

APLICAÇÃO DO PROCESSO DE IRRADIAÇÃO IONIZANTE COM COBALTO 60 EM MASSA ALIMENTÍCIA FRESCA

Natália Lika Sakotani ¹; Cynthia Jurkiewicz Kunigk ²

¹ Aluna de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

² Professora da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Massas frescas comerciais são produtos conservados em refrigeração por longos períodos, o que muitas vezes compromete a segurança do alimento devido à exposição a temperaturas abusivas. A presença de *Staphylococcus aureus* em massa fresca (nhoque) é um perigo para o consumidor, pois o desenvolvimento da bactéria implica na possível produção de enterotoxinas, responsáveis por causar intoxicação alimentar. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da radiação gama na destruição de *S. aureus* em nhoque a fim de aumentar a segurança do produto. O nhoque comercial foi contaminado com 10^6 UFC/g de *S. aureus* e irradiado com doses 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 kGy. As amostras foram armazenadas em temperaturas abusivas (15 e 25 °C) e o número de *S. aureus* foi determinado durante 31 dias. Os resultados mostraram que a irradiação com 1,5 e 2,0 kGy causou uma redução maior que 6 log UFC/g no número inicial de *S. aureus*, não sendo possível a detecção da bactéria durante 31 dias de armazenamento. As doses de 0,5 e 1,0 kGy causaram redução de 2,6 e 6 log UFC/g, respectivamente, entretanto durante o armazenamento a 15 e 25 °C as células sobreviventes se multiplicaram.*

Introdução

Segundo dados da Nielsen (empresa global de informações e pesquisa) e ABIMA (Associação Brasileira Das Indústrias de Massas Alimentícias), no período entre 2010 e 2015, as massas frescas apresentaram um crescimento de 42,5 %, em valores de vendas (Branco, 2016).

As massas frescas sem recheio apresentam umidade máxima de 35 %, atividade de água (A_w) de $0,96 \pm 0,02$ e pH de $5,7 \pm 0,4$ (Resta e Oliveira, 2013). Essas características tornam o produto propício ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e deteriorantes como bolores, leveduras e algumas bactérias psicotróficas (Comelli, *et al.*, 2011). O desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos reduz a vida útil do produto e coloca em risco a saúde do consumidor. Embora as massas sejam cozidas antes do consumo, esse processo não garante a eliminação total de microrganismos contaminantes ou a inativação das toxinas produzidas por eles.

Para a conservação das massas frescas é necessário o uso de baixas temperaturas, além da utilização de atmosfera modificada e a adição de conservantes químicos na formulação (Guerreiro (2006).

Staphylococcus aureus é uma bactéria produtora de enterotoxina, responsável por diversos surtos de toxinfecção alimentar. Em massas frescas a presença da enterotoxina é um grande perigo para o consumidor pois o cozimento do produto não causa sua inativação.

A irradiação é uma tecnologia que pode ser utilizada para aumentar a segurança dos alimentos e estender sua vida útil, entretanto pouco se conhece sobre seu efeito na conservação de massas frescas (Rajkowski, Niebuhr e Dickson, 2006).

A radiação gama em combinação com embalagem adequada e armazenamento a frio foi utilizada para a conservação de massas recheadas, resultando em alimentos seguros do ponto de vista microbiológico, com qualidade sensorial aceitável e sem alteração no valor nutricional (International Atomic Energy Agency, 2003)

O estudo realizado por Thayer *et al.* (1997), mostrou que a irradiação de carne de bisonho, avestruz, jacarés com 1,5 kGy reduziu a contagem de *S. aureus* em 4,1 log.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da radiação ionizante com cobalto 60 na destruição de *Staphylococcus aureus* em massa fresca (nhoque) e avaliar o desenvolvimento de células sobreviventes durante o armazenamento em temperaturas abusivas (15 e 25 °C). Também será determinado o valor D₁₀ em kGy para *S. aureus*.

Material e Métodos

Massa fresca

Foi utilizada a massa fresca, nhoque de batata cozida, da marca M.R. (Massas Rarllem), adquirida em mercados no município de São Paulo, com no máximo 15 dias de fabricação. O produto possui vida de prateleira de 44 dias, é embalado à vácuo, e armazenado em refrigeração, entre 3 e 10 °C). Os ingredientes utilizados na formulação do produto são: farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, batata, ovo, gordura vegetal, sal e realçador de sabor glutamato monossódico. Não há adição de conservantes químicos.

