

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE ESPOROS DE *Bacillus cereus* INOCULADOS EM PIMENTA-DO-REINO

Ângela Froehlich^{*}; Anna Lúcia C. H. Villavicencio^{**}; Raquel M. C. Azeredo^{*} e Maria Cristina D. Vanetti^{*}

^{*}Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Microbiologia
Campus Universitário
36571-000, Viçosa, MG, Brasil

^{**}Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP.
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, Brasil

RESUMO

Foram analisadas 37 amostras de pimenta-do-reino moída e, em 85% destas, constatou-se a presença de *Bacillus cereus* em números de até $4,6 \times 10^4$ UFC/g. A população de bactérias aeróbias mesófilas variou de $2,8 \times 10^5$ a $1,9 \times 10^8$ UFC/g. A pimenta-do-reino utilizada durante o experimento foi avaliada, constatando-se a presença de uma microbiota aeróbia mesófila de, aproximadamente, $2,6 \times 10^6$ UFC/g, constituída, principalmente, por espécies do gênero *Bacillus*. Constatou-se ausência de *B. cereus*, coliformes, fungos filamentosos e leveduras. A avaliação da irradiação da pimenta-do-reino inoculada com 10^6 UFC/g de esporos de *B. cereus* com doses de radiação gama variando entre 2 e 10 kGy evidenciou que doses acima de 5 kGy foram suficientes para reduzir a contagem de, aproximadamente, 10^6 UFC/g de aeróbios mesófilos e 10^4 UFC/g de esporos de *B. cereus* a números não detectáveis pela metodologia utilizada. A dose de redução decimal (D_{10}) para os esporos de *B. cereus* inoculados em pimenta-do-reino, foi de 1,78 kGy.

I. INTRODUÇÃO

Os condimentos são considerados veículos importantes de vários microrganismos, que podem resultar em possíveis problemas de saúde para os consumidores, bem como interferirem na qualidade e na vida útil dos alimentos onde esses ingredientes forem adicionados. Essa contaminação se deve às más condições de manuseio durante a colheita, estocagem e processamento do produto.

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas em condimentos geralmente é elevada e pode alcançar 10^6 a 10^8 UFC/g, constituída basicamente por bactérias deterioradoras, esporulantes e produtoras de gás [1]. Essa microbiota é representada por espécies do gênero *Bacillus*, acompanhadas em alguns casos, por *Salmonella* ou *Clostridium* spp [1].

Bactérias formadoras de esporos são contaminantes comuns de condimentos [2] e constituem agentes potenciais de deterioração dos alimentos onde esses condimentos são utilizados. Entre os esporulados, aqueles capazes de causar gastroenterites são de relevada importância e incluem *Clostridium perfringens* [3] e *Bacillus cereus* [1; 3].

Em razão da contaminação elevada dos condimentos e do risco à saúde dos consumidores, existe a necessidade de submetê-los a processos de redução ou inativação da microbiota contaminante. Métodos convencionais de descontaminação não são ideais para o tratamento de condimentos [4]. Em função da termosensibilidade dos óleos essenciais, o calor não pode ser usado. Gases como óxidos de etileno, propileno e brometo de metila são eficientes, mas estão sendo banidos, por deixarem resíduos químicos no produto e também por serem potencialmente carcinogênicos e mutagênicos [5]. Uma outra alternativa para a descontaminação de condimentos é a radiação gama, que elimina a necessidade do uso de compostos químicos e reduz o risco de contaminação, principalmente em condimentos utilizados com maior frequência [6]. A irradiação é, sem dúvida, o método mais efetivo e o mais seguro para a descontaminação de condimentos, não produzindo compostos tóxicos [7].

A irradiação de condimentos é aprovada pelo FDA que estabeleceu doses máximas de 30 kGy [8], enquanto no Brasil, a dose máxima permitida para condimentos é de 10 kGy [9].

O presente estudo teve por objetivo avaliar o uso da radiação gama para inativação de esporos de *B. cereus* inoculados em pimenta-do-reino e determinar a dose de redução decimal.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Contagem de Aeróbios Mesófilos e de *Bacillus cereus* em Amostras de Pimenta-do-Reino. Foram avaliadas de duas a seis amostras de 11 marcas comerciais adquiridas no comércio de Viçosa (MG) e São Paulo (SP) num total de 37 amostras.

