**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise físico-química e microbiológica por método
molecular, de pratos prontos radapertizados
para suprimentação alimentar de imunodeprimidos**

Juliana Ferreira Alves Walder

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

**Piracicaba
2011**

Juliana Ferreira Alves Walder
Nutricionista

**Análise físico-química e microbiológica por método
molecular, de pratos prontos radapertizados
para suprimensão alimentar de imunodeprimidos**

Orientadora:
Prof.^ª Dra. **JOCELEM MASTRODI SALGADO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Walder, Juliana Ferreira Alves

Análise físico-química e microbiológica por método molecular, de pratos prontos
radapertizados para suprimetização alimentar de imunodeprimidos / Juliana Ferreira
Alves Walder. - - Piracicaba, 2011.

119 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Alimentos - Análise físico-química 2. Esterilização de alimentos 3. Irradiação de
alimentos 4. Microbiologia de Alimentos 5. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDD 664.0288
W163a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Julio Marcos, pelo carinho,
força e apoio para concluir este trabalho, e por
ser um grande exemplo em minha vida.

À minha mãe Marcia,
estrela e luz da minha vida.

Ao meu querido noivo Henrique, pelo
amor, carinho e paciência em todos esses anos.

Aos meus irmãos, Mauricio e Daniel,
meus melhores amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a toda espiritualidade amiga, que estão sempre me acompanhando.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Joicelem Mastrodi Salgado, pela total confiança, compreensão e por todas as valiosas dicas e sugestões.

Aos meus amados pais, por todas as oportunidades que proporcionaram para meu crescimento educacional.

Ao meu noivo, por estar sempre presente em minha vida, me dando apoio, e me fazer tão feliz.

Ao meu amado sobrinho Christopher Venâncio, alegria da minha vida.

À minha “avozinha” Cidoca, pelos cafezinhos da tarde.

Ao meu “cãopanheirinho” Fred, pela companhia - inclusive nas madrugadas a fora.

Às Prof^{as}. Dras. Marta Helena Fillet Spoto e Tsai Siu Mui, pela amizade e todo o valioso apoio.

À equipe da Prof^a. Dra. Carmen Contreras, pelo auxílio nas análises específicas da carne.

À equipe GEFH, da Prof^a. Dra. Marta Spoto, pelo auxílio nas análises físico-químicas.

À química Clarice Matraia, pela amizade e auxílio nas análises físico-químicas.

À Dra. Maria Lucila Hernandez Macedo, Dra. Danielle Caldas e Biólogo José Elias Gomes, pelo auxílio nas análises moleculares.

À bibliotecária Beatriz Helena Giongo, pela atenção e ensinamentos nas correções finais.

Aos amigos Telma e Edécio, pelo incentivo e apoio.

À Companhia Brasileira de Esterilização, pela irradiação e dosimetria dos pratos prontos.

A todos meus amigos queridos, que me acompanharam em mais esta jornada.

Enfim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	3
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão bibliográfica.....	21
2.1.1 Irradiação de alimentos.....	21
2.1.1.1 Histórico	21
2.1.1.2 Processo de Irradiação	22
2.1.1.3 Irradiação como ferramenta bactericida	24
2.1.1.4 Ação da irradiação nos nutrientes.....	26
2.1.1.5 Potencialidade da irradiação de alimentos no Brasil	28
2.1.1.6 Normas brasileiras sobre irradiação de alimentos	30
2.1.2 Pratos prontos para consumo	31
2.1.3 Técnicas moleculares usadas na detecção de microrganismos.....	34
2.1.3.1 Reação de Cadeia de Polimerase	34
2.1.3.2 PCR em Tempo Real (q-PCR)	37
2.1.3.3 T-RFLP	39
2.1.3.4 Biblioteca genômica	40
2.2 Material e Métodos	43
2.2.1 Alimentos dos pratos prontos	44
2.2.2 Processo de irradiação e armazenagem	45
2.2.3 Análises físico-químicas.....	46
2.2.3.1 Umidade	46
2.2.3.2 Determinação do pH.....	47
2.2.3.3 Acidez titulável (AT).....	47
2.2.3.4 Vitamina C (ácido ascórbico)	47
2.2.3.5 Compostos Fenólicos Totais.....	47
2.2.3.6 Carotenóides totais	47
2.2.3.7 Determinação da cor.....	47
2.2.3.8 Determinação da oxidação lipídica (TBARS)	48
2.2.3.9 Força de Cisalhamento (FC).....	48
2.2.4 Controle da carga microbiana.....	48
2.2.4.1 Coleta das amostras a serem analisadas	48
2.2.4.2 Extração de DNA.....	49
2.2.4.3 Análise dos DNAs extraídos, em gel de agarose.....	49
2.2.4.4 Biblioteca genômica	49
2.2.4.4.1 Reação de PCR, usando primers universais para Bactérias (16S) e Fungos filamentosos (18S).....	50
2.2.4.4.2 Amplificação dos genes 16S rRNA de bactéria	50
2.2.4.4.3 Clonagem dos fragmentos	50
2.2.4.4.4 Transformação bacteriana.....	51
2.2.4.4.5 Purificação	52

2.2.4.4.6 Sequenciamento	52
2.2.4.5 T-RFLP	52
2.2.4.5.1 PCR para análise de T-RFLP	52
2.2.4.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA de bactéria	53
2.2.4.5.3 Purificação do DNA	53
2.2.4.5.4 Digestão dos produtos da PCR com enzimas de restrição	53
2.2.4.5.5 Análise estatística dos dados de T-RFLP	54
2.2.4.6 PCR quantitativo em tempo real	54
2.2.4.6.1 Amplificação do gene ribossomal 16S rRNA	54
2.2.5 Delineamento Experimental	55
2.3 Resultados e Discussão	55
2.3.1 Variáveis físico-químicas	55
2.3.1.1 Arroz cozido	56
2.3.1.2 Cenoura refogada	60
2.3.1.3 Carne grelhada (bife de alcatra)	68
2.3.2 Análise microbiológica molecular	74
2.3.2.1 Clonagem e Identificação dos microrganismos por biblioteca do gene 16S rRNA	74
2.3.2.2 T-RFLP (Terminal Restrict Fragment Length Polimorfism)	86
2.3.2.3 Quantificação de PCR em Tempo Real (q-PCR)	90
2.3.3.3.2 Quantificação absoluta das amostras	92
3 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	97

RESUMO

Análises físico-química e microbiológica por método molecular, de pratos prontos radapertizados para suprimimentação alimentar de imunodeprimidos

A refeição de hospital é parte fundamental dos cuidados de pacientes. Uma dieta balanceada pode incentivar pacientes a comer de forma equilibrada dando-lhes os nutrientes que necessitam para se recuperarem em curto prazo de cirurgia ou doença. A irradiação gama é conhecida como o melhor método para destruir tanto os microrganismos patogênicos como os de deterioração, sem comprometer as propriedades nutricionais e a qualidade sensorial dos alimentos. Por conta disto, pode ser um método eficaz para elaboração de refeições apropriadas para pacientes imunodeprimidos. Neste trabalho, pratos prontos contendo arroz, carne grelhada e refogado de cenoura, foram submetidos a doses radapertizantes (30 kGy e 50 kGy) e armazenados a temperatura ambiente por até 90 dias. O tratamento controle permaneceu congelado pelo mesmo período. Os alimentos foram avaliados através de análises físico-química e microbiológicas por método molecular. O teor de umidade dos alimentos permaneceu inalterado por todo o período em todos os tratamentos. A irradiação provocou mudança de cor no arroz, favorecendo um tom amarelado e tornando-se ainda mais acentuado no decorrer do armazenamento. A cenoura teve a coloração característica vermelho-alaranjada reduzida com o tempo de armazenamento. No mesmo alimento, a irradiação reduziu o pH e o teor de carotenóides, ao passo que os compostos fenólicos decresceram durante o armazenamento. A carne grelhada conservou sua maciez, mas teve sua coloração alterada para uma tonalidade mais clara. Houve também uma pequena rancificação devido à radiação e também ao período de armazenamento. Por metodologia genômica, bactérias, com predominância dos gêneros *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Enterobacter*, foram detectadas nos alimentos controle e até nos irradiados com a dose de 30 kGy. A dose de radiação segura para esterilização foi a de 50 kGy.

Palavras chave: Pratos prontos; Irradiação de alimentos; Biblioteca genômica; PCR em tempo real; Imunodeprimidos

ABSTRACT

Physical-chemical and molecular microbiological analysis of radappertized ready-to-eat-food for immunocompromised patients

Hospital food is an essential part of patient care. A good meal can encourage patients to eat well, giving them the nutrients they need to recover from surgery or illness. Gamma irradiation is well known to be the best method for destroying pathogenic and spoilage microorganisms without compromising the nutritional properties and sensory quality of the foods; it is also a method used for preparing foods for immunocompromised patients. In this work, ready-to-eat food containing rice, grilled meat and steamed carrot, was radappertized with doses of 30 kGy and 50 kGy, and stored at room temperature for 90 days. The control treatment remained frozen for the same period. Analysis by physical-chemical molecular microbiological methods were used. The moisture of the foods remained unchanged through this period, in all treatments. Irradiation caused a yellowing of rice, which became more pronounced during the storage. The characteristic red-orange color of carrots was decreased during storage time. In the same food irradiation reduced the pH and content of carotenoids, while the phenolic compounds declined with the storage. Grilled meat retained its softness, but its color had/was changed to a lighter shade. There was also a small/some rancidity, due to radiation and also to the storage period. By genomic methodology, bacteria, predominantly of the genera *Bacillus*, *Acinetobacter* and *Enterobacter*, were detected in control and even in food irradiated with a dose of 30 kGy. The safe radiation dose for sterilization was 50 kGy.

Keywords: Shelf-stable food; Food irradiation; Genomic library; Real time PCR; Immunocompromised

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas da reação de PCR	37
Figura 2 -	Esquema representativo da técnica de T-RFLP	40
Figura 3 -	Esquema de clonagem em plasmídeos	42
Figura 4 -	Fluxograma do desenvolvimento do experimento	44
Figura 5 -	Conjunto de pratos prontos, ainda na empresa, antes do congelamento e irradiação	45
Figura 6 -	Pratos prontos irradiados e distribuídos ao acaso na estante da câmara de armazenamento	46
Figura 7 -	Aparência dos alimentos nos pratos prontos em função dos tratamentos e armazenamento	56
Figura 8 -	Classificação por Ordem, das bactérias encontradas na amostra de controle (1 dia), com as respectivas porcentagens	80
Figura 9 -	Classificação por Famílias, das bactérias encontradas na amostra de controle (1 dia), com as respectivas porcentagens	81
Figura 10 -	Classificação por Gênero, das bactérias encontradas na amostra controle (1 dia), com as respectivas porcentagens	82
Figura 11 -	Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , das amostras de controle cenoura de 30 dias, identificando ausência de contaminação por <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , e <i>S. Thyphimurium</i>	86
Figura 12 -	Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , da amostra de controle cenoura de 30 dias, identificando possível contaminação por <i>Bacillus cereus</i>	87
Figura 13 -	Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , das amostras de controle mix de 30 dias, identificando ausência de contaminação por <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , e <i>S. thyphimurium</i>	87
Figura 14 -	Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , da amostra de controle mix de 30 dias, identificando possível contaminação por <i>Bacillus cereus</i>	88
Figura 15 -	Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , das amostras de controle cenoura de 60 dias, identificando ausência de contaminação por <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , e <i>S. Thyphimurium</i>	88
Figura 16 -	Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , das amostras de controle cenoura de 60 dias, identificando possível contaminação por contaminação por <i>Bacillus cereus</i>	89
Figura 17 -	Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , das amostras de controle mix de 60 dias, identificando ausência de contaminação por <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , e <i>S. Thyphimurium</i>	89

Figura 18 - Eletroferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição <i>Hha I</i> , das amostras de controle mix de 60 dias, identificando possível contaminação por contaminação por <i>Bacillus cereus</i>	90
Figura 19 - Curva de <i>Melting</i> da reação para confirmação da amplificação específica do fragmento do gene 16S rRNA das amostras analisadas, e do clone de biblioteca genômica contendo o gene ribossomal utilizado na padronização ..	91
Figura 20 - Curva de amplificação padrão e quantificação do gene 16S rRNA das amostras.....	91
Figura 21 - Gráficos com a quantificação (abundância relativa) dos genes 16S rRNA das amostras de pratos prontos com 30, 60 e 90 dias, analisadas (indicados no eixo horizontal) por PCR em tempo real.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de F e significância das variáveis físico-químicas de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias	56
Tabela 2 -	Valores médios de umidade de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias	57
Tabela 3 -	Valores médios de L* de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias	57
Tabela 4 -	Valores médios do índice de coloração a* de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias	58
Tabela 5 -	Valores médios do índice de coloração b* de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias	58
Tabela 6 -	Valores de F e significância das variáveis físico-químicas de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	60
Tabela 7 -	Valores médios, em porcentagem, de umidade de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	60
Tabela 8 -	Valores médios de pH de cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	61
Tabela 9 -	Valores médios de Acidez Titulável (mL de ácido cítrico e málico/100mL solução) para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	62
Tabela 10 -	Valores médios de L* para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	62
Tabela 11 -	Valores médios do índice de coloração a* para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	63
Tabela 12 -	Valores médios do índice de coloração b* para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	63
Tabela 13 -	Valores de F e significância dos compostos funcionais da cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	64
Tabela 14 -	Médias e significâncias da variável compostos fenólicos de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	64
Tabela 15 -	Médias e significâncias da variável Vitamina C de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	66
Tabela 16 -	Valores médios ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) e significâncias da variável carotenóides de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	67
Tabela 17 -	Valores de F e significância das variáveis físico-químicas de carne grelhada (filé de alcatra) submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	68
Tabela 18 -	Valores médios em porcentagem e significâncias da variável umidade de carne submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	69
Tabela 19 -	Médias e significâncias da variável Força de cisalhamento (kgf) da carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	69
Tabela 20 -	Médias e significâncias da variável TBARS de carne grelhada (bife de alcatra) submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	71
Tabela 21 -	Médias e significâncias da variável L* de carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	72

Tabela 22 -	Médias e significâncias da variável a* de carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	73
Tabela 23 -	Médias e significâncias da variável b* de carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias	73
Tabela 24 -	Microrganismos identificados na análise de biblioteca genômica das amostras controle (0 kGy) de 1 dia de armazenamento	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Funções, doses e produtos das respectivas classes de irradiação de alimentos	24
Quadro 2 -	Sensibilidade de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis à irradiação ionizante	28
Quadro 3 -	Resumo das leis e decretos referentes à irradiação de alimentos no Brasil, no período de 1969 a 1989	30

1 INTRODUÇÃO

A história e a evolução da gastronomia hospitalar vem desde a antiguidade, associando a alimentação dietética com a saúde, e reconhecida como um importante recurso terapêutico. Com o surgimento e as modificações dos hospitais, os avanços clínicos apresentaram diversos aliados, como as ações da hotelaria para a promoção da qualidade de vida dos pacientes. Desta forma, o sabor passou a fazer parte das refeições, bem como os valores nutricionais dos alimentos. Todos os alimentos que são preparados possuem um processo especial e, por necessidade dietética, é indispensável que os cardápios sejam nutritivos, com boa aparência, bom sabor e de fácil preparo (BÁRBARA, 2008).

A preocupação com as doenças transmitidas por alimentos (DTAs), por parte dos governos, organizações internacionais e consumidores tem aumentado, principalmente com relação aos prejuízos que este problema tem causado à Saúde Pública (MORAES, 2000). Esta preocupação é ampliada quando os consumidores são pessoas ou pacientes imunodeprimidos. Eles são muito mais propensos a adquirirem doenças veiculadas por alimentos contaminados uma vez que suas defesas naturais estão abaixo daquele patamar considerado normal. Isto torna sua alimentação muito restrita uma vez que se deve evitar todo e qualquer produto que possa ser fonte de microrganismo (PIETRANERA et al., 2003).

Mas, apesar de toda a tecnologia empregada e da utilização das boas práticas de manuseio, os alimentos veiculam alguma forma de microrganismo, que pode ser altamente prejudicial aos pacientes imunodeprimidos (LEITE; WEISSMANN; VEGGI, 2007).

O uso de alimentos radapertizados (esterilizados por altas doses de radiação ionizante) na alimentação desses pacientes com deficiência no sistema imune, pode revolucionar o campo da medicina no que diz respeito à conservação da saúde, diminuição dos riscos de contaminação, melhora na eficiência dos tratamentos e redução do tempo e custos de internação. Podem ser usados nos casos de pacientes que, pelas consequências da própria doença ou pela ação de elementos químicos, como no caso da quimioterapia ou mesmo da radioterapia, têm o sistema imunológico e seus organismos de defesa prejudicados. São os casos de pacientes oncológicos, portadores do HIV (Human Immunodeficiency Virus) em estágio avançado da doença e pacientes internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). O emprego de radiações ionizantes pode contribuir muito para a otimização do tempo de vida útil desses alimentos e para a eliminação de microrganismos patogênicos (ROCHA; SOUSA, 2007).

Trata-se de radiação eletromagnética com ondas de alta frequência que tem poder de alta penetrabilidade, atravessando a matéria, o que permite a eliminação de microrganismos patogênicos, tais como alguns tipos de vírus, bactérias, fungos, leveduras e outros parasitas presentes nos alimentos. As técnicas de tratamento dos alimentos utilizadas atualmente nos hospitais, ou mesmo por fornecedores terceirizados, não são suficientes para a total eliminação desses microrganismos. Pela apertização, que é a esterilização a quente, a alimentação, além de perder grande parte de seu valor nutritivo, passa a ser insossa, sem sabor e aroma, fazendo com que haja uma redução do consumo por parte dos pacientes, aumentando os riscos de prolongar o tratamento ou até mesmo agravar seu estado de saúde (PRYKE; TAYLOR, 1995).

O processo de radapertização em alimentos devidamente preparados e embalados pode proporcionar uma dieta ou um prato-pronto esterilizado, mantendo suas mínimas qualidades nutritivas e organolépticas, com a vantagem de poder ser armazenada em condições ambiente por longos períodos. Desta forma, o uso de alimentos radapertizados pode contribuir muito para a otimização dos resultados clínicos durante o tratamento e recuperação dos pacientes imunossuprimidos.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma alimentação, na forma de prato-pronto esterilizado por radiação gama (radapertização), mantendo as qualidades mínimas nutricionais e organolépticas, apropriada para pessoas imunodeprimidas, que seja de fácil transporte, conservação e armazenamento. Nesta proposta, optou-se por utilizar doses efetivas quanto à eliminação de carga microbiana e potencialmente viáveis do ponto de vista econômico, para implementação a curto prazo permitindo assim a garantia requerida para a sua distribuição ao consumidor.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Irradiação de alimentos

2.1.1.1 Histórico

As primeiras pesquisas realizadas com o objetivo de eliminar microrganismos, utilizando radiações ionizantes, foram realizadas em 1896, um ano após a descoberta da radioatividade por Henri Becquerel. Em 1905 surgiu o primeiro pedido de patente na Inglaterra, mas seu uso só foi expandido após 1950 nos Estados Unidos da América com o lançamento do programa Átomos para a Paz (O'BRYAN et al., 2008).

O Exército dos Estados Unidos, com trabalhos de pesquisas iniciadas em 1953, imulsionou fortemente o uso da técnica de irradiação. Nesta mesma época, em países como Inglaterra, Bélgica, Canadá, França, Polônia e Alemanha, teve o início de programas no campo da irradiação de alimentos (DIEHL, 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1994).

Proctor e associados do MIT (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY), em 1943, relataram o primeiro trabalho de conservação de hambúrguer usando raios X (LEE et al., 1996).

Em 1957, na Alemanha, uma empresa de especiarias, na busca de melhoria de qualidade higiênica de seus produtos usou, pela primeira vez, com fins comerciais, a irradiação de alimentos, por meio de um gerador de elétrons Van der Graff. Dois anos depois a empresa teve que mudar o processo para fumigação com óxido de etileno devido a uma lei proibindo a irradiação de alimentos (DHIEL, 2002).

Pesquisas de esterilização de produtos cárneos por irradiação, visando aumentar por meses a sanidade do produto, e substituindo técnicas como apertização e congelamento de refeições militares, foram realizadas nos anos 60 (DIEHL, 1995).

Ainda em 1960, com objetivo de inibir brotamentos de batatas, autorizou-se o uso da técnica de irradiação no Canadá, por meio de ^{60}Co em planta com capacidade para processar até 15.000 ton/mês de alimentos; no entanto, a instalação do equipamento, por motivos econômicos, foi encerrada (DHIEL, 2002; MASEFELD; DIETZ, 1983).

Embora, já em 1965, após mais de 10 anos de pesquisas, o Comando Geral do Exército Americano tenha afirmado que “alimentos irradiados com doses superiores a 56 kGy utilizando

radiação gama ou elétrons acelerados, são seguros e nutricionalmente apropriados para o consumo humano”, o FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) e outras agências de saúde solicitaram maior rigor nos testes de segurança alimentar. Somente em 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS), se pronunciou favorável ao consumo de alimentos irradiados até a dose de 10 kGy, por serem seguros não trazendo nenhum risco a saúde humana (WHO, 1981).

Com este parecer da OMS, o processo de radapertização (> 10k Gy) teve que passar por novas pesquisas mais rígidas até que, em 1999, um novo relatório da OMS foi emitido, comprovando a inocuidade e segurança de alimentos irradiados até a dose de 70 kGy (WHO, 1999).

2.1.1.2 Processo de Irradiação

Métodos, como uso de transferência de calor (resfriamento, congelamento, esterilização, pasteurização), conservantes, alteração de características do ambiente do microorganismo, usados nos dias atuais para a preservação de alimentos, teve sua origem nos tempos antigos. Adicionou-se a estes métodos novos processos não térmicos, como a irradiação, que apresentam princípios que diminuem a perda de qualidade dos alimentos no processamento (SINGER, 2006).

Radiação é definida como a energia que, por um processo físico, é transportada pelo espaço ou matéria. Quando esta energia produz partículas eletricamente carregadas (íons), chama-se ionizante, e, quando comparada com a eletromagnética, possui menor comprimento de onda e maior frequência de energia. Nos alimentos a radiação ionizante usada são os raios gama, feixe de elétrons e raio-X (MYAGUSKU, 2001).

Estas radiações, sozinhas ou associadas a outros tratamentos, têm sido bastante utilizadas para promover o aumento do tempo de vida de prateleira dos alimentos (URBAIN, 1986; DIEHL, 1995).

