INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE FERMENTO
BIOLÓGICO SECO POR RADIAÇÃO GAMA

INGRID TRAETE SABUNDJIAN

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

Orientadora:
Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio

SÃO PAULO
2007

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE FERMENTO
BIOLÓGICO SECO POR RADIAÇÃO GAMA

INGRID TRAETE SABUNDJIAN

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

Orientadora:
Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio

SÃO PAULO
2007

*À minha mãe Sílvia, as minhas
irmãs, Michelle e Thatiane, a minha querida
tia Gaianê e ao meu grande amor Thiago
Luiz pela paciência, incentivo e carinho que
por muitas vezes deu-me forças para trilhar
este caminho cheio de obstáculos.*

Agradecimentos

À Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio por permitir que eu fizesse parte deste maravilhoso grupo de trabalho e também pela compreensão, amizade, incentivo e carinho.

Ao IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), representado pelo Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo gerente do CTR, pela Dra. Maria Helena de Oliveira Sampa e Dra. Margarida Hamada, chefes de departamento do CTR, pelo apoio financeiro que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Benedito Corrêa por compartilhar conhecimentos, ceder seu laboratório e equipamentos, os quais foram essenciais para a concretização desta pesquisa.

À Dra. Mariza Landgraf pela ajuda e conselhos no desenvolvimento prático e teórico desta dissertação.

Aos meus colegas, Débora, Gustavo, Juliana, Mariana, Michel, Priscila, Reginaldo, Ricardo, Rosamaria e Simone por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem para uma melhor elaboração desta dissertação.

A Tatiana, técnica de laboratório do ICB, por me auxiliar em momentos decisivos do desenvolvimento deste trabalho.

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira por auxiliarem no processo de irradiação das amostras.

À Nelson Minori Omi por sua paciência e pelo fornecimento de informações e recursos na área de informática.

À Dra. Sueli Borrelly pelo empréstimo de equipamentos essenciais para o desenvolvimento da parte experimental desta pesquisa.

Aos demais funcionários, pós-graduandos e estagiários agradeço pela troca de experiências, conselhos e sugestões.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, sem o qual, não seria possível o desenvolvimento desta dissertação.

Aos familiares:

A minha mãe Sílvia pelo amor incondicional, pela paciência, incentivo, compreensão e pela sua disposição para ouvir meus desabafos e confissões.

As minhas amadas irmãs Michelle e Thatiane pelos inesquecíveis momentos de descontração, pelo carinho e incentivo.

Ao meu grande amor Thiago Luiz pelo amor, paciência, carinho e incentivo.

As minhas tias, Gaianê e Cláudia, por me auxiliarem nos mais diversos momentos, pelas oportunidades e por acreditarem e confiarem na minha capacidade.

As minhas avós, Fairouz e Nilza e ao meu avô Gêiser por torcerem, rezarem, orarem por mim e por reconhecerem meu esforço e dedicação.

A minha tia Niélcia e às minhas primas Priscila e Patrícia por momentos de descontração inesquecíveis e pelo apoio emocional nas mais diversas situações.

A todos aqueles que colaboraram para a criação, desenvolvimento e conclusão deste trabalho os meus mais sinceros agradecimentos.

***“Destino não é questão de sorte, mas uma questão de escolha:
não é uma coisa que se espera, mas que se busca.”***

William Jennings Bryan

AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE FERMENTO BIOLÓGICO SECO POR RADIAÇÃO GAMA

Ingrid Traete Sabundjian

RESUMO

O trabalho desenvolvido teve com objetivos demonstrar se houve alteração no crescimento de UFC em placa e na viabilidade (método DF-BE) de leveduras e bactérias totais quando o fermento biológico seco foi tratado por diferentes doses de radiação gama e armazenado sob diferentes tempos de estocagem, determinar a dose D_{10} para bactérias Totais e Leveduras neste produto e analisar se o processamento deste produto promoveu algum benefício sem causar inviabilidade do mesmo. As diferentes amostras de fermento biológico foram irradiadas com doses de 0 (controle); 0,5; 1; 2 e 3kGy no Centro de Tecnologia das Radiações do (IPEN/CNEN – SP) em fonte de ^{60}Co (Gammacell-220), com taxa de dose de 3,51kGy/h. Após este procedimento amostras referentes a cada dose de radiação foram destinadas à análise microbiológica e ao teste de viabilidade enquanto as demais amostras foram armazenadas a temperatura ambiente (23°C). O aumento da dose de radiação provocou uma diminuição na contagem de UFC de leveduras, UFC de bactérias totais e também na frequência de células viáveis de leveduras, evidenciadas pelo método fluorescente DF-BE. Além da radiação o tempo de armazenamento também influenciou na redução da contagem de bactérias totais e na diminuição da frequência de células viáveis. De acordo com a análise de regressão linear simples, a dose de radiação necessária para eliminar 90% da população leveduriforme ficou entre 1,10 e 2,23kGy e para a população bacteriana variou entre 2,31 e 2,95kGy. Nos resultados são demonstrados claramente os pontos negativos da aplicação de radiação ionizante em fermento biológico seco, pois o intervalo de D_{10} encontrado para bactérias totais é superior ao encontrado para leveduras. Sendo assim, torna-se inviável a utilização deste recurso para a melhora da qualidade do produto, visto que para reduzirmos consideravelmente a população bacteriana necessariamente temos que diminuir a população leveduriforme. Com a redução das leveduras iremos alterar significativamente a qualidade e a viabilidade do produto.

EVALUATION OF THE PROCESSING OF DRY BIOLOGICAL FERMENT FOR GAMMA RADIATION

Ingrid Traete Sabundjian

ABSTRACT

The developed work had with objectives to demonstrate if it had alteration in the growth of UFC in plate and in the viability of yeasts and total bacteria when dry biological ferment was dealt with by different doses to gamma radiation and under different times storage, to determine the D_{10} dose for total bacteria and yeasts in this product and to analyzed the processing of this product it promoted some benefit without causing unfeasibility of exactly. The different samples of dry biological ferment had been irradiated at IPEN in a Gammacell – 220 source at 0.5; 1; 2 and 3kGy doses (dose-rate of 3.51kGy/h). This procedure referring samples to each dose of radiation had been after destined to the microbiological analysis and the test of viability while excessively the samples had been stored the ambient temperature (23°C). The increase of the dose of radiation caused a reduction in the counting of yeasts growth, of total bacteria growth and also in the frequency of viable yeast cells, demonstrated by FDA-EB fluorescent method. Beyond of radiation the storage time also it influenced in counting reduction of total bacteria and reduction of frequency of viable cells. According with the analysis of simple linear regression, the dose of radiation necessary to eliminate 90% of the yeast population was between 1.10 and 2.23kGy and for the bacterial population varied between 2.31 and 2.95kGy. These results demonstrated clearly the negative points of the application of ionizing radiation in dry biological ferment; therefore the interval of D_{10} found for total bacteria is superior to found for yeasts. Being thus, the use of this resource for the improvement of the product quality becomes impracticable, since to reduce significantly the bacterial population necessarily we have that to diminish the population of yeasts. With yeasts reduction of we will go significantly to modify the quality and the viability of product.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1.Fermento Biológico seco.....	03
2.2.Fungos: Bolores e Leveduras.....	05
2.3.Irradiação.....	06
2.4.Efeitos da radiação em microorganismos.....	12
2.5.Influência do Oxigênio no processamento por radiação.....	13
2.6.Influência da temperatura no processamento por radiação.....	14
2.7.Valor D ₁₀	15
2.8.Legislação Brasileira para Alimentos Irradiados.....	16
2.9.Legislação Brasileira para Fermentos.....	17
2.10.Teste de viabilidade com corantes fluorescentes.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. Amostras de Fermento Biológico Seco.....	22
4.2. Tratamento por radiação gama.....	23
4.3. Análise Microbiológica.....	24
4.3.1. Semeadura em profundidade.....	25
4.3.1.1. Leveduras.....	25
4.3.1.2. Bactérias.....	26
4.4. Teste de viabilidade com corantes fluorescentes.....	27
4.5. Cálculo do valor D ₁₀ (kGy) de Bactérias totais e Leveduras.....	29
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30

6. RESULTADOS.....	31
6.1.Contagem de UFC/g de leveduras e bactérias totais nas amostras controle e irradiadas a 0,5, 1, 2 e 3kGy de fermento biológico seco.....	31
6.2. Determinação do D ₁₀ de leveduras e bactérias totais em fermento biológico seco.....	38
6.3. Teste de viabilidade com corantes fluorescentes DF-BE.....	42
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONCLUSÕES.....	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto geral de colônias da levedura Colônias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em variados meios de cultura.....	03
Figura 2. Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em variados meios de cultura.....	03
Figura 3. Efeito Direto e Indireto da radiação ionizante sobre moléculas de DNA.....	09
Figura 4. Radiólise da Água com conseqüente formação de Radicais livres.....	10
Figura 5. Moléculas originadas a partir da união de radicais livres altamente reativos.....	10
Figura 6. Fórmula estrutural do Diacetato de Fluoresceína.....	19
Figura 7. Fórmula estrutural do Brometo de Etídio e Processo de intercalação entre o Brometo de Etídio e a molécula de DNA.....	19
Figura 8. Fonte de ^{60}Co do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.....	23
Figura 9. Procedimento realizado para análises microbiológicas no CTR.....	24
Figura 10. Semeadura em profundidade: Leveduras.....	25
Figura 11. Semeadura em profundidade: Bactérias Totais.....	26
Figura 12. Preparação para a realização do Teste de Viabilidade (DF-BE)	27
Figura 13. Teste de viabilidade: Preparação das lâminas.....	28
Figura 14. Representação esquemática das etapas do experimento	30
Figura 15. Número de UFC/g de leveduras presente na amostra 1 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.....	32
Figura 16. Número de UFC/g de leveduras presente na amostra 2 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.....	32
Figura 17. Número de UFC/g de leveduras presente na amostra 3 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.....	33
Figura 18. Gráfico contendo as médias das amostras 1, 2 e 3 em UFC/g de leveduras presentes no fermento biológico seco processado por diferentes doses de radiação e mantido sob distintos tempos de armazenamento.....	34
Figura 19. Número de UFC/g de bactérias totais presentes na amostra 1 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.....	35

Figura 20. Número de UFC/g de bactérias totais presentes na amostra 2 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.....	36
Figura 21. Número de UFC/g de bactérias totais presentes na amostra 3 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.....	36
Figura 22. Gráfico contendo as médias das amostras 1, 2 e 3 em UFC/g de bactérias totais presentes no fermento biológico seco processado por diferentes doses de radiação e mantido sob distintos tempos de armazenamento.....	37
Figura 23. Gráfico demonstrando o comportamento de leveduras constituintes da amostra 1 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.....	38
Figura 24. Gráfico demonstrando o comportamento de leveduras constituintes da amostra 2 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.....	39
Figura 25. Gráfico demonstrando o comportamento de leveduras constituintes da amostra 3 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.....	39
Figura 26. Gráfico demonstrando o comportamento de bactérias totais presentes na amostras 1 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.....	40
Figura 27. Gráfico demonstrando o comportamento de bactérias totais presentes na amostras 2 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.....	41
Figura 28. Gráfico demonstrando o comportamento de bactérias totais presentes na amostras 3 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.....	41
Figura 29. Células viáveis (verdes) e células não viáveis (vermelhas) de leveduras visualizadas pelo método de viabilidade com corantes fluorescentes (DF-BE).....	43
Figura 30. Percentuais de células viáveis de leveduras constituintes do fermento biológico seco na amostra 1 quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.....	43
Figura 31. Percentuais de células viáveis de leveduras constituintes do fermento biológico seco na amostra 2 quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.....	44
Figura 32. Percentuais de células viáveis de leveduras constituintes do fermento biológico seco na amostra 3 quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.....	44

Figura 33. Média dos percentuais de células viáveis de leveduras constituintes das 3 amostras de fermento biológico seco quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.....45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Número de UFC/g de leveduras das 3 amostras de fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 25°C por 5 dias.....	31
Tabela 2. Média de UFC/g de Leveduras das 3 amostras de Fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 25°C por 5 dias.....	33
Tabela 3. Número de UFC/g de bactérias totais das 3 amostras de fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 37°C por 48 horas.....	35
Tabela 4. Média de UFC/g de bactérias totais das 3 amostras de fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 37°C por 48 horas.....	37
Tabela 5. Efeito da radiação gama em leveduras constituintes de três amostras distintas de fermento biológico seco.....	38
Tabela 6. Efeito da radiação gama em bactérias totais presentes em três diferentes amostras de fermento biológico seco.....	40
Tabela 7. Frequência de células viáveis das 3 amostras de fermento biológico seco pelo método fluorescente (DF-BE) após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento.....	42
Tabela 8. Média da frequência de células viáveis das 3 amostras de fermento biológico seco pelo método fluorescente (DF-BE) após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento.....	45

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são importantes microorganismos utilizados nas mais diversas aplicações da indústria tecnológica (Chacharkar *et al.*, 1996; Sanz *et al.*, 2003). Esses organismos, geralmente, possuem sua importância voltada para sua habilidade de causar deterioração de determinados produtos, podendo conduzir muitas vezes a perdas de quantidades significativas de alimentos. Uma mesma espécie de levedura pode ser considerada benéfica para elaboração de um alimento e pode comportar-se como agente deteriorante em outros produtos. Como exemplo de leveduras fermentativas que contribuem positivamente para a obtenção de alimentos podemos citar a *Saccharomyces cerevisiae*. Este microorganismo participa do processo de elaboração de pães, cerveja, vinho e alguns queijos (Xavier *et al.*, 2006).

