

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM ALIMENTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE COM *ESCHERICHIA COLI*.

**R. L. Guedes¹, R. G. Crede¹, I. T. Sabundjian¹, S. Aquino¹, M. O. Ruiz, G. B. Fanaro¹,
A.L.C.H.Villavicencio^{1*}.**

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. Centro de Tecnologia das Radiações
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária
CEP: 05508-910, São Paulo, Brazil.
rlguedes@ipen.br

RESUMO

O ritmo de vida das pessoas moradoras dos grandes centros urbanos favorece as indústrias produtoras de alimentos minimamente processados, já que os consumidores buscam produtos que sejam mais fáceis e mais rápidos de preparar. O processamento mínimo é um conjunto de práticas simples e aplicáveis à maioria das hortaliças (como lavagem, picagem, empacotamento, entre outras), para preservar a qualidade visual e nutricional dos produtos, conservá-los por mais tempo, agregar valor e facilitar a vida dos consumidores. Por outro lado, alimentos minimamente processados estão muito expostos à contaminação microbiológica, principalmente por microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária, como a *Escherichia coli*. Um elevado número de microrganismos indicadores em um produto alimentício indica que, durante a produção, as Boas Práticas de Produção não foram respeitadas, aumentando a probabilidade de se encontrar microrganismos patogênicos nesses alimentos, ou seja, microrganismos causadores de toxinfecções alimentares. Nesse sentido, a irradiação dos alimentos minimamente processados com raios gama pode ser uma solução para a redução da carga microbiana desse produto, tornando-os seguros à saúde dos consumidores. Nesse estudo iremos avaliar a radiorresistência da *Escherichia coli* em um produto alimentício minimamente processado contaminados artificialmente. O produto será contaminado com 10⁷ de *Escherichia coli* e irradiados com doses de 0, 0,5 e 1,0kGy, em seguida será realizada a semeadura pela técnica de semeadura em superfície utilizando ágar McConkey que será incubado a 35°C por 48 horas em estufa bacteriológica. O número de células viáveis presentes no meio de cultura serão contadas e confirmadas pela técnica de reação de cadeia da polimerase – PCR.

1. INTRODUÇÃO

Mudanças no estilo de vida dos consumidores têm gerado alterações nos hábitos alimentares de grande parte da população. A entrada da mulher no mercado de trabalho, a grande distância entre a casa e o lugar onde a população trabalha e a facilidade econômica em fazer as refeições fora de casa fizeram com que as indústrias de alimentos desenvolvessem produtos minimamente processados.

As operações para o processamento de alimentos minimamente processados consistem apenas em pré-seleção, lavagem, seleção, descascamento, corte, embalagem e armazenamento [1, 4]. A popularidade desses produtos é crescente devido à facilidade no preparo, item cada vez mais exigido, já que esses frutos e hortaliças vêm lavados, limpos e cortados [1]. Uma pesquisa de mercado, realizada em 2000, mostrou que as empresas de alimentos minimamente processados disputavam um mercado de R\$100 milhões por ano [9].

O risco de contaminação por microrganismos que possam desenvolver uma doença gastrointestinal nos consumidores de produtos minimamente processados é maior do que naqueles que adquirem o produto fresco e realizam as etapas de lavagem, seleção e corte em

sua residência. Esse fato tem gerado uma preocupação crescente nos órgãos reguladores de qualidade dos alimentos [5, 7]

A etapa de corte é um dos fatores que contribuem significativamente para o aumento da contaminação dos alimentos: os fluidos celulares e vasculares, ricos em nutrientes, são liberados, favorecendo a multiplicação da microbiota acompanhante [5].

A contaminação de hortaliças com bactérias de origem fecal já é amplamente conhecida. Na década de 70, pesquisadores apontaram a contaminação com *Escherichia coli* em 54% das hortaliças produzidas em São Paulo [7]. Em 2002, Sant'Ana e colaboradores realizaram um levantamento dos perigos biológicos associados ao processamento de hortaliças minimamente processadas e concluíram que 33,3% dos produtos estavam em desacordo com a legislação vigente com relação aos coliformes de origem fecal.

A irradiação é um processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento a doses controladas de radiação ionizante, com finalidades sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica [2]. Nesse sentido a irradiação de alimentos minimamente processados é utilizada como tratamento fitosanitário, reduzindo as populações microbianas e aumentando seu tempo de validade.