Isótopos radioativos, como Cobalto-60 (^{60}Co) e Césio 137 (^{137}Cs) são usados como fonte dos raios gama. O ^{60}Co é usado na área médica, em radioterapia e na esterilização de produtos médicos, além de irradiação de alimentos. Sua manipulação é segura, uma vez que é produzido em forma de canetas de metal, e encapsulado duplamente em zircônio e aço inoxidável (RADOMYSKI et al., 1994).

Todos alimentos que tenham sido submetidos intencionalmente à ação de radiações ionizantes, a fim de preservá-lo ou para outros fins lícitos, de acordo com as normas que vierem a ser elaboradas pelo órgão competente do Ministério da Saúde, são alimentos irradiados (BRASIL, 1969).

A irradiação de alimentos é um tratamento que consiste em submeter os alimentos, já embalados ou a granel, a uma quantidade minuciosamente controlada de radiação ionizante, por um tempo prefixado e com objetivos bem determinados (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY -IAEA, 1992).

A unidade de doses absorvidas é Gray ou Gy, que é equivale a 1 Joule por kg de matéria. Existem subclasses de irradiação, classificadas de acordo com a faixa de dose aplicada, e aplicação com objetivos microbiológicos (Quadro 1). Doses baixas são denominadas radurização (0,4 a 1,0 kGy); doses médias (2 a 8kGy), radicidação, tem efeito de pasteurização, destruindo ou inibindo muitos dos microrganismos presentes nos alimentos, conferindo um prolongamento da vida útil dos mesmos; e doses elevadas, radapetização (25 a 45 kGy), que basicamente esterilizam os alimentos (URBAIN, 1986; DIEHL, 1995; EHLERMANN, 2009).

Em produtos pouco ácidos, e que podem sofrer deterioração de bactérias, e alimentos ácidos, deterioráveis por fungos, usa-se a radicidação, que aumenta a vida de prateleira de pães, cereais, frutas, vegetais, e sucos – associado a leve tratamento térmico. A radurização é útil na destruição de *Salmonella spp.* em carne de aves, alimentos para ração animal, e produtos à base de ovos congelados ou desidratados, levando a destruição de microrganismos causadores de toxinfecções alimentares, reduzindo assim o risco de saúde pública. Destruição e inativação de esporos resistentes ocorre na radapertização, sendo que esporos de *Clostridium botulinum* são os mais resistentes à radiação; este nível de tratamento é indicado para esterilização de pratos prontos pra consumo, dietas hospitalares, entre outros (HOBBS; ROBERTS, 1998; SPOLAORE; GERMANO; GERMANO, 2001).

Dose baixa (Radurização)		
Funções	Dose (kGy)	Produtos irradiados
Inibir germinação	0,05 a 0,15	Raízes e tubérculos, como batata, cebola, alho, gengibre.
Eliminar insetos e parasitas	0,15 a 0,50	Cereais e legumes, frutas secas e frescas, pescados e carnes frescas e secas, carne suína fresca.
Retardar processos fisiológicos (maturação)	0,50 a 1,00	Frutas e hortaliças frescas
Dose média (Radiciação)		
Funções	Dose (kGy)	Produtos irradiados
Aumentar tempo de vida de prateleira	1,0 a 3,0	Pescado fresco
Eliminar microrganismos patogênicos e de decomposição	1,0 a 7,0	Mariscos frescos e congelados, aves, carne crua, ou congelada.
Melhorar propriedades tecnológicas do produto	2,0 a 7,0	Uvas (maior produção de suco), verduras desidratadas (menor tempo de cocção).
Dose elevada (Radapertização)		
Funções	Dose (kGy)	Produtos irradiados
Esterilização industrial (associado à calor brando)	30,0 a 70,0	Carnes, aves, mariscos, alimentos preparados, dietas hospitalares esterilizadas.
Descontaminação de aditivos alimentares e ingredientes	10,0 a 50,0	Especiarias, preparações enzimáticas

Quadro 1 - Funções, doses e produtos das respectivas classes de irradiação de alimentos (Fonte: Adaptado de POLIZEL, 2006).

O objetivo da irradiação, aplicada a alimentos, é o aumento de sua segurança e vida útil. Este processo de conservação pode ser aplicado em vários tipos de alimentos. Além de aumentar o tempo de conservação, o tratamento pode ser utilizado para a destruição de insetos, bactérias patogênicas, fungos e leveduras (CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA - CENA, 2011).

2.1.1.3 Irradiação como ferramenta bactericida

A irradiação impede a divisão celular de bactérias e outros organismos, alterando sua estrutura molecular causando assim danos aleatórios e extensos ao impedir que os sistemas biológicos reparem quebras nas fitas simples e duplas do DNA, molécula bastante sensível à radiação, pelo fato de ser bem maior que as outras estruturas moleculares, presentes no interior das células. Além desses danos nas células, o microorganismo apresenta incapacidade de se

reproduzir, quando se atinge diretamente DNA. Os microorganismos podem ser afetados indiretamente também, pela ionização de moléculas adjacentes ao DNA (dentre as quais a água é a que mais age na letalidade dos microorganismos), gerando radicais livres que irão afetar o material genético (RAZSKAZOVSKIY et al., 2003; DIEHL, 1995; GRECZ et al., 1983).

Especificamente, a irradiação, ao provocar rupturas na cadeia de DNA ou interromper a síntese protéica dos microorganismos, pode alterar quimicamente as bases nitrogenadas. Reparos nos danos causados no DNA, através de enzimas, podem ser realizadas pela maioria das bactérias, que apresentam somente um cromossomo circular, mas a capacidade de multiplicação permanece inativo. Dentro do grupo das bactérias, as mais sensíveis à radiação ionizante são as Gram-negativas e os esporos são mais resistentes que as formas vegetativas das mesmas espécie (MYAGUSKU, 2001; MOSELEY, 1990).

De um modo geral, a sensibilidade à radiação é inversamente proporcional ao tamanho do organismo, sendo que nos microorganismos depende do seu valor D_{10} , que é a dose suficiente para diminuir em 1 log (90%) a população microbiana, ou seja, para a eliminação de um microorganismo existe uma dose específica. Quando comparadas a bactérias não esporuladas (não formam esporos), as leveduras e fungos apresentam a mesma susceptibilidade à radiação, considerando as doses letais para leveduras próximas da faixa de 5 a 20kGy, e para bolores 2,5 a 6 kGy. Com relação aos vírus, estes são mais resistentes que os esporos bacterianos (SMITH, 2004; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Assim sendo, para o controle de microbiano nos alimentos, deve-se considerar o valor D_{10} de cada microorganismo, além da quantidade presente no produto, bem como de outros fatores que exercem uma forte influência na resitência do microorganismo, como composição do meio, umidade, temperatura, e presença ou ausência de oxigênio, os quais devem ser considerados durante a irradiação de alimentos (RAZSKAZOVSKIY et al., 2003).

A irradiação, na presença de oxigênio, com a formação de peróxidos, os microorganismos tornam-se mais sensíveis; na presença de altas temperaturas, podendo ocorrer alterações organolépticas nos alimentos, com produção de odor e sabor desagradáveis, devido à oxidação lipídica (MONK et al., 1995).

2.1.1.4 Ação da irradiação nos nutrientes

O processo de irradiação causa algumas pequenas alterações químicas nos alimentos, sendo nenhuma delas consideradas nocivas ou perigosas. Essas alterações ocorrem também em outros processos comumente usados na conservação de alimentos, principalmente a oxidação de lipídeos com formação de radicais livres (INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP OF FOOD IRRADIATION - ICGFI, 1990; LIMA et al., 2001).

A mudanças observadas nos alimentos irradiados não diferem daquelas observadas em outras técnicas de processamento de alimentos, como o enlatamento, congelamento e desidratação, sendo que, para a OMS, essas mudanças são insignificantes (BRUHN, 1992).

O alimento pode ser afetado pela radiação ionizante por modo direto, quando a radiação atinge diretamente uma ligação química de um componente do alimento, ou indireta, que ocorre pela ionização de outras moléculas que formam radicais livres ao interagir com outros compostos do alimento, como a água, que é a molécula mais frequentemente afetada pela irradiação (SÁNCHEZ-BEL et al., 2008).

Radiólise, fenômeno da quebra das ligações químicas da água pela radiação, ocorre numa proporção direta à presença de água e oxigênio e, em função da dose, os produtos radiolíticos são produzidos e trocas químicas indesejáveis podem ocorrer no meio irradiado (CHIRINOS, 1999).

Os principais radicais livres formados são e^-_{aq} (elétron aquoso ou hidratado) e o próton hidratado (H_3O^+) OH^- (hidroxilas), e H^+ (hidrogênio), sendo estes dois últimos espécies reativas e instáveis, que combinam entre si em regiões com altas concentrações de radicais, ou se difundem e reagem com outras moléculas, continuando assim a reação de oxidação (LANDGRAF, 2002).

Produtos de oxidação, como carbonilas e peróxidos, podem ser formados com a irradiação de gorduras e lipídeos. A rancidez é desenvolvida a partir de irradiação e/ou armazenamento subsequente na presença de oxigênio, causando assim alteração organoléptica do produto, efeito que pode ser evitado eliminando-se o oxigênio presente, por meio de processo “a vácuo ou atmosfera modificada. A sensibilidade à irradiação é maior quando a grau de insaturação do substrato é maior. Alterações organolépticas, provocadas pela reações químicas do processo de irradiação de lipídeos, nem sempre são sensorialmente observadas (CHIRINOS, 1999; MEXIS; KONTOMINAS, 2009; KANATT et al., 1997; HASHIN et al., 1995).

Dependendo da sua natureza, bem como a dose aplicada, a radiação gama induz alterações nas propriedades físico-químicas das proteínas, por meio transformações químicas de

aminoácidos, tais como, quebra de ligações peptídicas, dissulfídicas, pontes de hidrogênio, bem como, ligações cruzadas das cadeias protéicas, e afetam a estrutura terciária; Compostos nitrogenados, como proteínas, podem ser sensíveis à irradiação, sendo os mais afetados os aminoácidos com anel aromático, e podem formar compostos como amônia (NH_3), hidrogênio (H^+), dióxido de carbono (CO_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), amidas e carbonilas (SOUZA, 2006; CIÉSLA; ROOS; GLUSZEWSKI, 2000; JAY, 2000).

A dose máxima indicada para carnes varia de acordo com o tipo (carne de aves ou vermelha), e também se o produto está refrigerado ou congelado. Para redução patogênica, a dose máxima permitida é de 4,5 kGy para carnes cruas refrigeradas, dose de 7,0 kGy é liberada para carnes cruas congeladas, e 3,0 kGy para carnes de aves frescas ou congeladas. Porém, os principais bloqueios para o uso de irradiação com o objetivo de aumentar o tempo de vida de prateleira, e reduzir cargas microbianas em carnes frescas, são os efeitos deletérios da irradiação, que podem ocorrer no odor, sabor e cor. Para carnes congeladas estes efeitos colaterais são bastante reduzidos (BREWER, 2009).

Na reação dos carboidratos, ao contrário do que ocorre com as proteínas, o radical mais importante é o OH, que retira hidrogênio das ligações C-H, formando água. Em reações subsequentes, pode formar um ácido, uma cetona ou um aldeído (DIEHL, 1995).

As vitaminas apresentam sensibilidade variada à radiação, sendo assim classificadas em sensíveis, como as vitaminas C, B₁ (tiamina), E (α -tocoferol), vitamina A (retinos); de média sensibilidade como β -caroteno e vitamina K (em carne), e de baixa sensibilidade, como a vitamina D, vitamina K (vegetais), B₂ (riboflavina), B₆ (piridoxina), B₁₂ (cobalamina), B₅ (niacina), ácido fólico, ácido pantotênico, B₁₀ (biotina) e colina (KILCAST, 1994).

Entre as vitaminas solúveis em água, a tiamina é a mais sensível à radiação, seguida de vitamina C, piridoxina (B₆), riboflavina (B₂) e niacina. Dentre as lipossolúveis, alfa-tocoferol é a mais facilmente destruída pela radiação, sendo que em alimentos com maior teor de gordura, as perdas são maiores. Depois do α -tocoferol a vitamina A é considerada como a mais sensível das lipossolúveis. A maioria dos alimentos fontes desse micronutriente na dieta humana, como leite e derivados, são produtos não totalmente utilizados na irradiação comercial (Quadro 2). (DIEHL, 1995; MOLINS, 2001; SOUZA, 2007).

Mais sensível		Menos sensível	
Vitaminas lipossolúveis			
vitamina E	→	vitamina A	→ vitamina K → vitamina D
Vitaminas hidrossolúveis			
vitamina B1	→	vitamina C	→ vitamina B6 → vitamina B2 → folato/niacina → vitamina B12

Quadro 2 - Sensibilidade de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis à radiação ionizante (Fonte: Adaptado de DIEHL; JOSEPHSON, 1994 apud MOLINS, 2001).

A perda da qualidade nutricional decorrente da irradiação está associada a diversos fatores, tais como: dose da radiação, tipo de alimento, embalagem e processamento, temperatura, e exposição à oxigênio durante o tempo de armazenamento e o processo da irradiação (CRAWFORD; RUFF, 1996).

Portanto, a aplicação da técnica da irradiação de alimentos, em estado congelado e meio isento de oxigênio, é considerada a solução ideal para diminuir as alterações nas propriedades organolépticas, bem como na formação de produtos radiolíticos (LAGUNAS-SOLAR, 1995).

2.1.1.5 Potencialidade da irradiação de alimentos no Brasil

Em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, as doenças transmissíveis por alimentos (DTAs) são consideradas um grave problema de saúde pública, afetando a saúde da população e, conseqüentemente, incapacidade laboral e aumento nos gastos com tratamentos e hospitalizações. O aumento da incidência dessas doenças está associada a fatores como preferência por produtos frescos, naturais, prontos e semi-prontos, devido a mudanças no estilo de vida. No entanto estes dados não podem ser considerados idôneos, pois as DTAs não são notificadas na maioria dos países, o que impede a avaliação do tamanho do problema, e o desenvolvimento de estratégias de controle (CAPUANO et al., 2008). A associação entre o consumo de alimentos contaminados e conservação em condições inadequadas, é que permitem a multiplicação de microrganismos no alimento, responsável pela maioria dos surtos alimentares (OLIVEIRA et al., 2010).

Para aumentar a vida útil dos produtos, auxiliando no processo de distribuição e comercialização e, conseqüentemente, diminuir o risco de DTAs, diversos países vem usando a tecnologia de irradiação de alimentos (RAJKOWSKI; NIEBUHR; DICKSON, 2006).

O número de países com regulamentação sobre o uso deste processo tem aumentado, desde a aprovação, em 1984, pelo Comitê (ICGFI) formado pela FAO/IAEA/OMS. Até 2002,

mais de 44 países faziam parte deste grupo, entre os quais está o Brasil. O ICGFI permitiu e aprovou mais de 60 alimentos a ser submetidos a irradiação, incluindo grãos, frutas, vegetais, carnes desossadas de aves, bovinos e peixes. Até aquela data, somente Brasil, Chile e Argentina apresentavam legislações amplas referentes a irradiação de alimentos, os quais diferem entre si de acordo com alimentos permitidos de serem irradiados e doses aplicadas (MATSUDA, 2002; SPOLAORE; GERMANO; GERMANO, 2001).

De 1997 para 1999, de acordo com dados da Food and Enviromental Protection Section da FAO/IAEA, em Viena, houve um aumento de alimentos irradiados no mundo, de 200.000t para 257.000t (DIEHL, 2002). Dados mais recentes indicam que em somente em 2005, a produção mundial de produtos alimentícios irradiados chegou a 405.000 toneladas. Estados Unidos, Canadá e Brasil, juntos, irradiaram produtos num total de 116.400 toneladas, dos quais 101.400 toneladas de especiarias, 7.000 toneladas de frutas, e 8.000 toneladas de carne. Somente no Brasil foram irradiadas 23.000 toneladas de alimentos, dos quais 20.000 toneladas foram de especiarias e 3.000 toneladas de frutas e grãos (KUME et al., 2009). Isto é muito pouco para um país que iniciou suas pesquisas nesta área em 1968, no Centro de Energia Nuclear da Agricultura, Piracicaba, SP, com o primeiro curso internacional sobre irradiação de alimentos, patrocinado pela FAO/ IAEA (LEÃO, 1997).

A comercialização de produtos irradiados no Brasil compreende basicamente temperos e condimentos que são ingredientes para alimentos industrializados, como embutidos e salgadinhos, embora, no campo da pesquisa, muitos estudos tem sido realizados com os mais variados tipos de alimentos (SILVA; ROZA , 2010).

Quanto a aceitação pelos consumidores, o brasileiro não é diferente dos demais e os alimentos irradiados são discriminados e evitados devido principalmente aos tabus existentes que trazem preocupações e dúvidas sobre uso de radiação no processamento de alimentos. Como em outros países, quando o consumidor é esclarecido sobre a segurança, a inocuidade e vantagens do consumo, o preconceito é desfeito (ORNELLAS et al., 2006; BEHRENS et al., 2009).

De todos os tipos de alimentos, as carnes tem sido as mais estudadas do ponto de vista da radapertização. No período de 1953 até 1981, a radapertização de carnes foi amplamente estudada pelas forças armadas americanas para desenvolver ração para soldados e astronautas (URBAIN, 1986). O uso dessa tecnologia desenvolvida pelo mundo científico sempre foi muito bem acompanhada de perto pelas organizações locais e internacionais de saúde e defesa do

consumidor (WHO, 1981). Economicamente, a tecnologia de irradiação é útil, no sentido de diminuir as grandes perdas de alimentos decorrentes de infestação por insetos e ácaros, deterioração por microrganismos, inibição de germinação raízes, bulbos e tubérculos, retardo da maturação precoce de frutas e principalmente na eliminação dos microrganismos patogênicos veiculados pelos alimentos (TAUXE, 2001).

2.1.1.6 Normas brasileiras sobre irradiação de alimentos

Os decretos e leis já publicados no Brasil são: Decreto - lei nº 986, de 21 de outubro de 1969; Decreto lei nº 72 718, de 29 de agosto de 1973; Portaria DINAL nº 09, de 8 de março de 1985, do Ministério da Saúde (MS); Portaria DINAL nº 30, de 25 de setembro de 1989, do MS; e finalmente a Resolução ANVISA - RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Um resumo das quatro primeiras legislações estão no Quadro 3.

LEIS E DECRETOS	RESUMO
Decreto - lei nº 986, de 21 de outubro de 1969	Primeira norma sobre irradiação de alimentos no Brasil, define produtos e irradiados e estabelece que estes deverão, nos rótulos, apresentar indicação em caracteres facilmente legíveis.
Decreto lei nº 72 718, de 29 de agosto de 1973	Primeira a estabelecer normas gerais sobre irradiação de alimentos, abordando o processamento, estocagem, transporte, importação e exportação, venda e consumo desta categoria de alimentos, os quais devem conter o símbolo da Radura no rótulo.
Portaria DINAL nº 09, de 8 de março de 1985, do Ministério da Saúde (MS)	Reconheceu e aprovou a irradiação de alimentos no Brasil, indicando o nível e dose média de energia de radiação para cada caso, bem como o tratamento prévio conjunto ou posterior; estabeleceu os tipos de alimentos que podem ser irradiados, bem como as doses médias de radiação. Foi revogada pela Resolução RDC 21, de 26 de janeiro de 2001.
Portaria DINAL nº 30, de 25 de setembro de 1989	Ampliou a autorização a outros tipos de alimentos (frutas e tomates) que não constavam da portaria anterior. Foi revogada pela Resolução RDC 21, de 26 de janeiro de 2001.

Quadro 3 - Resumo das leis e decretos referentes a irradiação de alimentos no Brasil, no período de 1969 a 1989 (Fonte: WALDER, 2003)

Atualmente, as recomendações internacionais propostas pela Food and Agriculture Organization (FAO), Internatinal Atomic Energy Agency (IAEA) e Codex Alimentarium, da ONU (Organização das Nações Unidas), servem de base para a legislação referente à irradiação de alimentos, sendo que todas as normas para o uso desta tecnologia estão descritas na vigente Resolução RDC nº 21, de 26 janeiro de 2001 (ORNELLAS et al., 2006). Este regulamento, emitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que tem por objetivo estabelecer os requisitos gerais para o uso da irradiação de alimentos com vistas à qualidade

sanitária do produto final, com o apoio da comunidade científica, e baseando-se no parecer da OMS, não impõem limites numéricos às dosagens para irradiação de alimentos, mas estabelecem rigores qualitativos ao produto irradiado. Prevê que a dose mínima adsorvida deve ser suficiente para o propósito pretendido de desinfestação, redução microbiana ou esterilização, e que a máxima não cause perdas nutricionais e funcionais, ou alterações organolépticas no alimento. Além disso, de acordo com esta resolução, no painel do rótulo dos alimentos irradiados deve constar a frase: “Alimento tratado por processo de irradiação”, letras com tamanho não inferior a um terço do da letra de maior tamanho; quando for irradiado somente um ingrediente de um determinado produto, este devem ser identificados, após seu nome, na lista de ingredientes, entre parênteses; fixação de placas ou cartaz com identificação “Produto tratado por irradiação” e/ou com símbolo de irradiação, denominado radura, devem ser usados no caso de produtos comercializados a granel (BRASIL, 2001).

2.1.2 Pratos prontos para consumo

A procura por alimentos prontos para o consumo (ready-to-eat food - REF) tem aumentado bastante desde o seu surgimento nos Estados Unidos da América. Mesmo no Brasil, onde o mercado deste produto é fraco, pode-se perceber que houve um grande aumento na oferta desses produtos, usados principalmente por cozinhas industriais e outros grandes centros consumidores. A conscientização dos consumidores que valorizam produtos promotores de comodidade e praticidade, com sabor natural e nutritivo, também tem crescido, e é o fator desencadeante dessa tendência mundial (HERNANDES et al., 2007).

Os alimentos prontos para o consumo à base de carne são bastante susceptíveis à contaminação por patógenos, principalmente a bactéria *Listeria monocytogenes*, durante seu manuseio, após sua cocção e durante o empacotamento. Este patógeno está associado à alta taxa de mortalidade em populações de risco (ZHU et al., 2004; SOMMERS; BOYD, 2006). Com isso, há a necessidade de uma rápida intervenção a fim de se eliminar os microrganismos patogênicos nesses produtos, e, neste caso, o método viável e efetivo é a irradiação (THAYER et al., 1995; SOMMERS; BOYD, 2006).

Sabe-se que a dose de radiação necessária para esterilizar alimentos deve ser suficiente para matar 12 ciclos logarítmicos de *Clostridium botulinum*, o mais tóxico e radiorresistente

microrganismo anaeróbico que pode estar presente em alimentos embalados a vácuo como devem ser os produtos de pronto consumo (WHO, 1999).

