

EFEITO DA RADIAÇÃO POR MICRO-ONDAS NA INATIVAÇÃO DE CEPAS DE *Escherichia coli*.

Cristiano Ragagnin de Menezes

Gabriela Poletto

Maria Fernanda da Silveira Cáceres de Menezes

Mariana de Araújo Etchepare

Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS

gabriela.poletto@hotmail.com

RESUMO

Entre as bactérias patogênicas vinculadas a doenças transmitidas por alimentos destaca-se a *Escherichia coli*, sendo a espécie predominante na microbiota do trato intestinal dos humanos e animais de sangue quente e que está associada diretamente com a má higienização dos manipuladores. Com a necessidade de aplicar processos inovadores sem a geração de resíduos, o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle e redução de carga microbiana nos alimentos vem sendo estudado, destacando-se a irradiação por micro-ondas. Com a intenção de testar o efeito bactericida de um forno micro-ondas (2450 MHz) sob cepas de *E. coli*, diferentes tempos de irradiação foram utilizados, sendo estes 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 60s tendo como controle, uma amostra não irradiada. Ainda, imagens termográficas e mapeamento do forno foram realizados para verificar a distribuição da temperatura das amostras irradiadas, demonstrando a heterogeneidade da incidência das ondas no interior da cavidade do mesmo. Após a realização dos testes, verificou-se que em 20s de

irradiação, as cepas de *Escherichia coli* foram inativadas, demonstrando a relevância do método para a ciência e tecnologia dos alimentos uma vez que o processo mostrou-se eficaz no controle microbiano, de fácil operação, sem a geração de resíduos, rápido e econômico, quando comparado aos métodos convencionais de inativação e destruição microbiana.

Palavras chave: *Novas tecnologias. Desinfecção microbiana. E. coli.*

ABSTRACT

Among the pathogenic bacteria transmitted to foodborne illness there is the Escherichia coli, being the predominant species in the microflora of the intestinal tract of humans and warm-blooded animals and is directly associated with poor hygiene of food handlers. With the need to apply innovative processes without waste generation, the development of new technologies for the control and reduction of microbial load in food has been studied, highlighting irradiation by microwave. With the intention of testing the bactericidal effect of a microwave oven (2450 MHz) as strains of E. coli

different irradiation times were used, these being 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 60 as having a control, a sample not irradiated. Further, thermographic images and oven mapping were performed to verify the temperature distribution of the irradiated samples, demonstrating the heterogeneity of incidence of the waves within the cavity thereof. After the tests, it was found that in 20 seconds irradiation, strains of Escherichia coli were inactivated, demonstrating the relevance of the method for science and technology of food once the process has been shown to be effective in microbial control, easy operation with no waste generation, quickly and cost when compared to conventional methods of microbial inactivation and destruction.

Keywords: *New technologies. Microbial disinfection. E. coli.*

INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana nos alimentos pode ocorrer por fatores como manipulação e conservação inadequadas, contaminação cruzada entre produtos crus e proces-

sados e o uso de utensílios e materiais mal higienizados (MURMANN et al., 2008). Os alimentos quando contaminados podem ocasionar surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) aos consumidores constituindo um dos maiores problemas de saúde pública (WELKER et al., 2010).

Entre os patógenos veiculados por alimentos e causadores de doenças, a *Escherichia coli* tem-se mostrado relevante em muitos estudos. A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bastonete gram-negativo, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativo e fermentador da lactose. Se multiplica em temperaturas de 7°C a 48°C, com temperatura ótima de 37°C, e em pH próximo ao neutro, sendo a espécie predominante na microbiota do trato intestinal dos humanos e dos animais homeotermos (SILVA et al., 1997).

Tendo em vista a inativação microbiana, diferentes métodos de desinfecção têm sido avaliados, entre eles a radiação micro-ondas. As micro-ondas localizam-se na região do espectro eletromagnético entre as ondas milimétricas (0,01m) e as ondas de rádio (1m) correspondendo a frequências entre 0,3 GHz e 30 GHz. Nos fornos de micro-ondas, as ondas geradas são reguladas em frequências que podem ser absorvidas por materiais polares, os quais simplesmente absorvem a energia e tornam-se aquecidos. Esta propriedade das micro-ondas as torna uma opção para acelerar os processos de tratamento térmico, uma vez que reduz o tempo necessário para que os alimentos atinjam a temperatura ideal para redução ou eliminação de micro-organismos (RAMPELOTTO, 2012).

