

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

ADRIANA CRISTINA DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE LIPÍDIOS,
MICROBIOTA CONTAMINANTE E VALIDADE COMERCIAL DO
LEITE CRU INTEGRAL REFRIGERADO E SOBRE
CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO LEITE PASTEURIZADO
INTEGRAL REFRIGERADO**

**Niterói-RJ
2008**

ADRIANA CRISTINA DE OLIVEIRA SILVA

EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE LIPÍDIOS, MICROBIOTA CONTAMINANTE
E VALIDADE COMERCIAL DO LEITE CRU INTEGRAL REFRIGERADO E SOBRE
CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO LEITE PASTEURIZADO INTEGRAL
REFRIGERADO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária da Universidade Federal
Fluminense. Área de concentração:
Higiene Veterinária e Processamento
Tecnológico de Produtos de Origem
Animal

Orientador: PROF. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ

Co-orientador: PROF. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA

Co-orientador: Prof^a. Dr^a ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO

Co-orientador: Prof. Dr. EDGAR FRANCISCO OLIVEIRA DE JESUS

ADRIANA CRISTINA DE OLIVEIRA SILVA

EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE LIPÍDIOS, MICROBIOTA CONTAMINANTE
E VALIDADE COMERCIAL DO LEITE CRU INTEGRAL REFRIGERADO E SOBRE
CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO LEITE PASTEURIZADO
INTEGRALREFRIGERADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária da Universidade Federal
Fluminense, como requisito parcial para obtenção
do Grau de Doutor. Área de concentração: Higiene
Veterinária e Processamento Tecnológico de
Produtos de Origem Animal

Aprovada em 19 de dezembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ – Orientador
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. EDGAR FRANCISCO OLIVEIRA DE JESUS – Co-Orientador
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO – Co-Orientador
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA - Co-Orientador
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS ALBUQUERQUE DO PRADO CARVALHO
Centro Universitário Plínio Leite – UNIPLI

Niterói/RJ
2008

Dedico a Tese à minha mãe que me ensinou a viver e que me transmitiu os melhores valores da vida: honestidade, sinceridade, humildade, fraternidade e perdão.

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Ao meu orientador Marco Antonio Sloboda Cortez por ter me aceito sem me conhecer e sem saber o que esperar de mim. De Orientador, tornou-se amigo;

A minha querida amiga e Prof^a Eliane Teixeira Mársico, que me auxiliou de forma concreta, contínua, incansável, com carinho, amor e dedicação;

Aos meus Co-orientadores Luiz Antônio Trindade e Edgar Francisco O. de Jesus que tiveram paciência com minha ignorância e que me co-orientaram com alegria;

A Indústria de Laticínios Companhia do Leite – Maraporã Cooperativa Agropecuária Industrial Ltda, pela doação do leite necessário para meu experimento;

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto Militar de Engenharia (IME), pela disponibilização de seu espaço para a realização da RMN;

A Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE), que disponibilizou o equipamento para irradiar as amostras de leite;

Ao Técnico de Laboratório e amigo Carlos Frederico Magalhães pelo auxílio durante a execução da tese;

Ao Prof. Sérgio Borges Mano pelo apoio logístico e pelo carinho ofertado;

Ao Prof. Robson Maia Franco que me auxiliou na execução de fases do meu trabalho com a dedicação de um mestre;

A Prof^a Mônica Queiroz de Freitas, pelo auxílio na análise sensorial;

Ao meu querido amigo Drausio Ferreira que me socorreu nos dias de ansiedade e exasperação;

Aos meus amigos Letícia Figliuolo Pinto Coelho, Patrícia Castanheiras e Leonardo Pessanha Silva, que mesmo de longe me deram forças necessárias para não desistir nas horas difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 7