Os produtos de pronto consumo, contendo carnes, antes da irradiação, devem ser tratados termicamente (mínimo de 75 °C) para assegurar a inativação de enzimas autolíticas, uma vez que a radiação não possui esta propriedade (URBAIN, 1986). Entretanto, existem poucas pesquisas abordando o uso da irradiação ionizante na redução de níveis de patógenos em produtos de alimentos prontos para consumo, como sanduíches e refeições (SOMMERS; BOYD, 2006) e sorvetes para imunodeprimidos (PIETRANERA et al., 2003).

A radapertização desses alimentos minimiza ou até elimina a necessidade de conservantes químicos e o produto irradiado normalmente apresenta maior valor nutricional do que aquele esterilizado por calor, porque destrói menos vitaminas e aminoácidos essenciais (WIERBICKY, 1980; WHO, 1999).

A África do Sul é um dos países que mais produz alimentos radapertizados para pronto consumo de soldados, alpinistas, iatistas, canoístas, geólogos e praticantes de safári, uma vez que não necessitam de congelamento para sua conservação. Os pratos mais produzidos são: rosbife com purê, filé com tomate, bacon, estrogonofe de carne, carne e frango temperados com *curry* e frango com cogumelo. Os produtos são cozidos, resfriados, embalados a vácuo e irradiados com uma dose mínima de 45 kGy a uma temperatura negativa de 20 a 40 °C. Os produtos são de alta qualidade, de bom sabor e de textura agradável (BRUYN, 2000).

O primeiro trabalho de radapertização para alimentos no Brasil, foi realizado por Spoto et al. (1999), utilizando filés de frango grelhados, embalados à vácuo e irradiados com 50 kGy. Após 180 dias sob condições ambiente, o produto apresentou condições microbiológicas seguras e propriedades físico-químicas e sensoriais excelentes.

Os alimentos radapertizados, estáveis no ambiente (shelf-stable) são de alta qualidade e tem sido utilizados com sucesso por astronautas, militares, atletas e por um grupo específico de pessoas imunodeprimidas ou por pacientes sob cuidados médicos (IAEA, 1995; PRYKE; TAYLOR, 1995; PLACEK et al., 2004).

Pacientes imunodeprimidos devem ter mais cuidados com relação a sua alimentação, uma vez que os alimentos podem estar contaminados e, portanto, veicular doenças.

Apesar do consumo de alimentos contaminados por *Listeria* ser de risco baixo na população de um modo geral, mesmo que esta seja a via mais preocupante, em pacientes

imunodeprimidos devem ser cautelosos, pois apresentam maior risco (GUENTHER et al., 2009; MOOK; O'BRIEN; GILLESPIE, 2011; SLUTKER; SCHUCHAT, 1999).

Produtos cozidos ou com ingredientes cozidos, ricos em amido ou proteínas são os alimentos mais frequentemente associados a surtos por *Bacillus cereus*. Vegetais (crus e cozidos), carnes, pescados, produtos à base de arroz, são alguns alimentos que podem ser contaminados pelo patógeno (SÃO PAULO, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2002; SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

A *Escherichia coli*, causa desde infecções intestinais, até infecções urinárias, septicemias, meningites e outros tipos de infecções, por isso um maior interesse na área médica. Os principais alimentos envolvidos na contaminação por *E. coli* é a carne bovina (hambúrguer e rosbife), sendo que ela pode ocorrer no processamento inadequado de carne, ou mesmo durante o abate, momento em que as bactérias intestinais contaminam a carcaça (XANDE, 2007; CHAPAVAL et al., 2010).

Salmonelose humana de origem alimentar apresenta como veículos mais importantes alimentos de origem animal. Entre 1985 e 1996, ao isolarem cepas de *Salmonella* no Estado de São Paulo, pesquisadores identificaram que 34% eram originários de carnes vermelhas. *Salmonella* spp., dentre outros microrganismos, mesmo com baixos níveis de contaminação, indicam elevado risco, devendo, portanto estar ausente em alimentos (SANTOS et al., 2003; AMADOR, 2010; PEREIRA et al., 2010).

De acordo com a ANVISA, na resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que estabelece Parâmetros Microbiológicos para alimentos, em dietas para pacientes, exceto aqueles que exigem a necessidade de adicionar-se líquidos aquecidos para o consumo, como tolerância de amostra indicativa, deverão apresentar ausência de coliformes a 45 °C (BRASIL, 2001).

Para a garantia de segurança microbiológica dos alimentos, diversas ferramentas estão disponíveis, as quais podem ser tradicionais, que são baseadas na análise dos aspectos morfológicos e bioquímicos dos microrganismos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies, e subespécies, ou moleculares, ferramentas bastante valorizadas nos dias atuais (CASTELANI; DUARTE, 2011).

2.1.3 Técnicas moleculares usadas na detecção de microrganismos

Técnicas tradicionais de detecção de microrganismos, métodos específicos para patogênicos com características de crescimento conhecidas, são normalmente usadas nas rotinas, mas nem sempre na identificação de patogênicos, devido a grande quantidade de falhas e problemas, como: incapacidade de identificar alguns microrganismos, fraca diferenciação entre microrganismos com características comportamentais parecidas, na aparência visual não específica, demora na detecção de microrganismos de crescimento lento, entre outros (MIGUEL, 2007).

Também podem apresentar desvantagens os resultados dos testes bioquímicos usados na metodologias tradicionais, quando usa-se pouca quantidade de testes, tais como: baixa capacidade de diferenciação pouco variáveis geneticamente, riscos de interpretações errôneas e altos custos para desenvolver as análises (FORNAZARI, 2010).

Para fungos, os métodos tradicionais, que se baseiam em exames microscópicos e análises bioquímicas (quitina, ergosterol e metabólitos secundários), além de despendiar tempo e exigir quadro técnico qualificado, apresentam baixa especificidade e reprodutibilidade (MEIRELLES et al., 2006). Com isso, a urgência de controle epidemiológico tem levado ao desenvolvimento de novas metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos e muitas pesquisas na área de microbiologia molecular têm sido realizadas nas últimas décadas (PEREIRA, 2006).

Apesar do crescimento do uso das técnicas moleculares na área da microbiologia de alimentos, e do aumento da procura do pesquisadores por respostas mais rápidas e satisfatórias, como a Polimerase em Reação de Cadeia (PCR), raras são as publicações em português que abordem estes métodos (GANDRA et al., 2008).

2.1.3.1 Reação de Cadeia de Polimerase

Descoberto em meados da década de 80 por Kary Mullis, a Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) causou uma revolução na área de pesquisa e aplicações da Biologia, sendo esta técnica bastante aplicada na detecção de bactérias patogênicas (CASTELANI; DUARTE, 2011).

Medicina forense, imunologia, oncologia, transplantes de órgãos, microbiologia, genética, arqueologia, patologia clínica, entre outras são algumas das áreas que fazem uso da técnica de PCR (DESTRO, 1995; REECE, 2004).

Com o desenvolvimento da técnica de PCR, houve um grande impulso para os métodos moleculares. O método de amplificação de DNA, que se baseia no aumento do número de cópias do segmento alvo, é um procedimento rápido, eficaz, e sensível na detecção e identificação de microorganismos. Além da sensibilidade, apresenta também alto grau de seletividade, fator que influi no fato de ser uma técnica bastante usada nos laboratórios, podendo-se aplicar este método em vários tipos de amostras, como alimentos, bastando apenas adequar a técnica para o material (REIS-JUNIOR. et al., 2002; PEREIRA, 2006; BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008).

A possibilidade de usar bactérias não cultiváveis em meios de culturas usados frequentemente, automação, maior seletividade e especificidade, maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, e bom limite de detecção são algumas das vantagens deste método em relação aos tradicionais. Porém, existem algumas desvantagens, como sua complexidade, o que dificulta nas análises rotineiras, sendo que recentemente surgiram kits básicos para realizar reações de PCR, o que facilitou o seu uso e difusão. Concentração de íons de magnésio, temperatura dos ciclos, período de cada etapa de um ciclo, número de ciclos, concentração de dNTPs (dideoxynucleotide triphosphates) adicionado à reação, e a concentração da polimerase, além de contaminantes presentes nas amostras e presenças de enzimas termoestáveis sintetizadas por microrganismos, podem afetar a eficiência da PCR (GANDRA et al, 2008).

A PCR consiste na obtenção de várias cópias de uma área específica do DNA, por meio da ação de uma enzima Taq DNA polimerase termoestável, e de 2 primers, oligonucleotídeos com comprimento, normalmente, de 17 a 30 nucleotídeos, e com sequência de bases complementar ao DNA, em termocicladores, equipamento automatizado e computadorizado, onde se tem a capacidade de alternar as temperaturas por certos períodos (KONEMAM et al., 2001 apud FORNAZARI, 2010; REECE, 2004; BARROS, OLIVEIRA; MARIN, 2008).

Na verdade, a partir dos primers, ocorre a extensão do fragmento de DNA, sendo que antes, ocorre a desnaturação do DNA, e anelamento do primer, sendo que este ciclo ocorre várias vezes, amplificando exponencialmente a sequência específica (REIS-JUNIOR et al., 2002).

A reação de PCR é dividida em 3 etapas, as quais compreendem os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira etapa, a desnaturação, ocorrem dois processos: a ativação da enzima DNA polimerase e a desnaturação que, por aquecimento, frequentemente a uma temperatura de 94°C, os componentes da fita dupla de DNA são separados. Diferentes temperaturas podem ser usadas, de modo que se adeque a composição da sequência alvo na fita

dupla, Guanina (G) ou Citosina (C), que requerem temperaturas mais altas. A fase seguinte (anelamento), cujo objetivo é replicar a sequência alvo específica para o microrganismo a ser estudado. Inicia-se com o emparelhamento dos primers, pela ligação de moléculas de hidrogênio ao DNA alvo sendo que, para que isso ocorra, a temperatura do produto da PCR deve estar mais baixo, quando os primers reconhecem e se ligam cada um numa ponta 3' da fita dupla alvo, sendo que a temperatura varia de acordo com o comprimento e a sequência do primer, além nível de especificidade necessária para a reação de PCR, bem como da % G-C mas, normalmente, a faixa de temperatura usada varia entre 45 a 60°C. Na última etapa, a extensão, ocorre a ligação da DNA polimerase (Taq – da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*) à 3' final de cada oligonucleotídeo, em direções opostas na presença dos 4 trifosfatos de oxirribonucleicos (ATP, GTP, CTP, e TTP) e, a partir de dNTPs, sintetiza uma nova fita de DNA na direção 5' a 3' (Figura 1). Esta etapa ocorre a 94°C, não comprometendo o primer usado no anelamento e, o tempo da extensão varia de acordo com a DNA polimerase, temperatura em que ocorre a reação, do comprimento e da concentração da sequência alvo. Para finalizar todas as reações e assegurar que todas as cadeias de DNA foram extendidas, uma extensão dos oligonucleotídeos é realizada no final, normalmente a 72 °C, num período entre 5 a 15 minutos (depende do comprimento do DNA molde), originando em duas cadeias duplas provavelmente idênticas à original (REECE, 2004; MIGUEL, 2007).

Figura 1 - Etapas da reação de PCR (Fonte: REECE, 2004)

Pelo fato da técnica de PCR ser limitada na característica qualitativa, sendo portanto usada somente em estudos quantitativos, desenvolveu-se a PCR em tempo real (Real Time PCR), que se baseia no monitoramento do acúmulo de produtos da PCR em uma reação, por meio de processos automatizados, em tempo real, com auxílio de sondas químicas fluorescentes (GLYNN et al., 2006 apud GANDRA et al., 2008).

2.1.3.2 PCR em Tempo Real (q-PCR)

Técnicas que se baseiam na PCR, como PCR em Tempo Real, vêm sendo bastante aplicados na detecção de patógenos de origem alimentar. Este método, baseado associa, numa reação em tubo fechado, as fases de amplificação e detecção. Diferencia-se da PCR pela possibilidade de detecção, no decorrer da reação, do aumento do número de cópias do DNA alvo, e isso se deve graças à compostos fluorescentes presentes no meio da reação, além da amplificação do DNA ser diretamente proporcional à intensidade da resposta. Ao contrário da PCR convencional (semiquantitativo), os ciclos de anelamento extensão da PCR em Tempo Real ocorrem simultaneamente, pois o produto obtido devem ter, no máximo, 100 pb (FRÖDER, 2008; NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

Entre as vantagens dessa técnica, pode-se citar: possibilidade de execução de estudos quantitativos e qualitativos, menor risco de contaminação (realizado em sistema tubular fechado),

visualização das amplificação sem uso de eletroforese, precisão, exatidão, alto rendimento e execução relativamente fácil. Porém, existem algumas desvantagens, como custo elevado, e necessidade de treinamento especializado (REECE, 2004; GANDRA et al., 2008; BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008).

Os dois sistemas mais usados na reação de q-PCR são SYBR Green e Taqman, sendo este último usa a atividade exonuclease 5'-3' da enzima Taq DNA polimerase (ALMEIDA; SADDI, 2007).

Na reação da PCR ocorre o acúmulo de amplicons que, por meio da q-PCR, é detectado em tempo real, ciclo a ciclo sendo que, à medida que se aumenta a quantidade do produto de amplificação, detecta-se um sinal fluorescente emitido por fluoróforos associados a sondas (Taqman[®]), ou intercalados na fita dupla de DNA amplificado (SYBR[®] Green); as sondas são sequências de DNA que, ligados a região central da sequência alvo, aumentam a seletividade do método. Para que a reação de PCR-RT ocorra, usa-se uma plataforma de instrumentação com um termociclador ligado a um sistema ótico, para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação (CASTELLANI; DUARTE, 2011; BARRO; OLIVEIRA; MARIN, 2008).

Ao se adicionar o corante SYBR[®] Green à amostra, ele se liga a todas as fitas duplas de DNA. AmpliTaq Gold[®] DNA Polimerase, no decorrer de toda a reação da PCR, amplifica a sequência alvo, que cria produtos da PCR (amplicons); o corante, então, se liga a cada nova cópia da fita dupla aumentando, assim, a intensidade da fluorescência, que é proporcional à quantidade de produto da PCR (Applied Biosystems, 2011).

O SYBR[®] Green apresenta algumas vantagens, como baixo custo, uso fácil e sensibilidade. A fluorescência é afetada por alguns fatores: é aumentada durante a reação de PCR, devido ao aumento exponencial de DNA alvo; porém, ela é bastante diminuída com a desnaturação da fita dupla. Na amplificação inespecífica ou de dímeros primers, estes também são detectados, afetando a quantificação final dos produtos específicos da PCR, que são analisados por curvas de fusão, onde será visualizado vários picos (ALMEIDA; SADDI, 2007, NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

Outra técnica molecular usada como alternativa para identificar e quantificar diversidade microbiana em alimentos, entre outras, é análise de Polimorfismo no Tamanho de Fragmento de

Restrição Terminal (do inglês Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP) (HERNÁNDEZ – MACEDO; BARANCELLI; CONTRERAS – CASTILLO, 2011).

2.1.3.3 T-RFLP

T-RFLP foi desenvolvida Shangkuan et al. (2000), onde concluíram que tem potencial para ser para método rápido para tipagem e diferenciação de bactérias do mesmo gênero, além ser simples de executar (GANDRA et al., 2008).

Esta reação inicia-se com a extração de DNA e, por PCR, a amplificação, do gene 16S rRNA forward, com primers específicos, marcados com fluoróforos (HEX, FAM ou ROX), detectando-os, assim como seu tamanho, através de sequenciador automático ABI, no fragmento 5' terminal da digestão de restrição. Purifica-se o produto após a amplificação e digere-se, individualmente, 2-4 enzimas de restrição, sendo a *HaeI* umas das enzimas que promovem resolução máxima. Carrega-se, então, produtos da digestão num sequenciador, onde converte-se o fragmento de restrição terminal (T-RFs), marcado por fluorescência, num eletroferograma, no qual um T-RF é representado por cada pico; os dados são processados pela conversão dos eletroferogramas em matriz, onde cada coluna é uma amostra e as linhas são uma T-RF encontrada na amostra (Figura 2) (MENDES, 2009).

Os produtos da PCR digeridos produzem diferentes fragmentos de restrição, também conhecidos como unidades taxonômicas operacionais (OTU), ou seja, OTU representa os microrganismos relacionados filogeneticamente. Pode-se analisar quantitativamente, por meio da análise de dados de altura ou área do pico, os perfis gerados pelo sistema automatizado de eletroforese, e qualitativamente através de gel de agarose, visualizando os polimorfismos (CAFFARO-FILHO; FANTINATTI-GARBOGGINI; DURRANT, 2007; GANDRA et al, 2008).

Peak Scanner (Applied Biosystems) é uma das opções de software que calculam a intensidade de fluorescência, pela altura ou área do fragmento, assim como o tamanho do fragmento terminal permitindo-se, assim, importar dados não processados; pelas bases de dados ribossomais completa pode-se calcular o comprimento do fragmento de restrição (MENDES, 2009).

Figura 2 - Esquema representativo da técnica de T-RFLP (adaptado de GRÜN et al., 2002 apud MENDES, 2009)

Pode-se citar como vantagens desta técnica: reprodutibilidade alta e, com relação à sequência de DNA, não há a necessidade de informações prévias. Pode-se restringi-la a uma variedade de pesos moleculares de acordo com regiões de maior resolução no gel, mesmo sendo elevado o número de fragmentos, o que dificulta a análise. Uma desvantagem é a possibilidade de analisar apenas uma fração do genoma (CASTELLANI; DUARET, 2011).

Análises como esta é uma grande fonte de recurso para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos e, combinados com técnicas mais rápidas, como a construção de bibliotecas genômicas, disponibilizam informações consistentes da composição das comunidades microbianas ambientais (MENDES, 2009).

2.1.3.4 Biblioteca genômica

Através de um processo de clonagem, que representa todo o genoma de um organismo ou célula, obtêm-se uma coleção de fragmentos de DNA, constituindo assim a biblioteca genômica; dentro das variadas formas de biblioteca genômica, a mais comum é formada pela clivagem de todo o genoma, em várias partes, que serão clonadas pela inserção num vetor (plasmídeo), que se dá pela transformação bacteriana (COSTA; COSTA, 2009).

A transformação bacteriana, processo onde se insere um novo DNA exógeno (plasmídeo) num hospedeiro (bactéria), se dá por dois métodos: choque térmico, no qual as bactérias, a 42°C, são colocadas em contato com gelo; e eletroporação, que se dá por meio de campo elétrico (CAMPBELL; FARREL, 2007).

O tipo mais simples de transferência de genes, que leva a uma recombinação, é a transformação. O DNA, em laboratórios, é extraído, por técnicas químicas, de bactérias em suspensão, sendo então adicionadas a uma cultura de células receptoras, as quais são aptas a absorver fragmentos pequenos de DNA doador, sendo estes incorporados, por recombinação, aos cromossomos da receptora (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Para garantir o crescimento somente das bactérias com o plasmídeo inserido, um marcador selecionável (geralmente genes que promovem resistência a antibióticos, como por exemplo, a ampicilina), deve estar presente no plasmídeo escolhido para clonagem. As bactérias são, então, por plaqueamento, colocadas em um meio com antibiótico, ao qual o plasmídeo apresenta resistência, onde somente as células resistentes sobreviverão (CAMPBELL; FARREL, 2007; COSTA; COSTA, 2009).

A transformação ocorre somente em certas espécies de bactérias, as quais devem estar em estado de crescimento logarítmica tardia, estando assim receptivo para aderir o DNA doador, sendo por isso chamados de competentes. Uma proteína especial, que liga os fragmentos de DNA doador em sítios específicos presentes na superfície celular, são produzidas por essas células (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

O produto da reação da ligação de plasmídeos de DNA endonuclease de restrição com fragmentos de cDNA é usado na transformação da bactéria *E. coli* (fator F). Colônias resistentes são selecionadas, sendo que cada colônia de bactéria apresentará uma única cDNA, pois cada plasmídeo rende uma colônia antibiótica-resistente; pode-se, então, extrair o DNA dos plasmídeos, os quais apresentam, agora, grande capacidade de crescimento, e são representados por pequenas moléculas circulares que contém a origem da replicação (*ori*). Liga-se o vetor ao DNA inserido, e os plasmídeos recombinados são usados na transformação bacteriana (*E.coli*), que é plaqueada em meio contendo antibiótico (ampicilina), para que somente as bactérias resistentes à ampicilina formem colônias, as quais podem ser isoladas e multiplicadas, para isolamento de plasmídeos recombinados (Figura 3). Essas colônias resistentes ao antibiótico compreendem as bibliotecas genômicas. Finalmente, sequencia-se os fragmentos clonados,

obtidos por PCR, cuja comparação com base de dados fornece informação sobre a diversidade filogenética dos organismos encontrados no material pesquisado (COOPER; HAUSMAN, 2003; CAMPBELL; FARREL, 2007; MENDES, 2007).

Figura 3 - Esquema de clonagem em plasmídeos (Adaptado de: COOPER; HAUSMAN, 2003).

O gene 16 S RNA, a região alvo mais usada em estudos de filogenia, é um fragmento de mais ou menos 1500 nucleotídeos, encontrados em todos seres vivos, e fornece diversas informações úteis para análises filogenéticas; uma das vantagens é que este gene fornece uma diversidade de sequências em bancos de dados públicos, gratuitamente acessíveis, como o Ribossomal Data Base Project (RDP), entre outros, que possibilitam a comparação de novas sequências obtidas com as depositadas nestes bancos. O RDP possibilita, dentre outros métodos de análise de bibliotecas genômicas, a determinação com sequência mais próxima em relação à similaridade, o cálculo de índices de diversidade, estimar a riqueza de espécies (AMANN; LUDWING, 2000; COUTINHO et al., 1999, BENSON et al., 2005; COLE et al., 2007; CURY, 2006).

O banco central dos dados sobre informações genômicas é o NCBI (National Center of Biotechnology Information), dos Estados Unidos, sendo que os bancos de dados localizados em

outros países trocam informações com o NCBI num período de 24 horas. O principal banco de dados do NCBI é o GenBank, onde são armazenadas, publicamente, todas as sequências disponíveis de DNA (desde sequências pequenas, até genomas inteiros), RNA e proteínas. Existem outros bancos do NCBI, que apresentam as informações organizadas de modo diferente. O acesso e análise dos dados no GenBank se dá por diversas ferramentas desenvolvidas pela bioinformática, como o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), por meio do qual é possível comparar uma sequência genômica qualquer de DNA ou proteína (Query), com todas as outras de domínio pública, identificando no banco de dados com similaridade mais próxima da estudada, descartando os resultados não produtivos; o BLAST determina a dificuldade de se detectar uma sequência perfeitamente idêntica, que é representada pelo valor “E” e, quanto menor for este, menor a chance de tal comparação ter sido identificada por coincidência (SANTOS; ORTEGA, 2003).