A couve manteiga (*Brassica oleracea var. acephala*) é a variedade mais conhecida de uma família de plantas chamadas genericamente de couve. Esse vegetal tem folhas grandes e lisas, de cor verde brilhante e recobertas por uma espécie de cera que além de fazê-las brilhar, as deixa mais duras e resistentes.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a radiorresistência de *Escherichia coli* em couve manteiga minimamente processadas, já que este produto encontra-se em um grupo de hortaliças que os brasileiros mais consomem.

3. MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram utilizados 10 g de couve orgânica minimamente processada adquiridas no mercado varejista de São Paulo.

3.2 Cepa bacteriana

A espécie bacteriana utilizada em todos os experimentos foi a *Escherichia coli* ATCC 25922, gentilmente cedida pela seção de microbiologia de alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

3.3 Primers:

MalB promoter Eco – 1: 5'GACCTCGGTTTAGTTACAGA 3'
Eco – 2: 5'CACACGCTGACGCTGACCA 3'

3.4 Irradiação e Microbiologia

Foram realizados três experimentos independentes. As amostras foram aliquotadas e contaminadas com 1mL de cultura de *E.coli* em fase estacionária. Essas amostras foram irradiadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP) com 0, 0,5 e 1,0 kGy em Fonte GammaCell de Cobalto 60. Após a irradiação, as amostras foram semeadas pela técnica de semeadura em superfície em Ágar MacConkey (Merck) e incubadas em estufa a 35°C/48h. Após o período de incubação as colônias características foram contadas em contador de colônia.

3.5 Extração do DNA

Três colônias características de cada uma das placas foram isoladas em caldo BHI (Merck) e incubadas por 18-24h. Após esse período, um mL da cultura foi transferida a um tubo de 2 ml e centrifugada por 5 min/2.000g. O sobrenadante que resultou foi descartado e o DNA do precipitado foi extraído conforme o método tradicional do CTAB, com 100mM Tris, 20mM Na₂EDTA, 150mM de NaCl, 2% SDS pH8.0 a 65°C por 30 minutos (tampão 1). O DNA foi centrifugado por mais 10 min/10.000g. O sobrenadante resultante foi separado em um tubo seco enquanto adicionou-se 0,6 volumes de 2-propano. Centrifugou-se por mais 10 min/10.000g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500µL de etanol 70%. A última etapa consiste em outra centrifugação por 10 min/10.000g, com descarte do sobrenadante e a secagem do tubo por 30min – 1 hora a temperatura ambiente.

3.6 PCR

O volume final para cada uma das amostras que foram amplificadas foi de 25µL. Sendo constituídas de 2µL de amostra com 23µL de mastermix - 12,3µL de água bidestilada, 2,5µL de buffer, 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1,5µL dNTP's (2,5mM), 2,5µL de cada primer (10µM) e 0,2µL de Taq polimerase termoestável (5U/µL).

Essa solução foi levada ao Termociclador Mastercycle da Eppendorf utilizando as condições de amplificação descritas por Wang *et. al.* [10] foram um ciclo à 94°C/15 segundos, 35 ciclos à 94°C/3 segundos, um ciclo à 50°C/10 segundos, um ciclo à 74°C/35 segundos, um ciclo à 74°C/2 minutos e um ciclo à 45°C/2 segundos.

3.8. Gel

Para a obtenção do gel foram pesados 1,2g de agarose, adicionado 60mL de TBE 0,045M (diluição de 1/10 de TBE 0,45M [54g de 0,45M Tris; 27,5g de 0,45M Ácido Bórico; 20ml de 0,1M EDTA {0,744g de Na₂EDTA.2H₂O e completado com 18ml de água}, pH 8,0 e completado com 1000ml e acertado o pH para 8,4]) e aquecidos e forno de microondas por 1 minuto e 30 segundos em potência máxima. Antes que o gel solidificasse, foi adicionado 3µ

L de Brometo de Etídio (10mg/mL) e colocado no suporte da cuba de eletroforese até por alguns minutos.

3.9. Eletroforese em Gel

Em cada um dos poços do gel foi colocado uma mistura constituída de 10µL da amostra amplificada e 2µL de azul de bromofenol – 0.025g de azul de bromofenol diluído em 6mL de TBE 0,045M e 40mL de glicerol. O gel de agarose foi submerso em uma cuba de eletroforese contendo TBE 0,045M a uma tensão constante de 75V. A imagem foi fotografada pelo sistema Vilber Lourmat Imager.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos em nosso experimento são listados na tabela abaixo.

Tabela 1: Número de sobreviventes de *E. coli* (UFC/g) em couve minimamente processada irradiada.

