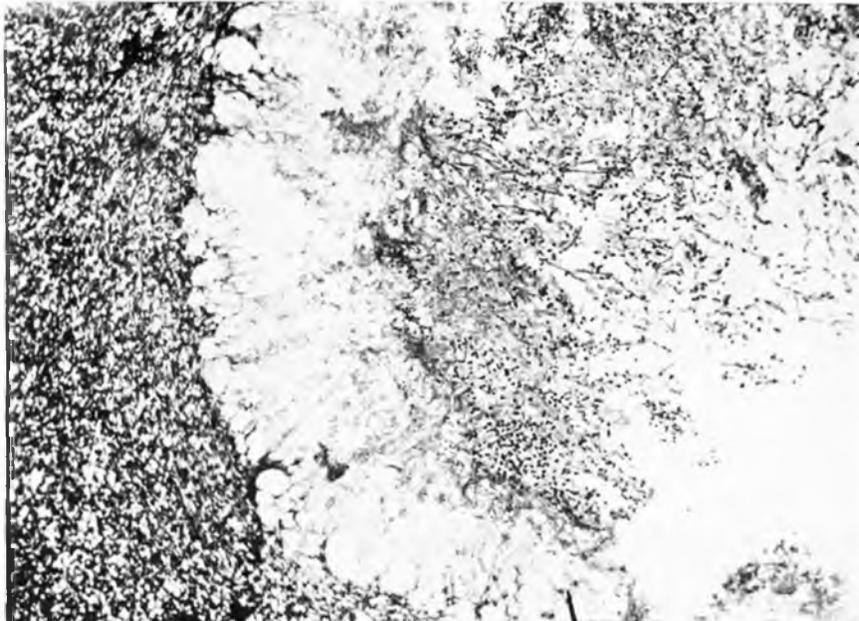
- 1940 — Retarding mold in cheese Nat. Butter and Cheese Jour., 31: 8-12 "in" *Jour. Dairy Sci.*, 23: A 221.
- 1946 — Danger from moldy feed? *J. A. V. M. A.* 109 (836): 373-5.
- ADAMS, J. — PARFITT, E. H. — 1939 — Some factors influencing the amount of the mold mycelia in butter. *Jour. Dairy Sci.*, 22: 367-74.
- ALMEIDA, F. — LACAZ, C. S. — RIBEIRO DO VALE, L. A. — 1943 — Flora micotica de alguns produtos alimentares. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 3 (1): 148-55.
- ALMEIDA, F. et al — 1946 — Ação do "Yatren" e do "merthiolate" "in vitro" sobre o "Paracoccidioides brasiliensis". *Arch. Brasil-Med.*, 36: 41-4.
- BRIEN, R. M. — DENNE, R. W. — 1945 — Investigations into causes and control of moulds in State houses. *New Zealand Jour. Sci. and Technol.*, 26 B (4): 174-81 "in" *Jour. Dairy Sci.*, 28: A 120.
- BÜLLER SOUTO, A. — GODOI, O. — MENEZES JR., J. B. FERRAZ — 1946 — Investigações microscópicas sobre manteigas. — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 4 (1): 28-49.
- CECILIA, C. A. — 1942 — Indústrias lácteas, Madrid, Espasa-Calpe, S. A.
- ELLIKER, P. R. — 1944 — A new quantitative method for estimation of total combined length of mold fragments in butter. *Jour. Dairy Sci.*, 27: 369.
- ELLIKER, P. R. — HERRALL, B. E. — 1945 — The mold mycelia count as an index of quality of butter. *Jour. Dairy Sci.*, 28: 519-24.
- EMMONS, C. W. — 1933 — Fungicidal action of some common disinfectants on 2 dermatophytes. *Arch. Dermat & Syph.*, 28: 15-21.
- FASCETTI, G. — 1935 — Burro e formaggio. 4.^a ed. Milano, Ulrico Hoepli.
- FLEISCHMANN, W. — 1945 — Tratado de Lecheria. Trad. 6.^a ed. alemana. Barcelona, Editorial Gustavo Gili, S. A.
- GLOBE, E. F. — 1942 — Preventing spoilage by mold and bacteria. *Food Indus.*, 14 (2): 46-8 "in" *Jour. Dairy Sci.*, 25: A 329.
- GOLDING, N. S. — 1940 — The gas requirements of "Penicillium Roqueforti" (three strains originally isolated from blue veined cheese) in the presence of nitrogen as diluent and the absence of carbon dioxide. *Jour. Dairy Sci.*, 23: 879-89.