2.2 Material e Métodos

Os pratos prontos foram gentilmente cedidos por uma empresa produtora de refeições prontas para consumo, localizada em São Paulo, SP. A irradiação foi realizada pela CBE-Embrarad em Jarinú, SP, e o armazenamento dos mesmos deu-se no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia (LIARE) do CENA/USP. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP e as análises físico-química nos Laboratórios de Frutas e Hortaliças e de Qualidade e de Processamento de Carnes do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP, conforme fluxograma da Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma do desenvolvimento do experimento

2.2.1 Alimentos dos pratos prontos

A refeição contida nas amostras (Figura 5), pesando aproximadamente 240 a 270 g, foi previamente estabelecida de comum acordo com a empresa e constou de:

Carne (bife de alcatra) - foi pré preparado na véspera, temperado com sal e alho; foi grelhado em chapa à gás untada com óleo de milho, sendo mergulhada em molho da própria carne, evitando-se assim a oxidação do produto; a quantidade do produto preparada foi de 110 a 120 gramas de peso líquido cru.

Arroz cozido - polido tipo 1, numa quantidade de 40 g do produto cru, preparado em óleo de milho com cebola e sal.

Cenoura – refogada com alho, cebola, sal e azeite de oliva, numa porção de 100 g do produto em cubos.

Os pratos foram preparados e colocados na embalagem tradicional da empresa (Delpak, modelo D75, preta, cap. 750 mL, polipropileno) e selados termicamente com filme transparente. No mesmo dia, os pratos a serem irradiados foram distribuídos de 2 caixas térmicas de poliestireno (isopor) de 60 L em camadas intercaladas com gelo seco para o congelamento a 78°C

negativos, conforme metodologia de Spoto et al. (1999). No dia seguinte, pela manhã, as caixas foram levadas ao irradiador em Jarinú, SP, retornando ao CENA/USP para o período de armazenamento e análises.

Os pratos prontos que serviram como testemunha, ficaram na empresa de alimentos para receberem o tratamento de congelamento industrial, seguindo no dia seguinte para o CENA/USP.

Figura 5 - Conjunto de pratos prontos, ainda na empresa, antes do congelamento e irradiação

2.2.2 Processo de irradiação e armazenagem

A irradiação foi realizada na empresa Companhia Brasileira de Esterilização - CBE/Embrarad - unidade 1, localizada em Jarinu, SP. A radiação utilizada foi a gama, proveniente do radioisótopo Cobalto-60. Foram empregadas duas doses de radiação (30 kGy e 50 kGy). A quantidade de dose absorvida pelas amostras foi validada através de dosímetros Red Perspex (Harwell Dosimeters-UK) colocados nas faces externas das caixas térmicas e lidos em espectrofotômetro (Spectronic Instruments – HD). Pelo relatório técnico da empresa, a dose nominal de 30 kGy, apresentou uma mínima de 26,80 kGy e máxima de 36,34 kGy e a de 50 kGy variou da mínima de 48,84 kGy até máxima de 67,11 kGy.

De volta ao CENA, procedeu-se ao sorteio da identificação dos pratos em função dos períodos das análises (1, 30, 60 e 90 dias) e a embalagem em papel alumínio para evitar qualquer interferência da luz nos alimentos. Os pratos irradiados foram distribuídos ao acaso na estante

(Figura 6) da câmara de armazenamento que permaneceu escura e não climatizada (t: 25- 33 °C; UR: 40 - 75%). A luz era acesa somente para a retirada das amostras nos períodos das análises.

Os pratos do tratamento testemunha não foram irradiados e, após serem envoltos no papel alumínio, foram colocados em freezer horizontal (Eletrolux modelo H400) permanecendo a 12-13 °C negativos durante todo o período de estudo. Um dia antes das avaliações, as amostras eram retiradas e colocadas em geladeira para o descongelamento gradativo e depois permaneciam no ambiente até o início das análises.

Figura 6 - Pratos prontos irradiados e distribuídos ao acaso na estante da câmara de armazenamento.

2.2.3 Análises físico-químicas

Para a verificação da qualidade dos alimentos dos pratos prontos foram escolhidos alguns parâmetros característicos. Para o arroz cozido: Umidade e Cor (L^* , a^* , b^*); para a cenoura refogada: Umidade, pH, Acidez titulável, Cor (L^* , a^* , b^*), Ácido ascórbico (vit. C), Carotenóides e Compostos fenólicos; para a carne grelhada: Umidade, Oxidação lipídica (TBARS); Força de cisalhamento (FC) e Cor (L^* , a^* , b^*).

2.2.3.1 Umidade

Para a determinação de umidade, aproximadamente 10 g de amostra de cada alimento foram colocadas em balança marca OHAUS modelo MB 200, própria para determinação de

umidade. A secagem ocorreu através de raios infra vermelhos, tendo como princípio a diferença de peso da amostra, conforme metodologia proposta pela AOAC (2005).

2.2.3.2 Determinação do pH

O pH foi medido em potenciômetro DOGIMED modelo DMPH através do Método Potenciométrico (LANARA, 1981).

2.2.3.3 Acidez titulável (AT)

Determinada e calculada como volume em mililitros de NaOH 0,1N, requeridos para titular 100mL de solução aquosa de amostra, expressa em mL de ácido cítrico e málico por 100mL de solução (AOAC, 2005).

2.2.3.4 Vitamina C (ácido ascórbico)

Medida através do indicador 2,6-diclorobenzenoindofenol de acordo com metodologia de Leme Junior e Malavolta (1950) e Jacobs (1958), e expressa em mg de vitamina C por 100g de amostra.

2.2.3.5 Compostos Fenólicos Totais

Esta análise foi realizada através de reação do reagente Folin-Ciocateau utilizando o ácido gálico como padrão e os resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ (SINGLTON; ROSSI, 1965).

2.2.3.6 Carotenóides totais

Foi determinado através da metodologia proposta por Lichtenthaler, 1987. Usou-se o método através de extração em coluna sob vácuo dos componentes carotenóides e leitura em espectrofotômetro (MINAZZI-RODRIGUES; PENTEADO, 1989). Os dados foram calculados em $\mu\text{g/mL}$.

2.2.3.7 Determinação da cor

A cor das amostras de cada alimento foi determinada através do fotocolorímetro Minolta-chromameter CR-200b, onde avaliou-se os parâmetros L, a*, b*, onde L representa a

luminosidade, a^* a intensidade de vermelho e b^* a intensidade de amarelo. As leituras foram realizadas em três diferentes pontos da superfície dos alimentos nos pratos prontos.

2.2.3.8 Determinação da oxidação lipídica (TBARS)

A determinação do valor das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada segundo o método de extração descrito por Vyncke (1970), Vyncke (1975) e Sorensen e Jorgensen (1996). Os resultados foram calculados com uma curva padrão de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano, expressos em mg de malonaldeído por kg de carne.

2.2.3.9 Força de Cisalhamento (FC)

A determinação da força de cisalhamento dos bifes foi realizada através do texturômetro com lâmina Warner-Bratzler (com velocidade de 5 mm/s). Os bifes grelhados de todos os tratamentos foram cortados em retângulos 1,5cm de espessura e cisalhados, onde o resultado foi expresso em kgf.

2.2.4 Controle da carga microbiana

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do CENA/USP, através de construção de uma biblioteca genômica, análise de T-RFLP, e quantificação de PCR em Tempo Real.

Utilizaram-se materiais biológicos, como linhagens de referência das bactérias a serem estudadas, as quais foram revividas em meio específico, e cultivadas em condições adequadas.

2.2.4.1 Coleta das amostras a serem analisadas

A coleta das amostras foi feita em triplicata para cada tratamento (controle, 30kGy, 50kGy), sendo todos o procedimento realizado em câmara de fluxo, previamente higienizado com álcool 70%, e tratamento de luz UV, usando sempre utensílios estéreis e ou higienizados também com álcool 70%.

Primeiramente, os pratos e em especial as tampas, eram limpos externamente com álcool, com o objetivo de retirar possíveis sujidades e microrganismos presentes.

Com o objetivo de construir a biblioteca genômica, a coleta das amostras de 1 dia, foi realizada juntando-se todas as preparações (mix), separando-se somente por tratamento. As

amostras de arroz e cenoura foram misturadas, e as de carne foram cortadas em pedaços menores com um bisturi, esfregando-se bem um pedaço no outro. Colocou-se todos os alimentos numa placa de Petri com solução salina a 0,85%. Após boa homogenização, pipetou-se todo o líquido presente da placa, transferindo-o para tubos Eppendorf, que eram centrifugados a 12.000 rpm por 3 minutos. A seguir, o sobrenadante era descartado restando somente o pellet. Este procedimento foi repetido varias vezes até a formação de uma quantidade ideal de pellet para as análises moleculares.

Da análise dos 30 dias em diante, diferentemente à de 1 dia, a coleta das preparações foi também realizada separadamente, em triplicata para cada tratamento, retirando-se uma alíquota padrão devidamente registrada, variando de 10 a 20g, em média. As amostras coletadas (arroz, cenoura e carne) foram colocadas separadamente em tubos Falcon estéreis, sendo que a carne foi cortada em rodelas, com o auxílio de um vasador de aço inox esterilizado, dentro de uma placa de Petri estéril. Em cada tubo, adicionou-se aproximadamente 0,20 mL de solução salina a 0,85% autoclavada.

2.2.4.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em triplicata, usando kit de Extração de DNA Genômico de Solo “Power-Soil DNA Isolation”, da MoBio, seguindo especificações do fabricante.

2.2.4.3 Análise dos DNAs extraídos, em gel de agarose

Esta técnica é realizada a fim de se analisar a qualidade e quantidade aproximada dos DNAs extraídos, por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com GelRed™ (Biotium), e visualizados sob luz UV.

2.2.4.4 Biblioteca genômica

Realizou-se a análise da biblioteca genômica nas amostras do 1º período de armazenamento. Para a construção da biblioteca genômica, realizou-se a amplificação do gene 16S rRNA, a partir do DNA total, por PCR para detectar a presença de bactérias, e amplificação do gene 18S rRNA para a detecção de fungos filamentosos. Para o gene 16S, foram usados os

primers FD1 5' (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e RD1 (5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') (BRESLER et al., 2000).

2.2.4.4.1 Reação de PCR, usando primers universais para Bactérias (16S) e Fungos filamentosos (18S).

Esta análise foi realizada com o intuito de verificar a presença das bactérias de interesse nas amostras. Após a extração de DNA total, fragmentos do gene 16S rRNA das espécies *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, e *Salmonella typhimurium*, e fragmentos de gene 18S rDNA de espécies de fungos de Terra Preta (fungo filamentoso e levedura), foram amplificados quanto a genes dessas espécies de fungos e bactérias por PCR, usando-se os primers para os genes rRNA.

2.2.4.4.2 Amplificação dos genes 16S rRNA de bactéria

O produto da reação para genes 16S rRNA foi composto por 2,5 µL de 10X PCR Buffer (Invitrogen); 0,2 mM de dNTP; 50 mM com 1,0 µL de MgCl₂; 0,2 pmol/ µL de cada primer; 0,05 U/µL de Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen); 50 ng de DNA de cada amostra; e água ultra pura (Milli Q) esterilizada para volume final de 25 µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 96°C por 4 min em 30 ciclos, 94°C por 1 min; 55 °C por 30 seg., e extensão final de 72°C por 10 min.

PCR da região ITS1-5.8s-ITS 2 foi usado para o gene 18S rRNA, cuja reação para 25µL de volume final, foi composta por: 15,8µL de água ultra pura (Milli Q) esterilizada, 2,5µL de PCR Buffer 10X, 1µL de MgCl₂; 0,5µL de dNTP, 5,0pmol/µL de cada primer; 5U/µL de Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen); e 1 µL de DNA de cada amostra. Nas seguintes condições ocorreu a reação: 94°C por 5 min., 94°C por 3 seg., seguido de 33 ciclos de 55°C, 30 s; 72°C, 45 s; e extensão final de 72°C, 10 min, e armazenamento no termociclador a 4°C. Para a confirmação da amplificação, realizou-se a eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (Biotium).

2.2.4.4.3 Clonagem dos fragmentos

Para a purificação dos produtos, usaram-se os kits GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences), e clonou-se no plamídeo pGEM – T Easy Vector

(Promega), seguindo instruções do fabricante. Após essa reação de ligação usando pGEM®-T Easy Vector, por meio de choque térmico, inseriu-se o vetor com inserto em células competentes *E. coli* (DH5 α), ocorrendo assim a transformação bacteriana (SAMBROOK et al., 1989).

2.2.4.4.4 Transformação bacteriana

Realizou-se da seguinte forma o processo da transformação: 5 μ L do produto da ligação e 100 μ L de células competentes foram colocados em microtubo, misturados gentilmente e incubados no gelo por 30 min. Incubou-se o microtubo a 42°C em banho-maria por 50 s o microtubo, e tornou a incubá-los no gelo por mais 2 min. Para a transformação das células competentes de *E. coli* (DH5 α), estas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de Ampicilina e X-Gal (ambos em concentração final de 100 μ g/mL⁻¹), incubadas em estufa a 37 °C por 16 h, e, após esse período, as placas foram colocadas a 4°C para facilitar a visualização e seleção das colônias azuis/brancas. Com auxílio de um palito estéril, selecionaram-se as colônias brancas, e transferiu-as para microplaca 96-well, contendo 50 μ L de TE (Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Submeteu-se essas placas, em termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems), a 95°C por 10 min, para a extração do DNA, mantendo essas placas a -20 °C até posterior utilização. Em seguida, a amplificação da região do vetor com inserto 166S rRNA foi realizada, usando primers M13F (5' GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A 3') e M13R (5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAG G 3'), os quais são específicos das regiões adjacentes ao inserto no vetor pGEM – T Easy Vector (Promega). A solução usada nesta reação foi: 1X de PCR Buffer (Invitrogen); 0,2 mM de dNTP; 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 pmol/ μ L de cada primer; 0,05 U/ μ L de Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen); 50 ng do DNA extraído das colônias; e água ultra pura (Milli Q) esterilizada para volume final de 30 μ L. As condições de amplificação foram: 95°C por 5 min seguido de 30 ciclos de 95°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 1 min e extensão final de 72°C por 10 min. Posteriormente, para a confirmação da amplificação, correu-se os produtos em gel de agarose a 1% corado com GelRedTM (Biotium). Através do programa BLAST, do GenBank, analisou-se, por homologia, as sequencias nucleotídicas (ALTSCHUL et al.,1990).

2.2.4.4.5 Purificação

Purificou-se, então os produtos, adicionando-se 3 partes de Isopropanol 100% para 1 parte de água ultra pura (Milli Q) autoclavada. Misturou-se o conteúdo dos tubos em vórtex, e incubou-as -20°C overnight.

2.2.4.4.6 Sequenciamento

Reação de sequenciamento foi realizada após a purificação, em microplaca 96-well, usando o kit Dyanamic ET – Terminator Cycle Sequencing (Amershan, GE Bioscience), e os *primer* M13F e M13R. Realizou-se amplificação, seguida de precipitação pela adição de 2 µL de solução Acetato de Sódio/EDTA 3M pH 4,8 e 60µL de etanol absoluto. Misturou-se o produto em vórtex, e centrifugou-o a 4,000 xg por 40 minutos em centrífuga modelo 504 (Eppendorf), removendo o sobrenadante, e adicionado-se 150 µL de etanol 70%; repetiu-se este procedimento até a etapa da remoção do sobrenadante e, secou-se as amostras em termociclador, a 40°C por 10 min, ressuspensando-as em água ultra pura. Ressuspendeu-se as amostras em 10µL de Hi-Di formamida (Applied Biosystems), e em seguida, procedeu-se o sequenciamento dos clones em sequenciador capilar automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.2.4.5 T-RFLP

Nas amostras de 30, 60 e 90 dias, foi usada a técnica de T-RFLP, cujos procedimentos iniciais foram a PCR para gene 16S rRNA (bactérias), amplificação por PCR do gene 16S rRNA do DNA de bactéria. Para a posterior identificação dos amplicons, em sequenciador automático, usou-se primers forwards marcados com 6-carboxifluorescein (FAM) na extremidade 5'. Realizou-se também a purificação do DNA, precipitação dos fragmentos de DNA em microtubos, e digestão dos produtos da PCR com enzimas de restrição. Ao final, realizou-se a análise estatística dos dados, no programa Peak Scanner.

2.2.4.5.1 PCR para análise de T-RFLP

A reação de T-RFLP foi realizada, seguindo a metodologia descrita por Liu et al., (1997). Amplificou-se por PCR, após a extração do DNA total das amostras e das linhagens padrão, os fragmentos do gene 16S rRNA, com os seguintes primers: 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG

CTC AG 3') marcado na região 5' com 6- carboxyfluorescein (FAM) e 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT AGG ACT T 3') (AMANN; LUDWING; SCHELEIFER, 1995).

2.2.4.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA de bactéria

Para 25µL de reação, usou-se 2,5µL de tampão para PCR 10X, 1,0µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de dNTP (10µM), 0,2µL de Platinum® Taq DNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,25µL de bovine serum albumin (BSA) (10mg/mL); 0,25µL de cada primer (10 pmoles/µL), 1,0 µL de DNA, e 15,05µL de água ultra pura (Milli Q) esterilizada. As reações de amplificação foram realizadas num termociclador, termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), nas seguintes condições: 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 45 s, 1 min a 72°C, e a extensão final de 72°C por 15 min. O produto da amplificação foi conferido em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (Biotium), e visualizado em luz UV.

2.2.4.5.3 Purificação do DNA

Após a eletroforese em gel de agarose, realizou-se a purificação de DNA, seguindo protocolo descrito pelo fabricante do kit usado (kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification - GE Healthcare). A enzima de restrição (endonuclease) *HhaI* (Invitrogen) foi usada para a digestão dos amplicons (175 ng), em cada 15 µL de produto de reação por 3 horas a 37°C, e por 10 minutos a 65°C, para inativação da enzima. A escolha da enzima baseou-se numa prévia análise no site Virtual Digest (<http://www.restrictionmapper.org/>), identificando a *HhaI* como a que apresentou melhor perfil de restrição.

2.2.4.5.4 Digestão dos produtos da PCR com enzimas de restrição

Usou-se um mix de digestão específica, e sob as seguintes condições de reação: 37°C por 3 horas para a retingir, e 68 °C por 10 minutos para inativar. Para 60 µl, usou-se 6 µl de buffer react2 10x, 0,6 µl de BSA, 4 µl de enzima *HhaI* (0,66 U/µl), 20 µl amostra (± 60 ng), e 29,4 µl de água ultra pura (Milli Q) esterilizada. As reações de restrição foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems). Para a precipitação dos fragmentos de DNA em microtubos, usou-se o kit Dyenamic (GE Healthcare), seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Precipitou-se o produto da digestão com Acetato de Sódio/EDTA, e misturou-se

com 0,25 µL de padrão de tamanho GeneSacr 500 Rox (Invitrogen) e 10 µL de formamida deionizada. Desnaturou-se a 95°C por 5 minutos, e resfriados em gelo, permitindo assim a discriminação dos fragmentos. Um sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, UK) foi usado para a análise do tamanho e da quantidade de fragmentos.

O programa Peak Scanner versão 1.0 (Applied Biosystems) foi usado para a análise dos fragmentos de restrição, usando uma linha de base limite de 25 unidades de fluorescência para diferenciar os “picos verdadeiros” dos ruídos de background oriundos da técnica, e excluíram-se os T-RFS menores de 550 pares de base e maiores que 800 (CULMAN et al., 2008).

2.2.4.5.5 Análise estatística dos dados de T-RFLP

Usou-se o programa Peak Scanner v 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para visualizar o perfil e a qualidade dos eletroferogramas; na análise TRFs, exclui-se os menor que 50 pb, e calculou-se a abundância relativa por meio da porcentagem de sinal relativo à intensidade de fluorescência total dos picos detectados.

2.2.4.6 PCR quantitativo em tempo real

Para a quantificação do número de cópias de genes presentes nas 15 amostras de alimentos do prato pronto, realizou-se PCR em tempo real. Usou-se, como padrão para comparações, o gene ribossomal 16S rRNA. O equipamento StepOnePlus® (Applied Biosystems) foi usado para as reações, com auxílio do sistema SYBR Green.

2.2.4.6.1 Amplificação do gene ribossomal 16S rRNA

Primers universais para o domínio Bactéria, que amplificam U968F (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') e R1387 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') (HEUER et al., 1997), que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb foram usados para a reação de amplificação do gene 16S. Como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras, usou-se os valores de Cts (cycle threshold). Usou-se um volume de 10 µL contendo 5 µL do kit Syber Green Rox qPCR (Fermentas, Brasil), para as reações de PCR em tempo real, 2,5µM de cada primer e 3ng de DNA. Para a amplificação do DNA, usou-se um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 20 s, 60°C por 50 s e 72°C por 50 s, e inclui-se uma curva de melting,

ao final da reação, a uma temperatura de 95°C por 15 seg., 56°C por 1 min., e aumentou-se a temperatura foi até 95°C por 15 seg., sendo que a leitura de dados se deu a cada 0,7°C. Usou-se um clone obtido a partir de biblioteca contendo gene 16S rRNA, para a amplificação e construção de curva padrão, e quantificou-se os plasmídeos em um espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm - NanoDrop® ND-1000), e diluídos para construir uma curva padrão de 10^3 até 10^7 genes μl^{-1}

2.2.5 Delineamento Experimental

O delineamento experimental empregado para as análises físico-químicas foi realizada em blocos ao acaso, com os tratamentos dispostos no esquema fatorial 3 x 4, referentes a 3 doses de radiação (0 (test), 30 e 50 kGy) e 4 períodos de armazenamento (1, 30, 60 e 90 dias), com 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e, obtendo-se F significativo ao nível de 5%, a análise teve continuidade com a aplicação do teste de Tukey (SAS, 1996).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Variáveis físico-químicas

A aparência dos pratos prontos dos três tratamentos (0 kGy, 30 kGy e 50 kGy), sorteados para fotos, e nos três últimos períodos de armazenamento (30, 60 e 90 dias) pode ser verificada na Figura 7.

Figura 7 – Aparência dos alimentos nos pratos prontos em função dos tratamentos e armazenamento:
a – Controle, 30 dias; **b**- 30 kGy, 30 dias; **c**- 30 kGy, 30 dias; **d**- Controle, 60 dias; **e**- 30 kGy, 60 dias; **f**- 50 kGy, 60 dias; **g**- Congelado, 90 dias; **h**- 30 kGy, 90 dias; **i**- 50 kGy, 90 dias.