Atualmente, com o crescimento da competitividade industrial as atenções têm-se voltado cada vez mais para a qualidade dos produtos comercializados (Oliveira *et al.*, 2005). Durante o processo de produção, elaboração e armazenamento, qualquer alimento está sujeito à contaminação por substâncias tóxicas ou por bactérias patogênicas, vírus e parasitos (Catão *et al.*, 2001).

Para garantir a qualidade de um alimento, tanto do ponto de vista de saúde pública bem como para aumentar sua vida útil, existem vários métodos disponíveis para as indústrias alimentícias, sendo um deles a irradiação (Santos *et al.*, 2003). A irradiação de alimentos, hoje em dia, é considerada um tratamento versátil e efetivo para a preservação, desinfestação e descontaminação dos mais diversos produtos do setor alimentício (Chirinos *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2006).

A radiosensibilidade de microrganismos pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: temperatura do ambiente, atmosfera, pH, umidade do substrato e umidade relativa do ar (Hilmy *et al.*, 1995). Analisando a sensibilidade de microorganismos à radiação, Alcarde *et al.* (1997), Domarco *et al.* (1996) e Urbain (1986), afirmam que a dose suficiente para inviabilizar leveduras está, aproximadamente, na faixa de 4,65 a 20kGy, e que a dose de radiação para eliminar, especificamente, leveduras do gênero *Saccharomyces* encontra-se no intervalo entre 5,40-5,80kGy. Doses de 3 a 5kGy são capazes de eliminar potencialmente bactérias não

formadoras de esporos, enquanto que as demais apresentam uma redução em produtos alimentícios somente com doses acima de 3kGy (Spoto *et al.*, 1999).

No comércio internacional, a contaminação microbiana de produtos alimentícios acarreta rejeições de lotes de alimentos que podem chegar a uma proibição da importação destes produtos de países ou regiões específicas (Merican, 1996).

Em julho de 2005, um lote de fermento biológico seco foi analisado por órgãos oficiais do estado onde se encontrava o produto e constatou-se a presença de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira vigente (Brasil, 2001). A partir deste fato iniciamos as pesquisas com esta classe de produto. O tratamento do fermento biológico seco por radiação foi observado ao longo de 90 dias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fermento Biológico Seco

As transformações microbianas e em particular aquelas mediadas por fermento, têm sido largamente empregadas desde os primórdios da humanidade para a produção de pão, de laticínios e bebidas alcoólicas. Grande parte destas aplicações utilizavam culturas de microorganismos mistos, e dirigidas para operações biotecnológicas em áreas da agricultura e nutrição humana. A ação redutora da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1) foi observada pela primeira vez por Dumas em 1874 (Rodrigues *et al.*, 2001).

Figura 1. A: Aspecto geral de colônias da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. B: Colônias de *Saccharomyces cerevisiae* em meio de cultura líquido. 5000x.

Figura 2. Levedura *Saccharomyces cerevisiae* em variados meios de cultura.

As leveduras são empregadas, com frequência, em produtos de consumo diário, entre eles o pão e as bebidas alcoólicas, destacando-se as fermentadas e as posteriormente destiladas. Caracterizam – se por apresentarem alta resistência em condições ambiente, pH, presença de sais e temperatura de até, aproximadamente, 35°C. No processo de panificação, a função principal do fermento biológico é a de induzir a fermentação dos açúcares, produzindo CO₂, que é responsável pela formação dos alvéolos internos e pelo crescimento da massa (Lodder, 1971; Blumer, 2002).

Fermento biológico é um produto oriundo de culturas puras de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) por procedimento tecnológico adequado e empregado para dar sabor próprio, aumentar o volume e a porosidade dos produtos forneados. Os fermentos biológicos, de acordo com o seu teor de umidade, foram classificados em: fermento fresco e fermento seco, também conhecido como fermento desidratado e levedura seca (Brasil, 1977). O *Saccharomyces cerevisiae* é conhecido por sua capacidade de desdobrar a sacarose e maltose em álcool etílico (Silveira, 1995).

Para manter a viabilidade das leveduras por um longo tempo é necessário que ocorra um retardamento do metabolismo celular. A liofilização é considerada um dos mais efetivos métodos de preservação (Alexander, 1981; Staab & Jan, 1987; Balen *et al.*, 1989).

Este procedimento consiste na remoção do vapor de água diretamente de amostras congeladas e contínua secagem à vácuo, até a produção de um material estável. Apesar de promover uma alta taxa de mortalidade destes microorganismos, a viabilidade celular remanescente permanece estável durante o período de estocagem (Costa *et al.*, 1991; Alcarde *et al.*, 1997).

2.2. Fungos: Bolores e Leveduras

Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte. Os fungos são organismos heterotróficos isentos de clorofila, dependentes exclusivos de uma fonte externa de componentes orgânicos para suprir sua demanda energética. Esta característica confere a muitas espécies a necessidade de subsistência com organismos

superiores, na forma de parasitas ou saprófitas, vindo a constituir importantes contaminantes em alimentos, que desencadeiam processos de deterioração dos mesmos (Pelczar *et al.*, 1996; Minami, 2003; Bittencourt *et al.*, 2005).

Os bolores são compostos principalmente de filamentos ou hifas que em conjunto denominam-se micélio. As hifas podem ser septadas ou asseptadas; são ramificadas, longas e tubulares. As leveduras são, basicamente, estruturas unicelulares, formando colônias cremosas ou pastosas (Minami, 2003; Xavier *et al.*, 2006).

Os fungos encontram-se amplamente difundidos no ambiente. Assim, alguns alimentos são contaminados por estes microorganismos já durante o seu cultivo, colheita e armazenamento (Sant'Ana *et al.*, 2006).

Leveduras são importantes para o homem devido a suas propriedades de fermentar carboidratos, dissociando a glicose para produzir álcool etílico e dióxido de carbono. Assim, as leveduras são utilizadas pelos vinicultores como fontes de etanol, pelos panificadores como fonte de dióxido de carbono e pelos cervejeiros como fonte de ambas as substâncias (Raven *et al.*, 1996).

Bolores e leveduras se desenvolvem melhor em alimentos que possuem pH entre 4,0 e 4,5kGy, com atividade de água inferior a 0,94 e temperatura variando entre 25 e 28°C. A ocorrência de apenas um destes fatores já oferece melhores condições de desenvolvimento para os fungos do que para qualquer outro microorganismo (Leitão, 1998).

Alguns produtos, tais como maionese, suco de frutas e conservas, devido ao pH baixo ficam mais suscetíveis ao desenvolvimento de bolores e leveduras. Alimentos com elevados teores de açúcar ou sal também são alvos destes microorganismos (Franco & Landgraf, 2001).

Dentre os microorganismos envolvidos na contaminação de produtos muito ácidos, as leveduras são consideradas agentes potenciais de deterioração. Algumas delas apresentam metabolismo respiratório, oxidando diferentes substratos, particularmente carboidratos. Essas leveduras normalmente não são produtoras de gases e apresentam

crescimento restrito a superfície do meio, não se desenvolvendo em condições de anaerobiose. Sua ocorrência no alimento pode acarretar a elevação do pH, criando condições para o desenvolvimento de outros microorganismos, inclusive patógenos, desde que o pH atinja valores acima de 4,5 (Hoffmann *et al.*, 2001).

2.3. Irradiação

Desde os primórdios da humanidade, o homem, demonstra preocupações com saúde e qualidade de vida. Ou seja, preocupa-se com recursos básicos que garantem sua sobrevivência. Desta forma, dentro deste rol de recursos básicos encontram-se os alimentos (Souza *et al.*, 2006).

Durante séculos a humanidade procura formas de conservar melhor e por mais tempo os alimentos que consomem. A preservação e o armazenamento desses alimentos a baixa temperatura estão entre as técnicas de preservação mais antigas que se conhece. Além dessa, uma das formas mais recentes de preservação dos alimentos é o tratamento destes por radiação gama (Lee *et al.*, 2003; Guedes, 2005).

Atualmente, a qualidade é componente fundamental dos alimentos, como a segurança é um requisito indispensável da qualidade (Silva *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2004). A Irradiação de alimentos é um processo físico de tratamento comparável à pasteurização térmica, ao congelamento ou enlatamento. Este processo envolve a exposição do alimento, embalado ou não, a um dos três tipos de energia ionizante: raios gama, raios X ou feixe de elétrons (Matsuda, 2002; Santos *et al.*, 2003). Isto é feito em uma sala ou câmara especial de processamento por um tempo determinado. A fonte mais comum de raios gama, para processamento de alimentos, é o radioisótopo ^{60}Co (CDTN, 2004).

O termo radiação designa processos físicos de emissão e propagação de energia, enquanto o termo irradiação se refere à aplicação desta energia a um determinado material, atingindo assim os objetivos pré-estabelecidos. A característica da radiação de alta energia é causar ionização no meio em que é absorvida, ou seja, é capaz de remover elétrons de seus orbitais, seja em átomos ou moléculas (Satin, 1993; Aquino *et al.*, 2005).

A tecnologia de processamento da radiação, principalmente para fins alimentícios, intensificou seu desenvolvimento durante a II Guerra Mundial (Diehl, 2002). A adequação nutricional dos alimentos irradiados é sumarizada em muitas revisões, as quais nos mostram claramente que as alterações ocorridas nos alimentos são mínimas ou mesmo, em alguns casos, nulas quando se é respeitada a dose certa para cada tipo de alimento (Diehl *et al.*, 1994).

Em geral, o processo de irradiação nas doses recomendadas, acarreta poucas alterações químicas nos alimentos. Segundo Diehl (1992; 1995), nas doses de até 1kGy, as perdas nutricionais são consideradas insignificantes e nenhuma das alterações conhecidas encontradas nos alimentos irradiados é nociva ou perigosa, estando dentro dos limites encontrados normalmente para alimentos (Satin, 1993; Delincée *et al.*, 1998; Marathe *et al.*, 2002).

Organizações internacionais tais como a FAO (Organização de Agricultura e Alimentos), AIEA (Agência Internacional de Energia Atômica) e a OMS (Organização Mundial de Saúde) concluíram, após anos de pesquisas, que a irradiação de alimentos é um processo seguro, prático e benéfico (Fumento, 1994; Loaharanu, 1994; Delincée *et al.*, 1998; Spoto *et al.*, 1999; Lacroix *et al.*, 2000; Rezende, 2000; Spolaore *et al.*, 2003).

Para garantir a qualidade de um alimento, tanto do ponto de vista de saúde pública bem como aumentar a sua vida útil existem vários métodos disponíveis para as indústrias alimentícias, sendo um deles a irradiação (Santos *et al.*, 2003). O processamento por radiação possui o intuito de controlar doenças de origem alimentar causadas por microorganismos patogênicos e parasitas (Andrews *et al.*, 1998; Foley, 2002; Niemira *et al.*, 2003).

Essa técnica deve ser aplicada em alimentos já embalados evitando, desta forma, a recontaminação. Como em qualquer outro tipo de processamento, a irradiação deve produzir produtos de acordo com as boas práticas de fabricação (Villavicencio, 1998).