Onze gramas de pimenta-do-reino foram homogeneizadas em “stomacher” (Seward 400, London, UK), com 99 mL de tampão fosfato, pH 7,2. Para a contagem de aeróbios mesófilos, alíquotas de 0,1 mL das suspensões foram plaqueadas em superfície do ágar PCA e incubadas a 37°C durante 48 horas [10].

Para contagem de *B. cereus*, utilizou-se o ágar vermelho de fenol - gema de ovo - manitol - polimixina B (MYP). As placas, em duplicata, foram incubadas a 30°C, em aerobiose, durante 18 a 24 h, para contagem de colônias típicas de *B. cereus* [11].

Preparo da Suspensão de Esporos de *B. cereus*. Utilizou-se uma estirpe de *B. cereus* de referência NCTC 11145 do tipo diarréico. As células foram cultivadas no meio de esporulação, preparado com caldo nutriente suplementado com 0,01% MnSO₄, 1% de amido e 2% de ágar, em frascos de Roux [12]. Após incubação a 30°C por 96 h, a massa celular foi removida com o auxílio de bastão de vidro estéril e 10 mL de solução salina a 0,85%. Os esporos foram separados por centrifugação, a 5.000 g por 20 minutos, a 4°C por cinco vezes [13]. A suspensão de esporos foi liofilizada em equipamento Heto Lab modelo VR-1 (Vacuum Concentrator).

Caracterização Microbiológica da Pimenta-do-Reino Utilizada no Experimento. A caracterização da microbiota contaminante da pimenta-do-reino foi feita determinando-se a contagem de aeróbios e anaeróbios mesófilos, *B. cereus*, bactérias esporuladas, coliformes totais e fecais, fungos filamentosos e leveduras.

Tratamento das Amostras de Pimenta-do-Reino por Irradiação. Porções de 5 g de pimenta-do-reino contendo 10⁴ UFC/g de esporos de *B. cereus* foram acondicionadas em embalagens de polietileno e seladas em seladora Tec Maq Ap-450, a vácuo.

Os tratamentos de irradiação foram feitos em irradiador Gamma Cell-220, ⁶⁰Co (Atomic Energy of Canada, LTD), com doses de 2, 3, 4, 5, 7 e 10 kGy. A taxa de dose durante a utilização do equipamento foi de 6,7 kGy/h.

Após o tratamento, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, por aproximadamente 24 horas, e submetidas a análises microbiológicas. Os valores de dose de redução decimal (D₁₀), do tratamento de irradiação para os esporos de *B. cereus* foram determinados pela análise de

regressão dos dados das curvas de inativação dos esporos obtidas experimentalmente.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem de Aeróbios Mesófilos e de *B. cereus* em Amostras de Pimenta-do-Reino. As 37 amostras de pimenta-do-reino analisadas apresentaram contagens de bactérias aeróbias mesófilas que variaram entre 2,8 x 10⁵ e 1,9 x 10⁸ UFC/g (Tab. 1). Este resultado evidencia a contaminação elevada da pimenta-do-reino por bactérias aeróbias e é similar a resultados encontrados na literatura [14; 1; 15; 16; 17; 18; 19; e 20].

TABELA 1. Contagem Padrão de Aeróbios Mesófilos e de *B. cereus* (UFC/g) de 11 Marcas Diferentes de Pimenta-do-Reino Moída, Coletadas no Comércio das Cidades de Viçosa (MG) e São Paulo (SP)