Além de ocasionarem aquecimento, as micro-ondas apresentam efeitos não térmicos nas membranas celulares. As teorias da eletroporação e acoplamento magnético são alguns dos efeitos não térmicos estudados. A eletroporação ocorre quando um potencial elétrico penetra a membrana do microrganismo

provocando a formação de poros que resultam em vazamento do conteúdo celular. O acoplamento do campo magnético provoca uma ruptura nos componentes internos da célula, o que leva a lise celular permitindo que as bactérias sejam destruídas a temperaturas mais baixas do que o uso do calor sozinho (LAKINS et al., 2008).

A temperatura de incidência das micro-ondas na amostra foi verificada através de imagens termográficas. A termografia trata-se de um método de detecção da distribuição de energia térmica emitida pela superfície de um ou vários corpos ou objetos. É um ensaio não destrutivo que utiliza os raios infravermelhos para medir temperaturas ou observar padrões diferenciais de distribuição de temperatura (AZEVEDO & SILVA, 2012).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito bactericida de um sistema de irradiação de micro-ondas na inativação de cepas *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se um forno de micro-ondas convencional, da marca LG®, de frequência 2450 MHz, modelo MS3042RA, capacidade de 30L, com potência nominal de 800W.

Mapeamento do forno de micro-ondas através da variação da temperatura da água

De acordo com Trindade e Cerqueira (2007) e Rosini et al. (2004) com adaptações, o procedimento consistiu em distribuir no prato giratório (30,5 cm) em “forma de cruz”, 9 béqueres com capacidade de 50mL, contendo 25mL de água ultrapura. Cada béquer foi identificado e posicionado no mesmo local do prato onde foi verificada a temperatura inicial da água de cada béquer. As identificações adotadas foram: A1, A2, A3 e A4 para os béqueres da borda do prato, ou seja, 2,5cm da extremidade do prato; B1, B2, B3

e B4 para os béqueres da área intermediária ou 8,5cm da extremidade do prato; C para o béquer posicionado no centro do prato giratório ou 15,2cm da extremidade do mesmo. As temperaturas das amostras de água foram verificadas simultaneamente, por meio de dois termômetros de mercúrio (marca HG) após a exposição de 60s de irradiação micro-ondas.

A incidência da radiação é medida através do cálculo da potência. Este é feito por aplicação dos valores de temperatura à equação:

$$P = \frac{k.Cp.m.\Delta t}{t} \quad (1)$$

P = potência

k = fator de conversão (4,184 J.g⁻¹K⁻¹)

Cp = capacidade calorífica da água (1°C)

m = massa da água

Δt = variação da temperatura, em °C

t = tempo, em segundos

Determinação da potência real do forno de micro-ondas

Para verificar a potência real do processo de aquecimento do equipamento foram realizados ensaios, com três repetições, do aquecimento de 1000g de água ultrapura em béquer com capacidade para 2L durante o tempo de 120s. O béquer foi posicionado no centro da cavidade do micro-ondas. A temperatura foi determinada antes e após a irradiação, com termômetro de mercúrio (HG) (RASCHEN et al., 2014).

A potência real (P) foi determinada (em watts) pela razão entre a energia absorvida pela água e o tempo de irradiação, através da equação utilizada no procedimento anterior.

Imagens termográficas das cepas de *E. coli*

As imagens foram coletadas e armazenadas com câmera termográfica em infravermelho (FLIR, E60), para cada unidade experimental (placa de

Petri), após 2 segundos dos diferentes tempos de irradiação micro-ondas. Monitorou-se 85% da imagem (85x85cm) resultando em 5940 pixels a uma distância de 40 cm entre câmera e amostra. A câmera apresenta sensibilidade térmica $\leq 0,05^\circ\text{C}$ e mede uma faixa de temperatura de -20 a $+650^\circ\text{C}$. A emissividade da câmera termográfica foi ajustada para 0,95.

Preparação do inóculo de *E. coli*

A preparação do inóculo seguiu a metodologia descrita por Apostolou et al. (2005) com adaptações. As culturas da estirpe (ATC 25922) foram preparadas em tubos inclinados de Ágar Trípico de Soja (Himedia) e armazenados a 5°C em refrigerador (Electrolux®). Culturas puras de *E. coli* foram preparadas por subcultura da estirpe de ensaio em 10mL de Caldo Trípico de Soja (Himedia) a 37°C durante 18-24 h e subsequente inoculação de 4mL em 400 mL de Caldo Trípico de Soja armazenados em estufa de incubação a 37°C (Cienlab) durante 24h.