Nas últimas décadas a irradiação de alimentos tem recebido atenção crescente devido às vantagens que apresenta sobre os métodos convencionais de processamento. Este método possibilita o tratamento dos alimentos após a embalagem, a conservação

dos produtos em seu estado fresco, alimentos perecíveis podem ser conservados por mais tempo sem perder sua qualidade e o produto praticamente não sofre alterações de temperatura (Verruma-Bernardi *et al.*, 2002; Farkas, 2006).

A radiação pode causar uma variedade de efeitos físicos e bioquímicos nos microorganismos. Uma vez absorvida por um material biológico, a radiação ionizante pode ter ação direta ou indireta sobre o material que recebeu este processamento (Hansen *et al.*, 2001).

Quando a radiação age de forma direta (Figura 3) no material ocorre a excitação ou ionização de moléculas de ácido nucléico, e a partir daí serão conduzidas mudanças biológicas que podem levar até a morte celular (Alcarde *et al.*, 2002; Alcarde *et al.*, 2003).

No mecanismo direto a radiação age diretamente sobre uma biomolécula importante, tal como o DNA, danificando o material genético. As moléculas de DNA são enormes quando comparadas com outras moléculas dentro de uma estrutura celular, por isso constituem o alvo principal dos efeitos da radiação.

Considerando que a sensibilidade de macromoléculas a radiação é proporcional ao seu peso molecular, uma dose de 0,1kGy sobre uma célula bacteriana irá danificar 2,8 % do DNA, enquanto que a mesma dose irá danificar 0,14 % das enzimas e apenas 0,005% dos aminoácidos. \

A lesão em 2,8 % do DNA é letal para uma grande fração das células irradiadas, e isto pode ser facilmente observado pelo decréscimo das unidades formadoras de colônia (UFC) em meio de cultura; contudo o dano de 0,14 % sobre as enzimas dificilmente é detectado, apenas por sofisticados métodos analíticos e, no caso dos aminoácidos, não é possível detectar em sistemas biológicos (Diehl, 1995; Ferreira, 2005).

Já o efeito indireto (Figura 3) é ocasionado pela interação da radiação com a molécula de água, o que acaba por gerar os chamados radicais livres (Figura 4 e 5) (Smith *et al.*, 2005).

Estes irão interagir com outros constituintes do material biológico tratado com radiação, podendo trazer sérias consequências para o mesmo (Diehl, 1995).

Figura 3. Efeito Direto e Indireto da radiação ionizante sobre moléculas de DNA (CNEN, 2006).

Figura 4. Radiólise da Água com conseqüente formação de Radicais livres (CNEN, 2006).

Figura 5. Novas moléculas originadas a partir da união de radicais livres altamente reativos (CNEN, 2006).

Os produtos da radiólise da água são (WHO, 1994): $\bullet\text{OH}$ - radical hidroxila; e^-_{aq} - elétron aquoso (ou hidratado); $\bullet\text{H}$ - átomo de hidrogênio; H_2 - hidrogênio; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; H_3O^+ ($= \text{H}^+_{\text{aq}}$) - próton hidratado .

Enquanto $\bullet\text{OH}$, e^-_{aq} e $\bullet\text{H}$ são espécies reativas transitórias, H_2 e H_2O_2 , são os únicos produtos da radiólise da água estáveis. Por causa das reações, expostas abaixo, o hidrogênio e peróxido de hidrogênio são largamente consumidos.

Eles são conseqüentemente produzidos em baixas quantidades, mesmo quando as doses de irradiação são altas. A saturação da água com oxigênio pode aumentar intensamente a produção de H_2O_2 . A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conhecido por ser um agente oxidante, tem grande significado na irradiação de alimentos. O radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) é um poderoso agente oxidante e o elétron aquoso (e^-_{aq}) é um forte agente redutor.

O átomo de hidrogênio ($\bullet\text{H}$) é um agente redutor menos efetivo. Considerando que todos os alimentos contêm substâncias que podem ser oxidadas ou reduzidas, as reações acima descritas são esperadas quando alimentos que contêm água são irradiados (Diehl, 1995).

Estima-se que boa parte dos danos causados a uma célula pela radiação ionizante ocorre pela ação indireta da radiação, provocado por radicais livres. Isto se deve ao fato de que a maioria das células vivas apresenta em média 80 % de água. Mesmo produtos aparentemente seco contém água: farinha de trigo (13% de água), vegetais desidratados (cerca de 10%), nozes (5%) entre outros (WHO, 1994).

A radiólise da água então é de fundamental importância para o processo de irradiação de alimentos (Farkas, 1985; Diehl, 1995). Dessa forma, é mais provável que a maioria dos efeitos na célula seja o resultado da ação indireta da radiação, sendo a molécula de DNA o alvo crítico para a ocorrência do dano. O baixo conteúdo de água no citoplasma é o principal fator da radioresistência dos esporos bacterianos (Farkas, 2001).

O processo de irradiação pode inibir a divisão de células vivas, como microorganismos, promovendo uma alteração em seu material genético, a ponto de inibir os processos biológicos necessários para a sua sobrevivência. Geralmente, os microorganismos são facilmente inativados por este processo (Tallentire, 1980; Murano *et al.*, 1995).

2.4. Efeitos da radiação em microorganismos

A irradiação inativa os organismos que decompõem os alimentos, em particular as bactérias, bolores e leveduras. A idade das culturas pode influenciar consideravelmente a radiosensibilidade. Por esta razão, experimentos realizados por diferentes autores, para determinar a sensibilidade à radiação de bactérias e fungos, não apresentam resultados idênticos (Lou e Youssef, 1999; Jay, 2001).

Estudos mostram que doses de até 3,0kGy não são suficientes para causar inviabilidade de leveduras (Jay, 2001). De acordo com Alcarde *et al.* (1997), Domarco *et al.* (1996) e Urbain (1986), leveduras e bolores possuem sensibilidade à radiação comparada a de algumas bactérias não formadoras de esporos. As doses que podem eliminar leveduras estão, aproximadamente, na faixa de 4,65 a 20,0kGy e para os bolores entre 2,50 a 6,0kGy. Segundo os mesmos autores a dose suficiente para inviabilizar microorganismos em kGy, para o gênero de leveduras *Saccharomyces* encontra-se no intervalo entre 5,40-5,80kGy.

Chacharkar *et al.* (1996) comentam que com dose de 5kGy a atividade fermentativa do *Saccharomyces* aumenta aproximadamente de 25%, enquanto que em doses de 10 e 25kGy essa atividade reduz consideravelmente. Já Alcarde *et al.* (2001), diz que doses de até 10kGy não provocam efeitos danosos na atividade fermentativa.

Kaupert *et al.* (1980) observaram que é necessária uma dose de 1kGy para obter uma redução de um décimo da população de *Saccharomyces rouxii* em suco de maçã.

Pezzutti *et al.* (2005), notaram que doses entre 7 e 15kGy reduziram 2 ciclos logarítmicos de leveduras presentes em flocos de cebola. Koorapati *et al.* (2004) dizem que em pedaços de cogumelos doses inferiores a 0,5kGy são suficientes para reduzir a contagem de bolores e leveduras de modo que estes não são observados quando o material é semeado em placa contendo meio nutritivo.

Em 1999, El-Mongy *et al.* observaram que com 5kGy tilápias frescas e desidratadas ficavam livres de contaminação bacteriana e os níveis de contagem de bolores e leveduras eram reduzidos consideravelmente, demonstrando assim novamente que a radioresistência de fungos, em geral, é maior do que em bactérias.

2.5. Influência do Oxigênio no processamento por radiação

A presença ou ausência de oxigênio durante o processo de irradiação tem uma importante influência no curso da radiólise. A água em equilíbrio com o oxigênio do ar, contém baixas concentrações de oxigênio. Átomos de hidrogênio podem reduzir o oxigênio formando o radical hidroperóxido, que é um agente oxidante fraco (WHO, 1994; Aquino *et al.*, 2005; Ferreira, 2005):

Em equilíbrio com radical ânion superóxido:

Outro caminho para formação do radical superóxido é a reação de elétron aquoso com oxigênio:

Com a remoção de agentes redutores (e^-_{aq} e $\bullet H$), a importância do radical $\bullet OH$ e portanto o papel das reações de oxidação se torna maior em soluções oxigenadas. Tanto o radical hidroperóxido ($\bullet HO_2$) quanto o radical superóxido ($\bullet O_2^-$) podem causar o aumento de do peróxido de hidrogênio (H_2O_2):

Muitos outros radicais são produzidos quando os alimentos são irradiados. O oxigênio pode acrescentar alguns dos radicais, levando ao aumento de radicais peróxidos (Grant, 1991). A radiosensibilidade das bactérias é menor em condições de anaerobiose, em compensação o efeito letal das radiações ionizantes aumenta em presença de oxigênio, devido à oxidação dos lipídios de membrana, que acabam por reduzir a energia e o material necessário para a reparação da lesões (Corre & Venaille, 1988; Ferreira, 2005).

2.6. Influência da temperatura no processamento por radiação

A extensão das alterações radiolíticas pode ser influenciada pela temperatura. As reações intermediárias da radiólise da água são interrompidas em materiais congelados e são, desta forma, mantidos inertes nas reações entre os radicais ou com o substrato. Quando o material atinge novamente temperatura ambiente, os danos no substrato são reduzidos quando comparado a produtos não congelados, quando irradiados (Aquino *et al.*, 2005; Ferreira, 2005).

A difusão de moléculas e radicais livres é maior em temperatura de $-2^\circ C$ do que a $-10^\circ C$, e a $-10^\circ C$ mais do que $-80^\circ C$ (Ley *et al.*, 1970). Tem sido sugerido que com a redução da temperatura, o efeito indireto na formação de radicais livres é diminuído, as moléculas de água vão tornado-se indisponíveis e, portanto, os radicais livres também (Murano *et al.*, 1995).

De acordo com Murano *et al.* (2005) o oxigênio potencializa a ação lesiva da radiação, aumentando a radiosensibilidade das células. A presença do oxigênio dissolvido no meio celular não apenas fixa os danos químicos ocasionados pelos radicais livres, como também possibilita a formação destes radicais. Mudanças nas propriedades e a formação destes produtos radiolíticos podem ser minimizadas ao irradiar o alimento na ausência de oxigênio (Lagunas-Solar, 1995).

2.7. Valor D_{10}

A radorresistência de um microrganismo é expressa pela dose de redução decimal (valor D_{10}), que é equivalente à dose necessária para reduzir 90% da população microbiana e um produto (Santos *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005).

De acordo com Santos *et al.* (2003), a cinética de morte microbiana está diretamente relacionada com as doses de radiação aplicada segundo uma lei exponencial do tipo: $N = N_0 [10]^{-D/D_{10}}$, onde N_0 representa a contagem inicial de microorganismos; N é igual a contagem de microorganismos sobreviventes após a aplicação da dose D de radiação; D é a dose de radiação aplicada e D_{10} é a dose de radiação necessária para a eliminação de 90% da população de microorganismos.

Após uma linearização desta equação obteremos uma reta do tipo $y = a + bx$, onde: $a = \log N_0$ (coeficiente linear de regressão); $b = 1/D_{10}$ (coeficiente angular de regressão). A dose D_{10} é calculada como sendo o inverso positivo do coeficiente angular de regressão: $D_{10} = 1/b$.

Cada microrganismo se comporta de forma diferente quando expostos aos efeitos da radiação. A variação na radiosensibilidade de microorganismos está relacionada com as diferenças em suas estruturas químicas e em sua habilidade de reparar os danos causados pela radiação. O meio onde o microrganismo é encontrado também pode alterar consideravelmente o valor D_{10} devido a presença ou ausência de substâncias radioprotetoras (Murano *et al.*, 1995).

2.8. Legislação Brasileira para Alimentos Irrradiados

A fim de se estudar as diversas aplicações da irradiação de alimentos, em 1984 a Organização Mundial da Saúde (WHO), juntamente com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) criaram o ICGFI, grupo que vem acompanhando a evolução da aplicação desta tecnologia mundialmente.