2.3.1.1 Arroz cozido

Os dados de umidade e cor do arroz cozido foram submetidos à análise de variância e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de F e significância das variáveis físico-químicas de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias

Causa de Variação	Umidade	Valor L*	Valor a*	Valor b*
Período	1,02 ns	49,61 *	655,02 *	270,03 *
Tratamento	1,51 ns	4,20 *	26,23 *	777,44 *
Período x Tratamento	0,76 ns	3,07 *	2,99 *	54,89 *
C V (%)	10,98	3,86	33,32	7,08

ns - não significativo * significativo ao nível de 5%

O teor de umidade do arroz não foi alterado nem pela irradiação e nem em função período e local de armazenamento, apresentando uma média geral de 54,89% (Tabela 2). Este fato era esperado por ser a embalagem impermeável, não havendo, portanto, motivo para perda ou ganho de umidade entre tratamentos e durante o período do experimento.

Tabela 2 - Valores médios de umidade de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias. Valores expressos em porcentagem

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	55,62 Aa	48,84 Aa	54,64 Aa	52,75 Aa	52,96 a
30 kGy	52,75 Aa	52,22 Aa	55,36 Aa	59,91 Aa	55,06 a
50 kGy	55,65 Aa	56,42 Aa	58,49 Aa	56,00 Aa	56,64 a
Médias	54,67 A	52,49 A	56,16 A	56,22 A	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nas Tabelas 3, 4 e 5, são apresentados os valores médios de L*, a* e b*, respectivamente. Houve um escurecimento gradativo do arroz em função dos tratamentos e dos períodos de armazenamento. O valor L*, responsável pela luminosidade das amostras, manteve-se igual para todos os tratamentos até aos 30 dias de armazenamento. A alteração foi observada a partir dos 60 dias, para os tratamentos irradiados (30 kGy e 50 kGy), sendo que o controle manteve-se inalterado até os 60 dias, igualando-se às amostras irradiadas aos 90 dias. De modo geral pode-se verificar que as alterações verificadas foram devidas não só ao processo de irradiação mas também devido ao período de armazenamento.

Tabela 3 - Valores médios de L* de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	62,21 Aa	61,91 Aa	65,86 ABa	71,10 Ba	65,27 a
30 kGy	62,52 Aa	61,00 Aa	72,56 Bb	74,24 Ba	67,58 b
50 kGy	62,39 Aa	63,66 Aa	73,30 Bb	70,79 Ba	67,54 b
Médias	62,37 A	62,19 A	70,58 B	72,04 B	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os valores de a^* (Tabela 4) embora tenham sido afetados significativamente pela maior dose de radiação e com o período de armazenamento em relação ao primeiro dia, todos os valores médios obtidos ficaram na região central do espaço tridimensional de cor, caracterizado por uma zona difusa, predominada pela mistura de todas as cores. Por esta razão, a determinação da cor do arroz neste trabalho foi regida pelo parâmetro b^* (Tabela 5) que conferiu a tonalidade amarelada causada pela radiação e tempo de armazenamento. À medida que se aumentou a dose de radiação houve aumento significativo da cor amarela no arroz cozido e o mesmo processo ocorreu com o tempo de armazenamento. O controle, não irradiado e armazenado a temperatura de freezer, permaneceu com a cor branca característica durante todo o período (Figura 7).

Tabela 4 - Valores médios do índice de coloração a^* de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	1,30 Aa	-1,28 Ba	-1,41 Bab	-1,37 Ba	-0,69 a
30 kGy	1,57 Aab	-1,25 Ba	-1,66 Bb	-1,66 Ba	-0,75 a
50 kGy	1,80 Ab	-1,06 Ba	-1,00 Ba	-0,92 Bb	-0,30 b
Médias	1,56 A	-1,19 B	-1,36 B	-1,32 B	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 5 - Valores médios do índice de coloração b^* de arroz cozido submetido a diferentes tratamentos e armazenado por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	3,40 Aa	3,77 Aa	4,01 Aa	4,12 Aa	3,82 a
30 kGy	4,43 Aa	8,70 Bb	11,03 Cb	13,60 Db	9,44 b
50 kGy	6,32 Ab	10,89 Bc	14,61 Cc	15,84 Cc	11,92 c
Médias	4,72 A	7,79 B	9,88 C	11,18 D	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A reação não enzimática de escurecimento é uma reação química complexa que produz pigmentos marrons com uma condensação de vários derivados durante um processamento de alimentos ou armazenamento (HODGE, 1953). Essa reação é notoriamente difícil de controlar.

Alguns pesquisadores têm observado que a intensidade da cor dos alimentos irradiados sofreu acréscimo com o aumento da dose de radiação (ROUSHDI et al, 1981; KIM et al., 2004; LEE et al., 2004). A hipótese da reação não enzimática de escurecimento gerada por irradiação

gama pode ser o resultado da quebra das ligações peptídicas e formação de outras ligações durante a irradiação e, a seguir, os produtos de degradação, tais como a carbonila e compostos amina, reagem formando compostos coloridos (LIGGETT et al., 1959).

No presente estudo, o escurecimento (ou amarelecimento) foi desenvolvido, não só durante o processo, mas também durante o período pós-irradiação. Esta observação pode sugerir que os produtos de degradação que foram produzidos pelos radicais hidroxila ou pelos efeitos diretos das radiações ionizantes durante a irradiação foram condensados para co-polímeros coloridos durante o período pós-irradiação (LIGGETT et al., 1959). O estado de água é importante para as mudanças químicas induzidas por radiação ionizante, porque as alterações são causadas principalmente por produtos de radiólise de água. Quando a água pura é irradiada, uma série de entidades altamente reativas como elétrons aquosas (eaq), radical hidroxila (OH), hydroperoxyl radical (H_2O) e ânion superóxido radical (O_2) são formados. No estado congelado, os reativos intermediários de radiólise da água estão ligados quimicamente e, portanto, não livres para interagir uns com os outros ou com outros componentes (FURUTA et al., 1992).

De fato, pequenas alterações na composição dos açúcares, tais como a formação de açúcares redutores, são observadas em soluções irradiadas em estado congelado. Em uma reação não enzimática de escurecimento, a baixa produção de açúcares redutores é importante devido ao sítio reativo que estes apresentam (HODGE, 1953). A irradiação induz a quebra de uma ligação glicosídica gerando radicais livres na posição C1 sobre a molécula de glicose em amido ou dissacarídeo na presença de água e, por conseguinte, estes produtos finais radiolíticos com poder redutor (STEWART, 2001).

A intensidade dos radicais livres é dependente da quantidade de água presente no alimento, dose de irradiação, temperatura e tempo de armazenamento. A dispersão de íons e radicais livres é maior na forma líquida e menor em produtos secos ou congelados (RAFFI; AGNEL, 1983). Quando a água está congelada, radicais livres tendem a recombinar formando a substância original, porque a difusão é reduzida, limitando o seu acesso a outros componentes de alimentos (TAUB et al., 1978).

Arroz cozido é um alimento importante no Brasil. No entanto, é muito perecível por causa de sua atividade alta água e nutrientes. Apesar da irradiação ser capaz de melhorar a vida de prateleira de arroz cozido, sua aplicação pode ser limitada porque os consumidores são sensíveis às alterações das propriedades sensoriais de arroz cozido, como o flavor, textura e cor após

irradiação (LEE et al., 2004). No entanto, quando o arroz cozido é irradiado no estado congelado, a reação de escurecimento efetivamente é impedida durante a irradiação, bem como durante a armazenagem à temperatura ambiente (LEE et al., 2007), fato este não verificado no presente trabalho provavelmente por estar em presença de ar, uma vez que a embalagem não era a vácuo..

A irradiação forma produtos de radiólise de açúcar e glicina e radicais livres que podem se condensar para produzir produtos coloridos no período pós-irradiação (TOMASIK; ZARANYIKA, 1995).

2.3.1.2 Cenoura refogada

Na Tabela 6, pode-se verificar os resultados obtidos nas análises de variância das cenouras refogadas para as variáveis umidade, pH, acidez titulável e cor (L^* , a^* , b^*).

Tabela 6 - Valores de F e significância das variáveis físico-químicas de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Causa de Variação	Umidade	pH	Ac. Tit.	Valor L^*	Valor a^*	Valor b^*
Período	2,06 ns	78,43 *	2575,73 *	37,01 *	19,61 *	6,57 *
Tratamento	0,37 ns	1240,99 *	95,95 *	13,49 *	80,45 *	106,74 *
Período x Tratamento	1,10 ns	16,32 *	34,43 *	3,43 *	9,78 *	7,96 *
CV (%)	9,89	0,76	6,53	9,58	18,59	9,09

ns= não significativo * = significativo ao nível de 5%

Para a umidade, assim como ocorreu no arroz, não houve diferença significativa entre os tratamentos, períodos, bem como na interação entre tratamento e período. Com relação ao pH, acidez titulável e cor (L^* , a^* , b^*) houve diferença significativa para todas essas variáveis entre tratamento e período, demonstrando também interação significativa entre esses fatores.

Tabela 7 - Valores médios, em porcentagem, de umidade de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	83,44 Aa	87,85 Aa	84,17 Aa	78,23 Aa	83,43 a
30 kGy	88,80 Aa	89,32 Aa	77,67 Aa	87,82 Aa	85,90 a
50 kGy	87,82 Aa	89,09 Aa	86,62 Aa	77,28 Aa	85,25 a
Médias	86,68 A	88,75 A	82,88 A	81,13 A	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pelos valores de umidade (Tabela 7) verifica-se uma variação de 77,28% a 89,32% , com média geral de 84,86%. Não houve diferença significativa entre as parcelas analisadas indicando que a embalagem foi hermética e apropriada para os pratos-prontos.

Na Tabela 8 estão os valores de pH para os diferentes tratamentos e períodos analisados. A radiação causou uma acidificação das cenouras refogadas fato este verificado logo após ao processo de irradiação (1 dia) e que permaneceu ao longo do período de armazenamento (30, 60 e 90 dias). As cenouras irradiadas ficaram ligeiramente mais ácidas em relação as do controle provavelmente devido à quebra de moléculas aquosas e formação de radicais livres e hidroxilas, o que otimiza o processo, aproximando o pH da região de segurança, abaixo de 4,5, inibindo o desenvolvimento de microrganismos patogênicos formadores de esporos.

Nota-se também um aumento significativo do pH ao final do período de armazenamento (90 dias) dentro de todos os tratamentos irradiados e também do controle.

Tabela 8 - Valores médios de pH de cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	5,06 Aa	5,03 Aa	5,15 Ba	5,41 Ca	5,16 a
30 kGy	4,61 Ab	4,53 Ab	4,58 Ab	4,71 Bb	4,61 b
50 kGy	4,58 Ab	4,56 Ab	4,63 Ab	4,66 Bb	4,60 b
Médias	4,75A	4,70B	4,79A	4,92C	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O pH da cenoura crua minimamente processada encontrado por Pilon (2003), girou em torno de 6,1 a 6,7. Entretanto Garcia-Gimero e Zurera-Cosano (1997 apud PILON, 2003), encontraram em salada mista de cenoura, alface e repolho armazenadas a 15°C, pH 4,0 e, neste meio, os microrganismos patogênicos perdem a capacidade de se desenvolver e os deteriorantes se desenvolvem lentamente, principalmente sob temperatura de refrigeração.

Os dados de acidez titulável estão dispostos na Tabela 9. Observa-se uma diminuição na acidez titulável, tanto nas amostras irradiadas quanto no controle, principalmente após 60 dias de armazenamento. Nos dois primeiros períodos analisados (1 e 30 dias) verificou-se um aumento da acidez titulável nas amostras irradiadas em relação ao controle congelado.

Tabela 9 - Valores médios de Acidez Titulável (mL de ácido cítrico e málico/100mL solução) para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	0,0816 Aa	0,0853 Aa	0,0166 Ba	0,0032 Ca	0,0464 a
30 kGy	0,1014 Ab	0,1203 Bb	0,0157 Ca	0,0052 Da	0,0606 b
50 kGy	0,1078 Ab	0,1270 Bb	0,0146 Ca	0,0058 Ca	0,0638 b
Médias	0,0966A	0,1109B	0,0156C	0,0047D	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

São numerosos os compostos ácidos, com natureza química variada. O ácido cítrico e o málico são encontrados em maior abundância nas frutas tropicais. No abacaxi, 87% do teor de ácidos são representados pelo ácido cítrico, sendo ácido málico o restante, na cenoura ocorre o inverso. A acidez titulável expressa a quantidade de moléculas de ácido total e parcialmente dissociado na solução, enquanto que o pH expressa apenas o potencial hidrogeniônico. Portanto, no presente trabalho, a radiação deve ter provocado a dissociação total dos ácidos logo após o processo de irradiação (1 dia) e que foi diminuindo com o período de armazenamneto.

Quanto a cor da cenoura refogada,verificou-se pelos valores de L*, a* e b* (Tabelas 10, 11 e 12) que houve uma perda de pigmentação, ficando a mesma esbranquiçada em função das doses de radiação e período de armazenamento. O valor L* aumentou indicando maior luminosidade e os valores a*, responsável pela tonalidade vermelha e b* responsável pela tonalidade amarela, diminuíram em função da radiação e do período de armazenamento.

Tabela 10 - Valores médios de L* para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	34,60 Aa	34,10 Aa	41,43 ABa	49,65 Ba	39,94 a
30 kGy	37,99 Aa	41,97 ABab	56,50 Cb	49,26 BCa	46,43 b
50 kGy	35,45 Aa	45,02 ABb	51,41 BCb	56,02 Ca	49,94 b
Médias	36,01A	40,36A	49,78B	51,64B	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 11 - Valores médios do índice de coloração a* para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	16,16 Aa	14,35 Aa	15,48 Aa	18,16 Aa	16,04 a
30 kGy	15,28 Aa	9,85 Bab	8,15 BCb	3,75 Cb	9,25 b
50 kGy	11,52 Aa	8,82 Ab	6,94 ABb	2,34 Bb	7,40 c
Médias	14,32A	11,00B	10,19BC	8,08C	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 12 - Valores médios do índice de coloração b* para cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	34,13 Aa	33,25 Aa	37,18 Aba	41,17 Ba	36,43 a
30 kGy	29,73 Aa	22,71 BCb	24,41 ABb	19,56 Cb	24,10 b
50 kGy	28,77 Aa	22,49 ABb	23,67 ABb	20,38 Bb	23,82 b
Médias	30,88A	26,15B	28,42AB	27,03AB	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O escurecimento que é normalmente observado em hortaliças, quando sofrem qualquer distúrbio é devido, principalmente, a oxidações de origem enzimática (BERTOL, 2000), ou seja, enzimas que catalizam a oxidação de compostos derivados do catecol a ortoquinonas, as quais, através de polimerizações dão origem a compostos escuros, denominados melanoidinas. Às enzimas que catalisam este tipo de escurecimento dá-se o nome de polifenoloxidase.

Muitas hortaliças apresentam em sua composição polifenoloxidases e compostos fenólicos em concentrações adequadas para iniciar as reações de escurecimento, tão logo sua organização celular seja afetada e o oxigênio esteja presente.

As enzimas podem ser inativadas através do branqueamento, que é uma operação onde as hortaliças são imersas em água fervente, por um tempo relativamente curto, dependendo do tamanho e espécie vegetal em questão. Embora o calor seja eficiente na prevenção do escurecimento enzimático, tona-se imprescindível a questão do binômio tempo/temperatura para evitar alterações indesejáveis nas propriedades físicas, químicas ou organolépticas dos alimentos (POULSEN, 1986; CANTARELLI et al., 1984 apud BERTOL, 2000).

No processo de inativação enzimática por irradiação em frutas e hortaliças, esse processo depende exclusivamente da dose aplicada. No presente trabalho, independente do tratamento aplicado, não houve efeito do escurecimento, pois o tratamento térmico prévio antes da irradiação inativou as enzimas. Portanto, a perda de pigmentação, observada nas amostras irradiadas das Tabelas 11 e 12, pode ser devido à quebra do β -caroteno pela irradiação, pelo fato de ser esse o principal pigmento encontrado na cenoura.

Os resultados relativos à análise de variância dos compostos funcionais, incluindo os compostos fenólicos, vitamina C e carotenóides podem ser observados na Tabela 13. Pode-se observar que para estas três variáveis houve diferença significativa dentro do período de armazenamento. Diferença dentro dos tratamentos houve somente para vitamina C e carotenóides. Não houve interação significativa entre período e tratamento para nenhuma das variáveis.

Tabela 13 - Valores de F e significância dos compostos funcionais da cenoura refogada e submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Causa de Variação	C. Fenólicos	Vitamina C	Carotenóides
Período	19,66 *	11,75 *	66,57 *
Tratamento	1,47 ns	16,05 *	11,67 *
Período x Tratamento	0,80 ns	1,31 ns	1,92 ns
CV (%)	56,94	21,03	23,42

ns= não significativo * = significativo ao nível de 5%

Na Tabela 14 são apresentados os valores médios de compostos fenólicos totais das amostras irradiadas e controle em função do período de armazenamento. Observa-se drástica redução dos compostos fenólicos aos 90 dias de armazenamento.

Tabela 14 - Médias e significâncias da variável compostos fenólicos de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	13,11 Aa	9,44 Aa	5,39 ABa	0,02 Ba	6,99 a
30 kGy	8,96 Aa	5,07 Aa	5,69 Aba	0,02 Ba	4,93 a
50 kGy	9,46 Aa	8,77 Aa	7,21 ABa	0,01 Ba	6,36 a
Médias	10,51A	7,75AB	6,09B	0,02C	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os compostos fenólicos incluem a catequina, leucoantocianidinas, antocianinas, flavonóis, derivados do ácido cinâmico e fenóis simples. Constituem o substrato para o escurecimento enzimático, ou seja, para a oxidação em o-quinonas, mediados pela polifenoloxidase. Tanto as polifenoloxidases como os substratos estão fartamente distribuídos em muitas frutas e vegetais, tais como: maçã, pêra, banana, mandioquinha. Outras frutas e a maioria dos vegetais são carentes de substratos, de enzimas ou de ambos, portanto, menos suscetíveis ao escurecimento (OETERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

A maioria dos compostos fenólicos encontrados em frutos e vegetais, quando avaliados por análise sensorial, em baixas concentrações e na forma pura, não apresenta características especiais de sabor. As exceções são relacionadas aos ácidos fenólicos (sabor ácido), flavonas pouco condensadas (adstringência) e aos flavonóides em frutos cítricos (amargor).

Kluge et al. (2002) determinaram que durante a maturação de frutos e vegetais ocorre diminuição nos valores de compostos fenólicos devido à polimerização ou condensação dos mesmos. Fato semelhante pode ter ocorrido nas amostras irradiadas e nas armazenadas por 90 dias, resultando em perda de maciez e aspecto aguado.

Furgeri (2009) irradiou erva mate desidratada com doses crescentes de radiação gama com fins microbiológicos e verificou que não houve diminuição dos compostos fenólicos até a dose máxima de 10kGy. Isto provavelmente ocorreu por se tratar de produto desidratado onde as reações radiolíticas são minimizadas ou até nulas, preservando com isso os compostos.

Já Santillo (2011) estudando os efeitos da radiação gama sobre as propriedades nutricionais uvas de mesa e uvas passas, verificou que a radiação foi responsável pelo decréscimo de compostos fenólicos nas uvas de mesa, mas não afetou estes compostos em uvas passas devido provavelmente a baixa umidade.

A Tabela 15 apresenta as médias e significâncias da vitamina C na cenoura refogada em função da irradiação e período de armazenamento. Observa-se estabilidade desse componente, durante o período de armazenamento, com ligeira redução na amostra tratada com 30 kGy, aos 30 dias de armazenamento.

Promotora de diversas funções bioquímicas e fisiológicas em animais e plantas, a vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, entre as várias funções que desempenha no organismo, pode-se citar a relacionada ao sistema imune; por ser instável é facilmente destruída

pela oxidação, quando temperaturas elevadas, luz, umidade, alcalinidade, catalisadores metálicos, e danos físicos (LIMA et al., 2009).

Tabela 15 - Médias e significâncias da variável Vitamina C de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	3,61 Aa	4,69 Aa	3,46 Aa	3,41 Aa	3,79 a
30 kGy	3,91 Aa	3,81 Aab	2,41 Aa	2,17 Aab	3,07 b
50 kGy	3,01 Aa	2,95 Ab	2,11 Aa	1,86 Ab	2,48 c
Médias	3,51 A	3,81A	2,66B	2,48B	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O principal fator limitante nutritivo de refeições prontas é relatado por seu conteúdo de ácido ascórbico, com níveis de 30 a 90% mais baixos nas refeições refrigeradas e congeladas (especialmente vegetais). Segundo Esashi et al. (1992), durante armazenagem a 2°C o conteúdo de ácido ascórbico das refeições refrigerados registra uma diminuição de 4 a 16% por dia, e que durante o reaquecimento o ácido ascórbico é reduzido em 23–49%. Quanto ao efeito da irradiação sobre a vitamina C em batata pronta para o consumo, estes mesmos autores verificaram que uma dose de 1 kGy reduziu em 28% o conteúdo de ácido ascórbico aumentando para 54% com a dose de 3 kGy.

Graham e Stevenson (1992) observaram que irradiação, armazenamento e cozimento afetam significativamente os conteúdos de ácido ascórbico total (TAA), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroxiascórbico (DHAA) em batatas. Verificaram também que o cozimento das refeições pode ser mais prejudicial para o teor de vitamina C em batata do que irradiação e, segundo eles, o cozimento não diminuiu o teor de vitamina C em batatas irradiadas em maior proporção do que o controle não irradiado.

Pela presente trabalho, pode concluir que a irradiação de alimentos prontos pra consumo, supercongelados, não interfere nos teores de vitamina C (Tabela 15) e que a perda verificada deveu-se mais ao período de armazenamento em condições ambiente. Desta forma, torna-se importante que as refeições sejam armazenadas em boas condições de embalagem e temperatura para se obter o máximo benefício com o tratamento por irradiação

As perdas de vitaminas pela irradiação ionizante são comparáveis às perdas induzidas pelo cozimento e armazenamento. Em geral, a vitamina C e tiamina de refeições prontas como:

carne suína assada, batatas cozidas e seleta de legumes, é baixa. Como estas refeições são preparadas principalmente para consumo por idosos e doentes, os fabricantes poderão considerar a suplementação de vitamina das refeições para melhorar seu valor nutricional (NARVAIZ et al., 2003)

Na Tabela 16 estão os valores médios e significâncias para Carotenóides e apontam uma diminuição da variável em cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias.