- GONZALEZ OCHOA, A. — RUILOBA, J. — 1944 — Acción del propionato de sódio “in vitro” sobre “Actinomyces mexicanus” y “Cephalosporium” sp.; ensayo terapéutico en micetomas producidos por estos hongos. *Rev. Inst. Salub. y Enferm. Trop.*, 5: 83-6.
- HAMMER, W. B. — 1938 — Dairy Bacteriology. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- INGLE, J. D. — 1940 — Some preliminary observations on the effectiveness of propionates as mold inhibitors on dairy products. “in” *Jour. Dairy Sci.*, 23: (M 28): 509.
- IRVINE, O. R. — SPROULE, W. A. — 1940 — Mold inhibitors for cheese. *Canad. Dairy and Ice Cream Jour.*, 19: (11-19) “in” *Jour. Dairy Sci.*, 24: A 139
- JACOBS, M. B. — 1944 — The chemistry and technology of food and food products 2 New York, Interscience Publishers Inc.
- JACOBS, M. B. — 1947 — Synthetic food adjuncts. New York, D. Van Nostrand Company Inc.
- JAMIESON W. A. — POWELL, H. M. — 1931 — Merthiolate as preservative for biological products. *Am. J. Hyg.*, 14: 218-24.
- JOHNS, C. K. — 1941 — Controlling mold growth on cheddar cheese. *Canad. Dairy and Ice Cream Jour.*, 20: (4) “in” *Jour. Dairy Sci.*, 24: A 359.
- KEENEY, E. L. et al. — 1943 — Fungistatic and fungicidal effect of sodium propionate on common pathogens, *Bull. John Hopkins Hosp.*, 73: 379-90.
- KEENEY, E. L. et al. — 1944 — Propionate und undecylenate ointments in the treatment of “tinea pedis” and in vitro comparison of their fungistatic and antibacterial effects with other ointments. *Bull. John Hopkins Hosp.*, 75: 417-39.
- KEENEY, E. L. — BROYLES, E. N. — 1943 — Sodium propionate in treatment of superficial fungous infections. *Bull. John Hopkins Hosp.*, 73: 479-87.
- LEGGATT, A. G. — 1945 — Testing for yeasts and molds in Butter encourages sanitation. *Canad. Dairy and Ice Cream Jour.*, 24: (1) “in” *Jour. Dairy Sci.*, 29: A 141, 1946.
- LEGGE, R. T. — BONAR, L. — TEMPLETON, H. J. — 1933 — Epidermomycosis at University of California. *Arch. Dermat. & Syph.*, 27: 12-24.
- MACY, H. — ANDERSON A. E. — 1934 — Effect of temperature, salt and acidity on growth of mould (“Oospora Lactis”) *Nat. Butter & Cheese Jour.*, 25: (22) “in” *Jour. Dairy Sci.*, 19: A. 41, 1936.
- MACY, H. — OLSON, J. C. — 1939 — Preliminary observations on the treatments of parchment paper with sodium or calcium propionate. *Jour. Dairy Sci.*, 22: 527-34.
- MACY, H. — 1940 — New developments in mold control. *Jour. Milk Technology*, 3. (2): 113.
- MALLMAN, N. Z. — 1941 — Mycostatic salts prevent mold growth on stored foods. *Food Indus.*, (7): 41-42-54 “in” *Jour. Dairy Sci.*, 24: A 355.
- MARSHALL, M. S. — 1931 — Merthiolate new antiseptic. *California & West. Med.*, 35: 43-4.
- OLIVER, F. — 1943 — Lecheria e Industrias derivadas. 2.^a ed. Barcelona, Editorial José Montesó.
- OLSON, J. C. — MACY, H. — 1940 — Propionic acid and its calcium and sodium salts as inhibitors of mold growth. “in” *Jour. Dairy Sci.*, 23 (M29): 509-10.