O Brasil e mais 44 países fazem parte deste grupo. Alguns países como Brasil, Chile e Argentina possuem legislações sobre irradiação de Alimentos e estas regulamentações diferem entre si principalmente em termos de alimentos que podem ser irradiados e doses aplicadas (AQUINO, 2003; MATSUDA, 2002).

Os Decretos e Resoluções do Brasil são apresentados de forma resumida a seguir:

❖ Decreto - Lei nº 986 de 21 de Outubro de 1969

Estabelece normas gerais sobre alimentos – Apresenta a definição do termo alimento irradiado.

❖ Decreto - Lei nº 72 718 de 29 de Agosto de 1973

Estabelece normas gerais sobre alimentos – Normas gerais para processamento. Estocagem, transporte, importação e exportação, venda e consumo de alimentos irradiados. Estabelece o logo da Radura no rótulo de produtos irradiados.

❖ Portaria DINAL nº 09 de 08 de março de 1985 MS – Revogada pela RDC nº 21 de 26 de novembro de 2001

Aprovar normas gerais para a irradiação de alimentos no Brasil, indicando para cada caso o tipo, nível e dose média de energia de radiação e o Tratamento prévio conjunto ou posterior. Limitada a dose de 10kGy e proibida a re-irradiação.

❖ Portaria DINAL nº 30 de 25 de setembro de 1989 – Revogada pela RDC nº 21 de 26 de novembro de 2001.

Ampliação da autorização a outros tipos de alimentos que não constavam na portaria anterior.

❖ Resolução ANVISA - RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001 – *Revoga as Portarias DINAL nº 09 de 08 de março de 1985 e nº 30 de 25 de setembro de 1989*

“4.3. Dose absorvida: Qualquer alimento poderá ser tratado por radiação desde que sejam observadas as seguintes condições:

a) A dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida;

A dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento”.

2.9. Legislação Brasileira para Fermentos

❖ Resolução - CNNPA nº 38, de 12 de outubro de 1977.

A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, do Ministério da Saúde, conforme deliberado na sua 394ª sessão, do dia 12 de outubro de 1977, tendo em vista o disposto no artigo 5º, item III, artigos 9º e 59 do Decreto-Lei 986, de 21 de outubro de 1969, resolveu, nos termos da Resolução nº 17/76 da CNNPA:

1. Aprovar como coadjuvantes da tecnologia de fabricação as substâncias constantes dos anexos I, II, III e IV, destinadas ao fabrico de produtos forneados, tais como: pão, broa, biscoito, bolacha, bolo, torta e demais produtos afins de confeitaria.

2. As substâncias químicas contidas nos anexos acima referidos deverão atender às especificações constantes da Farmacopéia Brasileira ou do Food Chemicals Codex ou ainda as que venham a ser aprovadas pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.

3. Os preparados ou as substâncias relacionadas nos anexos citados no item 1, acima, estão sujeitos a registro no órgão competente do Ministério da Saúde, quando comercializados para os fins mencionados nesta Resolução, exceto se constarem da Farmacopéia Brasileira ou do Food Chemicals Codex.

Fermentos Biológicos

OBJETO: - Os fermentos biológicos destinam-se a ser empregados no preparo de pães e certos tipos de biscoitos e produtos afins de confeitaria.

DEFINIÇÃO: - Fermento biológico é o produto obtido de culturas puras de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) por procedimento tecnológico adequado e empregado para dar sabor próprio e aumentar o volume e a porosidade dos produtos forneados.

DESIGNAÇÃO: - O produto será designado "Fermento Biológico" ou "Levedura Ativa"

CLASSIFICAÇÃO: - Os fermentos biológicos, de acordo com o seu teor de umidade, serão classificados em:

- a) Fermento Fresco, também denominado: "Fermento Prensado", "Fermento Verde" e "Levedura Prensada";
- b) b) Fermento Seco, também denominado: "Fermento Desidratado" e "Levedura Seca".

HIGIENE: - O produto deverá ser fabricado com matérias-primas em perfeito estado sanitário, isentos de matérias terrosas e detritos vegetais e animais. O produto não deverá conter substâncias estranhas à sua composição. Não deverá possuir cheiro a mofo e sabor amargo.

Contaminantes microbianos:

- a) Coliformes - ausência em 0,1 g.
- b) *E. coli* - ausência em 1 g.
- c) *Salmonella* - ausência em 50 g.

ROTULAGEM: - No rótulo deverá constar a denominação "Fermento Biológico Fresco" ou "Fermento Biológico Seco" ou seus sinônimos de acordo com a classificação. No rótulo deverá ainda constar a seguinte recomendação: "Mantenha à temperatura inferior a 10°C" ou expressões equivalentes.

2.10. Teste de viabilidade com corantes fluorescentes

Métodos fluorescentes, que empregam o Diacetato de Fluoresceína (Figura 6) e o Brometo de Etídio (Figura 7) podem ser utilizados na determinação da viabilidade de células fúngicas (Calich *et al.*, 1978; Ferreira, 2005).

Pesquisas realizadas com Acetato de Fluoresceína (3,6 diacetil fluoresceína) concluíram que este corante era hidrolisado por diferentes enzimas, tais como esterases e proteases. O produto desta conversão enzimática resulta na fluoresceína que se acumulava no interior das células, desde que a membrana celular estivesse intacta, podendo ser facilmente visualizada através de microscopia de fluorescência, apresentando coloração verde brilhante (Guibault *et al.*, 1964; Medzon *et al.*, 1969 Lopes *et al.*, 2002; Aquino *et al.*, 2005).

O Brometo de Etídio (brometo de 2,7 diamino, 9 fenil, 10 etil fenantridina) é outro corante fluorescente que possui como características a lenta penetração em células íntegras e a penetração rápida em células danificadas. Esta rápida penetração em células injuriadas ocorre devido a ligação do brometo de etídio ao DNA da célula por intercalação (Figura 2), formando um complexo fluorescente com o material presente no núcleo, que quando visualizado ao microscópio de fluorescência, apresenta coloração vermelho brilhante (Calich *et al.*, 1978; Corrêa *et al.*, 1990; Lopes *et al.*, 2002).

Em 1971, Takasugi utilizou o Diacetato de Fluoresceína em teste citotóxico empregando, simultaneamente, o Brometo de Etídio, outro composto fluorescente, que foi empregado por Edidin (1970), como contracorante em experimentos de células de mamíferos. A união de ambos compostos fluorescentes foi utilizada para determinar a viabilidade de cultivo de microbactérias, células fúngicas e biópsia de tecido, ressaltando - se a sensibilidade e a rapidez de execução dessa técnica (Corrêa *et al.*, 1986; Corrêa *et al.*, 1987; Rojas Pedral *et al.*, 1988; Corrêa *et al.*, 1989; Corrêa *et al.*, 1991; Aquino, 2003).

Foi observado em diversos estudos realizados, com variados gêneros fúngicos, uma uniformidade na coloração de células não viáveis coradas pelo brometo de etídio (Calich *et al.*, 1978; Corrêa *et al.*, 1991; Rodrigues, 2000). Já as células fúngicas viáveis (coradas pelo Diacetato de Fluoresceína) exibiram áreas de intensa fluorescência em

tonalidade amarelo-esverdeada brilhante (Padrão de fluorescência PF1) e células com coloração esverdeada com fraca intensidade fluorescente (Padrão de fluorescência PF2) uniformemente distribuída.

Figura 6. Fórmula estrutural do Diacetato de Fluoresceína.

Figura 7. a: Fórmula estrutural do Brometo de Etídio; b: Processo de intercalação entre o Brometo de Etídio e a molécula de DNA.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Observar se houve alteração no crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) em placa de leveduras e bactérias totais quando o fermento biológico seco (FBS) foi tratado por diferentes doses de radiação gama e armazenado sob diferentes tempos de estocagem.
- Determinar a dose D_{10} para bactérias totais e leveduras em Fermento Biológico Seco.
- Verificar se a viabilidade do produto é alterada pelas diferentes doses de radiação gama e também pelos distintos tempos de armazenamento através do método fluorescente DF-EB (Diacetato de Fluoresceína e Brometo de Etídio).
- Analisar se o processamento por radiação de fermento biológico seco promoveu algum benefício ao produto sem causar inviabilidade do mesmo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de Fermento Biológico Seco

As diferentes amostras de fermento biológico seco foram adquiridas no mercado varejista de São Paulo. Foram utilizadas neste experimento três amostras de fermento de marcas distintas que denominamos como: Amostra 1 (embalagem com 11g), Amostra 2 (embalagem com 10g) e Amostra 3 (embalagem com 10g). Foram adquiridas 45 amostras de cada marca para cada repetição. Utilizamos 9 embalagens de cada uma das três diferentes marcas de Fermento Biológico Seco (por repetição) para cada uma das doses de radiação utilizada.

As datas de validade e fabricação das amostras de Fermento Biológico Seco, para cada repetição, variaram conforme observamos a seguir:

1ª Repetição

Amostra 1 Data de Fabricação: 06/2004
Data de Validade: 06/2006

Amostra 2 Data de Fabricação: 05/2004
Data de Validade: 05/2006

Amostra 3 Data de Fabricação: 06/2004
Data de Validade: 06/2006

2ª Repetição

Amostra 1 Data de Fabricação: 08/2004
Data de Validade: 08/2006

Amostra 2 Data de Fabricação: 08/2004
Data de Validade: 08/2006

Amostra 3 Data de Fabricação: 09/2004
Data de Validade: 09/2006

3ª Repetição

Amostra 1 Data de Fabricação: 10/2004
Data de Validade: 10/2006

Amostra 2 Data de Fabricação: 09/2004
Data de Validade: 09/2006

Amostra 3 Data de Fabricação: 12/2004
Data de Validade: 12/2006

4.2. Tratamento por radiação gama

As amostras de fermento foram irradiadas com doses de 0 (controle); 0.5; 1; 2 e 3kGy, em suas embalagens originais, no Centro de Tecnologia das Radiações do (IPEN/CNEN – SP) em fonte de ^{60}Co (Gammacell 220– Figura 8), com taxa de dose de 3,51kGy/h (outubro/2005) com incerteza de $\pm 1,7\%$. Foram utilizados Dosímetros Harwell Amber 3042 para monitoramento de dose. Após este procedimento amostras referentes a cada dose de radiação foram destinadas à análise microbiológica e ao teste de viabilidade enquanto as demais amostras foram armazenadas a temperatura ambiente. Passados 30, 60 e 90 dias foram repetidas a análise microbiológica e o teste de viabilidade. As amostras foram mantidas a temperaturas que variaram entre 23,5 °C e 24,5 °C até a repetição dos procedimentos citados anteriormente.

Figura 8. Fonte de ^{60}Co do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN.

4.3. Análise Microbiológica

Foi realizada no Laboratório de Alimentos do Centro de Tecnologia das Radiações. Este laboratório é utilizado exclusivamente para experimentos com microorganismos.

Figura 9. Procedimento realizado para análises microbiológicas no Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN/CNEN-SP. 1 e 2: Diluição das amostras de FBS em BPW. 3 e 4: Plaqueamento de amostras.

4.3.1. Semeadura em profundidade

3.3.1.1. Leveduras

Foram dissolvidos 10 gramas de fermento biológico seco em 90 mL de caldo Buffered Peptone Water (diluição 10^{-1}) e em seguida, transferimos 1 mL deste homogeneizado para um tubo de ensaio contendo 9 mL de Buffered Peptone Water, o que resultou em uma diluição de 10^{-2} do produto analisado. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de uma diluição de 10^{-9} . Foram plaqueadas (duplicata) apenas as diluições de 10^{-5} a 10^{-9} (diluições estabelecidas através de testes realizados com estes produtos). Foi colocado 1 mL desses produtos nas placas devidamente identificadas e em seguida foram acrescentados cerca de 20 mL de ágar *Sabouraud* (OXOID), foram homogeneizadas com leves movimentos circulares e posteriormente foram incubadas (invertidas) por 5 dias a 25 °C. A contagem foi realizada em contador de colônias tipo Quebec e foi baseada na determinação do número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) (Bittencourt *et al.*, 2005).

Figura 10. A: Estufa a 25°C contendo placas semeadas; B: Desenvolvimento de Leveduras características do Fermento Biológico Seco; C: Contagem de Unidades Formadoras de Colônia em um contador Quebec; D: Aspecto das Placas após a contagem de UFC.

