

Radiossensibilidade da *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* em leite tratado por irradiação gama

Radiosensitivity of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* in milk treated by gamma radiation

DOI:10.34117/bjdv6n11-047

Recebimento dos originais: 04/10/2020

Aceitação para publicação: 04/11/2020

Fabiana Regina Lima

Doutoranda em Ciência dos Alimentos

Instituição: Universidade Federal de Lavras – UFLA - MG

Endereço: Aqueça Sol, Lavras - MG

E-mail: fabianalima1818@hotmail.com

Kássia Héllen Vieira

Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Instituição: Faculdade de Saúde e Humanidade Ibituruna – FASI - MG

Endereço: Avenida Professora Aida Mainartina Paraíso, nº 99, Ibituruna, Montes Claros - MG

E-mail: kah-1815@hotmail.com

Elismara das Graças Costa

Discente do curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM – MG

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, Diamantina – MG

E-mail: costaelismara@gmail.com

Paulo de Souza Costa Sobrinho

Doutor em Ciência dos Alimentos

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM – MG

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, Diamantina – MG

E-mail: psobrinho@ufvjm.edu.br

Larissa de Oliveira Ferreira Rocha

Doutora em Ciência dos Alimentos

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM – MG

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, Diamantina – MG

E-mail: larissa.rocha@ict.ufvjm.edu.br

Poliana Mendes de Souza

Doutora em Ciência dos Alimentos

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM – MG

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, Diamantina – MG

E-mail: poliana.souza@ict.ufvjm.edu.br

RESUMO

O estudo teve por objetivo investigar o efeito da irradiação gama na letalidade de microrganismos inoculados em leite. As amostras foram esterilizadas e inoculadas com culturas ativadas de *S. enteritidis*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. As amostras foram irradiadas no Laboratório de Irradiação Gama (LIG)-BH. Para análise dos dados, utilizou-se o software SISVAR 5.3. Os resultados mostram que houve efeito significativo ($p < 0,05$) das doses de irradiação sobre a população de microrganismos presentes.

Palavras-chave: leite, irradiação gama, microrganismos patogênicos, inativação microbiana.

ABSTRACT

The study aimed to investigate the effect of gamma irradiation on the lethality of microorganisms inoculated in milk. The samples were sterilized and inoculated with activated cultures of *S. enteritidis*, *E. coli* and *L. monocytogenes*. The samples were irradiated at the Gamma Irradiation Laboratory (LIG) - BH. For data analysis, the SISVAR 5.3 software was used. The results show that there was a significant effect ($p < 0.05$) of the irradiation doses on the population of microorganisms present.

Keywords: milk, gamma irradiation, pathogenic microorganisms, microbial inactivation.

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos em termos nutricionais, mas em função deste mesmo motivo, constitui um substrato adequado para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive os patogênicos. Dentre as bactérias patogênicas associadas aos produtos lácteos estão a *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Menezes et al., 2014). Nesse contexto, o leite destinado ao consumo humano tem despertado a atenção de pesquisadores, tendo em vista sua importância no aspecto nutricional, econômico, social e de saúde pública, sob o enfoque global de segurança alimentar (Cardoso, 2000).

Para se promover a estabilidade dos alimentos, aplica-se métodos térmicos de processamento, no caso de leites, a pasteurização tem sido usada como principal tratamento térmico que visa a manutenção da qualidade microbiológica e aumento de vida de prateleira desse produto (Filho et al., 2012).

Como alternativa à pasteurização, novas tecnologias têm sido estudadas e empregadas no processamento do leite e seus derivados. As novas tecnologias, além de proporcionarem a destruição de microrganismos, também podem conferir ao alimento uma maior vida de prateleira, alterações mínimas em sua estrutura biológica, em suas características sensoriais e nutricionais e minimizar a utilização de aditivos químicos (Leistner; Gorris, 1995). Entre as tecnologias emergentes em destaque está a radiação ionizante.

A radiação ionizante vem sendo aplicada com diversos propósitos. Destaca-se a sua aplicação em alimentos, área em que se tornou promissora técnica de conservação em combinação ou substituição ao tratamento térmico. Quando doses controladas são administradas, as alterações nas características nutricionais e sensoriais do alimento são mínimas (Filho et al., 2012).