Dose (kGy)	Número de sobreviventes (UFC/g)		
	A*	B*	C*
0	6.3×10^5	$2,5 \times 10^6$	$9,8 \times 10^4$
0,5	$7,8 \times 10^4$	$5,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$
1,0	$3,7 \times 10^3$	$4,7 \times 10^4$	$8,8 \times 10^3$

* experimentos independentes

Chaudry e colaboradores [3], ao estudarem o efeito da radiação ionizante em cenouras concluíram que 0,5 e 1,0 kGy é a dose necessária para reduzir, respectivamente, um e dois ciclos logarítmicos do microrganismo no alimento. A redução logarítmica encontrada em nossos experimentos está de acordo com a encontrada pelos autores.

Chaudry e colaboradores [3] encontraram que com uma dose de 2 kGy foi possível eliminar microrganismos deteriorantes de cenouras. O mesmo foi encontrado por Mayer-Miebach e colaboradores [8] quando estudaram carne bovina crua. Sugere-se um estudo com couve contaminadas artificialmente com *E. coli* irradiada com doses maiores que 1,0kGy para comprovar se os resultados obtidos em outros alimentos são equivalentes.

A banda de visualização da *E. coli* está em 585bp, assim como o encontrado por Wang et. al. [10].

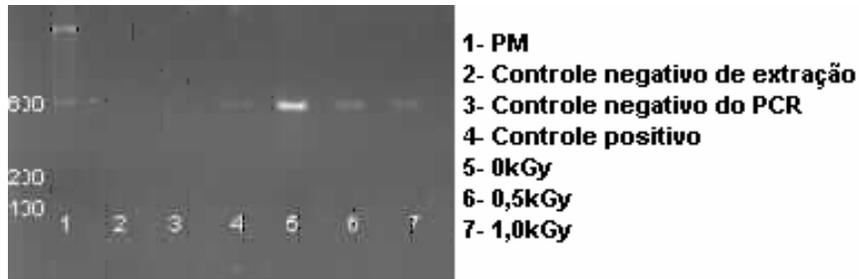


Figura 1. Gel de agarose identificando a *E. coli* inoculada artificialmente na couve.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a dose necessária para redução de 90% da população inicial de *Escherichia coli* na couve manteiga (D_{10}) é 0,63kGy.

6. REFERÊNCIAS:

1. Barriga, M.I.; Trach, G.; Willmot, C.; Simard, R.E. Microbial changes in shedded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. *Journal of Food Science*. **V.56**, n.6, p.47-58. 1991.
2. Brasil. *Regulamento técnico para irradiação de alimentos*. Resolução – RDC nº21, de 26 de janeiro de 2001
3. Chaudry, M.A.; Bibi, N.; Kam, M.; Kam, M.; Badshah, A.; Qureshi, M.J. Irradiation treatment of minimally processed carrots ensuring microbiological safety. *Radiation Physical and Chemistry* **v.71** p.169-173. 2005.
4. Chitarra, M.I.F. *Processamento mínimo de frutos e hortaliças*. Viçosa, Centro de Produções Técnicas, 1998, 88.
5. Faber, J. Microbiological issues surrounding the safety of fresh cut produce. *10th World Congress of Food Science and Technology. Abstract Book*, Sidney, Australia, p.11. 1999.
6. Gelli, D.S.; Tachibana, T.; Oliveira, I.R.; Zamboni, C.Q.; Pacheco, J.A.; Spiteri, N. Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas no Estado de São Paulo, SP, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, **v.39**, p.37-43, 1979.
7. Gopal, A.; Ajlonni, S., Roginskif, H.; Coventry, J.; Wan, J. Application of non-conventional disinfection techniquesto extended the shelf-life of minimally processed foods. *10th World Congress of Food Science and Technology. Abstract Book*, Sidney, Australia, p.7. 1999.
8. Mayer-Miebach, E.; Stahl, M. R.; Eschrig, U.; Deniuad, L.; Ehlermann, D. A. E. Schuchmann, H. P. Inactivation of a non-patogenic of *E. coli* by ionizing radiation. *Food Control*, **v.16**, p. 701-705, 2005.
9. Sanches, M. *Hortaliças: consume e preferência de escolares*. Tese apresentada a Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” – ESALQ para a obtenção do título de mestre. p.162. Piracicaba, 2002.
10. Wang, R.F.; Cao, W.W.; Cerniglia, C.E. A universal protocol for PCR detection of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*. **v.83**, 727-736pp. 1997.