| Marca | Núm. de amost. | Aeróbios mesófilos (UFC/g) | <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g) |
|-------|----------------|---|---|
| 1 | 5 | 2,8 x 10 ⁶ a 6,0 x 10 ⁶ | 5,0 x 10 ² a 2,1 x 10 ³ |
| 2 | 6 | 4,4 x 10 ⁶ a 1,9 x 10 ⁸ | 2,0 x 10 ³ a 4,6 x 10 ⁴ |
| 3 | 2 | 3,3 x 10 ⁵ a 6,0 x 10 ⁶ | 7,0 x 10 ² a 1,3 x 10 ³ |
| 4 | 2 | 2,0 x 10 ⁶ a 8,6 x 10 ⁶ | 1,8 x 10 ³ a 3,0 x 10 ³ |
| 5 | 5 | 4,7 x 10 ⁶ a 1,3 x 10 ⁷ | 1,2 x 10 ³ a 2,3 x 10 ³ |
| 6 | 5 | 2,9 x 10 ⁶ a 3,0 x 10 ⁷ | 6,0 x 10 ² a 2,3 x 10 ³ |
| 7 | 4 | 2,6 x 10 ⁶ a 3,0 x 10 ⁶ | <10 |
| 8 | 2 | 2,8 x 10 ⁵ a 7,3 x 10 ⁵ | 1,5 x 10 ² a 3,1 x 10 ² |
| 9 | 2 | 3,8 x 10 ⁶ a 5,5 x 10 ⁶ | 2,0 x 10 ² a 4,5 x 10 ² |
| 10 | 2 | 3,8 x 10 ⁶ a 7,2 x 10 ⁷ | 2,2 x 10 ² a 8,5 x 10 ² |
| 11 | 2 | 5,0 x 10 ⁵ a 4,3 x 10 ⁶ | 3,0 x 10 ² a 6,0 x 10 ² |

A análise de *B. cereus* em pimenta-do-reino moída, pela contagem de colônias típicas em ágar MYP, evidenciou números entre 1,5 x 10² e 4,6 x 10⁴ UFC/g em 85% das amostras analisadas (Tab. 1). Para outros autores, em 40% das amostras de pimenta preta, analisadas foi verificada a incidência de *B. cereus* [21]. Na África do Sul, foram analisadas amostras de pimenta preta, páprica, coentro e manjerição e detectada a presença de *B. cereus* em 14 das 20 amostras [15]. Esses autores observaram contagem de *B. cereus* variando entre 10² e 10⁶ UFC/g, em condimentos em geral, 3 x 10³ UFC/g em pimenta preta e 6 x 10³ UFC/g em pimenta branca. Em outro estudo foram detectados números de *B. cereus* entre 10² e 10⁵ UFC/g em amostras da maioria dos 34 condimentos analisados e 1 x 10² e 4 x 10³ UFC/g em grãos de pimenta preta [18], entretanto outro autor registrou números de 4,3 x 10⁶ UFC/g de *Bacillus* spp em pimenta preta [22].

Caracterização Microbiológica da Pimenta-do-Reino Utilizada no Experimento.

A amostra de pimenta-do-reino moída usada para inoculação dos esporos de *B. cereus* apresentou uma contagem de $2,6 \times 10^6$ UFC/g de aeróbios mesófilos e na menor diluição avaliada, 10^{-1} , não foram encontradas colônias típicas de *B. cereus* em meio MYP. Também não houve crescimento de anaeróbios mesófilos, nem foi detectada a presença de coliformes no teste presuntivo em caldo LST, nem de fungos filamentosos e leveduras.

Após submeter à suspensão de pimenta-do-reino ao tratamento térmico de 80°C durante 20 minutos, a contagem de aeróbios mesófilos foi de $2,7 \times 10^6$ UFC/g, sugerindo que a microbiota do condimento em questão é constituída, predominantemente, por esporos de bactérias aeróbias mesófilas. Dos isolados avaliados, a maioria é de bastonetes Gram positivos e produtores de catalase e foram reconhecidos como membros do gênero *Bacillus*. Em outros trabalhos, a presença de esporos termorresistentes foi registrada em pimenta preta na ordem de $3,2 \times 10^5$ UFC/g [4], enquanto em pimenta preta em grão tratada a 80°C por 20 minutos, foi detectada uma contagem de bactérias termorresistentes variando de $1,7 \times 10^3$ a 6×10^6 UFC/g [23].

Avaliação do Efeito da Irradiação Sobre os Esporos de *B. cereus* inoculados em Pimenta-do-Reino.

A aplicação de doses de radiação maiores do que 5 kGy promoveram uma eliminação completa da população de 10^6 UFC/g de aeróbios mesófilos, incluindo a população de 10^4 UFC/g de esporos de *B. cereus* inoculada na amostra (Fig. 1).