A irradiação de alimentos consiste em expor os mesmos a partículas carregadas de alta energia, tais como elétrons, raio X e raio gama, exemplos de radiação ionizante. Em alimentos, a técnica mais utilizada baseia-se no uso de uma faixa específica da energia eletromagnética conhecida como radiação ionizante com raios gama. O processo consiste na exposição dos alimentos a uma fonte controlada de radiação ionizante, durante um determinado período de tempo. Neste processo, apenas os raios gama entram em contato com o produto sem qualquer risco de contaminação radioativa (Neves; Manzione; Vieites, 2002).

A habilidade da irradiação para inativação de microrganismos é a principal razão para o uso da irradiação em alimentos. A irradiação foi demonstrada como sendo um meio efetivo de destruição de bactérias patogênicas e não patogênicas, bem como parasitas e em uma escala menor, vírus. Neste

contexto, a irradiação é vista como análoga a vários outros processos usados na eliminação de microrganismos como o aquecimento (Moy, 1993).

Para utilizar a irradiação como tecnologia de processamento de alimentos, é imprescindível estudar a sensibilidade à radiação de microrganismos contaminantes, pois isso fornece uma base para estimativa precisa das doses de inativação. A sensibilidade à irradiação varia entre diversos fatores como espécies microbianas, componentes dos alimentos, temperatura durante a irradiação e armazenamento subsequente (Neimira, 2007; Thayer, 2000). A medida mais usada para medir a radiosensibilidade é o valor de D_{10} (dose de redução decimal), a qual é definida como a dose requerida para eliminar 90% da população bacteriana inicial, ou diminuir a população em 1 ciclo logarítmico.

Tendo em vista a importância do leite em seus vários aspectos, como o nutricional e de saúde pública, este estudo teve por objetivo investigar o efeito de baixas doses de irradiação gama na letalidade de microrganismos patogênicos inoculados no leite e determinar a radiosensibilidades dos mesmos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima (leite cru) utilizada neste experimento foi gentilmente cedida pelo Laticínio Bom Gosto - Laticínios Pitangui Lima LTDA, localizado na cidade de Curvelo-MG.

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro rosqueável previamente esterilizados e mantidas sob refrigeração (5-7 °C) em bolsas térmicas contendo gelo reciclável para transporte (em média 3 horas) até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), para realização do estudo microbiológico.

2.2 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS

A partir de culturas estoque de *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* obtidas na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e mantidas congeladas na UFVJM, foi realizada a ativação através do descongelamento à temperatura ambiente e incubação em 3mL de caldo nutritivo por 48 horas a 36 °C (Alves, 2010).

O inóculo foi incubado em leite previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Utilizou-se 40 µL do inóculo para 10 mL de leite. Deixou-se o leite inoculado em estufa a 36 °C por

24 horas para desenvolvimento do microrganismo. Este método foi obtido a partir de testes realizados com objetivo de atingir nível de carga microbiana suficiente para a obtenção das cinéticas de inativação.

Para a realização do experimento, as amostras foram subdivididas em 3 grupos experimentais, um para cada microrganismo estudado.

2.3 IRRADIAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As amostras de leite inoculadas foram transportadas até o Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) em Belo Horizonte/Minas Gerais, para o tratamento com irradiação gama. Durante todo o período de transporte (em média 4 horas) as amostras foram mantidas refrigeradas (5-7 °C) em bolsas térmicas contendo gelo reciclável. Foi utilizado Irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II, fabricado pela MDS Nordion no Canadá, Modelo IR-214 e tipo GB-127, equipado com uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco.

As amostras foram expostas às seguintes doses: 0,5 kGy, 1,0 kGy, 1,5 kGy, 2,0 kGy, 2,5 kGy e 3,0 kGy com taxa de dose de 1,2 kGy/hora. As amostras controle (não irradiadas) foram mantidas nas condições que as amostras irradiadas. Foram realizadas 3 repetições para cada microrganismo estudado.

2.4 ENUMERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE MICRORGANISMOS SOBREVIVENTES

A contagem de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* foi feita por plaqueamento em superfície em ágar PCA (Plate Count Agar), incubação a 36 °C por 48 horas e posterior contagem, o resultado foi expresso em Log (UFC/mL) (Torquato, 2007). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Análise dos dados

Para análise dos dados, utilizou-se o software SISVAR 5.6. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5 % de significância.

O valor D_{10} foi calculado graficamente através da análise de regressão linear. Segundo a International Atomic Energy Agency (IAEA), a cinética de morte microbiana está relacionada diretamente com as doses de irradiação aplicadas segundo uma lei exponencial do tipo:

$$N = N_0 [10]^{-D/D_{10}}$$

Onde:

N_0 = contagem inicial dos microrganismos;

N= contagem de microrganismos sobreviventes após a aplicação da dose D;
 D= dose de irradiação aplicada;
 D₁₀= dose de irradiação necessária para destruição de 90% da população microbiana ou diminuir a população em 1 ciclo logarítmico.