As amostras de nhoque foram armazenadas na embalagem original sob refrigeração (7 °C) até o momento da utilização.

Contaminação da massa com *S. aureus*

As massas foram previamente esterilizadas com radiação gama na dose de 25 kGy, na embalagem original da fábrica e refrigeradas a 7 °C.

A cepa de *S. aureus* 2644.00/2014, cedida pelo Banco de Cepas da Fundação Ezequiel Dias – MG, produtora de enterotoxina SEC, foi cultivada em Ágar Soja Triptona (TSA: CM0131, Oxoid LTD, Inglaterra) e incubada a 37 °C por 24 horas em estufa de Cultura (Modelo 002 CB, Fanem LTDA, Brasil). As células foram coletadas das placas de petri e suspensas em solução salina 0,85 % (Cloreto de Sódio P.A., Sigma-Aldrich), de modo a obter uma suspensão nº 10 na escala Mc Farland (Probac do Brasil, 2016).

A comparação de turbidez da suspensão de *S. aureus* com a suspensão nº 10 da escala Mc Farland foi realizada pela medida de absorbância em espectrofotômetro (B295II, Micronal, Brasil). O inóculo, com 10⁹ UFC/ml de *S. aureus* foi diluído em solução salina 0,85 % e homogeneizado em *Stomacher* 400 (*Seward*, Inglaterra), a 230 rpm por 2 minutos para obtenção de uma suspensão final contendo 10⁶ UFC/ml.

Após essa etapa, a suspensão final foi adicionada ao nhoque na proporção em massa, de 1:1, e homogeneizada manualmente com uma colher estéril durante 30 segundos, e em seguida permaneceu em repouso por 20 minutos. Os nhoques foram transferidos para peneiras horizontais de aço INOX, previamente esterilizadas, localizadas no fluxo laminar Biosafe 12 Classe II Tipo A (Veco, Brasil), onde permaneceram por 1 hora e 40 minutos para drenar o excesso de água de modo que a atividade de água do produto retornasse ao valor original. A massa contaminada foi embalada em sacos de polietileno em porções de 10 g, na presença de oxigênio e armazenada sob refrigeração (7 °C) até o momento da irradiação.

Irradiação das amostras de nhoque

Foi utilizado para irradiação da massa alimentícia fresca o Irradiador de ⁶⁰Co de pequeno porte Gammacell, localizado no CTR (Centro de Tecnologia das Irradiações), no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN.

As amostras foram encaminhadas ao irradiador em caixas de isopor e mantidas refrigeradas a 7 °C durante o tempo que permaneceram no equipamento. Foram aplicadas as doses de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 kGy. A amostra controle (não irradiada) foi mantida nas mesmas condições das amostras irradiadas. Finalizado o processo de irradiação, as amostras foram armazenadas a (15 ± 1) °C em câmara incubadora refrigerada B.O.D. MA 415 (Marconi, Brasil) e a (25 ± 1) °C em câmara incubadora refrigerada B.O.D. TE – 391 (Tecnal, Brasil) para posterior análise. O experimento foi repetido três vezes.

Análises microbiológicas

A quantificação de *S. aureus* nas amostras irradiadas e nas amostras controle, foi realizada imediatamente após a irradiação (dia 0) e nos dias 3, 6, 10, 20 e 31 de armazenamento, em duplicata, conforme metodologia descrita em *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, APHA (LANCETTE e BENNETT, 2001). Para tanto, 10 g de amostra foram transferidas para saco plástico estéril (Interscience, França) e diluída 10 vezes com solução salina 0,85 % estéril. A homogeneização foi realizada em *Stomacher* 400 (*Seward*, Inglaterra), a 230 rpm por 2 minutos. As diluições decimais foram realizadas utilizando-se o mesmo diluente. O plaqueamento foi realizado em ágar TSA (CM0131, Oxoid LTD, Basingtoke, Hampshire, Inglaterra), em profundidade, e as placas foram incubadas em estufa de cultura (Modelo 002 CB, Fanem LTDA., Brasil) a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 48 horas.

Foram enumeradas todas as colônias, para cálculo do número de UCF de *Staphylococcus aureus* presente por grama de nhoque.