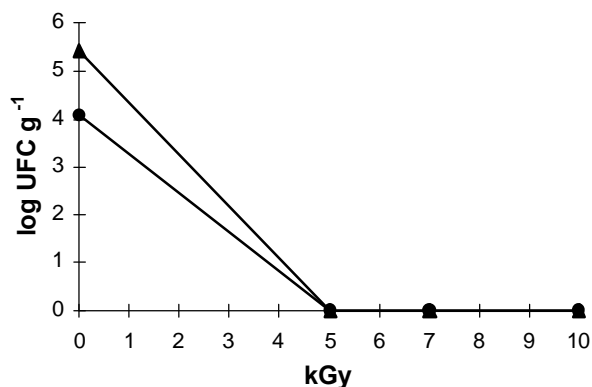


FIGURA 1. Logaritmo do Número de Unidades Formadoras de Colônias de Esporos *B. cereus* NCTC 11145 Inoculados em Pimenta-do-Reino Submetidos ao Tratamento de Irradiação com Doses de 5, 7 e 10 kGy (- -) e Redução da Contagem de Aeróbios Mesófilos em PCA (- -)

Quando se compara o resultado do presente estudo, com os da literatura consultada, podemos perceber que as doses utilizadas nesse trabalho são menores, no entanto resultou em maior eficiência. Por exemplo, na literatura consultada um trabalho revelou que doses de 10 kGy reduziram a população de microrganismos aeróbios mesófilos em pimenta preta de $3,2 \times 10^7$ UFC/g para 6×10

UFC/g, o equivalente a seis ciclos logarítmicos [17], enquanto outro trabalho registrou reduções de cinco ciclos logarítmicos na população de aeróbios mesófilos contaminante de pimenta preta, submetida a doses de 10 kGy de radiação [4]. Os mesmos autores observaram que doses de 7 kGy promoveram uma redução de, aproximadamente, três ciclos logarítmicos.

O tratamento das amostras de pimenta-do-reino inoculadas com esporos de *B. cereus* com radiação de até 4 kGy promoveu uma inativação de até 2,3 ciclos logarítmicos (Fig. 2).

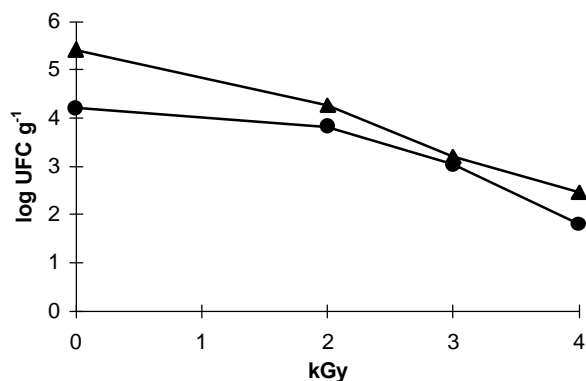


FIGURA 2- Logaritmo do Número de Unidades Formadoras de Colônias de Esporos de *B. cereus* NCTC 11145 Inoculados em Pimenta-do-Reino Submetidos ao Tratamento de Irradiação com Doses de 2, 3, e 4 kGy (- -) e Redução da Contagem de Aeróbios Mesófilos em PCA (- -)

A dose de redução decimal (D_{10}), que é a dose em kGy necessária para reduzir um ciclo logarítmico da população de um determinado microrganismo, foi de 1,78 kGy para os esporos de *B. cereus* NCTC 11145 inoculados na pimenta-do-reino. O resultado do presente estudo é comparável a dose de redução decimal (D_{10}) em outro estudo em chá de flores de camomila, que foi de 1,70 kGy para a população de aeróbios mesófilos e de 2,03 kGy para bactérias esporuladas [24].

IV. CONCLUSÕES

Das 37 amostras de pimenta-do-reino analisadas, 85% apresentaram contaminação com *B. cereus* com uma população entre $1,5 \times 10^2$ e $4,6 \times 10^4$ UFC/g e contagem de bactérias aeróbias mesófilas de $2,8 \times 10^5$ a $1,9 \times 10^8$ UFC/g.

Doses de radiação iguais ou maiores a 5kGy foram suficientes para reduzir, para níveis não detectáveis na menor diluição, 10^{-1} , a população de 10^6 UFC/g de aeróbios mesófilos e de 10^4 UFC/g de *B. cereus*.

A dose de redução decimal (D_{10}), foi de 1,78kGy para esporos de *B. cereus* inoculados em pimenta-do-reino.

A irradiação é um processo tecnológico eficiente para eliminar bactérias esporuladas de pimenta-do-reino.