Essa equação pode ser linearizada para a seguinte forma:

$$\text{LogN} = \text{LogNo} - (1/D_{10}) D$$

Que corresponde a uma reta do tipo $y=a+bx$, onde:

a= LogNo= coeficiente linear de regressão;

b= 1/D₁₀= coeficiente angular de regressão;

O valor D₁₀ foi calculado como o inverso positivo do coeficiente angular da regressão: D₁₀ = 1/b.

Também foram calculados o coeficiente de correlação linear (R²) e as equações de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios de contagens obtidos para os microrganismos inoculados no leite cru esterilizado frente a doses de irradiação aplicadas.

Tabela 1. Contagem de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* em amostras de leite irradiadas.

Doses (kGy)	Microrganismos inoculados (Log UFC/ml*)		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Controle	7,73	7,81	5,37
0,5	7,38	7,07	4,82
1	6,70	6,26	2,97
1,5	5,64	4,98	2,62
2	4,67	3,89	2,32
2,5	2,83	3,01	2,12
3	2,67	2,93	1,82

*Valores expressos em média ± desvio padrão.

Os resultados experimentais mostram que houve efeito significativo ($p<0,05$) das doses de irradiação sobre a população de microrganismos presentes. Quanto maior a dose maior a inativação observada. De acordo com Murano (1995) quanto maior a dose aplicada, menor o número de microrganismos sobreviventes. Dessa forma, se uma dada dose elimina 1 ciclo logarítmico (log), o dobro desta dose eliminará 2 log de microrganismos.

Ao considerar as médias das populações de microrganismos inoculados no leite no decorrer das doses de radiação aplicadas no experimento, observou-se um decréscimo nas concentrações dos microrganismos presentes. Com a aplicação de uma dose de 3 kGy, pode-se observar redução de

aproximadamente 5 log para a *Listeria Monocytogenes* e para a *Salmonella enteritidis*, e de aproximadamente 4 log para a *Escherichia coli*. O que comprova o efeito de descontaminação causado pelos raios gama.

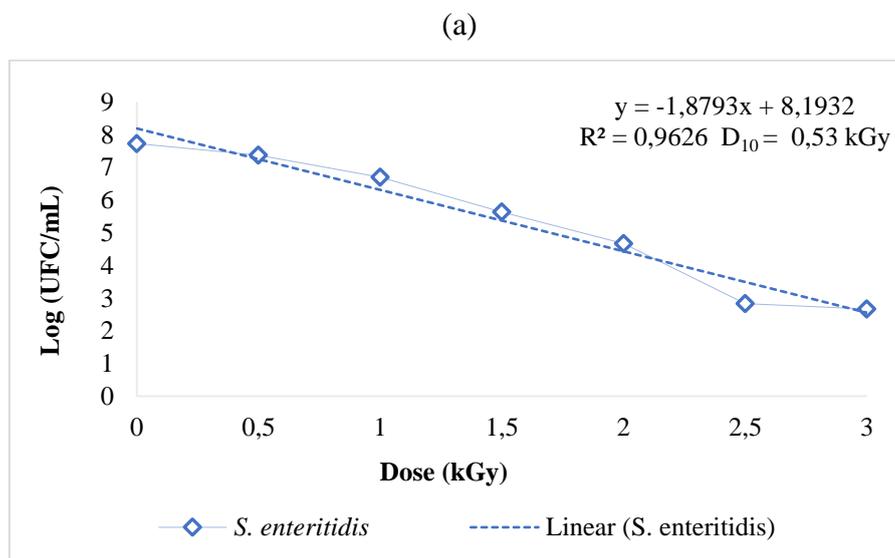
A *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella enteritidis*, apresentaram contagens iniciais da ordem de 8 log, enquanto a *Escherichia coli* na ordem de 5 log. A aplicação de 1 kGy foi suficiente para reduzir a contagem de *Listeria monocytogenes* em 1,03 log e em 1,55 log a da *Salmonella enteritidis*. Já para a *Escherichia coli*, a aplicação da mesma dose, 1 kGy, reduziu a contagem inicial em 2,4 ciclos logarítmicos.

Segundo Franco e Landgraf (1999), o número de microrganismos influencia na irradiação, da mesma maneira que no tratamento térmico, na desinfecção química e em outros fenômenos, ou seja, quanto maior o número de células, menor a eficiência de uma certa dose.