Cálculo do valor D_{10}

Para o cálculo do valor D foi construído o gráfico do logaritmo do número de sobreviventes de *S. aureus* em função da dose e realizado o ajuste de uma reta por regressão linear. O valor D foi obtido pelo cálculo do inverso do coeficiente angular (GRODNER, CHEN e L.S., 1996).

Análise estatística

Os resultados das contagens foram transformados em log e analisados por ANOVA, considerando um nível de significância de 5 %. A comparação das médias foi realizada pelo método de Tukey.

Resultados e Discussão

. Os resultados das contagens de *S. aureus* nas amostras de nhoque irradiadas e no controle (sem irradiar), armazenadas a 15 e a 25 °C, durante 31 dias estão apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Observa-se nas tabelas 1 e 2 que a amostra controle apresentou logo após a contaminação, uma contagem de *Staphylococcus aureus* de $(6,06 \pm 0,06)$ log UFC/g. Durante o armazenamento a contagem atingiu $(8,6 \pm 0,3)$ log UFC/g a 15 °C após 6 dias e $(9,3 \pm 0,3)$ log UFC/g a 25°C após 3 dias, permanecendo constante até o final. A amostra irradiada com 0,5 kGy apresentou uma contagem após a irradiação de $(3,5 \pm 0,3)$ log UFC/g, e durante o armazenamento a 25°C, atingiu $(8,8 \pm 0,2)$ log UFC/g depois de 3 dias, enquanto a 15°C a contagem atingiu $(8,9 \pm 0,3)$ em 20 dias. Utilizando uma dose de 1,0 kGy a redução inicial no número de *S. aureus* foi maior que 6 log, entretanto, a partir do dia 6, a contagem era de $(3,3 \pm 1,3)$ log UFC/g, atingindo $(7,7 \pm 0,6)$ log UFC/g no 31º dia a 15 °C. Para o nhoque irradiado com a mesma dose de 1,0 kGy e armazenamento a 25 °C, a contagem atingiu $(6,3 \pm 0,2)$ log UFC/g no dia 3, e $(8,3 \pm 0,3)$ log UFC/g no 10º dia.

A contagem de *S. aureus* não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre as amostras irradiadas e o controle a partir do décimo dia quando o nhoque foi armazenado a 25°C e a partir do vigésimo dia quando armazenado a 15°C. A contagem de células nas amostras irradiadas com 1,5 e 2,0 kGy permaneceu abaixo do limite de detecção, durante os 31 dias em ambas as temperaturas.

Tabela 1 – Contagem de *S. aureus* em nhoque fresco (controle e irradiados), armazenado à 15 °C durante 31 dias de armazenamento.

Temp (°C)	Dose	Log UFC/g					
		Tempo (dias)					
		0	3	6	10	20	31
15	0	(6,06±0,06) ^{cA}	(6,9±0,8) ^{bcA}	(8,6±0,3) ^{abA}	(9,0±0,1) ^{aA}	(8,8±0,2) ^{abA}	(8,6±0,5) ^{abA}
	0,5	(3,5±0,3) ^{cB}	(4,3±0,8) ^{cB}	(6,4±0,2) ^{bB}	(7,6±0,3) ^{abAB}	(8,9±0,3) ^{aA}	(8,5±0,5) ^{aA}
	1	< 1	< 1	(3,3±1,3) ^{bC}	(6,3±0,7) ^{aB}	(7,1±0,6) ^{aA}	(7,7±0,6) ^{aA}

A, B médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).
a, b, c médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Contagem de *S. aureus* em nhoque fresco (controle e irradiados), armazenado à 25 °C durante 31 dias de armazenamento.

Temp (°C)	Dose	Log UFC/g					
		Tempo (dias)					
		0	3	6	10	20	31
25	0	(6,06±0,06) ^{bA}	(9,3±0,3) ^{aA}	(9,4±0,1) ^{aA}	(9,4±0,3) ^{aA}	(8,8±0,5) ^{aA}	(8,6±0,5) ^{aA}
	0,5	(3,5±0,3) ^{bB}	(8,8±0,2) ^{aA}	(9,1±0,3) ^{aA}	(9,3±0,1) ^{aA}	(9,0±0,1) ^{aA}	(8,2±0,9) ^{aA}
	1	< 1	(6,3±0,2) ^{aB}	(7±1) ^{aB}	(8,3±0,3) ^{aA}	(8,2±0,5) ^{aA}	(8,2±0,5) ^{aA}

A, B médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).
a, b, c médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

As figuras 1 e 2 mostram a curva de crescimento do *S. aureus* durante os 31 dias de armazenamento nas temperaturas de 15 e 25 °C, respectivamente.