4.3.1.1. Bactérias

Foram dissolvidos 10 gramas de amostra de fermento em 90 mL de caldo Buffered Peptone Water (diluição 10^{-1}) e foi repassado 1 mL em diluições seriadas para tubos de ensaio estéreis até atingirmos a diluição de 10^{-3} (diluições estabelecidas através de testes realizados com este produto). Para cada diluição foram utilizadas duas placas de Petri. Foi colocado 1 mL de tais diluições nas placas devidamente identificadas e em seguida foram acrescentados a estas cerca de 20 mL de *Plate Count Ágar* (PCA - OXOID), foram homogeneizadas com leves movimentos circulares e incubadas (invertidas) por 48 horas a 37 °C. A contagem foi realizada em contador de colônias tipo Quebec e foi baseada na determinação do número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

Figura 11. A: Estufa a 37°C contendo placas semeadas; B: Desenvolvimento de Bactérias Totais presentes no Fermento Biológico Seco; C: Contagem de Unidades Formadoras de Colônia em um contador Quebec; D: Aspecto das Placas após a contagem de UFC.

4.4. Teste de viabilidade com corantes fluorescentes

Para a realização deste teste utilizamos solução de Diacetato de Fluoresceína (3,6 diacetil fluoresceína Sigma Chemical - USA) com uma concentração de 5mg/mL de acetona mantida a temperatura de - 20°C e solução de brometo de etídio (brometo de 2,7 diamino, 9 fenil, 10 etil fenantridina Sigma Chemical - USA) em concentração de 1000 µg/mL de solução tampão de fosfatos (PBS) pH 7,4 e estocada a - 20°C.

Figura 12. Preparação para a realização do Teste de Viabilidade (DF-BE).

Fonte: Rodrigues, 2000.

A solução de diacetato de fluoresceína foi diluída 2500 x e a de brometo de etídio 20 x, ambas em água destilada estéril. Em seguida, uma alíquota de 1 g de cada uma das amostras foi transferida a um eppendorf e a este acrescentamos 1,5 mL de água destilada estéril. Uma gota desta solução foi colocada em uma lâmina, juntamente com uma gota de DF e outra de BE. Após homogeneizarmos, foi colocada sobre esta mistura uma lamínula para examinarmos o material em microscópio de fluorescência.

A contagem de células vivas (coloração verde) e de células mortas (coloração vermelha) foi realizada em 3 campos distintos que foram focados no microscópio de fluorescência. Obtendo-se o número total de células, calcula-se a porcentagem de células vivas e mortas (para os três campos) e calcula-se a média aritmética das porcentagens, sendo este o resultado do teste de viabilidade para o fermento biológico.

Figura 13. A e B: Preparação das amostras de Fermento Biológico Seco a serem observadas no microscópio de fluorescência; C: Microscópio de Fluorescência; D: Imagens das lâminas que foram observadas no microscópio.

4.5. Cálculo do valor D_{10} (kGy) de Bactérias totais e Leveduras

O D_{10} corresponde à dose de radiação necessária para eliminar 90 % da população microbiana. O valor D_{10} tanto para Bactérias como para Leveduras foi calculado, graficamente, através da análise de regressão linear simples (Microsoft Excel, Microsoft Office, 2000).

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento descrito a seguir foi repetido por 3 vezes.

Figura 14. Representação esquemática das etapas do experimento.

* número total de amostras (amostra 1, 2 e 3) irradiadas para 1 repetição.

6. RESULTADOS

6.1. Contagem de UFC/g de leveduras e bactérias totais nas amostras controle e irradiadas a 0,5, 1, 2 e 3kGy de fermento biológico seco.

Ao realizarmos a contagem de UFC/g em placas das amostras controle e irradiadas de fermento obtivemos os resultados expostos na tabela 1 e figura 15,16 e 17. Notamos que conforme aumentamos a dose de radiação, a contagem de leveduras decresce e este fato pode ser observado nas amostras 1, 2 e 3 processadas por radiação. Quanto ao período de armazenamento observamos que não há relação entre o aumento ou diminuição de UFC/g e os dias de estocagem. Este fato encontra-se claramente expresso na figura 15,16 e 17.

Nas amostras 1 e 3 as maiores contagens de UFC/g de leveduras foram observadas nas amostras controle estocadas por 30 dias ($18,3 \times 10^9$ UFC/g e $9,8 \times 10^9$ UFC/g, respectivamente). Já na amostra 2 a mais elevada contagem foi feita nas amostras controle com 01 dia de armazenamento ($15,1 \times 10^9$ UFC/g).

As mais baixas contagens de leveduras nas amostras 1, 2 e 3 foram evidenciadas nas amostras tratadas com doses de 3kGy, porém com distintos tempos de estocagem.

Tabela 1. Número de *UFC/g de leveduras das 3 amostras de fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 25°C por 5 dias.

Amostras	Tempo de armazenamento	*UFC/g de Leveduras				
		0kGy	0,5kGy	1kGy	2kGy	3kGy
A1	01 dia	** $13,8 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$0,59 \times 10^9$	$0,46 \times 10^9$
	30 dias	$18,3 \times 10^9$	$5,07 \times 10^9$	$1,26 \times 10^9$	$0,52 \times 10^9$	$0,38 \times 10^9$
	60 dias	$8,98 \times 10^9$	$5,03 \times 10^9$	$0,81 \times 10^9$	$0,67 \times 10^9$	$0,49 \times 10^9$
	90 dias	$11,9 \times 10^9$	$2,25 \times 10^9$	$0,78 \times 10^9$	$0,56 \times 10^9$	$0,49 \times 10^9$
A2	01 dia	$15,1 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$	$0,67 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9$	$0,14 \times 10^9$
	30 dias	$6,03 \times 10^9$	$0,41 \times 10^9$	$0,21 \times 10^9$	$0,16 \times 10^9$	$0,13 \times 10^9$
	60 dias	$4,6 \times 10^9$	$0,63 \times 10^9$	$0,07 \times 10^9$	$0,0003 \times 10^9$	$0,00005 \times 10^9$
	90 dias	16×10^9	$0,33 \times 10^9$	$0,0002 \times 10^9$	$0,0003 \times 10^9$	$0,00001 \times 10^9$
A3	01 dia	$6,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$0,67 \times 10^9$	$0,38 \times 10^9$	$0,034 \times 10^9$
	30 dias	$9,8 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$	$1,03 \times 10^9$	$0,34 \times 10^9$	$0,18 \times 10^9$
	60 dias	$3,35 \times 10^9$	$0,93 \times 10^9$	$0,5 \times 10^9$	$0,0027 \times 10^9$	$0,0005 \times 10^9$
	90 dias	$9,3 \times 10^9$	$0,17 \times 10^9$	$0,0006 \times 10^9$	$0,0038 \times 10^9$	$0,005 \times 10^9$

* Unidade Formadora de Colônia por grama;

** Resultados obtidos pela Média de 3 repetições de cada uma das amostras. Análise realizada em duplicata.

Figura 15. Número de *UFC/g de leveduras presente na amostra 1 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.* Unidade Formadora de Colônia por grama.

Figura 16. Número de *UFC/g de leveduras presente na amostra 2 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.* Unidade Formadora de Colônia por grama.

Figura 17. Número de *UFC/g de leveduras presente na amostra 3 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.* Unidade Formadora de Colônia por grama.

Na tabela 2 encontram-se expressas as médias das contagens das 3 amostras distintas. Com estes dados notamos o mesmo que quando analisamos as amostras individualmente, ou seja, conforme aumentamos a dose de radiação observamos uma diminuição de UFC/g de leveduras. As maiores contagens de leveduras são apresentadas nas amostras controle com 01 de armazenamento (12×10^9 UFC/g) e com 90 dias ($12,4 \times 10^9$), enquanto que a menor contagem é evidenciada nas amostras tratadas com dose de 3kGy e com tempo de estocagem de 90 dias ($0,16 \times 10^9$ UFC/g) (figura 18).

Tabela 2. Média de *UFC/g de Leveduras das 3 amostras de Fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 25°C por 5 dias.

Amostras	Tempo de armazenamento	*UFC/g de Leveduras				
		0kGy	0,5kGy	1kGy	2kGy	3kGy
**Média	01 dia	12×10^9	$4,2 \times 10^9$	$1,08 \times 10^9$	$0,46 \times 10^9$	$0,21 \times 10^9$
	30 dias	$11,4 \times 10^9$	$3,13 \times 10^9$	$0,84 \times 10^9$	$0,34 \times 10^9$	$0,23 \times 10^9$
	60 dias	$3,64 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$0,46 \times 10^9$	$0,23 \times 10^9$	$0,17 \times 10^9$
	90 dias	$12,4 \times 10^9$	$0,92 \times 10^9$	$0,26 \times 10^9$	$0,19 \times 10^9$	$0,16 \times 10^9$

* Unidade Formadora de Colônia por grama;

** Média aritmética das amostras 1, 2 e 3 de acordo com a dose de processamento e tempo de armazenamento.

Figura 18. Gráfico contendo as médias das amostras 1, 2 e 3 em *UFC/g de leveduras presentes no fermento biológico seco processado por diferentes doses de radiação e mantido sob distintos tempos de armazenamento. * Unidade Formadora de Colônia por grama.

Após realizarmos a técnica de plaqueamento em profundidade e a contagem em placa, encontramos os resultados apresentados na tabela 3 e figura 19, 20 e 21. Analisando a tabela 3 notamos que com o aumento da dose de radiação ionizante há diminuição na contagem de UFC/g de bactérias totais no fermento biológico seco. Quando relacionamos esta contagem ao tempo de armazenamento, observamos que a maior parte das amostras apresenta uma redução da contagem de bactérias totais ao longo do tempo.

Nas amostras 1, 2 e 3 as maiores quantidades de bactérias totais foram encontradas nas amostras controle com 01 dia de armazenamento (tabela 3). Já as mais reduzidas contagens foram evidenciadas nas amostras tratadas com dose de 3kGy e 90 dias de estocagem para a amostra 1; nas amostras processadas com dose de 3kGy e 60 dias de armazenamento para a amostra 2 e nas amostras expostas a doses de 2kGy e 90 dias de estocagem para a amostra 3.

Tabela 3. Número de *UFC/g de bactérias totais das 3 amostras de fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 37°C por 48 horas.

Amostras	Tempo de armazenamento	*UFC/g de Bactérias Totais				
		0kGy	0,5kGy	1kGy	2kGy	3kGy
A1	01 dia	**40,5 x 10 ³	3,98 x 10 ³	9,27 x 10 ³	7,5 x 10 ³	4,03 x 10 ³
	30 dias	16,5 x 10 ³	4,55 x 10 ³	3,08 x 10 ³	1,8 x 10 ³	1,5 x 10 ³
	60 dias	22,2 x 10 ³	3,36 x 10 ³	2,08 x 10 ³	1,54 x 10 ³	1,11 x 10 ³
	90 dias	3,8 x 10 ³	1,82 x 10 ³	1,28 x 10 ³	0,52 x 10 ³	0,35 x 10 ³
A2	01 dia	84 x 10 ³	5,5 x 10 ³	8,9 x 10 ³	6,44 x 10 ³	4 x 10 ³
	30 dias	11,6 x 10 ³	4,31 x 10 ³	3,3 x 10 ³	2,4 x 10 ³	2,2 x 10 ³
	60 dias	22,9 x 10 ³	4,43 x 10 ³	4,6 x 10 ³	3 x 10 ³	1,6 x 10 ³
	90 dias	22,4 x 10 ³	5,67 x 10 ³	4,71 x 10 ³	2,62 x 10 ³	2,14 x 10 ³
A3	01 dia	79,7 x 10 ³	4,8 x 10 ³	9,9 x 10 ³	6,6 x 10 ³	4,4 x 10 ³
	30 dias	7,25 x 10 ³	4,2 x 10 ³	2,3 x 10 ³	1,8 x 10 ³	1,77 x 10 ³
	60 dias	3,52 x 10 ³	2,2 x 10 ³	1,6 x 10 ³	1,43 x 10 ³	0,8 x 10 ³
	90 dias	4 x 10 ³	2,6 x 10 ³	0,55 x 10 ³	0,38 x 10 ³	0,53 x 10 ³

* Unidade Formadora de Colônia por grama;

** Resultados obtidos pela Média de 3 repetições de cada uma das amostras. Análise realizada em duplicata.

Figura 19. Número de *UFC/g de bactérias totais presente na amostra 1 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem.* Unidade Formadora de Colônia por grama.