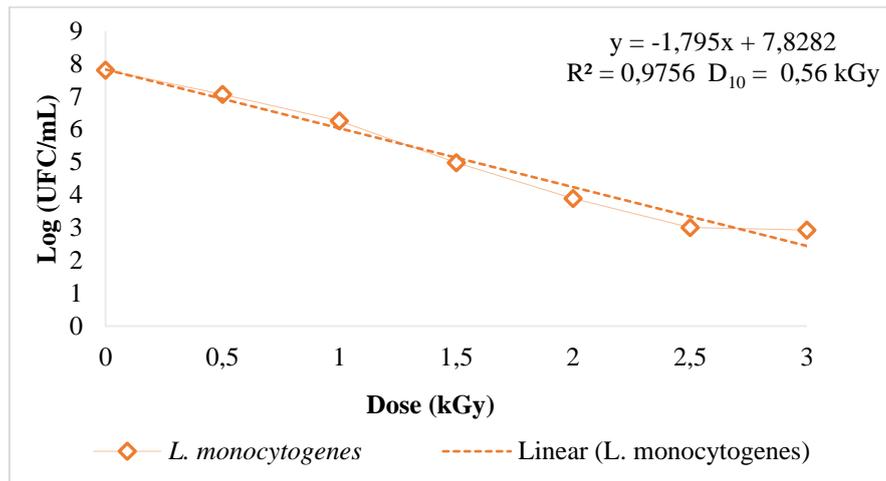
Na Figura 1 são apresentadas as curvas de regressão linear obtidas juntamente com suas respectivas equações, coeficientes de determinação (R^2) e valor D_{10} para cada microrganismo estudado.

Os resultados experimentais mostram que houve efeito significativo ($p < 0,05$) das doses de irradiação sobre a população de microrganismos presentes, existindo diferença significativa entre as doses aplicadas.

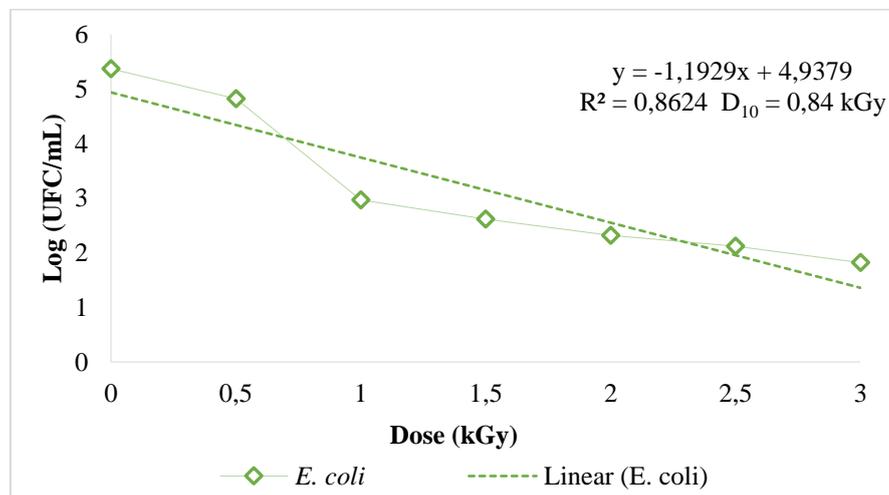
Figura 1. Curvas de inativação de *Listeria monocytogenes* (a), *Escherichia coli* (b) e *Salmonella enteritidis* (c) apresentando equação geral da reta, coeficiente de determinação (R^2) e valor D_{10} .



(b)



(c)



Para todos os microrganismos analisados foi observada alta significância ($p < 0,05$) dos modelos de regressão estimados, foram encontrados coeficientes de determinação com valores superiores a 0,80, ou seja, as equações quadráticas determinadas podem explicar mais de 80% dos dados, o que indica elevada dependência entre as variáveis: dose de irradiação aplicada e população de microrganismos presentes.

A dose necessária para inativar 90% ou diminuir em 1 ciclo logarítmico a população de *S. enteritidis* foi de 0,53 kGy, para *L. monocytogenes* foi de 0,56 kGy e para *E. coli* foi de 0,84 kGy. Esses valores são maiores do que os valores listados por Yadav; Tyagi (2005) para patógenos típicos em alimentos refrigerados: *E. coli* 0157:H7 (0,24 kGy), *Salmonella* spp. (0,30 kGy) e *Listeria monocytogenes* (0,30 kGy).