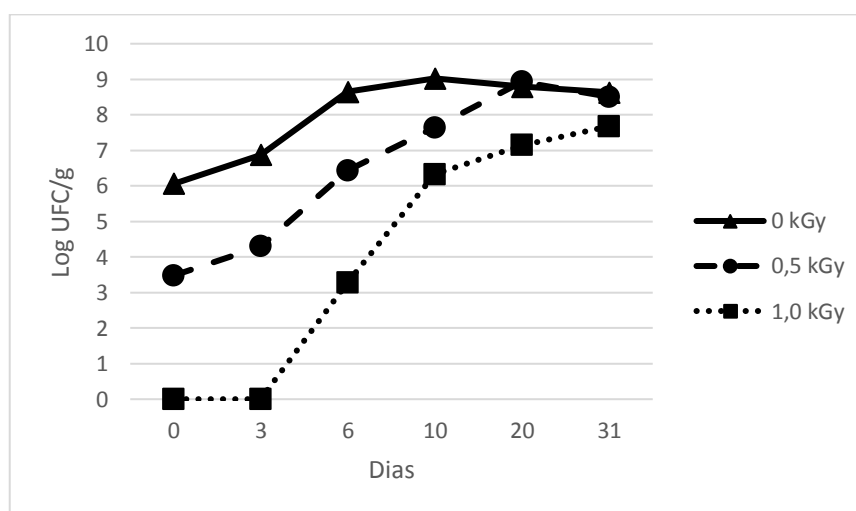


Figura 1 – Crescimento de *S. aureus* em nhoque fresco (controle e irradiados), armazenados à 15 °C durante 31 dias de armazenamento.

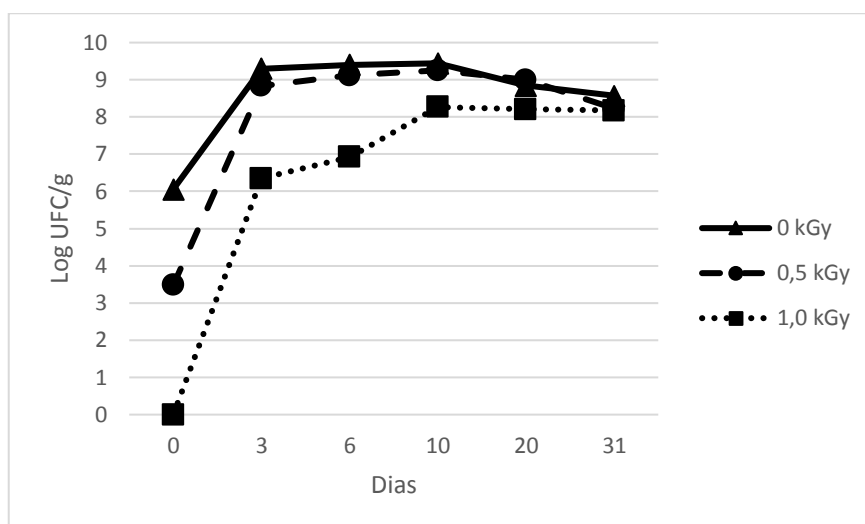


Figura 2 - Crescimento de *S. aureus* em nhoque fresco (controle e irradiados), armazenados à 25 C durante 31 dias de armazenamento.