Figura 20. Número de *UFC/g de bactérias totais presente na amostra 2 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem. * Unidade Formadora de Colônia por grama.

Figura 21. Número de *UFC/g de bactérias totais presente na amostra 3 tratadas com distintas doses de radiação e diferentes tempos de estocagem. * Unidade Formadora de Colônia por grama.

A seguir, na tabela 4 e figura 22, estão expostos os dados resultantes da média das 3 amostras diferentes. Ao observarmos a contagem representada, notamos que conforme elevamos a dose de radiação e o tempo de estocagem ocorre a redução de UFC/g de bactérias totais nas amostras de fermento biológico seco. Sendo assim a menor contagem de bactérias foi encontrada nas amostras processadas por 3kGy quando esta permaneceu estocada por 90 dias. As amostras controle com 01 dia de armazenamento foi a que apresentou maior contagem de UFC/g de bactérias totais.

Tabela 4. Média de *UFC/g de bactérias totais das 3 amostras de fermento biológico seco após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento, incubadas a 37°C por 48 horas.

Amostras	Tempo de armazenamento	*UFC/g de Bactérias Totais				
		0kGy	0,5kGy	1kGy	2kGy	3kGy
**Média	01 dia	68×10^3	$47,6 \times 10^3$	$9,36 \times 10^3$	$6,85 \times 10^3$	$4,15 \times 10^3$
	30 dias	$11,8 \times 10^3$	$4,36 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	2×10^3	$1,83 \times 10^3$
	60 dias	$16,2 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$2,76 \times 10^3$	$1,99 \times 10^3$	$1,17 \times 10^3$
	90 dias	10×10^3	$3,36 \times 10^3$	$2,18 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	1×10^3

* Unidade Formadora de Colônia por grama;

** Média aritmética das amostras 1, 2 e 3 de acordo com a dose de processamento e tempo de armazenamento.

Figura 22. Gráfico contendo as médias das amostras 1, 2 e 3 em *UFC/g de bactérias totais presentes no fermento biológico seco processado por diferentes doses de radiação e mantido sob distintos tempos de armazenamento.*Unidade Formadora de Colônia por grama.

6.2. Determinação do D_{10} de leveduras e bactérias totais em fermento biológico seco.

Na tabela 5 encontram-se os valores D_{10} para leveduras constituintes das diferentes amostras de fermento biológico seco irradiado. De acordo com a análise de regressão linear simples, a dose de radiação necessária para eliminar 90% da população leveduriforme ficou entre 1,10 e 2,23kGy para as distintas amostras de fermento (figura 23, 24 e 25).

Tabela 5. Efeito da radiação gama em leveduras constituintes de três amostras distintas de fermento biológico seco.

Amostras	Bactérias Totais		
	Equação linear	R^2	D_{10} (kGy)
* 1	$y = -0,4486x + 9,8112$	$R^2 = 0,8529$	2,23
* 2	$y = -0,5445x + 9,4998$	$R^2 = 0,6221$	1,84
* 3	$y = -0,9279x + 9,8443$	$R^2 = 0,9619$	1,10

* Média de três repetições.

Figura 23. Gráfico demonstrando o comportamento de leveduras constituintes da amostra 1 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.

Figura 24. Gráfico demonstrando o comportamento de leveduras constituintes da amostra 2 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.

Figura 25. Gráfico demonstrando o comportamento de leveduras constituintes da amostra 3 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.

Ao observarmos a tabela 6, encontramos os valores D_{10} para bactérias totais presentes nas diferentes amostras de fermento biológico seco irradiado. De acordo com a análise de regressão linear simples, a dose de radiação necessária para eliminar 90% da população bacteriana variou entre 2,31 e 2,95kGy para as distintas amostras de fermento (figura 26, 27 e 28).

Tabela 6. Efeito da radiação gama em bactérias totais presentes em três diferentes amostras de fermento biológico seco.

Amostras	Bactérias Totais		
	Equação linear	R^2	D_{10} (kGy)
* 1	$y = -0,4326x + 4,3784$	0,8009	2,31
* 2	$y = -0,3893x + 4,5681$	0,8836	2,57
* 3	$y = -0,3390x + 4,4147$	0,8333	2,95

* Média de três repetições.

Figura 26. Gráfico demonstrando o comportamento de bactérias totais presentes na amostra 1 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.

Figura 27. Gráfico demonstrando o comportamento de bactérias totais presentes na amostras 2 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.

Figura 28. Gráfico demonstrando o comportamento de bactérias totais presentes na amostras 3 de fermento biológico seco tratado com doses de 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 3kGy.

6.3. Teste de viabilidade com corantes fluorescentes DF-BE.

A análise de células viáveis e das não viáveis nas amostras de fermento biológico seco processado por diferentes doses de radiação e submetido a tempos de armazenamento distintos, revelou células viáveis de leveduras com fluorescência esverdeada, distribuída de maneira uniforme pelas células. As células não viáveis exibiram fluorescência de tonalidade vermelha brilhante (figura 29).

Notamos que com o aumento das doses de radiação empregadas, ocorreu uma redução na frequência de células viáveis (coloração verde) e conseqüentemente verificamos o aumento de células não viáveis (coloração vermelha) (tabela 7 e figura 30, 31 e 32). Em relação ao tempo de armazenamento das amostras, observamos que conforme aumenta o tempo de estocagem diminui a frequência de viáveis.

Nas amostras 1, 2 e 3 a mais elevada frequência de células vivas é evidenciada nas amostras controle com 01 de armazenamento, enquanto que a menor quantidade de células viáveis foi encontrada no fermento tratado com doses de 3kGy e com 90 dias de estocagem (tabela 7).

Tabela 7. Frequência de células viáveis das 3 amostras de fermento biológico seco pelo método fluorescente *(DF-BE) após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento.

Amostras	Tempo de armazenamento	Porcentagem de células viáveis (%)				
		0kGy	0,5kGy	1kGy	2kGy	3kGy
A1	01 dia	**87	77	70	66	62
	30 dias	83	75	57	53	47
	60 dias	79	70	57	36	34
	90 dias	65	52	45	31	27
A2	01 dia	92	79	72	71	67
	30 dias	84	74	61	50	47
	60 dias	80	78	62	41	36
	90 dias	68	57	49	29	21
A3	01 dia	90	79	72	69	63
	30 dias	84	70	63	55	48
	60 dias	76	74	62	41	39
	90 dias	71	57	37	15	12

* DF – Diacetato de Fluoresceína ; BE – Brometo de Etídio;

** Resultados obtidos pela Média de 3 repetições de cada uma das amostras. Análise realizada em triplicata.

Figura 29. Células viáveis (verdes) e células não viáveis (vermelhas) de leveduras visualizadas pelo método de viabilidade com corantes fluorescentes (DF-BE). A: leveduras controle (0kGy) após 01 dia de estocagem; B: leveduras tratadas com 1kGy após 30 dias de armazenamento; C: leveduras processadas com dose de 2kGy após 60 dias de estocagem; D: leveduras tratadas com dose de 3kGy após 30 dias de armazenamento.

Figura 30. Percentuais de células viáveis de leveduras constituintes do fermento biológico seco na amostra 1 quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.

Figura 31. Percentuais de células viáveis de leveduras constituintes do fermento biológico seco na amostra 2 quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.

Figura 32. Percentuais de células viáveis de leveduras constituintes do fermento biológico seco na amostra 3 quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.

Na tabela 8 estão expostos os resultados obtidos a partir da média aritmética das 3 amostras diferentes de fermento biológico seco. Analisando estes dados notamos que conforme aumentamos a dose de radiação e o tempo de armazenamento ocorre à redução da frequência de células viáveis (tabela 8 e figura 33).

Tabela 8. Média da frequência de células viáveis das 3 amostras de fermento biológico seco pelo método fluorescente *(DF-BE) após o processamento do produto por distintas doses de radiação e diferentes tempos de armazenamento.

Amostras	Tempo de armazenamento	Porcentagem de células viáveis (%)				
		0kGy	0,5kGy	1kGy	2kGy	3kGy
**Média	01 dia	90	78	71	69	64
	30 dias	84	73	60	53	47
	60 dias	78	74	60	39	36
	90 dias	68	55	44	25	20

* DF – Diacetato de Fluoresceína ; BE – Brometo de Etídio;

** Média aritmética das amostras 1, 2 e 3 de acordo com a dose de processamento e tempo de armazenamento.

Figura 33. Média dos percentuais de células viáveis de leveduras constituintes das 3 amostras de fermento biológico seco quando expostos a diferentes doses de radiação e a tempos de armazenamento distintos.

7. DISCUSSÃO

O processo de irradiação de alimentos tem sido tema de pesquisa intensiva desde a década de 60 até os dias atuais. Representa a solução para a produção de alimentos seguros, para a redução das perdas por deterioração, tanto quanto na prevenção de enfermidades veiculadas por alimentos. Essa prevenção é possível a partir da redução da população de bactérias patogênicas e de fungos toxigênicos, resultando uma melhor qualidade e segurança dos alimentos (Ingram & Farkas, 1977; Diehl, 1995).

Quando uma população de microrganismos é irradiada com uma dose baixa, somente algumas destas células serão danificadas ou mortas. Com o aumento da dose de radiação, o número de microrganismos sobreviventes diminui exponencialmente (como ocorre com o aumento em tratamentos com calor). Diferentes espécies e diferentes linhagens de uma mesma espécie requerem doses diferentes para atingir o mesmo grau de inativação.

A pesquisa da microbiota fúngica e bacteriana constitui uma ferramenta importante, pois permite através contagem do número de UFC/g de alimento, avaliar as condições de armazenamento e assim poder controlar o desenvolvimento de microorganismos nos alimentos (Ferreira, 2005).

Os métodos de preservação possuem como objetivo manter a viabilidade e estabilidade dos organismos. Em estudos anteriores, Silva *et al.* (1992) e Costa *et al.* (1991), afirmam que produtos alimentícios liofilizados permanecem estáveis durante longos períodos de estocagem o que pode ser observado em nossa pesquisa quando analisamos as amostras controle ao longo do tempo. Esse comportamento pode também ser visto nas amostras tratadas com radiação, porém as reduções são proporcionalmente mais elevadas.

O tratamento das amostras de fermento biológico seco com radiação gama ocasionou um decréscimo tanto de bactérias totais como de leveduras quando elevamos a dose de radiação. Em nossa pesquisa observamos que a radiação foi efetiva na redução do crescimento de bactérias totais e ocasionou consecutivamente uma diminuição no desenvolvimento de unidades formadoras de colônia de leveduras, o que não foi

considerado um efeito positivo, visto que este produto necessita destes microorganismos para exercer sua finalidade. Esta diminuição de células viáveis deve-se em grande parte ao efeito direto da radiação ionizante, visto que o fermento biológico seco possui baixa quantidade de água e este fato é essencial para que ocorra o processo de radiólise e conseqüentemente o efeito indireto da radiação. No efeito direto da radiação a principal molécula a ser lesionada é o DNA, devido ao seu tamanho superior em relação às outras moléculas. Uma vez atingido os danos aos microorganismos são profundos e dificilmente podem ser reparados.

Ao relacionarmos a contagem de colônias de bactérias e leveduras com o tempo de estocagem, notamos que há uma diminuição de unidades formadoras de colônia ao longo de 90 dias. De modo geral, notamos que esta diminuição ocorre de forma diretamente proporcional ao tempo de armazenamento, a medida que este período aumenta observamos também um aumento na diminuição tanto de bactérias totais como de leveduras.

Quando analisamos a média entre as três amostras de fermento biológico seco, notamos que as amostras controle armazenadas a 1 dia e a 90 dias apresentaram basicamente a mesma quantidade de UFC/g de leveduras. Este fato pode ser facilmente explicado, pois as amostras são liofilizadas e este é um procedimento que mantém estável a viabilidade de organismos por extensos períodos de armazenamento (Silva *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 1991). Em relação às amostras processadas por radiação, evidenciamos claramente a relação direta entre este fator e o tempo de armazenamento. Quanto maior a dose e o tempo de armazenamento maior é a redução de UFC/g de leveduras. Levando-se em conta a quantidade de UFC/g de bactérias totais para o mesmo parâmetro, observamos que há um padrão nos resultados; quanto maior é a dose de radiação menor é a quantidade destes microorganismos evidenciados em placa.