Análises microbiológicas

Após a incubação de 400mL de Caldo Trípico de Soja contendo 4mL de inóculo, retirou-se 30mL os quais foram irradiados em placa de Petri nos tratamentos de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 60 segundos, tendo como controle uma amostra não irradiada. Este procedimento foi realizado em 3 repetições para cada tempo. Em seguida, foram feitas as respectivas

diluições e a semeadura de 1mL de cada diluição em placas de Petri. Adicionou-se ágar Violet Red Bile (Himedia), homogeneizou-se adequadamente o ágar com o inóculo e deixou-se solidificar em superfície plana para posteriormente fazer a sobrecamada. Incubaram-se as placas invertidas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas em estufa de incubação. Decorrido o tempo de incubação realizou-se a leitura das placas no contador de colônias (LS 6000).

Análise estatística

Foram realizadas três repetições para cada tratamento e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (one-way, ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$) com auxílio do programa STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Inc, Tulsa – OK, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mapeamento do forno de micro-ondas através da variação da temperatura da água

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que a maior incidência da radiação micro-ondas ocorreu na região das bordas do prato giratório, uma vez que a variação de temperatura foi de $38,9^\circ\text{C}$ e a potência determinada 67,8W.

Segundo estudo realizado por Raschen et al. (2014), o mapeamento da radiação no interior do forno

demonstrou heterogeneidade da incidência das ondas, ressaltando a importância de disponibilizar de forma adequada os copos na cavidade do forno de micro-ondas. Na região central (0 e 5cm de distância a partir do centro do prato giratório) a potência obtida foi 43,9W, já na faixa intermediária (5 e 10cm) obteve-se 41,8W. A posição selecionada para a realização dos experimentos ficou na faixa das bordas (10 e 15cm do centro do prato giratório) pois foi a região de maior incidência de radiação micro-ondas (45,0W), resultado este que corrobora com o apresentado neste trabalho.

Determinação da potência real do forno de micro-ondas

A potência nominal fornecida pelo fabricante do forno (LG) foi de 800 W, enquanto que a potência real encontrada (potência máxima) foi 627,5 W, correspondendo esta a 78,4% da potência nominal, sendo o restante da energia dissipada pelo meio.

Em outro estudo, através da mesma metodologia realizada neste trabalho, a potência real (potência máxima) foi de 697 W, correspondente a 77,4% da potência nominal fornecida pelo fabricante do forno micro-ondas (RASCHEN et al., 2014).

Imagens termográficas das cepas de *E. coli*

Na Figura 1 apresentam-se as imagens termográficas das cepas de *E. coli*.

Analisando a Figura 1, observou-se

Tabela 1 – Mapeamento do forno micro-ondas.

Regiões de Identificação dos béqueres no prato giratório	Variação de Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Potência (W)
<i>Regiões de irradiação na cavidade</i>		
Centro	38,6	67,4
Intermediária	28,7	50,3
Borda	38,9	67,8

que de acordo com as variações do tempo de irradiação e temperatura, obteve-se a alteração das cores da escala policromática, sendo os pontos em branco e amarelo menos intensos responsáveis por apresentar maior incidência de calor e foram observados a partir de 30s de irradiação micro-ondas, principalmente, como pode-se visualizar nas imagens 1(e), 1(f) e 1 (g).

Observa-se ainda, que quanto maior o tempo de radiação, maior a temperatura emitida, uma vez que em 5s a temperatura média correspondeu a 31,6°C e em 60s, a média chegou a 67,9°C.

Pitchai et al. 2014, realizaram imagens termográficas de nuggets de frango e purê de batatas após irradiação micro-ondas. Para o purê de batatas a temperatura mais alta permaneceu em torno de 30°C mesmo após 90s de aquecimento, enquanto que a temperatura excedeu 72°C em nuggets de frango demonstrando o aquecimento não uniforme do equipamento.

Efeito bactericida das micro-ondas

A cinética bactericida das micro-ondas para *E. coli* e para diferentes tempos de exposição são

apresentados na Tabela 2.