Microrganismos pertencentes à uma mesma espécie, gênero e família podem apresentar valores D_{10} diferentes em função de características próprias do microrganismo como também do meio em que o mesmo se encontra (Murano, 1995; Santos et al., 2003).

De acordo com Landgraf (2008), Jay (2005) e Murano (1995), a radiosensibilidade dos microrganismos é afetada por fatores intrínsecos do mesmo e fatores extracelulares, como: tipo de microrganismo, natureza e extensão do dano direto na estrutura do DNA do microrganismo, fase de multiplicação dos microrganismos, composição do meio, pH, temperatura e composição atmosférica.

Em função disso, Urbain (1986), enfatiza que na elaboração de um processo de irradiação de um determinado alimento é necessário que o valor D_{10} do microrganismo-alvo seja determinado neste mesmo alimento.

4 CONCLUSÃO

As novas tecnologias aplicadas na conservação de alimentos têm recebido grande destaque devido ao grande potencial que oferecem como técnicas alternativas ou complementares aos métodos térmicos tradicionalmente utilizados.

Pela avaliação dos resultados podemos concluir que a irradiação gama é eficiente na descontaminação do leite, levando a redução 4 a 5 ciclos logarítmicos da carga microbiana inicial, e doses baixas, como 1 kGy já seria suficiente para reduzir a carga microbiana inicial em mais de 90% tanto para *Salmonella enteritidis* quanto para *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* no leite.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFVJM e ao CDTN pelo apoio na realização dos experimentos, ao Laticínio Bom Gosto pelo fornecimento das amostras e à FAPEMIG pela bolsa de estudos concedida à discente de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

- Alves, C. C. D. C. **Comportamento da Escherichia coli em queijo Minas Frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta**. 81p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.
- Cardoso, A. L. **Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarréica por cepas de mesófilos e psicrotróficos de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado**. Campinas, 2000, 95p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2000.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- Filho T. L, Teixeira L. J. Q. T., Rocha C. T., Ferreira G. A. M., Souza M. C. Energia Ionizante na Conservação de alimentos: Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 9, 2012.
- Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1999. 182 p.
- IAEA (International Atomic Energy Agency) Training manual on food irradiation technology and techniques. Vienna: Technical reports series No.114 2nd ed., 1982, p.3-101.
- Jay, J. M. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 711 p., 2005
- Landgraf, M. Controle do Desenvolvimento Microbiano nos Alimentos. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008.
- Leistner, L.; Gorris, L. G. Food preservation by hurdle technology. **Food Science & Technology**, v. 6, p. 41-45, 1995.
- Menezes M. F. C.; Simeoni C. P.; Etchepare M. A.; Katira Huerta K.; Bortoluzzi D. P.; menezes c. r. Microbiota e conservação do leite. **Revista do Centro do ciências naturais e exatas**. v. 18. ed. especial. 2014, p. 76-89.
- Moy, J. H.; Efficacy of irradiation vs thermal methods as quarantine treatments for tropicals fruits, **Radiation Physics and Chemistry**, 42, 269-272. 1993.
- Murano, E.A. Irradiation of fresh meats. **Food Technology**. Chicago, v.49, n.12, p.52-54, 1995.

Neimira B. A. Irradiation Sensitivity of Planktonic and Biofilm-Associated *Escherichia coli* 0157: H7 Isolates is influenced by culture conditions. **Appl Environ Microbiol.** 2007; 73(10):3239.

Neves, L.C.; Manzione, R.L.; Vieites, R.L. Radiação gama na conservação pós-colheita da nectarina (*Prunus pérsica* var. *nucipersica*) frigoconservada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 676- 679, 2002.

Santos, AF.; Vizeu, D.M.; Destro, M.T.; Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. Determinação da dose de radiação gama para reduzir a população de *Salmonella* spp. em carnes de frango. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v.23, n.2, p. 200-205, 2003.

Thayer DW. Sources of Variation and Uncertainty in the Estimation of Radiation D₁₀ Values for Foodborne Pathogens, ORACBA News, 2000, 4(5).

Torquato F. P. L. **Sensibilidade de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* à desinfecção com luz natural e artificial: avaliação da capacidade de reativação bacteriana.** 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande, 2007.

Urbain, W. M; Food Irradiation. Orlando: Academic, 1986.

Yadav PR, Tyagi R.; Food Irradiation. In Industrial biotechnology. Motilal Books Publ., UK, 2005.