Tabela 16 - Valores médios ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) e significâncias da variável carotenóides de cenoura refogada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	0,61 Aa	0,47 Aa	0,38 BCa	0,22 Ca	0,42 a
30 kGy	0,58 Aa	0,42 Ab	0,11 BCb	0,10 Ca	0,30 b
50 kGy	0,49 Aa	0,40 Ab	0,18 Bb	0,12 Ba	0,30 b
Médias	0,56A	0,43B	0,22C	0,14C	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Carotenóides são pigmentos naturais, cuja coloração varia do amarelo ao vermelho, em frutas, flores e algumas raízes como a cenoura, entre outras variedades de alimentos. Entre os efeitos benéficos ao organismo humanos está aumento da resposta imunológica (LIMA et al., 2009).

A vitamina A, também conhecida pela designação de retinol é um álcool primário, polietilênico, lipossolúvel e grande capacidade reativa por molécula insaturada; instável devido à oxidação e à ação do calor. Sua Absorção diz respeito à vitamina pré-formada do ácido retinóico e do β -caroteno ou outros carotenóides (FRANCO, 1999). O β -caroteno é encontrado principalmente na cenoura e batata doce (HENDLER, 1994).

Os carotenóides estão entre os constituintes mais apreciados dos alimentos, sendo as cores vermelha e amarela as que dão maior contribuição para a qualidade e atração dos alimentos, além dos benefícios à saúde (CAMPOS et al., 2008)

A perda de carotenóides é maior pela irradiação (10 kGy), somente quando comparada ao tratamento combinado de aquecimento e irradiação (SPOTO, 2007). Pilon (2003) encontrou em cenoura minimamente processada, embalada sob ar atmosférico, vácuo, e atmosfera modificada

os valores de 3,5; 4,0 e 2,8 mg/100g. Segundo este autor, tanto a embalagem a vácuo quanto a atmosfera modificada exerceram proteção à retenção do β -caroteno em relação à embalagem sob ar atmosférico.

Lima et al. (2004), verificaram que cenoura pronta para o consumo e irradiada com baixas doses de radiação apresentaram perdas de carotenóide não só devido ao efeito da radiação mas também ao tempo de armazenamento.

No presente trabalho verificou-se que a perda de carotenóides deveu-se mais ao período de armazenamento, tanto em condições de congelamento (controle) como em condições ambiente (irradiados). Pode-se também verificar que, o supergongelamento durante o processo de irradiação foi fator primordial na conservação dos valores nutritivos dos alimentos, pois as análises realizadas logo após a irradiação (1 dia) não apresentaram diferenças nos valores de carotenóides entre os tratamentos.

2.3.1.3 Carne grelhada (bife de alcatra)

Como pode-se observar na Tabela 17, na análise de carnes não houve alteração significativa nas variáveis de umidade e força de cisalhamento. Na variável cor, ocorreram alterações significativas, nos valores L e b*; no valor a* somente no período e tratamento, assim como nos dados de TBARS, sem diferença significativa na interação entre período e tratamento.

Tabela 17 - Valores de F e significância das variáveis físico-químicas de carne grelhada (filé de alcatra) submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Causa de Variação	Umidade	Valor L	Valor a*	Valor b*	TBARS	Força
Período	3,07ns	22,43 *	4,85 *	3,16 *	3,42 *	0,90 ns
Tratamento	0,62 ns	34,77 *	64,44 *	2,42 *	30,19 *	1,11 ns
Período x Tratamento	1,13 ns	4,41 *	2,01 ns	1,56 *	1,35 ns	1,89 ns
Coefficiente de Variação (%)	27,05	9,47	14,88	40,11	34,02	21,64

ns= não significativo * = significativo ao nível de 5%

Pelos valores de umidade, em percentagem, dos filés de alcatra grelhados (Tabela 18), verificou-se que não houve variação entre tratamentos e nem durante o período de armazenamento. O valor médio geral da umidade do filé grelhado foi de 37,81%.

Tabela 18 - Valores médios em porcentagem e significâncias da variável umidade de carne submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	41,90 Aa	37,37 Aa	30,50 Aa	32,30 Aa	35,45 a
30 kGy	46,37 Aa	35,55 Aa	45,57 Aa	26,16 Aa	38,41 a
50 kGy	40,67 Aa	44,55 Aa	38,17 Aa	33,74 Aa	39,28 a
Médias	42,98 A	39,16 A	38,08 A	30,64 A	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Irawati et al. (2003) em trabalhos com irradiação para aumento da vida útil de alimentos prontos para o consumo (peixe, frango e carne) utilizaram a dose de 45 kGy e observaram que nenhuma alteração significativa na umidade, proteínas totais, teor de gordura, pH e vitaminas foi encontrada nas amostras irradiadas. Todos os parâmetros foram relativamente estáveis durante a armazenagem, não indicando qualquer indício de deterioração. As amostras esterilizadas, armazenadas a 35°C por até um ano também se mostraram de boa qualidade sensorial, e sem estufamento das embalagens. Ainda segundo esses os autores os testes realizados mensalmente indicaram que as amostras foram esterilizadas. Peixe cozido em panela de pressão, embalado a vácuo e irradiados com uma dose mínima de 45 kGy em gelo seco, podem ser armazenados por mais de um ano à temperatura ambiente.

Na Tabela 19 constam os valores médios e significâncias da Força de cisalhamento. Pelos dados analisados não se observam alterações nesse parâmetro, nem para tratamentos ou para períodos de armazenamento.

Tabela 19 - Médias e significâncias da variável Força de cisalhamento (kgf) da carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	4,90 Aa	6,11 Aa	4,57 Aa	4,65 Aa	5,06 a
30 kGy	4,68 Aa	5,52 Aa	5,23 Aa	3,92 Aa	4,84 a
50 kGy	4,65 Aa	3,77 Aa	4,84 Aa	4,79 Aa	4,51 a
Médias	4,74 A	5,13 A	4,88 A	4,45 A	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A força de cisalhamento é uma medida física (kgf), objetiva, que avalia a textura e conseqüentemente o grau de maciez de um produto. Na carne ou produtos derivados, a maciez, juntamente com a suculência, é extremamente importante, pois dita a qualidade do produto.

A irradiação pode causar amolecimento da carne, com degradação excessiva do tecido conjuntivo, resultando em uma textura friável (WIERBICKI, 1980; GIROUX; LACROIX, 1998). O colágeno é suscetível à desagregação em unidades menores, especialmente em doses superiores a 50 kGy (GIROUX; LACROIX, 1998). Embora a carne irradiada seja tenra, é freqüentemente percebida pelos consumidores como seca/não suculenta, possivelmente devido à textura friável. A textura de carne é, no entanto, também afetada por vários outros fatores além da irradiação. Esses fatores incluem a raça, as características da fibra muscular, suculência, temperatura e método de cocção (KINSMAN et al, 1994).

A esterilização por irradiação em carne pré-cozida e embalada hermeticamente fornece um produto de vida útil estável, que pode ser armazenado por longos períodos de tempo sem refrigeração. Altas doses de irradiação têm um efeito de tenderização sobre a carne e este efeito pode ser usado para cortes de carne mais duras (WIERBICKI, 1980; GIROUX; LACROIX, 1998).

Como um alimento de vida útil estável, as carnes radapertizadas recebem constantemente avaliações para textura, particularmente em comparação com os itens processados termicamente (WIERBICKI, 1980). Outros autores (SHULTS et al., 1975; SHULTS; WIERBICKI, 1976) descobriram que costeleta e lombo de porco irradiado estavam significativamente mais macias do que os produtos não irradiados. Expondo a carne ao congelamento antes e durante o tratamento por irradiação o efeito de tenderização da irradiação pode ser neutralizado (SEGAR et al., 1981).

No presente trabalho, verificou-se que não houve diferença de maciez entre os diferentes tratamentos e nem durante o período de armazenamento. Murano et al., 1998, também observaram que os hambúrgueres de todos os tratamentos, irradiados e não irradiados, mantiveram a maciez após 5 meses graças ao tipo de embalagem que evitou trocas gasosas.

A deterioração mais importante que ocorre nos lipídeos, e que define a vida útil do produto, é a rancidez, também conhecida como oxidação lipídica. Para o controle de qualidade de óleos, gorduras, e produtos que os apresentem em sua composição, como carnes e produtos

cárneos, são usados testes como TBARS (ácido tiobarbitúrico), que fornece dados importantes sobre o estado oxidativo do alimento analisado.

Pelos resultados observados na Tabela 20, verifica-se que houve variação na TBARS dos bifes de alcatra submetidos a diferentes tratamentos e armazenados por 90 dias. Pela média houve um aumento significativo deste valor em função da alta radiação aplicada, em relação ao tratamento controle. O mesmo aconteceu para todos os tratamentos em função do período de armazenamento, mas com valores não tão expressivos como os devidos à radiação. O provável motivo desta alteração foi a presença do oxigênio dentro das embalagens uma vez que não foi utilizado vácuo e nem atmosferas modificadas. Isto indica que somente a baixa temperatura utilizada (-78 °C) durante a irradiação não foi suficiente para cessar os efeitos colaterais da radiação, conforme fizeram Spoto et al. (1999) e Bruyn (2000), que aplicaram vácuo e atmosfera controlada em seus produtos irradiados, respectivamente.

Tabela 20 - Médias e significâncias da variável TBARS de carne grelhada (bife de alcatra) submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias. Valores em mg de malonaldeído por kg de carne

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	0,99 Aa	1,15 Aa	1,29 Aa	1,06 Aa	1,12 a
30 kGy	2,63 Aa	3,39 Aa	3,90 Aa	3,03 Aa	3,24 b
50 kGy	1,69 Aa	3,62 Aa	2,80 Aa	3,33 Aa	2,86 b
Médias	1,77 A	2,72 B	2,67 AB	2,47 AB	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Altas doses de irradiação fazem com que haja alterações no sabor de produtos cárneos devido à formação de produtos de radiólise. A formação de produtos de radiólise pode ser reduzida significativamente pela irradiação em temperaturas abaixo de 20°C negativos (WIERBICKI, 1980; SEAGARS et al., 1981). Oxidação lipídica também contribui para as alterações de sabor em produtos cárneos irradiado (CAIN, 1958; WIERBICKI, 1980; AHN; JO; OLSON, 2000).

Noomhorm et al. (2003) mostraram que doses de radiação menores que 10 kGy, não causaram nenhuma alteração significativa nos lipídios, embora os conteúdos de TBA e carbonila em hambúrguer de frango irradiado fossem superiores ao controle.

Em carne suína semi-desidratada, Noomhorm et al. (2003) não verificaram diferença entre os tratamentos irradiados e o controle, com os valores de TBA inferior a 0,2 em todos os níveis de umidade. Esses resultados mostraram que irradiação não teve nenhum efeito significativo em lipídios. Durante 5 meses de armazenamento, valores TBA permaneceram relativamente inalterados. Isso foi possível porque todos os produtos foram embalados em atmosfera modificada (N₂ e CO₂ de 80% e 20%, respectivamente) e o filme de embalagem utilizado foi uma boa barreira ao O₂ e vapor de água. Esses produtos também tinham um nível de baixa umidade (18 a 25%), portanto, a reação de oxidação causada pelo O₂ e água foi limitada.

Murano et al. (1998), não relataram diferença na oxidação lipídica na primeira semana de armazenamento, independentemente da atmosfera de embalagem, entre carne moída irradiada e não irradiada. No entanto, depois de uma semana, valores mais altos de TBA foram observados nas amostras irradiadas (2 kGy) e armazenadas na presença de O₂, bem como nas irradiadas a vácuo, mas armazenadas ao ar.

Um dos principais atributos que mais afeta o consumidor sob o aspecto da qualidade é a cor, e esta característica interfere bastante na aceitação do produto (GRANATO; MASSON, 2010).

Através dos valores de L*, a* e b*, das Tabelas 21, 22 e 23, observa-se que houve aumento da luminosidade e diminuição do valor a*, para as amostras irradiadas em relação ao controle durante o período de armazenamento. Essas alterações conferiram aos filés de alcatra irradiado uma coloração mais palida em relação ao controle.

Tabela 21 - Médias e significâncias da variável L* de carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	29,97 Aa	28,67 Aa	32,10 Aa	31,55 Aa	30,57 a
30 kGy	29,16 Aa	35,38 Aab	43,21 Bb	47,82 Bb	38,89 b
50 kGy	34,23 Aa	37,71 Ab	42,73 Bb	44,55 Bb	39,80 b
Médias	31,12 A	33,92 A	39,35 B	41,31 B	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 22 - Médias e significâncias da variável a* de carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	6,42 Aa	5,98 Aa	6,67 Aa	7,19 Aa	6,56 a
30 kGy	4,61 Ab	3,07 Ab	4,09 Ab	4,19 Ab	3,99 b
50 kGy	5,11 Aab	3,75 Ab	3,93 Ab	3,56 Ab	4,09 b
Médias	5,38 A	4,26 B	4,90 AB	4,98 A	

* Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 23 - Médias e significâncias da variável b* de carne grelhada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 90 dias

Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)				Médias
	1	30	60	90	
Controle	10,53 Aa	9,39 Aa	10,84 Aa	11,01 Aa	10,44 a
30 kGy	8,42 Aa	12,97 Aa	15,74 Aab	18,14 Aa	13,81 a
50 kGy	10,21 Aa	13,68 Aa	16,26 Ab	18,12 Aa	14,57 a
Médias	9,74 A	12,01 A	14,28 AB	15,76B	

Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A maior parte dos trabalhos sobre este aspecto relata resultados com baixas doses de radiação em carnes muitas vezes cruas. Paul, Venugopal e Nair (1990) relataram que carne de carneiro irradiada com 2,5 kGy obteve maior aceitabilidade de cor do que a não irradiada ou irradiada com 1 kGy.

Quando os efeitos de 5 e 10 kGy sobre a cor de carnes bovina tratadas com e sem nitrito foram investigados, verificou-se que irradiação não teve nenhum efeito prejudicial sobre a cor ou sabor de qualquer amostras curadas (SHAHIDI; PEGG; SHAMSUZZAMAN, 1991). Fu et al. (1995a) atestaram que os valores de cor instrumental e contagens de avaliação visual não mostraram nenhuma diferença de cor entre filés controle e aqueles irradiados a 1,5 kGy. No entanto, tem sido observado um aumento da cor vermelha de carne suína devido à irradiação (GRANT; PATTERSON, 1991; FU et al., 1995b). Como já comentado, no presente trabalho houve um clareamento dos filés grelhados quando irradiados com doses de radiação radapertizantes.

2.3.2 Análise microbiológica molecular

2.3.2.1 Clonagem e Identificação dos microrganismos por biblioteca do gene 16S rRNA

Para a elaboração da biblioteca genômica foram utilizados os pratos prontos de todos os tratamentos (controle, 30 kGy e 50 kGy) do primeiro dia de armazenamento (1 dia). Pela análise das sequências, utilizando o programa BLAST, do NCBI, foi possível detectar as bactérias presentes nos alimentos do tratamento controle (Tabela 24). Nos alimentos dos pratos prontos irradiados não houve, nesta primeira avaliação, detecção de bactérias.

Tabela 24 - Microrganismos identificados na análise de biblioteca genômica das amostras controle (0 kGy) de 1 dia de armazenamento

(continua)				
Microrganismo	Tamanho do fragmento	Identidade (%)	Evalue	Gen bank (locus)
<i>Atopococcus</i> sp. CCUG 48253 16S rRNA gene, type strain CCUG 48253T	1055	100	0,0	AJ634917.1
<i>Azoarcus denitrificans</i> Td-3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	516	100	3e ⁻¹⁴³	L33693.1
<i>Rhodocyclus</i> sp. HOD 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	512	98	4e ⁻¹⁴²	AY691423.1
<i>Perchlorate-reducing bacterium</i> CR 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	512	98	4e ⁻¹⁴²	AY530552.1
<i>Rhodocyclaceae bacterium</i> MP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	98	6e ⁻¹⁴¹	EU849004.2
<i>Propionivibrio</i> sp. Smarlab 3302698 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	512	98	4e ⁻¹⁴²	AY643079.1
<i>Vogesella perlucida</i> strain DS-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	804	100	0,0	EF626691.1

Tabela 24 - Microrganismos identificados na análise de biblioteca genômica das amostras controle (0 kGy) de 1 dia de armazenamento

(continuação)				
Microrganismo	Tamanho do fragmento	Identidade (%)	Evalue	Gen bank (locus)
<i>Vogesella indigofera</i> strain QXL0711M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	710	100	0,0	FJ808728.1
<i>Chromobacterium sp.</i> HT27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	688	100	0,0	DQ415656.1
<i>Gulbenkiania mobilis</i> 16S rRNA gene, type strain E4FC31T	688	100	0,0	AM29491.1
<i>Aquaspirillum putridiconchylum</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	682	100	0,0	AB076000.1
<i>Aquitalea magnusonii</i> strain 2C1-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	665	95	0,0	GU169028.1
<i>Mercury-resistant bacterium</i> mCFU 581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	660	100	0,0	DQ401856.1
<i>Lactococcus fujiensis</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain	739	100	0,0	AB485959.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. lactis strain NM155-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	675	97	0,0	HM218614.1
<i>Moraxella osloensis</i> strain S44-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	422	100	$6e^{-115}$	HM217989.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain VC334S1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	490	100	$2e^{-135}$	HM452104.1

Tabela 24 - Microrganismos identificados na análise de biblioteca genômica das amostras controle (0 kGy) de 1 dia de armazenamento

(continuação)

Microrganismo	Tamanho do fragmento	Identidade (%)	Evalue	Gen bank (locus)
<i>Staphylococcus caprae</i> strain BAC2039 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	490	100	$2e^{-135}$	HM355630.1
<i>Pseudomonas fragi</i> strain PF-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	898	100	0,0	GM599487.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain BA39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	100	0,0	FJ263919.1
<i>Acinetobacter baumannii</i> strain T169 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	100	0,0	EU841004.1
<i>Acinetobacter genomosp.</i> 13TU strain LUH 3144 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	941	100	0,0	FJ860870.1
<i>Bacillus foraminis</i> strain OI 178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	701	94	0,0	GU117659.1
<i>Listeria grayi</i> strain H3506 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	94	0,0	EU545979.1
<i>Sporosarcina</i> sp. PaD3.20b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	688	93	0,0	GQ392011.1
<i>Bacillus nealsonii</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NCCP-28	688	93	0,0	AB547220.1

Tabela 24 - Microrganismos identificados na análise de biblioteca genômica das amostras controle (0 kGy) de 1 dia de armazenamento

(continuação)				
Microrganismo	Tamanho do fragmento	Identidade (%)	Evalue	Gen bank (locus)
<i>Bacillus</i> [pallidus] strain CW 7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	688	93	0,0	EU364818
<i>Bacillus niacini</i> strain Y2S4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	688	93	0,0	EU221374
<i>Bacillus circulans</i> strain WZ12 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	688	93	0,0	EU364818.1
<i>Bacillus benzoeverans</i> 'PapViBa6b' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	688	93	0,0	DQ346735.1
<i>Bacillus benzoeverans</i> 'PapViBa5c' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	688	93	0,0	DQ346733.1
<i>Enterobacter amnigenus</i> strain KNUC183 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	928	100	0,0	EF474091.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain RBE2CD-96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	928	100	0,0	EF111247.1
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. dissolvens strain SDM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	881	100	0,0	HQ434623.1
<i>Citrobacter freundii</i> strain MHF ENV 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	881	100	0,0	GU584226.1

Tabela 24 - Microrganismos identificados na análise de biblioteca genômica das amostras controle (0 kGy) de 1 dia de armazenamento

(continuação)				
Microrganismo	Tamanho do fragmento	Identidade (%)	Evalue	Gen bank (locus)
<i>Klebsiella</i> sp. 13T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	881	100	0,0	GU139546.1
<i>Leclercia adecarboxylata</i> strain LMG 2803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	881	100	0,0	GQ856082.1
<i>Sphaerotilus natans</i> strain 380 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	564	100	0,0	GU591793.1
<i>Acinetobacter johnsonii</i> partial 16S rRNA gene, strain WAB1932	900	99	0,0	AM184271.1
<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain mol20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	891	100	0,0	HM031481.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> strain LMG 9461 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	625	100	8e ⁻¹⁷⁶	EU091462.1
<i>Firmicutes bacterium</i> M71_D119 partial 16S rRNA gene, isolate M71_D119	701	93	0,0	FM992816.1
<i>Leptothrix mobilis</i> partial 16S rRNA gene, strain OTSz_M_218	520	100	3e ⁻¹⁴⁴	FM886890.1
<i>Comamonas aquatica</i> strain SB21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	100	3e ⁻¹⁴⁴	HQ610452.1
<i>Comamonas terrigena</i> DNA for 16S rRNA, strain IAM 12052T	989	100	0,0	AB021418.1

Tabela 24 - Microrganismos identificados na análise de biblioteca genômica das amostras controle (0 kGy) de 1 dia de armazenamento

Microrganismo	Tamanho do fragmento	Identidade (%)	Evalue	(conclusão)
				Gen bank (locus)
<i>Acidovorax</i> sp. PC-2010 partial 16S rRNA gene, isolate 14	933	100	0,0	FN999945.1
<i>Siboglinum</i> sp. associated bacterium partial 16S rRNA gene, clone W9_11	942	100	0,0	FR682099.2
<i>Delftia</i> sp. R-41392 partial 16S rRNA gene, strain R-41392	942	100	0,0	FR682935.1
<i>Acinetobacter baylyi</i> strain NBRAJG74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	100	0,0	EU734817.1

Após a identificação, classificaram-se as bactérias por Ordem, Família e Gênero. Pode-se verificar que das Ordens encontradas nas amostras controle de 1 dia, foram *Lactobacillale* (6,15%), *Rhodocyclales* (7,69%), *Bhurkolderiales* (12,31%), *Neisseriales* (15,38%), *Pseudomonadales* (16,92%), *Enterobacteriales* (18,46%), e em maior porcentagem *Bacillale* (23,08), como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Porcentagem de bactérias encontradas nas amostras de controle, de 1 dia, classificadas por ordem

Nove famílias estão classificadas na Ordem *Bacillales*, as quais são: *Alicyclobacillaceae*, *Bacillaceae*, *Listeriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Staphylococcaceae* e *Thermoactinomycetaceae*. Todas as famílias apresentam 51 Gêneros (YAKOUBOU, XU, CÔTE, 2010).

Entre as famílias, encontrou-se *Streptococcaceae* (5%), *Staphylococcaceae* (5%), *Rhodocyclaceae* (8%), outros (9%) *Comamonadaceae* (9%), *Bacillaceae* (14%), *Neisseriaceae* (15%), *Moraxillaceae* (17%), e *Enterobacteriaceae* (18%) (Figura 9).