De acordo com a Tabela 2 verifica-se que a contagem inicial de células viáveis da amostra controle (não irradiada) foi de 10,56 log UFC/g. Após 15s de irradiação obteve-se uma redução de 8,57 log UFC/g apresentando uma diferença significativa comparando-se com o controle. A partir de 20s obtêm-se a inativação da bactéria *E. coli*.

Comparando o efeito bactericida de aquecimento convencional e forno micro-ondas em culturas líquidas de *Escherichia coli*, *Salmonella sofia*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* obtiveram a conclusão que para todas as estirpes testadas as micro-ondas foram mais eficazes, uma vez que as bactérias morreram mais rapidamente do que no cozimento (C. PAPADOPOULOU et al., 1995).

Ao equiparar tratamento térmico convencional com energia de micro-ondas na inativação de esporos de *Bacillus subtilis*, após a irradiação a viabilidade dos esporos foi semelhante à observada para os esporos submetidos a aquecimento por condução para os mesmos intervalos de tempo. Completa inativação de

esporos foi obtida por irradiação e convencionalmente posteriormente a 20 min de aquecimento (CELANDRONI et al., 2004).

Em outro estudo, suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* NRRL 3711 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram expostas a irradiação micro-ondas. Os graus de inativação pelas variações de tempo, montante inicial de células bacterianas e de energia foram comparados de forma sistemática. A eficiência máxima das micro-ondas foi em 60s de exposição. Dados experimentais mostram que as micro-ondas aparentemente produzem efeitos letais sobre as bactérias examinadas por calor gerado durante a exposição de micro-ondas (GEDIKLI et al., 2007).

Ao estudar o efeito da radiação eletromagnética de um forno de micro-ondas à frequência de 2,45 GHz, em *Escherichia coli*, concluiu-se que é possível inativar uma grande parte das bactérias a partir de 30s de irradiação a uma temperatura de 60°C (PEREIRA, 2007).

Também analisando a incidência da radiação de micro-ondas sobre *E. coli*, Banik et al. (2003), observaram

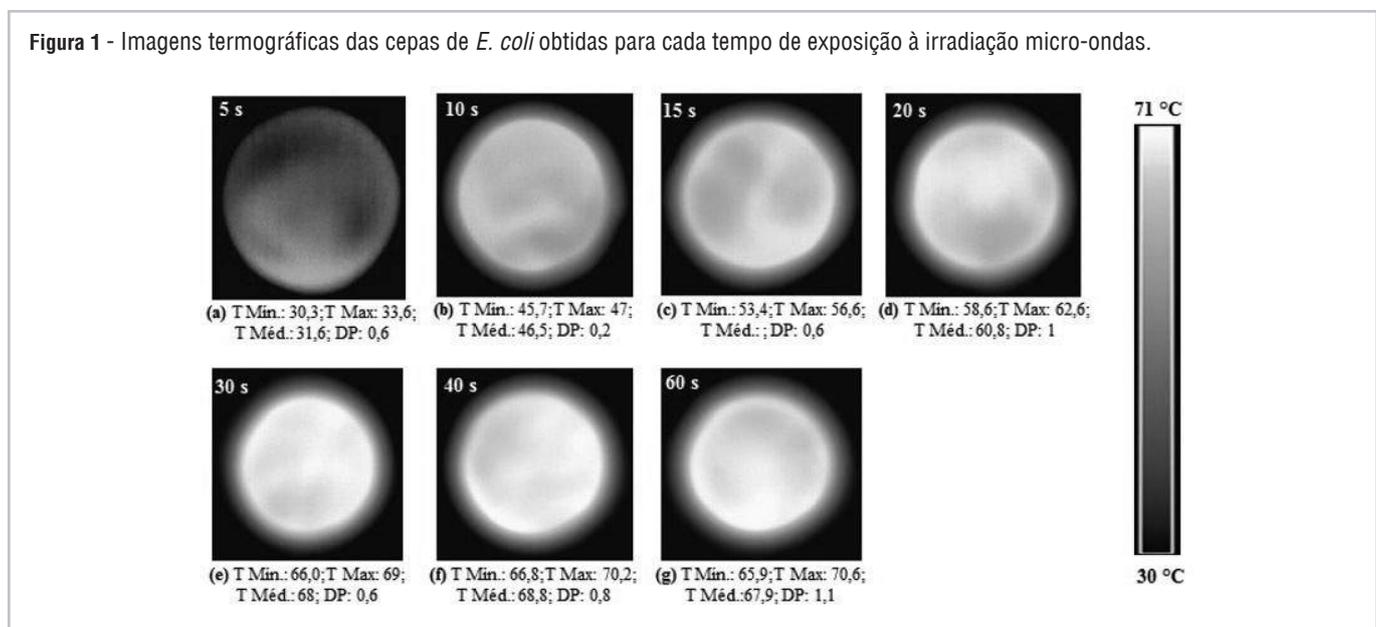


Tabela 2 - Cepas de *Escherichia coli* irradiadas por micro-ondas em diferentes tempos.