Em pesquisas realizadas anteriormente, Alcarde *et al.* (1997) e Domarco *et al.* (1996) relataram que as doses capazes de reduzir significativamente a contagem de leveduras encontram-se entre 4,65 e 20kGy. Essa afirmação não condiz com os resultados obtidos neste estudo, pois com doses de 3kGy notamos que a redução de 2 ciclos logarítmicos em média quando comparamos estas amostras irradiadas as amostras controle, o que pode ser considerado uma redução significativa.

Doses entre 2 e 7 kGy de radiação de ^{60}Co resulta em uma destruição considerável de microrganismos presentes nos alimentos, praticamente eliminando os patógenos (WHO, 1994). Outra constatação importante foi realizada por Saleh *et al.* (1996) e Abd El- Aal *et al.* (1997) que observaram os efeitos da radiação gama em fungos, aplicando doses entre 4 e 6kGy, visando uma completa inibição de fungos em diferentes alimentos.

Os fatos anteriormente expostos condizem em parte com nossos resultados, visto que o intervalo de doses acima referem-se a inibição total de fungos em geral e em nosso experimento a dose máxima utilizada foi de 3kGy, ou seja praticamente o limite inferior destes intervalos onde é iniciado o processo de inativação dos microorganismos. Provavelmente se aumentássemos a dose de radiação até os limites superiores citados observaríamos uma diminuição ainda mais significativa, ou ainda, uma inibição destes organismos. Porém nosso objetivo baseou-se na redução de bactérias totais somente, sendo que a redução de leveduras não era um resultado desejado.

As bactérias totais apresentam redução de 1 ciclo logarítmico quando comparamos a amostras controle com produto irradiado à 3kGy após 90 dias de estocagem. Esses resultados demonstram que além da radiação ionizante, o tempo de armazenamento auxilia na diminuição destes microorganismos.

Spoto *et al.* (1999) notaram que bactérias patogênicas não formadoras de esporos são eliminadas potencialmente com doses que variam de 3 e 5kGy e que doses de até 3kGy são suficientes para destruir grande parte a maioria das demais bactérias. Em nosso estudo analisamos a população de bactérias totais, ou seja, bactérias formadoras ou não de esporos. Assim sendo nossos resultados encontram-se de acordo com os autores referenciados, visto que começamos a notar uma redução mais efetiva a partir de doses de 3kGy.

Em relação ao tempo de estocagem, Spoto *et al.* (1999) observaram que aos 28 dias ocorreu uma redução de 3 ciclos logarítmicos na contagem total de bactérias em frangos quando estas foram tratadas com doses de 2kGy. No fermento biológico seco

notamos uma redução entre 1 e 2 ciclos logarítmicos quando analisamos as amostras 1, 2 e 3, após 30 dias.

Uma medida de sensibilidade à radiação, comumente usada, é a dose D_{10} , a qual elimina 90 % de uma população. Leveduras se reproduzem principalmente por brotamento ou por bipartição de uma única célula, formando novas células, mas também por formação de esporos. Fungos crescem por expansão de estruturas finas chamadas de hifas e também produzem esporos. Da massa de células de leveduras ou de bolores durante a produção de hifas, é difícil realizar a separação de células individuais e conseqüentemente este é o problema para delinear a curva de sobrevivência e determinar o valor D_{10} para tais organismos (Diehl, 1995).

Em nossa pesquisa, o D_{10} encontrado para bactérias totais apresentou um intervalo de doses que variou entre 2,31 e 2,95kGy, enquanto que a dose D_{10} para leveduras variou entre 1,10 e 2,23kGy. Nestes resultados são demonstrados claramente os pontos negativos da aplicação de radiação ionizante em fermento biológico seco, pois o intervalo de D_{10} encontrado para bactérias totais é superior ao encontrado para leveduras.

A partir dos resultados apresentados, torna-se inviável a utilização deste recurso para a melhora da qualidade do produto, visto que para reduzirmos consideravelmente a população bacteriana necessariamente temos que diminuir a praticamente o mesmo nível a população leveduriforme. Com a redução destes microorganismos iremos alterar consideravelmente a qualidade e a viabilidade do produto.

Alcarde *et al.* (1997) concluíram que a Dose D_{10} para a l; levedura *Saccharomyces cerevisiae* em mosto de cana – de açúcar foi de 0,77kGy, uma dose bem inferior do que o intervalo de dose encontrado em nosso estudo. Este fato deve-se provavelmente ao substrato ao qual a levedura encontra-se relacionada e a diferença da atividade de água contida neste.

Com a evidenciação de que o diacetato de fluoresceína podia ser utilizado como indicador da viabilidade de células de mamíferos, tendo como base a propriedade que possuem as células fúngicas de acumular a fluoresceína (fluocromasia) abriu-se

caminho para novas possibilidades como a determinação da viabilidade de culturas de fungos, coloração fluorescente de bactérias e de microrganismos do solo (Corrêa *et al.*, 1990).

Os métodos para a avaliação da viabilidade de células fúngicas baseiam-se no emprego de corantes vitais e no cultivo em meios apropriados. Neste estudo optamos por aplicar o método fluorescente (DF-BE) devido a sua eficiente sensibilidade, rapidez no processamento e a possibilidade de distinguir células vivas e mortas.

Em nossa pesquisa, a diminuição do número de células viáveis pelo aumento da dose de radiação, evidenciada pelo método fluorescente, confirmou os resultados obtidos no plaqueamento em profundidade, ainda que quando comparado ao cultivo em placa o método fluorescente (DF-BE) demonstrasse maior eficiência.

A frequência de células viáveis decaiu à medida que aumentamos a dose de radiação e o tempo de armazenamento. Devido à baixa atividade de água deste produto, o efeito direto da radiação torna-se predominante, agindo diretamente sobre as células leveduriformes, justificando assim o decréscimo de células viáveis observado. Ao processarmos uma população de microrganismos com baixas doses de radiação, poucas células serão danificadas ou mortas. Conforme aumentamos a dose de radiação o número de microrganismos sobreviventes diminui significativamente.

Ao observarmos as amostras controle e processadas com 0,5kGy em todos os tempos de estocagem notamos um grande predomínio de células verde brilhante (células viáveis). Essa coloração intensa concedida pelo diacetato de fluoresceína se deve a presença de sítios possuidores de maior atividade hidrolizante (Corrêa *et al.*, 1986).

Já nas amostras de fermento tratadas com 1, 2 e 3kGy, as células de leveduras exibiram uma tonalidade verde pouco intensa (pouca intensidade fluorescente) que pode ser justificada pelo fato de uma reduzida atividade enzimática celular. Alguns autores sugerem que a fraca intensidade de fluorescência esteja relacionada ao envelhecimento celular.

Células viáveis, coradas pelo Diacetado de Fluoresceína, refletiram áreas bem delineadas e intensamente coradas como a parede celular e a região vacuolar. Estes sítios foram apontados por Medzon & Brady (1969) como possuidores de atividade hidrolizante através das acetilesterases. Como consequência poderíamos pressupor que estruturas com estas enzimas apresentem maior atividade fluorescente (Corrêa *et al.*, 1986; Corrêa *et al.*, 1987).

A estrutura capsular, ao contrário do que se imaginava a princípio, não constitui barreira para a penetração dos corantes fluorescentes permitindo sua passagem em direção a célula. Outro detalhe que merece menção é a diminuição gradativa da atividade fluorescente a partir da parede celular, adquirindo a região intracelular coloração verde opaca. Tal comportamento não ocorre em determinados locais intracelulares possuidores de atividade acetilesterásica, como a região vacuolar que mostrou em algumas vezes atividade fluorescente semelhante a ocorrida em parede celular (Corrêa *et al.*, 1986; Corrêa *et al.*, 1989).

A fraca intensidade na coloração esverdeada de células viáveis nas amostras processadas por 1, 2 e 3kGy em relação à coloração verde brilhante exibida pela amostra controle e a tratada com dose de 0,5kGy ocorre devido aos efeitos diretos e indiretos da radiação nas enzimas envolvidas com o mecanismo de penetração de diacetato de fluoresceína.

8. CONCLUSÕES

- Baseado no número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) constatou-se que conforme aumentamos a dose de radiação nas amostras de fermento biológico seco, diminuimos a contagem de leveduras e bactérias totais. Notamos relação entre o tempo de estocagem e a contagem de leveduras, porém observamos um decréscimo da população leveduriforme e bacteriana ao longo do tempo.
- O intervalo de dose D_{10} para bactérias totais e leveduras nas amostras de Fermento Biológico seco encontrados neste estudo foi de entre 2,31 a 2,95kGy e 1,10 e 2,23kGy, respectivamente.
- O teste de viabilidade (DF-BE) mostrou-se eficiente na avaliação dos danos celulares causados pelas diferentes doses de radiação.
- A porcentagem de células viáveis decresceu à medida que aumentávamos a dose de radiação e o tempo de estocagem.
- O processamento por radiação do fermento biológico seco promoveu a redução de bactérias totais, porém houve também uma significativa redução de células viáveis de leveduras à medida que aumentamos as doses de radiação e o tempo de armazenamento.
- Nas condições do presente experimento, concluímos que a irradiação não é um modo de processamento eficaz para o tratamento do fermento biológico seco.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M. Efeito da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa M-300-A) em mosto de mel de cana- de- açúcar. *Sci. Agric.*, v. 54, n. 2, p.203-208, 1997.
2. ABD EL-AAL, S. S., & AZIZ, N. H. Effects of gamma radiation on mycotoxin production by toxigenic moulds in local karish cheese. *Egyptian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 151-168, 1997.
3. ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M.; HORII, J. Comparison between gamma radiation and Kamoran HJ in the decontamination of sugarcane must. *Journal of Food Processing and Preservation.*, v. 25, n. 2, p.137-147, 2001.
4. ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M.; HORII, J. Effect of γ radiation on physiological parameters of the ethanolic fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 18, p. 41-47, 2002.
5. ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. *Sci. Agric.*, v. 60, p. 677-681, 2003.
6. ALEXANDER, G. A. Improved Lyophilization procedure for storage of references cultures and clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v. 13, p. 805-806, 1981.
7. ANDREWS, L. S.; AHMEDNA, M.; GRODNER, R. M.; SHANE, S.; WILSON, P. W. Food preservation using ionizing radiation. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 154, p. 1-53. 1998.
8. BALEN, L.; SILVA, E. N.; ANDREATTI, R. L.; GAVIOLLE, M. C.; CAPPELLARO, C. E. M. P. D. Conservação da amostra Conn-F de *M. gallisepticum* pelo congelamento e liofilização. *Rev. Microbiol.*, v. 20, p. 71-77, 1989.
9. BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORRÊA, B. Determinação da Micobiota fúngica de fubá e farinha de milho, comercializados no município de São Paulo, SP. *Higiene Alimentar*, vol. 19, p. 79-83, 2005.
10. BLUMER, S. A. G. *Enriquecimento de Ferro em Levedura Saccharomyces cerevisiae*. 2002. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, São Paulo/Piracicaba.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto - Lei nº 986 de 21 de outubro de 1969. Institui Normas Básicas sobre Alimentos. Publicada no *Diário Oficial da União* de 21 de outubro de 1969. Alterado pela Medida Provisória nº2.190-34 de 23 de agosto de 2001.
12. BRASIL. ANVISA. Resolução - CNNPA nº 38, de 1977. Aprova como coadjuvantes da tecnologia de fabricação as substâncias constantes dos anexos I, II, III e IV, destinadas ao fabrico de produtos forneados, tais como: pão, broa,

biscoito, bolacha, bolo, torta e demais produtos afins de confeitaria. Publicada no *Diário Oficial da União* de 27 de dezembro de 1977.