Figura 9 – Porcentagem de bactérias encontradas nas amostras controle, de 1 dia, classificadas por famílias

As bactérias da Família das Enterobactérias apresentam as seguintes características: bacilos Gram negativos, aeróbios facultativos, redutores de nitrato, fermentadores de glicose, e oxidase negativos, metabolizadores de diversas substâncias (carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos), e são produtores de catalase. Além disso, usam como fontes únicas de carbono, nitrogênio, glicose e amônia, respectivamente. Produzem grande variedade de fatores virulentos potentes. Frutas, vegetais, grãos e animais, como homem, são alguns dos reservatórios de *Enterobacteriaceae*, de modo que, no homem, essas bactérias habitam o trato intestinal, como integrante da flora normal ou agente infectante (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; SEGABINAZI et al., 2005).

Como se pode observar na Figura 10, com relação ao Gênero, foram encontrados os seguintes: *Atopococcus*, *Chromobacterium*, *Listeria*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Sporosarcina*, *Klebsciella*, *Leclercia*, *Citrobacter*, *Propionivibrio*, *Delfitia*, *Aquaspirillum*, *Acidovorax*, *Gulbenkiania*, *Aquitella*, *Azoarcus*, *Rhodocyclus*, *Lactococcus*, *Pantoeae*, *Vogesella*, *Staphylococcus*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* e *Bacillus*.

Figura 10 - Classificação por gênero, das bactérias encontradas na amostra controle (1 dia), com as respectivas porcentagens

Destas bactérias, as de interesse em alimentos são:

- ***Listeria*:**

Denominada assim a partir dos anos 40, são bactérias Gram positivas, não formadoras de esporos, bastonetes não ácidos, catalases positivos, produtora de ácido láctico a partir de glicose, fermentadoras de açúcar, tolerante em meio com alta concentração salina (10 a 20%). São bactérias anaeróbias facultativas, com faixa de crescimento ótimo entre 2,5 a 44°C (célula vegetativa com maior resistência térmica) pH entre 5 a 9, atividade de água (Aa) ótima ao redor de 0,97. Sobrevivem à níveis recomendados de 120mg/kg de nitrato de sódio, e 3% de cloreto de sódio, representando assim um problema para indústrias. Carne bovina, produtos cárneos crus e termoprocessados, produtos de origem vegetal, e refeições preparadas são alguns dos alimentos onde já se isolou esta bactéria. No homem, *Listeria* se apresenta colonizando o intestino, podendo se disseminar para o sistema nervoso central, causando manifestações, como meningite, encefalite e abscesso. Além disso, podem afetar o coração, provocando a endocardite, manifestação mais rara da listeriose. Impossível é a eliminação total de *Listeria* de alimentos, exceto com uso de técnicas como irradiação (JAY, 2000; GUENTHER et al., 2009; FRANCO; LANDGRAF, 2002; HOBBS; ROBERTS, 1998).

- ***Moraxella*:**

Bacilos Gram negativos curtos, com metabolismo oxidativo, e não formador de ácido a partir de glicose; são também sensíveis à penicilina, oxidase positiva e apresenta 40 a 46% mol G+C de DNA, características que os difere do *Acinetobacter*, gênero de bactérias que frequentemente se classifica a *Moraxella*. Carnes frescas e moídas de hambúrguer são alguns dos reservatórios das bactérias desse gênero. Com relação a irradiação, este microrganismo apresenta maior resistência quando comparado a outras bactérias Gram negativas (JAY, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

- ***Pseudomonas*:**

Bacilos retos ou curvos, Gram negativos, *Pseudomonas* é um grupo heterogêneo, quando se observa sua composição de DNA, com 58 a 70mol% de G+C. Largamente distribuídos entre os alimentos, como carnes e vegetais; constituem o maior gênero de bactéria encontrados em alimentos refrigerados e congelados, devido a diversas espécies e linhagens psicotróficas sendo, portanto encontrada em alimentos contaminados após o seu processamento. Apresenta intensa atividade metabólica nos alimentos, usando diversos compostos orgânicos, e produzem pigmentos hidrossolúveis, enzimas proteolíticas, lipolíticas, e pectolíticas. Está associado à má higiene das mãos, sendo que já foi isolado sob aliança de enfermeiros (JAY, 2000; HOBBS; ROBERTS, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

- ***Klebsiella*:**

Classificada na família *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella* são coliformes, bacilos móveis, produtores de cápsulas; reações indesejáveis são produzidas por essas bactérias nos alimentos; não há evidências sobre sua patogenicidade quando veiculadas por alimentos. Carne é um dos alimentos onde pode se encontrar esta bactéria (JAY, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

- ***Citrobacter*:**

Pertencem ao grupo dos coliformes, as espécies deste gênero, que são bacilos móveis, usam como fonte única de carbono citrato. São fermentadores de lactose, Gram

negativos, anaeróbias facultativas. O conteúdo de DNA é 50 a 52mol% G+C. Colonizam o intestino; a principal espécie isolada de alimentos é a *C. freundii*, comuns, assim como outras espécies, em vegetais e carnes frescas. Não há evidências sobre sua importância como agente causador de DTAs (JAY, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

- ***Lactococcus*:**

Classificado anteriormente no gênero *Streptococcus*, como cocos Gram positivos, e bacilos Gram positivos do gênero *Lactobacillus*, *Lactococcus* são bactérias Gram positivas, não móveis, crescem a 10°C, catalase negativos; são produtores de ácido láctico a partir de glicose, obtendo fermentação como produto final. Compreendem células esféricas ou ovóides, ocorrem sozinhos, pares, ou formando correntes. Não são considerados patogênicos, mas apresentam importância no processamento industrial (JAY, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

- ***Staphylococcus*:**

Bactérias Gram positivas, catalase positivas, cocóides, anaeróbios facultativos, ocorrem isolados, aos pares, ou aglomerados. Alimentos curados são potenciais para este gênero de bactérias, devido à tolerância que apresenta à concentrações de 10 a 20% de NaCl, e a nitrato. Faixa pH entre 4 a 9,0, com pH ótimo na faixa entre 6 e 7, onde ocorre o maior crescimento. Mesófilos, a faixa temperatura ótima desse gênero de bactérias é de 7 a 48°C; entre 10 e 45°C ocorre a produção das enterotoxinas, com ótimo entre 40 a 45°C. Com relação à Aa, estafilococos são as únicas bactérias não halófilas que apresentam valores inferiores, sendo que o 0,86 é valor mínimo, apesar de já ter apresentado crescimento em 0,83 de Aa. Os principais alimentos associados a contaminação por bactérias deste gênero são: carnes cozidas, dentre outros tipos de alimentos. A intoxicação estafilocócica é causada pelas toxinas produzidas pela bactéria, conhecidas como enterotoxinas, que são termo resistentes, o que os torna importante para indústria de processamento de alimentos; estima-se que uma quantidade de 0,015 a 0,375 µg de enterotoxina por quilo de peso corpóreo é necessário para causar sintomatologia em seres humanos. Os sintomas, que se manifestam de 30 minutos a 8 horas, com uma média de 2 a 4 horas após a ingestão do alimento, variam conforme a susceptibilidade do indivíduo, e

compreendem: náuseas, vômitos, câimbras abdominais, diarreia e sudorese (JAY, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

- ***Enterobacter*:**

Bactérias entéricas Gram negativas, classificada na família de *Enterobacteriaceae*. São bacilos imóveis, colonizam o intestino, e pertencem ao grupo dos coliformes. Apesar de causarem deterioração nos alimentos, sua ação patogênica ainda é questionável (JAY, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

- ***Acinetobacter*:**

Gram negativos, coco bacilos ou bacilos curvos, geralmente em cadeias curtas ou aos pares, as bactérias do gênero *Acinetobacter* são mesófilos e aeróbios estritos. Carnes é um dos produtos do qual já se isolou esta bactéria.

- ***Bacillus*:**

Gênero que compreende bactérias com características diferentes, *Bacillus* são bacilos Gram positivos esporulados, flagelados e peritríquios; podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas; com relação à temperatura, existem psicotróficas, mesófilas ou termófilas, com temperatura mínima entre -5 e 45°C, e máxima de 25 a 75°C; faixa de pH entre 2,0 a 8,0 é o mínimo para multiplicação; 2 a 25% é a faixa de tolerância das bactérias deste gênero ao cloreto de sódio. Solo, água, fezes, e variados alimentos são alguns reservatórios deste microrganismo, cujo gênero apresenta duas espécies patogênicas (*B. anthracis* – causa anthrax, e *B. cereus* – causa gastroenterite de origem alimentar), diversas espécies deterioradoras de alimentos (*B. subtilis*, *B. coagulans*, e *B. stearothermophilus*, e outras espécies usadas na produção de alimentos. Cereais e outros alimentos são fontes frequentes de esporos produzidos pelos bacilos, os quais sobrevivem após cozimento e em armazenamento em temperaturas favoráveis, e subsequentemente germinam em bacilos, que crescem e produzem toxinas suficientes para causar doenças, que podem se manifestar de duas formas distintas: a síndrome diarreica (carnes e vegetais cozidos, dentre outros) e síndrome emética (associada a alimentos farináceos) (JAY, 2000; HOBBS; ROBERTS, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

2.3.2.2 T-RFLP (Terminal Restrict Fragment Length Polimorfism)

Para as análises por T-RFLP, foram comparadas as amostras com os organismos padrões com, ao menos, 3 enzimas de restrição, que devem apresentar o mesmo comprimento de T-RFLP, de modo que os locais onde as enzimas digerem a fita dupla de DNA não são únicos para cada grupo taxonômico específico. Assim, como se usou somente uma enzima de restrição, considerou-se que as amostras estavam possivelmente contaminadas.

Na amostra controle cenoura de 30 dias, não foi observada contaminação pelos padrões *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. typhimurium*, como mostra a Figura 11. Porém, observou-se possível contaminação dessa amostra com padrão de *B. cereus* (Figura 12).

Figura 11 - Eletoferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, das amostras de controle cenoura de 30 dias, identificando ausência de contaminação por *E. coli*, *L. monocytogenes*, e *S. typhimurium*

Figura 12 - Eletroferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, da amostra de controle cenoura de 30 dias, identificando possível contaminação por *Bacillus cereus*. H= altura do pico; S= tamanho do fragmento

Pela análise da Figura 13, pode-se observar que não houve contaminação pelos padrões de *E. coli*, *L. monocytogenes*, e *S. typhimurium* nas amostras de controle mix de 30 dias. Somente para *B. cereus* mostrou uma possível contaminação (Figura 14).

Figura 13 - Eletroferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, das amostras de controle mix de 30 dias, identificando ausência de contaminação por *E. coli*, *L. monocytogenes*, e *S. typhimurium*

Figura 14 - Eletróferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, da amostra de controle mix de 30 dias, identificando possível contaminação por *Bacillus cereus*, H= altura do pico; S= tamanho do fragmento

Nas amostras de controle (0kGy) de 60 dias não foi identificado contaminação por *E. coli*, *L. monocytogenes*, e *S. Thyphimurium*, mas uma possível contaminação ocorreu por *B. cereus* (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Eletróferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, das amostras de controle cenoura de 60 dias, identificando ausência de contaminação por *E. coli*, *L. monocytogenes*, e *S. thyphimurium*

Figura 16 - Eletroferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, das amostras de controle cenoura de 60 dias, identificando possível contaminação por contaminação por *Bacillus cereus*. H= altura do pico; S= tamanho do fragmento

Pelo eletroferograma da Figura 17 verifica-se que, nas amostras de controle (0 kGy) mix de 60 dias, não houve contaminação por *E. coli*, *L. monocytogenes*, e *S. Thyphimurium*. Já pelo resultado do eletroferograma da Figura 18, observa-se uma possível contaminação por *B. cereus*.

Figura 17 - Eletroferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, das amostras de controle mix de 60 dias, identificando ausência de contaminação por *E. coli*, *L. monocytogenes*, e *S. thyphimurium*

Figura 18 - Eletroferograma dos T-RFLPs analisados através do software Peak Scanner (v.1.0), usando a enzima de restrição *Hha I*, das amostras de controle mix de 60 dias, identificando possível contaminação por contaminação por *Bacillus cereus*. H= altura do pico; S= tamanho do fragmento

2.3.2.3 Quantificação de PCR em Tempo Real (q-PCR)

2.3.3.3.1 PCR quantitativo para gene 16S rRNA

A temperatura de melting média, na análise de PCR quantitativo para o gene 16S rRNA, foi de 88,37°C. A eficiência de amplificação foi de 107,3%, com um valor de R^2 de 0,996. Na curva de melting houve somente um pico, considerando, portanto, que ocorreu amplificação de especificidade dos produtos (Figuras 19 e 20). Para a confirmação e validação dos resultados, usou-se o gene 16S rRNA, considerando que ocorrem múltiplas cópias do gene ribossomal por célula bacteriana.

Figura 19 - Curva de Melting da reação para confirmação da amplificação específica do fragmento do gene 16S rRNA das amostras analisadas, e do clone de biblioteca genômica contendo o gene ribossomal utilizado na padronização

Figura 20 - Curva de amplificação padrão e quantificação do gene 16S rRNA das amostras. Os valores de Cts (cycle threshold) obtidos na reação foram utilizados para normalização dos dados. Pontos em vermelho: curva padrão a partir de clone de biblioteca contendo o gene ribossomal. A eficiência obtida para esta curva foi 2,07 (1,073 + 0,996) e a equação da reta obtida foi: $y = -3,158x + 32,995$

2.3.3.3.2 Quantificação absoluta das amostras

A quantificação do gene ribossomal bacteriano 16S rRNA das amostras de pratos prontos foi possível devido a análise de PCR quantitativa em tempo real. O número de cópias do gene ribossomal nas amostras variou bastante, indicando que houve contaminação (Figura 21).

Figura 21 - Gráficos com a quantificação (abundância relativa) dos genes 16S rRNA das amostras de pratos prontos com 30, 60 e 90 dias, analisadas (indicados no eixo horizontal) por PCR em tempo real. Eixo vertical: escala logarítmica de (cópias do gene g⁻¹). Barra de erros representa o erro padrão ($n=3$)

O lote de pratos prontos do primeiro dia de armazenamento, ou seja, logo após a irradiação, foi analisado microbiologicamente sob o ponto de vista qualitativo, uma vez que os alimentos foram misturados para a retirada do material para se obter a biblioteca genômica. Nestas circunstâncias, somente o prato pronto não irradiado (controle) apresentou contaminação bacteriana. Contaminações fúngicas e por leveduras não foram observadas em nenhum dos tratamentos.

Neste trabalho, a PCR quantitativa em tempo real indicou que os alimentos que não foram irradiados (controle) e os irradiados com a dose 30 kGy, apresentaram contaminações bacterianas ao longo dos períodos de armazenamento. Os alimentos que apresentaram maior contaminação foram as cenouras refogadas e a carne grelhada. Nenhuma amostra de arroz apresentou contaminação.

Portanto, uma refeição esterilizada e segura para pacientes imunodeprimidos deve receber uma dose de radiação superior a 30 kGy e, que no presente caso, foi 50 kGy. Esta dose de radiação, em todo o período de armazenamento dos pratos prontos em condições ambiente, manteve os alimentos esterilizados. Deve-se ressaltar também o papel importante da embalagem que evitou a entrada de contaminantes, preservando as condições estéreis iniciais.

3 CONCLUSÕES

Do presente estudo foram sugeridas as seguintes conclusões:

- O teor de umidade dos alimentos componentes do prato pronto não foi afetado nem pelo congelamento (controle), nem pela radiação permanecendo inalterado.
- A análise instrumental da cor mostra que as cenouras refogadas irradiadas tornam-se mais claras com o tempo de armazenamento.
- O refogado de cenoura tem seu pH reduzido pelo processo de irradiação.
- A acidez titulável aumenta inicialmente com a irradiação, mas decai proporcionalmente com o período de armazenamento.
- Concentração de carotenóides são reduzidos tanto devido à irradiação como em função do tempo de armazenamento.
- Teores de compostos fenólicos e de carotenóides não são afetados inicialmente pela irradiação mas diminuem com o armazenamento.
- A irradiação provoca escurecimento/amarelamento do arroz, tornando-se mais acentuado durante o período de armazenamento.
- O filé de alcatra grelhado tem sua maciez preservada durante todo o armazenamento tanto nos tratamentos irradiados como no controle congelado.
- Clareamento da cor natural de filé grelhado (controle) em função do tratamento de irradiação.
- Rancificação da carne em função da radiação aplicada (30 e 50 kGy) e também em função do período de armazenamento para todos os tratamentos.
- Presença de bactérias nos controles (sem irradiação), mas parcialmente eliminadas com a irradiação.
- Dose de 50 kGy é a mais eficiente em condições ambiente ao longo de 90 dias de armazenamento.
- Na dose de 30 kGy, a partir de 30 dias detecta a presença de bactérias na carne.
- A cenoura refogada apresenta contaminação sob o tratamento de 30 kGy. somente aos 90 dias.
- Preparo do arroz demonstra ser eficiente no controle de possíveis contaminantes.
- Predominância de contaminantes bacterianos dos gêneros *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Enterobacter*.
- A dose de radiação segura para esterilização é a de 50 kGy.

REFERÊNCIAS

- AHN, D.U.; JO, C.; OLSON, D.G., Analysis of volatile compounds and the sensory characteristics of irradiated pork. **Meat Science**, Toronto, v. 54, p. 209-215, 2000.
- ALMEIDA, P.S.R.; SADDI, V.A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 382-386, 2007.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 33, p. 403–410, 1990.
- AMADOR, M.P.P. **Pesquisa e caracterização molecular de β -lactamases em bactérias isoladas de alimentos prontos-a-comer**. 2010. 241 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agro-industrial) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- AMANN, F.; LUDWING, W. Ribossomal RNA – Targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p. 555-565, 2000.
- _____; _____; SCHELEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AMI, S. **Avaliação de parâmetros cinéticos de uma cultura mista de microrganismos destinados à eliminação autotrófica de nitrogênio via oxidação de tiosulfato**. 2008. 144p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of association of official analytical chemists**. 18th ed. Maryland, 2005. 1v.

APPLIED BIOSYSTEMS. **TaqMan® and SYBR® Green chemistries**. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>> Acesso em: 27 jun. 2011.

BÁRBARA, L. O novo conceito de alimentação hospitalar. In: **Food Service News**, n. 36, ago. / set., 2008. Disponível em: <www.foodservicenews.com.br/materia.php?id=244>. Acesso em: 05 abr. 2009.

BARROS, N.E.F.; OLIVEIRA, E.M.M.; MARIN, V.A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n.1, p. 85-92, jan./fev., 2008.

BEHRENS, J.H.; BARCELLOS, M.N.; FREWER, L.J.; NUNES, T.P.; LANDGRAF, M. Brazilian consumer views on food irradiation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Vienna, v. 10, p. 383-389, 2009.

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L.; GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 34-38, 2005.

BERTOL, T. **Efeito da combinação do ácido acético e láctico na qualidade da cenoura (*Dacus carota*) processada pelo calor**. 2000. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. ; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/decreto-lei_986_69.pdf. Acesso em: 14 jun. 2011.

_____. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. In: **Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 20 jun. 2011

_____. Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. In: **Resolução RDC nº 21, 26 de janeiro de 2001.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21_01rdc.htm. Acesso em: 2 abr. 2009.

BRESLER, M.M.; ROSSER, S.J.; BASRAN, A.; BRUCE, N.C. Gene cloning and nucleotide sequencing and properties of a esterase from *Rhodococcus* sp. Strain MB 1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 904-908, 2000.

BREWER, M.S. Irradiation effects on meat flavor: a review. **Meat Science**, Oxford, v. 81, p.1-14, 2009.

BRUNETTO, M.A.; GOMES, M.O.S.; JEREMIAS, J.T.; OLIVEIRA, L.D.; CARCIOFFI, A.C. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, n. 35, supl. 2, p. 230 - 232, 2007.

BRUYN, I. N. The application of high dose irradiation in South Africa. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, p. 223 - 225, 2000.

CAFFARO FILHO, R.A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; DURRANT, L. R. Quantitative analysis of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: peak height data showed to be more reproducible than peak area. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 736-738, 2007.

CAIN, R.F. Acceptability of fresh and precooked radiated meats. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 23, p. 603-609, 1958.

CAMBELL M. K.; FARREL, S.O. **Bioquímica**. São Paulo: Thompson Learning. 2007. 2 v.

CAMPOS, F.M.; MIRATINO, H.S.D.; SABARENSE, C.M.; PINHEIRO-SANTANA, H.M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v.19, n. 4, p. 481-490, out. / dez. 2008.

CAPUANO, D.V.; LAZZARINI, M.P.T.; GIACOMETTI-JUNIOR, E.; TAKAYANAGUI, O. M. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto – SP, 2000. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 687-695, 2008.

CASTELLANI, L.; DUARTE, K. M. R. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 5, n. 2, Ed. 149, Art. 1000, 2011. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=885>. Acesso em: 8 maio 2011.

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA - CENA. Irradiação de Alimentos. In: **Divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais**, 2007. Disponível em: <www.cena.usp.br/irradiacao/index.asp>. Acesso em: 07 abr. 2011.

CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C.S.; CANAFÍSTULA, F.G.S; ALVES, F.S.F.; FROTA, I.M.A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n.1, p. 49-56, 2010.

CHIRINOS, R.R.O. **Determinação da dose da radiação gama para a destruição de *Escherichia coli* 0157:H7 em hambúrguer bovino**. São Paulo, 1999. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CIÉSLA, K.; ROOS, Y.; GLUSZEWSKI, W. Denaturation processes in gamma irradiated proteins studied by differential scanning calorimetry. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 58, p. 233-243, 2000.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 169-172, 2007.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. **The cell: a molecular approach**. Boston: Sinauer, 2003. 739 p.

COSTA, M.A.F.; COSTA, M.F.B. **Biossegurança de OGM: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publit, 2009. 384p.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, p. 491-503, 1999.

CRAWFORD, L.M.; RUFF, E.H. A review of safety of cold pasteurization through irradiation. **Journal of Food Control**, Ames, vol. 7, n. 2, p. 87-97, 1996.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J. E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: a comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

CURY, J.C. **Diversidade de Bactéria Archea em solos de mangue e marisma**. 2006. 147p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. 1995. 142p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1995. 464 p.

_____. Food irradiation past, present and future. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 63, p. 211–215, 2002.

EHLERMANN, D.A. The radura-terminology and food irradiation. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 526-528, 2009.

FORNAZARI, A.C.Z. **Alternativas para controle e detecção de microrganismos relacionados com a deterioração de tipo blown pack em carnes embaladas à vácuo refrigeradas**. 2010. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2010.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**, São Paulo: Atheneu, 2002. 182 p.