Tratamento	Log UFC/g
Controle	10,56 ^a ± 0,03
5s	10,43 ^b ± 0,04
10s	10,38 ^b ± 0,00
15s	8,57 ^c ± 0,03
20s	0,00 ^d ± 0,00
30s	0,00 ^d ± 0,00
40s	0,00 ^d ± 0,00
60s	0,00 ^d ± 0,00

*Valores médios (n=3) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

a taxa de mortalidade da bactéria em diferentes temperaturas, onde não foi verificado a morte celular a 35°C, enquanto que a 45°C, 47°C e 50°C as taxas de mortalidade foram maiores que as obtidas na esterilização convencional à mesma temperatura.

Os últimos resultados apresentados corroboram com os obtidos no presente estudo, uma vez que a temperatura de inativação da *Escherichia coli* ocorreu a partir de 60°C.

CONCLUSÃO

Verificou-se que o forno de micro-ondas é um método eficaz para inativação da bactéria *Escherichia coli*, uma vez que após 20s de irradiação não houve contagem de células viáveis, porém mais estudos precisam ser realizados quanto à influência das micro-ondas na parede celular e efeitos térmicos e não térmicos causados sobre os micro-organismos.

REFERÊNCIAS

- APOSTOLOU, I; PAPADOPOULOU, C; LEVIDIOTOU, S; IOANNIDES, K. The effect of short-time microwave exposures on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto chicken meat portions and whole chickens. **International Journal of Food Microbiology**, 101, 105–110, 2005.
- AZEVEDO, LCS & SILVA, AMG. Uso da termografia na manutenção preditiva. **Rev divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense** v.2, n.1, p. 155-158, 2012.
- BANIK, S; BANDYOPADHYAY, S; GANGULY, S. Bioeffects of microwave: a brief review. **Bioresource Technology**, v.87, p.155–159, 2003.
- CELANDRONI, F; LONGO, I; TOSORATTI, N; GIANNESI, F; GHELARDI, E; SALVETTI, S; BAGGIANI, A; SENESI, S; Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. **J Appl Microbiol**, 2004, 97, 1220–1227.
- LAKINS, DG et al. Reduction of *salmonella enteritidis* in shell eggs using directional microwave technology. **Poultry Science**, v.87, n.5, p.985 – 991, maio 2008.
- MURMANN, L et al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.529-534, 2008.
- NOTERMANS, S; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, AH. Existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, n.3-4, p.197-205, 1992.
- PAPADOPOULOU, C; DEMETRIOU, D; PANAGIOU, A; LEVIDIOTOU, S; GESOUL, H; IOANNIDES, PK; ANTONIADIS, G. Survival of Enterobacteria in liquid cultures during microwave radiation and conventional heating. **Microbiol. Res.** (1995) 150, 305 – 309.
- PITCHAI, K; CHEN, J; BIRLA, S; GONZALEZ, R; JONES, D; Subbiah, J. A microwave heat transfer model for a rotating multi-component meal in a domestic oven: Development and validation. **Journal of Food Engineering** (128) 2014. 60 – 71.
- RAMPELOTTO, C. **Pasteurização de salsichas com ultrassom e micro-ondas**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)– Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- RASCHEN et al. Determinação do teor de umidade em grãos empregando radiação micro-ondas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.5, p.925-930, maio, 2014.
- ROSINI, F; NASCENTES, CC; NÓBREGA, JA. Experimentos didáticos envolvendo radiação micro-ondas. **Quim. Nova**, v.27, n.6, 1012-1015, 2004.
- SILVA, N; JUNQUEIRA, VCA; SILVEIRA, NFA. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, p.18, 1997.
- TRINDADE, MEJ; CERQUEIRA, RCA. **Saponificação assistida por forno de micro-ondas doméstico**. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa - PB – 2007.
- WELKER, CAD et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras de Biociências**, v.8, n.1, p.44-48, 2010.