13. CALICH, V. L. G.; PURCHIO, A.; PAULA, C. P. A. New fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*, v. 66, p. 175-177, 1978.
14. CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp*, Coliformes Totais e Fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, p. 281-287, 2001.
15. CHACHARKAR, M. P.; TAK, B. B.; BHATI, J. Alteration of yeast activity by gamma radiation. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 213, p.79-86, 1996.
16. CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. Radiações Ionizantes. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas.asp>. Data de acesso: 25 de novembro de 2006.
17. CHIRINOS, R. R. O.; VIZEU, D. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in hamburgers by gamma irradiation. *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, p. 53-56, 2002.
18. CORRÊA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W. Evaluation of a fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) in the study of the viability *Cryptococcus neoformans* strains. *Mycopathologia*, v.96, p. 91-96, 1986.
19. CORRÊA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W.; FRAMIL, V. M. S. Evaluation of a fluorescent method in the study of the viability of *Candida albicans* strains. *Rev. Microbiol.*, v.18, p. 258-263, 1987.
20. CORRÊA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W. Método fluorescente para o estudo da viabilidade de células fúngicas em materiais clínicos. *Rev. Microbiol.*, v.20, p. 349-357, 1989.
21. CORRÊA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Método fluorescente (diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para o estudo da viabilidade de *Cryptococcus neoformans* em líquido. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.32, n.1, p. 46-50, 1990.
22. CORRÊA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W.; SHIKANAI – YASUDA, M. A. Método fluorescente (diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para o estudo da viabilidade de *Cryptococcus neoformans* em líquido. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 32, n.1, p. 46 – 50, 1990. CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; PALAZZO, S. Morphogenesis of Sporothrix Schenk “in vivo” and “in vitro” through the method of viability by fluorescence. *Appl. Fluoresc. Technol.* v. 3, p.1-9, 1991.
23. COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microorganismos: revisão. *Revista de Microbiologia*, v. 22, p. 263-268, 1991.

24. DIEHL, J. F. *Safety of irradiated foods*. New York: Marcel Dekker, 1995.
25. DOMARCO, R.E, SPOTO, M.H.F, WALDER, J.M.M.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Efeito do tratamento combinado de irradiação gama e refrigeração no crescimento de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) em suco de laranja. *Sci. Agric.*, v. 53, p. 14-19, 1996.
26. EL-MONGY, T.M.; EL-FOULY, M.Z.; HAMMAD, A.A.I.; MATAR, Z.A.I. Irradiation for shelf-life extension and improvement of the hygienic quality of fresh, semidried and dried Tilapia nilotica fish. *Egyptian Journal of Food Science*, v.24, p. 119-134, 1999.
27. EDIDIN, M. A rapid quantitative fluorescent assay for celldamage by citotoxic antibodies. *J. Immunol.*, v. 104, p. 1303 – 1306, 1970.
28. FARKAS, J. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 148-152, 2006.
29. FERREIRA, F. L. Efeitos da radiação gama sobre amostras de milho contaminadas com *Fusarium verticillioides*. 2005. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo, São Paulo.
30. FOLEY, D. M.; PICKETT, K.; VARON, J.; LEE, J.; MIN, D.B.; CAPORASO, F.; PRAKASHI, A. Pasteurization of Fresh Orange Juice using Gamma Irradiation: Microbiological, Flavor and Sensory Analyses. *Food Microbiology and Safety*, v. 67, p. 1495-1501, 2002
31. FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Atheneu: Rio de Janeiro, 2001.
32. GRANT, I. R.; PATTERSON, M. Effect of irradiation and modified atmosphere packaging on the microbiological safety of minced pork stored under temperature abuse conditions. *Int. J. Fd. Sci. Technol.*, v. 26, p. 521-533, 1991.
33. GUEDES, R. *Análise microbiológica e de propriedades organolépticas de açaí (Euterpe oleracea) irradiado com radiação gama*. 2005. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo, São Paulo.
34. GUIBAULT, G. C.; KLAMER, N. D. Fluorometric determination of lipase, acylose, alpha e gamma chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Anal. Chem.*, v. 36, p.409 – 412, 1964.
35. HANSEN, J. M. & SHAFFER, H. L. Sterilization and preservation by radiation sterilization. In: BLOCK, S. S. *Disinfection Sterilization and Preservation*. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 729-746, 2001.

36. HILMY, N.; CHOSDU, R. AND MATSUYAMA, A. The effect of humidity after gamma-irradiation on aflatoxin B1 production of *A. flavus* in ground nutmeg and peanut. *Radiol. Phys. Chem.*, v 46, n. 4-6, p. 705-711, 1995.
37. HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; BUENO, S. M.; VINTURIM, T. M. Qualidade de sucos e frutas “in natura”. *Higiene Alimentar*, v. 15, n 80-81, 2001.
38. INGRAM, M; FARKAS, J. Microbiology of foods pasteurised by ionising radiation. *Acta Aliment.*, v. 6, p.123-184, 1977.
39. JAY, J. M. *Moderna Food Microbiology*. New York: International Thomson Publishing, 6ed., 2001.
40. KAUPERT, N.L.; LESCOANO, H.G.; KOTLIAR, N. Conservation of apple and pear juice concentration energetic effect on heat and radiation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF COMBINATION PROCESS IN FOOD IRRADIATION, Colombo, 1980. *Proceedings*. Viena: IAEA, 1981. p. 205-216.
41. KOORAPATI, A.; FOLEY, D.; PILLING, R.; PRAKASH, A. Electron-beam irradiation preserves the quality of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) slices. *Journal of Food Science*, v. 69, p. 25-29, 2004.
42. LACROIX, M.; OUATARRA, B. Combined industrial process with irradiation to assure innocuity and preservation of food products – a review. *Food Research International*, v. 33, p. 719-724, 2000.
43. LAGUNAS-SOLAR, M. C. Radiation processing of foods: an overview of scientific principles and current status. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 02, p. 186-192, 1995.
44. LEE, M.; SEBRANEK, J. G.; OLSON, D. G.; DICKSON, J. S. Irradiation and packaging of fresh meat and poultry. *Journal of Food Protection*, V. 59, p. 62-72, 2003.
45. LEITÃO, M. F. F.; HAGLER, L. C. S. M.; HAGLER, A. N. **Tratado de Microbiologia: Microbiologia de Alimentos, Microbiologia Sanitária, Microbiologia Industrial**, 1988. 186p.
46. LEY, F. J.; KENNEDY, T. S.; KAWASHIMA, K.; ROBERTS, D.; HOBBS, B. C. The use of gamma radiation for the elimination of *Salmonella* from frozen meat. *J. Hyg.*, v.6, p. 293-311, 1970.
47. LODDER, J. **The yeast: a taxonomic study**. 2 ed. Amsterdam: North Holland, 1971. 1385 p.
48. LOPES, M. A.; FISCHMAN, O.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B. Fluorescent method for studying the morphogenesis and viability of dermatophyte cells. *Mycopathologia*, v. 156, p. 61 – 66, 2002.

49. LOU, Y.; YOUSEF, A. E. *Characteristics of Listeria monocytogenes important to Food Processors*, 1999. In: MARTH, E. H.; RYSER, E. T. **Listeria , Listeriosis an Food safety**. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. p. 131- 224. New York, 1999.
50. MARTINS, C. G.; BEHRENS, J.H.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; VIZEU, D. M.; HUTZLER, B.; LANDGRAF, M. Gamma irradiation in the reduction of *Salmonella spp.* Inoculated on minimally processed watercress (*Nasturtium officinalis*). **Radiation and Physics and Chemistry**, v. 71, p. 87-91, 2004.
51. MATSUDA, A. H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para a de própolis**, 2002 – Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo.
52. MEDZON, E. L.; BRADY, M. L. Direct measurement of acetylsterase in living protist cells. **J. Bacteriol.**, v. 97, p. 402, 1969.
53. MERICAN, Z. Dealing with an expanding global food supply. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 1133-1137, 1996.
54. MINAMI, P. S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses**. Barueri, SP: Manole, 2003. 199p.
55. MURANO, E. A.; HAAYES, D. J.; MURANO, P. S.; OLSON, D.G.; SAPP, S. G. **Food Irradiation – A sourcebook**. Ames, 5 edição, 1995. 136p.
56. NIEMIRA, B. A.; FAN, X.; SOKORAL, K. J. B.; SOMMERS, C. H. Ionizing radiation sensivity of *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 and *Listeria innocua* ATCC 51742 inoculated on endive (*Cichorium endiva*). **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 993-998, 2003.
57. OLIVEIRA, S. P.; FREITAS, F. V.; MUNIZ, L. B.; PRAZERES, R. Condições Higiênico – Sanitárias do comércio de alimentos do Município de Ouro Preto, MG. **Higiene Alimentar**, v. 19, p. 26-31, 2005.
58. PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Segunda edição. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.
59. PEZZUTTI, A.; MATZKIN, M.R.; CROCI, C.A. Gamma irradiation improved the quality of onion flakes used by Argentine consumers. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 29, p. 120-131, 2005.
60. RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996. 727p.
61. RODRIGUES, J. A. R. E MORAN, P. J. S. Reduções enantioseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p.893-897, 2001.

62. RODRIGUES, M. A., L. **Morfogênese de dermatófitos utilizando método de viabilidade pela fluorescência**, 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
63. ROJAS Pedral, M. M.; PURCHIO, A. A avaliação de eficiência do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii*. **Rev. Lat. Am. Microbiol.**, v. 30, p. 197-200, 1988.
64. SALEH, N. A.; AZIZ, N. H. Incidence of mycotoxins in feedstuffs and effects of gamma irradiation and sodium propionate on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Journal of the Egyptian Medical Association**, v. 56, p. 281-299, 1996.
65. SANT'ANA, A. S.; CORREA, S. S. Efeito da adição de Dicloran ao diluente, para enumeração de fungos em alimentos desidratados utilizando-se o sistema petrifilmtm para bolores e leveduras. **Higiene Alimentar**, v. 21, n. 110, p. 122-126, 2006.
66. 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. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 200-205, 2003.
67. SANZ, R.; GALCERAN, M. T.; PUIGNOU, L. Field-Flow Fractionation as analytical technique for the characterization of dry yeast: Correlation with wine fermentation activity. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 1786-1791, 2003.
68. SILVA, A. B. P.; COUTO, S. M.; TÓRTORA, J. C. O. O Controle Microbiológico dos manipuladores, como indicativo da necessidade de medidas corretivas higiênico-sanitárias, em restaurante comercial. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p. 36-39, 2006.
69. SILVA, L. F. ; KAMIYA, N. F.; OLIVEIRA, M. S.; ALTERTHUM, F. Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, p. 177-182, 1992.
70. SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5^a. edição. Rio de Janeiro: Ânbito Cultural, 1995. 336p.
71. SOUZA, L. H. L. A manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 146, p. 32-39, 2006.
72. SOUZA, R. R.; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Técnica da simulação aplicada ao treinamento de manipuladores de alimentos, como recurso para a segurança alimentar de refeições transportadas. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 21-24, 2004.
73. SMITH, J. S.; PILLAI, S. Irradiation and Food Safety. V.58, n.11, 2004.

74. SPOTO, M. H. F.; GALLO, C. R.; DOMARCO, R. E.; ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; BLUMER, L. Radiação gama na redução da carga microbiana de filés de frango. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 19, p.397-400, 1999.
75. STAAB, A. J.; JAN, K. E. Viability of lyophilised anaerobes in two media. *Cryobiology*, v. 24, p. 174-178, 1987.
76. TAKASUGI, M. As improved fluorochromatic cytotoxic test. *Transplant.*, v.1, p. 148 – 150, 1971.
77. TALLENTIRE, A. The spectrum of microbial radiation sensitivity. *Radiation and Physics and Chemistry*, v. 15, p. 83-89, 1980.
78. URBAIN, W. M. *Food Irradiation*. Orlando: Academic Press, 1986.
79. VERRUMA – BERNARDI, M. R.; SPOTO, M. H. F. Estudo microbiológico e físico – químico do suco de laranja fresco irradiado. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 97, p. 76 - 80, 2002.
80. VILLAVICENCIO, A. L. C. H. **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de ⁶⁰ Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 1998. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
81. WEN, H. W.; CHUNG, H. P.; CHOU, F. I.; LIN, I.; HSIEH, P.C. Effect of gamma irradiation on microbial decontamination, and chemical and sensory characteristic of lycium fruit. *Radiation and Physics and Chemistry.*, v. 75, p. 596-603, 2006.
82. WHO - World Health Organization. *Safety and nutritional adequacy of irradiated food*. Geneva, p.1-17, 1994.
83. XAVIER, L. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. Presença de leveduras em produtos lácteos: uma abordagem especial para a significância de leveduras em queijos. *Higiene Alimentar*, v. 20, 61-64, 2006.