V. REFERÊNCIAS

- [1] POWERS, E.M., LAWYER, R.; MASUOKA, Y. **Microbiology of processes spices**. Journal Milk Food Technology, v.38, p.683-687, 1975.
- [2] KARLSON, K.E.; GUNDERSON, M.F. **Microbiology of dehydrated soups, II. 'Adding Machine' approach**. Food Technology v.19, p.86-90, 1965
- [3] ICMSF. **Microbiological ecology of foods**. Vol.1. Academic Press, New York, NY, 1980.
- [4] NARVAIZ, P., LESCANO, G., KAIRIYAMA, E., KAUPERT, N. **Decontamination of spices by irradiation**. Journal Food Safety, v.10, p.49-61, 1989.
- [5] IFT-Institute of Food Technologists'. **Radiation preservation of foods**. Food Technology. v.37, n.2, p.55-60, 1983.
- [6] HAWTHORN, J. **The wholesomeness of irradiated foods**. International Atomic Energy Agency, p. 29-46, 1989.
- [7] FARKAS, J. **Decontamination, including parasite control, of dried, chilled and frozen foods by irradiation**. Acta Alimentaria, v.19-26, p.351-384, 1987.
- [8] GIESE, J. **Spices and seasoning Blends: A taste for all seasons**. Food Technology. p.88-98, April, 1994.
- [9] DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO- Portaria nº 9 de 08 de março de 1985, Seção I, 13/03/1985.
- [10] SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G. **Colony count methods**. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F., eds. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3d. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), p.75-96, 1992.
- [11] HARMON, S.M.; GOEPFERT, J.M.; BENNET, R.W. **Bacillus cereus**. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F., eds. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3d. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), p.593-604, 1992.
- [12] MARTIN, J.H.; BLACKWOOD, P.W. **Effects of sub-lethal heat-shock, B-alanine, and L-alanine on germination and subsequent destruction of Bacillus spores by pasteurization**. Journal of Dairy Science, v.55, n.5, p.577-580, 1972.
- [13] AZEREDO, R. M. C. **Estimativa de Riscos Relacionados à Contaminação de Preparações de Arroz por Bacillus cereus**. Campinas, 1998. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas.
- [14] CHRISTENSEN, C.M.; FANSE, H.A.; NELSON, G.H.; BATES, F.; MIROCHA, C.J. **Microflora of black and red pepper**. Applied Microbiology, v.15, n.3, p.622-626, 1967.
- [15] BAXTER, R.; HOLZAPFEL, W.H. **A microbial investigation of selected spices, herbs, and additives in South Africa**. Journal of Food Science, v.7, p.570-574, 1982.
- [16] SCHAWAB, A.H.; HARPESTAD, A.D.; SWARTZENTRUBER, A.; LANIER, J.M.; WENTZ, B.A. DURAN, A.P.; BARNARD, R.J.; READ, Jr, R.B. **Microbiological quality of some spices and herbs in retail markets**. Applied and Environmental Microbiology, v.44, n.3, p.627-630, 1982.
- [17] EISS, M.I. **Irradiation of spices and herbs**. Food Technology in Australia, v.36, n.8, p.362, 363, 366 e 370, 1984.
- [18] PAFUMI, J. **Assessment of the microbiological quality of spices and herbs**. Journal of Food Protection, v.49, n.12, p.958-963, 1986.
- [19] SHIGEMURA, R.; GERDES, D.L.; HALL, W.R. **Effect of gamma processing on prepackaged black and white pepper (Piper nigrum L.)**. Food Science and Technology, v.24, p.135-138, 1991.
- [20] FARKAS, J. **Irradiation treatment of spices**. Prehrambeno-technology Biotechnology. v.30, n.4, p.159-163, 1992.
- [21] SEENAPPA, M.; KEMPTON, A.G. **A note on the occurrence of Bacillus cereus and other species of Bacillus in Indian spices of export quality**. Journal of Applied Bacteriology, v.50, p.225-228, 1981.
- [22] KNEIFEL, W.; BERGER, E. **Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market**. Journal of Food Protection, v.57, n.10, p.893-901, 1994.
- [23] RODRÍGUEZ, M.; ÁLVARZ, M.; ZAYAS, M. **Calidad microbiológica de especiarías consumidas en Cuba**. Revista Latino-americana de Microbiología, v.33, p.149-151, 1991.
- [24] KATUSIN-RAZEM, B.; MATIC, S.; RAZEM, D.; MIHOKOVIC, V. **Radiation decontamination of tea**