FRÖDER, H. **Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de *Salmonella sp.* por PCR – tempo real e por transcriptase reversa – PCR – tempo real**. 2008. 131p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2008.

FU, A.H.; SEBRANEK, J.G.; MURANO, E.A., Survival of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* O157: H7 and quality changes after irradiation of beefsteaks and ground beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, p. 972-977, 1995a.

_____, Survival of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* O157: H7 and quality attributes of cooked pork chops and cured ham after irradiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, p. 1001-1005, 1995b.

FURGERI, C. **Efeito do processamento por radiação de ^{60}Co na erva mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2009. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FURUTA, M.; DOHMARU, T.; KATAYAMA, T.; TORATANI, H.; TAKEDA, A. Detection of irradiated frozen meat and poultry using carbon monoxide gas as a probe. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 40, p. 1099–1100, 1992.

GANDRA, E.A; GANDRA, T.K.V; MELLO, W.S; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GIROUX, M.; LACROIX, M. Nutritional adequacy of irradiated meat – a review. **Food Research International**, Weinheim, v.31, p. 257–264. 1998.

GRAHAM, W.D.; ANNETTE, D. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in potatoes (*Solanum tuberosum*) and strawberries using ion-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 594, p.187-194, 1992.

GRANATO, D.; MASSON, M.L. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.4 n. 30, p. 1090-1096, out.-dez. 2010.

GRANT, I.R.; PATTERSON, M.F. Effect of irradiation and modified atmosphere packaging on the microbiological and sensory quality of pork stored at refrigeration temperature, **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 26, p. 507-519, 1991.

GRECZ, N.; ROWLEY, D.B.; MATSUYAMA, A. The action of radiation on bacteria and viruses. In: JOSEPHSON; E.S.; PETERSON, M.S. (Ed.). **Preservaron of foods by ionizing radiation**. Boca Raton: CRC Press, 1983, v. 2, p. 167- 218.

GUENTER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.J. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 5, n. 1, p. 93-100, Jan. 2009.

HASHIN, I.B.; RESSURECCION, A.V.A.; MCWATTERS, K.V. Descriptive sensory analysis of irradiated frozen or refrigerated chicken. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 3, p. 461-464, 1995.

HERNANDES, N.K.; CONEGLIAN, R.C.C.; GODOY, R.L.O.; VITAL, H.C., FREIRE JUNIOR, M. Testes sensoriais de aceitação da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* spp. *Vulgaris* L.), cv. early wonder, minimamente processada e irradiada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 64-68, ago. 2007.

HERNÁNDEZ-MACEDO, M.L.; BARANCELLI, G.V.; CONTRERAS – CASTILLO, C.J. Microbial deterioration of vaccum-packaged chilled beef cuts and techniquesf for microbiota detectionand characterization: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 1–11, 2011.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 376p.

HODGE, J E. Chemistry of browning reactions in model systems. **Journal of the Agricultural and Food Chemestry**, Easton, v. 1, n. 15, p. 928-943, 1953.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. **Use of irradiation as a quarantine treatment of food and agricultural commodities**. Viena, 1992. 66p.

INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP OF FOOD IRRADIATION - ICGFI. **Fatos sobre a irradiação de alimentos**. Belo Horizonte: CDTN, 1999. 46p.

IRAWATI, Z. ; MAHA, M.A.; ANSORI, N.; NURCAHYA, C.M.; ANAS, F. Development of shelf-stable foods fish pepes, chicken and meat dishes through radiation processing. In: IAEA-TECDOC-1337 - **Radiation processing for safe, shelf-stable and ready-to-eat food**. Vienna, 2003. p. 85-99

JACOBS, M.B. **The chemical analysis of food and food products**. New York: Van Nostrand, 1958. 979 p.

JAY, M.J. **Modern food microbiology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 2000. 701p.

KANATT, S.R.; PAUL, P.; D'SOUZA, S.F.; THOMAS, P. Effect of gama irradiation on the lipid peroxidation in chicken, lamb and buffalo meat during chilled storage. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 17, p. 283-294, 1997.

KILCAST, D. Effect of irradiation on vitamins. **Food chemistry**, Barking, v. 49, n. 2, p. 157-164, 1994.

KIM, J.H.; AHN, H.J.; YOOK, H.S.; KIM, K.S.; RHEE, M.S.; RYU, G.H.; BYUN, M.W. Color, flavor, and sensory characteristics of gamma-irradiated salted and fermented anchovy sauce. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 179–187, 2004.

KINSMAN, D.M.; KOTULA, A.W.; BREIDENSTEIN, B.C. (Eds.). **Muscle foods: meat, poultry and seafood technology**, New York: Chapman & Hall, 1994. 374p.

KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós colheita de frutas de clima temperado**. 2ª ed., Campinas: Livraria Rural, 2002. 214p.

KUME, T.; FURUTA, M.; TODORIKI, S.; UENOMAYAMA, N.; KOBAYASHI, Y. Status of food irradiation in the world. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 78, p. 222–226, 2009.

LAGUNAS-SOLAR, M. C. Radiation processing of foods: an overview of scientific principles and current status. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 2, p. 186-192, 1995.

LANDGRAF, M. **Fundamentos e perspectivas da irradiação de alimentos visando ao aumento de sua segurança e qualidade microbiológica**. 2002. 87p. Tese (Livre Docência em Microbiologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL - LANARA. **Métodos de análises oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, 1981.

LEÃO, R.M. **Trinta anos em CENA**. São Paulo: EDUSP, 1997. 192 p.

LEE, M; SEBRANEK, L.G; OLSON, D.G; DICKSON, L.S. Irradiation and packaging of fresh meat and poultry. **Journal of Food Protection**, Ames, v. S9, n. 1, p. 62-72, 1996.

LEE, J.W.; OH, S.H.; KIM, J.H.; BYUNA, E.H.; KIMB, M.R.; BAEKC, M.; BYUNA, M.W. The effect of irradiation temperature on the non-enzymatic browning reaction in cooked rice. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 76, p. 886–892, 2007.

LEE, Y.S.; OH, S.H.; LEE, J.W.; KIM, J.H.; RHEE, C.O.; LEE, H.K.; BYUNA, M.W. Effects of gamma irradiation on quality of cooked rice. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 582–586, 2004.

LEITE, L.H.M.; WEISSMANN, W.; VEGGI, A.B. Reprodutibilidade de um questionário para avaliação de conhecimentos, percepções e prática em segurança sanitária alimentar de portadores de HIV/AIDS ambulatorias. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 971-974, abr. 2007.

LEME JUNIOR, J.; MALAVOLTA, E. Determinação fotométrica de ácido ascórbico. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, v. 7, p. 115-129, 1950.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology. Plant cell Membranes**, Academic Press: London v. 148, n. 22, p. 350-373, 1987.

LIGGETT, R.W.; FEAZEL, C.E.; ELLENGER, J.Y. Food color changes, browning reaction initiated by gamma irradiation. **Journal of the Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 7, n. 4, p. 277-280, Apr.1959.

LIMA, K.S.C.; GROSSI, J.L.S.; LIMA, A.L.S.; ALVES, P.F.M.P.; CONEGLIAN, R.C.C.; GODOY, R.L.O.; SABAA-SRUR, A.U.O. Efeito da irradiação ionizante na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucus carota* L.) cv. nantes, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 202-208, maio / ago. 2001.

_____.; FREITAS, L.C.; LIMA, A.L.S.; DELLA-MODESTA, R.C.; GODOY, R.L.O. Efeito de baixas doses de radiação nos carotenóides majoritários em cenouras prontas para o consumo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 183-193, abr. / jun. 2004.

LIMA, A.L.S.; LIMA, K.S.C.; COELHO, M. J.; SILVA, J.M.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, S. Avaliação dos efeitos da radiação gama nos teores de carotenóides, ácido ascórbico e açúcares do fruto buriti do brejo (*Mauritia flexuosa* L.). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 3, p. 649-654, 2009.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

MASEFIELD, J.; DIETZ, G.R. Food irradiation: the evaluation of commercialization opportunities. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 19, n. 3, p. 259-272, 1983.

MATSUDA, A. H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para preservação de própolis**. Dissertação. 2002. 72p. Dissertação. (Mestrado em Ciências, na área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MCSEENEY, N.J.; PLUMB, J.J.; TILBURY, A.L; NYEBOER, H.J.; SUMICH, M.E.; MCKINNON, A.J.; FRANZMANN, P.D.; SUTTON, D.; KAKASONEN, A.H. Comparison of microbial communities in pilot-scale bioreactors treating Bayer liquor organic wastes. **Biodegradation**, v. 22, p. 397-407, 2011

MEDIANNIKOV, O.; SEKEYOVA, Z.; BIRG, M.L.; RAOULT, D. A novel obligate intracellular gamma-proteobacterium associated with ixodid ticks, *diploickettsia massiliensis*, gen. nov., sp. nov. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 7, July 2010.

MEIRELLES, P.G.; BIAZON, L.; ONO, M.A.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y. . Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 617-628, out. / dez., 2006.

MENDES, L.W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso – SP**. 2009. 141p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MEXIS, S.F.; KONTOMINAS, M.G. Effect of γ -irradiation on the physicochemical and sensory properties of walnuts (*Juglans regia* L.). **European Food Research and Technology**, New York, v. 228, n. 5, p. 823–831, 2009.

MIGUEL, A.L.C.S. F. **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL**. 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

MINAZZI-RODRIGUES, R.S.; PENTEADO, M.V.C. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A em hortaliças folhosas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 39-52, jan. / jun. 1989.

MOOK. P; O'BRIEN, S.J; GILLESPIE, I.A. Concurrent conditions and human listeriosis, England and Wales, 1999–2009. **Emerging Infection Diseases**. v. 17, n. 1, Jan. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/EID/content/17/1/38.htm>>. Acesso em: 14 maio 2011.

MURANO, P.S.; MURANO, E.A.; OLSON, D.G. Irradiated ground beef: sensory and quality changes during storage under various packaging conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 3, p. 548-551, 1998.

MONK, J.D.; BEUCHAT, L.R; DOYLE, M.P. Irradiation inactivation of foodborne microorganisms. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 2, p. 197-208, 1995.

MOLINS, R. **Food irradiation: principles and applications**. New York: John Willey, 2001. 469p.

MORAES, I.R. O uso da radiação ionizante no controle e prevenção de doenças transmitidas por alimentos. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n.75, p. 36-39, ago. 2000.

MOSELEY, B. Irradiation of food. **Food Control**, Guildford, v. 1, n. 4, p. 205-207, 1990.

MYAGUSKU, L. **O efeito da irradiação na qualidade e no aumento da vida útil de cortes de peito de frango (*Pectoralis major*) refrigerados**. 2001. 95p. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

NARVAIZ, P.; GIMÉNEZ, P.; HORAK, C.; ADEIL-PIETRANERA, M.; KAIRIYAMA, E.; GRONOSTAJSKI, D.; RIBETTO, A.M. Feasibility of obtaining safe, shelf-stable, nutritive and more varied whole rations for immunosuppressed patients by gamma irradiation. In: IAEA-TECDOC-1337 - **Radiation processing for safe, shelf-stable and ready-to-eat food**. Vienna, 2003. p. 62-84.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina, Especial Oncologia**, São Paulo, v. 67, supl. 10, p. 7-19, nov. 2010.

NOOMHORM, A.; VONGSAWASDI, P.; INPRASIT, C.; YAMPRAYOON, J.; SIRISOONTARALAK, P.; INGLES, M.E.A.; ADULPICHIT, A. Impact of irradiation on the quality of processed meat and fishery products. In: IAEA-TECDOC-1337 - **Radiation processing for safe, shelf-stable and ready-to-eat food**. Vienna, 2003. p. 167-193.

O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C.; OLSON, D.G. Impact of irradiation on the safety and quality of poultry and meat products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 442-457, 2008.

OETTERER, M; REGITANO d'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. 612p.

OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, Porto Alegre, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

ORNELLAS, C.B.D.; GONSALVES, M.P.J.; SILVA, P.R.; MARTINS, R.T. Atitude do consumidor frente à irradiação de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 211-213. jan. / mar. 2006.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PAUL, P.; VENUGOPAL, V.; NAIR, P.M. Shelf life enhancement of lamb meat under refrigeration by gamma irradiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 865-866, 1990.

PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. São Paulo: Makron Books, 1996. 2 v.

PEREIRA, J.C.G. **Listeriose nos alimentos**. 2006. 56p. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária de Alimentos) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, dez. 2006.

PEREIRA, R.A.; MACAGNAN, M; SCHWAR, P.; CANAL, C.W.; SCHIMIDT, V. Estabelecimento de um protocolo de soroaglutinação rápida (SAR) para detecção de anticorpos para *Salmonella typhimurium* em suínos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 677-682, jul.-set. 2010.

PIETRANERA, A.M.S.; NARVAIZ, P.; HORAK, C.; KAIRIYAMA, E. Irradiated icecreams for immunosuppressed patients. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 66, p. 357-365, 2003.

PILON, L. **Estabelecimento da vida útil de hortaliças minimamente processadas sob atmosfera modificada e refrigeração**. 2003. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PLACEK, V.; SVOBODA, V.; BARTONICEK, B.; ROSMUS, J; CAMRA, M. C. Shelf stable food through high dose irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 71, p. 513–516, 2004.

POLIZEL, G.G. **O uso da radiação no controle microbiológico dos alimentos de origem animal**. 2006. 38p. Monografia. (Especialização em Higiene e inspeção de produtos de origem animal e Vigilância Sanitária em Alimentos) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2006.

PRYKE, D.C.; TAYLOR, R.R. The use of irradiated food for immunosuppressed patients in the United Kingdom. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, Birmingham, v. 8, p. 411-416, 1995.

RADOMYSKI, T.; MURANO, E.A.; OLSON, P.G.; MURANO, P.S. Elimination of pathogens of significance in food by low dose irradiation: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, n. 1, p. 73-86, 1994.

RAFFI, J.; AGNEL, J., Influence of the physical structure of irradiated starches on their electron spin resonance spectra kinetics. **Journal of Physical Chemistry**, Madison, v. 87, p. 2369–2373, 1983.

RAJKOWSKI, K.T.; NIEBUHR, S.E.; DICKSON, J. Effect of gamma or beta radiation on *Salmonella* DT 104 in ground pork. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, n. 6, p. 1430-1433, 2006.

RAZSKAZOVSKIY Y.; DEBIJE M.G.; HOWERTON S.B.; WILLIAMS L.D.; BERNHARD W.A. Strand breaks in x-irradiated crystalline DNA: Alternating CG oligomers. **Radiation Resistance Research**, New York, v. 160, p. 334-339, 2003.

REECE, R. J. **Analysis of genes and genomes**. Chichester: Wiley, 2004. 469 p.

REIS-JUNIOR., F.B.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. **Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 33p.

ROCHA, L L. **Estudo de comunidades bacterianas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE e seleção de cepas com potencial para degradar hidorcarbonetos**. 2008. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROCHA, M.A.A.; SOUSA, Q.F. **O uso de alimentos irradiados no tratamento de pacientes com baixa imunidade**. Curso Técnico em Radiologia Médica, UNIP, Brasília, 16p, 2007. Disponível em: < <http://www.crtr01.org.br/html/pdf/irradiacao.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2009.

ROUSHDI, M.; HARRAS, A.; EL-MELIGI, A.; BASSIM, M. Effect of high dose of gamma rays on corn grains. I. Influence on the chemical composition of whole grains and the technological process of starch and by-product isolation. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 58 n. 2, p. 110–112, 1981.

SAMBROOK, J.; FRISTCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 545 p.

SÁNCHEZ-BEL, P.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; MARTÍNEZ-MADRID, M.C. Sensorial and chemical quality of electron beam irradiated almonds (*Prunus amygdalus*). **LWT-Food Science and technology**, Amsterdam, v. 41, p. 442–449, 2008.

SANTILLO, A.G. **Efeitos da radiação ionizante nas propriedades nutricionais das uvas de mesa Benitaka e uvas passa escuras**. 2011. 96p. Dissertação. (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS, A.F.; 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 carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n.2, p. 200-205, maio / ago., 2003.

SANTOS, F.R.; ORTEGA, J.M. **Bioinformática aplicada à genômica**. Manuscrito para capítulo do Biowork IV, 2008. Disponível em: <<http://www2.dcce.ufs.br/images/3/33/Bio03.pdf>> Acesso em: 27 jun. 2011.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Saude. Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE. **Manual de doenças transmitidas por alimentos e água: *Bacillus cereus* / intoxicação alimentar**. Texto organizado pela Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2002. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/BACILLUS_CEREUS.htm>. Acesso em: 20 jun. 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS: user's guide**. Version 6.11. 4th ed. Cary: SAS Institute, 1996. 956p

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomics units and estimating species richness. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SEGARS, R.A.; CARDELLO, A.V.; COHEN, J.S. Objective and subjective texture evaluation of irradiation sterilised meat products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 999-1003, 1981.

SEGABINAZI, S. D.; FLÔRES, M.L.; BARCELOS, A.S.; JACOBSEN, G.; ELTZ, R.D. Bactérias de família Enterocabteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 51-55, 2005.

SHAHIDI, F.; PEGG, R.B.; SHAMSUZZAMAN, K. Colour and oxidative stability of nitrite free cured meat after gamma irradiation, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 5, p. 1450-1452, 1991.

SHULTS, G.W.; WIERBICKI, E. Effects of salt and sodium tripolyphosphate on texture, organic volatiles and sensory characteristics of irradiated and nonirradiated pork rolls. **TR-75-116-FEL**, Natick: United States Army Natick Laboratories. p. 1-24, 1976.

_____; HOWKER, J.J.; WIERBICKI, E. Changes in sensory characteristics, texture and organic volatiles of irradiated and nonirradiated pork chops. **TR-74-22-FEL**, Natick: United States Army Natick Laboratories, p. 1-18, 1975.

SINGER, C.S. **Propriedades físico-químicas, reológicas, entálpicas e de panificação da farinha obtida de trigo irradiado**. 2006. 120 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JUNIOR, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.16, p. 144-158, 1965.

SILVA, A.A.; ABREU, F.M.; FERREIRA, D.O.L.; DAMASCENO, D.C.; DIAS, A.; GONÇALVES, R.C. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos (TBARS) em eritrócitos de ovinos anêmicos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, Suplemento 1, p. 282-285, 2009. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte.

SILVA, A. L. F.; ROZA, C.R. Uso da irradiação de alimentos: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n.1, p. 49 a 56, jan.-jun. 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V C A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M H. SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3a ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety: food science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p 75-95.

SMITH, J.S.; PILLAI, S. Irradiation and food safety. **Food Technology**, Chicago, v. 58, n. 11, p. 48-55, 2004.

SOMMERS, C.H.; BOYD, G. Variations in the radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with complex ready-to-eat food products. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 75, p. 773-778, 2006.

SORENSEN, G.; JORGENSEN, S.S.. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung**, New York, v. 202, n. 3, p. 205-210, 1996.

SOUZA, A.S. **Efeitos da irradiação na composição e propriedades funcionais da soja**. Campinas, 2006. 120 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição, área de Nutrição Experimental Aplicada a Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SOUZA, K.C.G. **Irradiação de queijos: revisão de literatura**. 2007. 28 p. Monografia (Pós-graduação “*Lato Sensu*” em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2007.

SPOLAORE, A.J G.; GERMANO, P.M. L.; GERMANO, M.I.S. Irradiação de alimentos. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.(ed.) **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, p. 421-442.

SPOTO, M.H.F. **Análise crítica de obra acadêmica: qualidade sensorial de frutas – laranja pera (*Citrus sinensis*) da matéria-prima ao suco**. 2007. 156p. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

_____; GALO, C.R.; ALCARDE, A.R.; GURGEL, M.S.A.; BLUMER, L.; WALDER, J.M.M.; DOMARCO, R. E. Gamma irradiation in the control of pathogenic bacteria in refrigerated ground chicken meat. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 389-394, jul.-set. 1999.

STEWART, E.M.. Food irradiation chemistry. In: MOLINS, R.A. **Food irradiation: principles and applications**. New York: Wiley Interscience, 2001. p. 37–76.

TAUB, I.A.; KARIELIAN, R.A.; HALLIDAY, J.W. Radiation chemistry of high protein food irradiated at low temperature. **Food preservation by irradiation**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1978, p. 371–384.

TAUXE, R.V. Food safety and irradiation: protecting the public from foodborne infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 3, p. 516-521, June 2001.

THAYER, D.W., BOYD, G., FOX, J., LAKRITZ, L., HAMPSON, J.W. Variations in radiation sensitivity of food-borne pathogens associated with the suspending meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, p. 63–67, 1995.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINGS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TOMASIK, P.; ZARANYIKA, M.F. Nonconventional methods of modification of starch. In: HORTON, D. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. New York: Academic, 1995. p. 296–298.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

URBAIN, W. M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986. 351 p.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium for the microbiological examination of foods**. Washington DC: American Public Health Association, 1992. 1219p.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, Leinfelden-Echterdingen, v. 72, p.1084–1087, 1970.

_____. Evaluation of direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Fette Seifen Anstrichmittel**, Leinfelden-Echterdingen, v. 77, p. 239–240, 1975.

WALDER, J.M.M. **Legislação brasileira sobre irradiação de alimentos**. Compilação. Apostila. Piracicaba: 2003. 37 p. Disponível em: < <http://apostilas.cena.usp.br/Julio/>>. Acesso em: 12 jul. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Safety and nutritional adequacy of irradiated food**. Geneva, 1994. 161 p.

_____. **Wholesomeness of irradiated food**. (TRS 659). Geneva, Switzland, 1981. 36p.

_____. **High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy**. (TRS 890), Geneva, Switzland, 1999. 103p.

WIERBICKI, E. Technology of irradiated preserved meats. **Proceedings of 26th European Meeting of Meat Research Workers**, Colorado Springs, 1980. p.194-197.

XANDE, A. C. ***Escherichia coli* enterohemorrágica**. 2007. 17p. Monografia. (Especialização em Inspeção e Higiene de Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária de Alimentos) - Instituto Qualitas, Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2007.

YAKHOUBOU, S.; XU, D.; CÔTE, J-C. Phylogeny of the order Bacillales from 3` 16S rDNA e 5` 16S-23S ITS nucleotide sequences. **Natural Science**, Irvine ,v. 2, n. 9, p. 990-997, 2010.

ZHU, M.J.; MENDONÇA, A.; LEE, E.J.; AHN, D.U. Influence of irradiation and storage on the quality of ready-to-eat turkey breast rolls. **Poultry Science**, Savoy, v. 83, p.1462-1466, 2004.