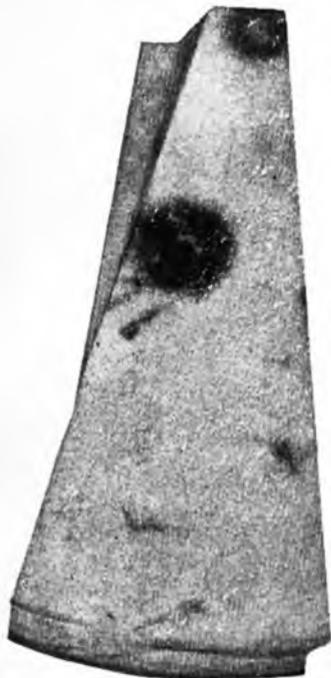
- OLSON JR., J. C. — MACY H. — 1945 — Propionic acid, sodium propionate and calcium propionate as inhibitors of mold growth. I. Observations on the use of propionate — treated parchment in inhibiting mold growth on the surface of butter. *Jour. Dairy Sci.*, 28: 701-10.
- OLSON JR. J. C. — MACY, H. — 1946 — Propionic acid, sodium propionate and calcium propionate as inhibitors of mold growth. 2: Studies pertaining to the active agent responsible for the inhibitory effect the propionates. *Jour. Dairy Sci.*, 29: (3): 173-80.
- ORLA-JENSEN — 1931 — Dairy Bacteriology. 2nd ed. London, J. & A. Churchill.
- POWELL, H. M. — JAMIESON, W. A. — 1931 — Merthiolate as germicide. *Am. J. Hyg.*, 13: 296-310.
- POWELL, H. M. — JAMIESON, W. A. — 1934 — On merthiolate and fungi associated with ringworm. *Proc. Indiana Acad. Sc.*, 43: 56-8.
- REID, W. H. E. — EDMONDSON, J. — ARBUCKLE, W. S. — 1941 — The effect of various factors on mold mycelia in cream and butter. "in" *Jour. Dairy Sci.*, 24 (M34): 548.
- THOM, C. — 1930 — The Penicillia. London, Bailliere, Tindall & Cox.
- TRIKOJUS, V. M. — 1946 — Chemistry of sodium ethylmercurithiosalicylate. *Nature*, London, 158. (4014): 472-3.
- TURNER, J. S. et al. — 1946 — Tropic-proofing of optical instruments by a fungicide. *Nature*, London, 158. (4014): 469-72.
- WALDO, J. H. et al. — 1931 — Bacteriological evaluation of some new water soluble organo-mercury compounds. *J. Bact.*, 21: 323-9.
- WATSON, R. D. — 1943 — Some factors influencing the toxicity of ozone to fungi in cold storage. *Refriger. Engin.* 46 (2): 103 "in" *Jour. Dairy Sci.*, 26: A 225.



Aspecto macroscópico da colônia de *Penicillium* sp., em
ágar-Sabouraud



Corte histológico de queijo contaminado por *Penicillium* sp., notando-se numerosos
filamentos e esporos do cogumelo que não invadem a massa



A



B



C



D-Testemunha

Estas fotografias mostram a ação do "Merthiolate" sobre fragmentos de um mesmo queijo em tempos diferentes de contato, após 15 dias da inoculação com *Penicillium sp.*
A) por 30 minutos; B) por 20 minutos; C) por 10 minutos e D) Testemunha.