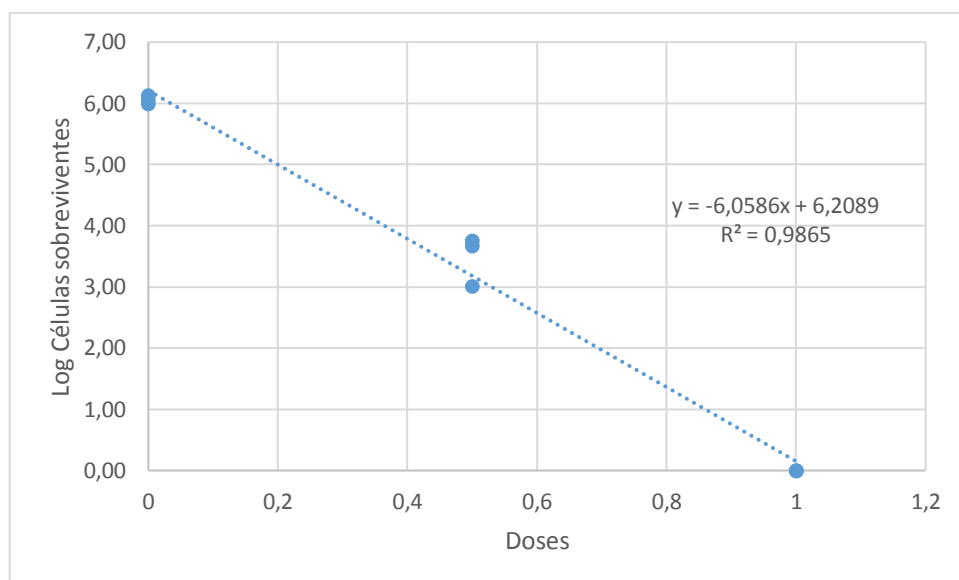


Figura 3 - Log do número de células sobreviventes de *S. aureus* em função da dose.

Para o cálculo do valor D_{10} foram utilizados os valores de contagem logo após a irradiação das amostras para as doses de 0,5 kGy, 1,0 kGy e para o controle. O coeficiente de correlação da reta foi de 0,986 (Figura 1) e o valor D_{10} foi de 0,17. De acordo com o valor D , a dose de 0,17 kGy reduz 90 % da população de *S. aureus* ou 1 ciclo logarítmico. Grodner, et al. (1996) encontrou um D de 0,16 kGy para o mesmo microrganismo em carne de caranguejo.

Conclusão

A aplicação de radiação gama em nhoque (massa fresca), na dose de 1,5 e 2,0 kGy, reduziu a contagem das células de *Staphylococcus aureus* a níveis não detectáveis pela metodologia utilizada na análise, durante os 31 dias de armazenamento nas duas temperaturas (15 e 25 °C). O valor D_{10} para o microrganismo foi 0,17 kGy.

Referências

- International Atomic Energy Agency. Radiation processing for safe, shelf-stable and ready-to-eat food, Montreal, Janeiro 2003. Disponível em:
<http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/34/032/34032363.pdf#page=67>. Acesso em: 30 Agosto 2017.
- Branco, M. D. Mercado de biscoitos, massas e grãos. **M. Dias Branco**, 2016. Disponível em:
<http://ri.mdiasbranco.com.br/conteudo_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=3003#indmassas>.
- Comelli, C. et al. Avaliação Microbiológica e da Rotulagem de Massas Alimentícias Frescas e Refrigeradas Comercializadas em Feiras Livres e Supermercados. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, p. 251-258, 2011.
- Grodner, R. M.; Chen, Y.; L.S., A. Effects of low dose gamma irradiation on the bacterial of freshly picked crabmeat, v. 48, p. 211-216, 1996.
- Guerreiro, L. Busca: Massas alimentícias. **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**, 2006. Disponível em: <<http://respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MjY=>>>. Acesso em: 27 Novembro 2017.
- Lancette, G.; Bennett, R. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins. In: F. P. DOWNES, & K. I. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, D. C: American Public Health Association, 2001. p. 387-403.
- PROBAC do Brasil. **Probac do Brasil**, 2016. Disponível em:
<<http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Isentos/Nefelobac-Rev03.pdf>>. Acesso em: 11 Novembro 2017.
- Rajkowski, K. T.; Niebuhr, S. E.; Dickson, J. Effect of gama or beta radiation on Salmonella DT 104 in ground pork. **Journal of Food Protection**, p. 1430-1433, 2006.
- Resta, M. S. A.; Oliveira, T. C. R. M. D. Avaliação do padrão estafilococos coagulase positiva estabelecido pela legislação brasileira para massas alimentícias. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, p. 319-325, 2013.
- Thayer, D. W. et al. Elimination by Gamma Irradiation os Salmonella spp. and Strain of Staphylococcus aureus Inoculated in Biso, Ostrich, Alligator, and Caiman Meat. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 756-760, 1997.