LISTA DE TABELAS, p.10

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p.12

RESUMO, p.14

ABSTRACT, p.15

1 INTRODUÇÃO, p.16

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 18

2.1 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS, p. 20

2.2 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICROTRÓFICAS, p. 21

2.3 BACTÉRIAS DO GRUPO DOS COLIFORMES TOTAIS (35-37°C) E FECAIS (45°C), p. 23

2.4 Staphylococcus spp. , p. 24

2.5 IRRADIAÇÃO EM ALIMENTOS, p. 25

2.5.1 Tipos de radiação para alimentos, p. 26

2.5.2 Efeitos da radiação sobre os microrganismos, p. 27

2.5.3 Benefícios da utilização da radiação em alimentos, p. 28

2.5.4 Desenvolvimento de ranço oxidativo ocasionado pela radiação, p. 30

2.6 OXIDAÇÃO LIPÍDICA E SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBA) , p. 32

2.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) , p. 37

2.8 RANÇO OXIDATIVO NO LEITE E AVALIAÇÃO SENSORIAL, p. 38

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 41

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS, p. 41

3.2 IRRADIAÇÃO DAS UNIDADES AMOSTRAIS DE LEITE, p. 42

3.3	METODOLOGIA	p. 43
3.3.1	Análises bacteriológicas	p. 43
3.3.2	Validade Comercial	p. 46
3.3.3	Determinação do Ranço pelo TBA	p. 46
3.3.4	Determinação de Produtos Secundários de Oxidação Lipídica por RMN (HU et al., 2004)	p. 47
3.3.4.1	Extração dos lipídios	p. 47
3.3.4.2	RMN	p. 47
3.3.5	Análise sensorial	p. 47
3.3.6	Tratamento Estatístico dos Resultados	p. 48
4	RESULTADOS	p. 50
4.1	ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS	p. 50
4.2	AVALIAÇÃO DA VALIDADE COMERCIAL	p. 55
4.2.1	– Análises bacteriológicas	p. 55
4.2.2	Análises Físico-Químicas	p. 59
4.3	SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO TBA	p. 61
4.4	RMN	p. 63
4.5	ANÁLISE SENSORIAL	p. 65
5	DISCUSSÃO	p. 67
6	CONCLUSÕES	p. 73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p. 74
8	APÊNDICES	p. 84
8.1	APÊNDICE 1 - RESULTADO DAS ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS DO LEITE CRU INTEGRAL IRRADIADOS NAS DOSES DE 1, 2 E 3 kGy E DA AMOSTRA CONTROLE	p. 85
8.2	APÊNDICE 2 - RESULTADO DA ANÁLISE SENSORIAL DO LEITE INTEGRAL PASTEURIZADO IRRADIADO	p. 87

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1 Fases da rancificação oxidativa da gordura, p.35
- Fig. 2 Reação do Teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectofotometricamente a 535 nm, p.38
- Fig. 3 Vista frontal da CIA do leite localizada em Cachoeiras de Macacu, RJ, Brasil, p.44
- Fig. 4 Irradiador Gama pertencente ao Laboratório de Instrumentação da COPPE/UFRJ, (Co 60 modelo Gammacell Nordion – Canadá), p.45
- Fig. 5 Metodologia da determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais, Fecais e E.coli - Método Rápido Fluorocult LMX (MERCK, 1996), modificado por Franco e Mantilla (2004), p.48
- Fig. 6 Ficha de análise sensorial utilizada no Teste Triangular, p.51
- Fig. 7 Representação gráfica da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral não irradiado e irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy, p.54
- Fig. 8 Representação gráfica da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas (Log UFC/mL) do leite cru integral não irradiado e irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy, p.55
- Fig. 9 Representação gráfica da contagem de Staphylococcus coagulase

positiva (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (controle), p.55

- Fig. 10 Representação gráfica do Número Mais Provável de Coliformes 35-37°C (log NMP/mL) do leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (controle), p.56
- Fig. 11 Representação gráfica do Número Mais Provável de Coliformes a 45°C (log NMP/mL) do leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (controle), p.57
- Fig. 12 Representação gráfica dos dados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral não irradiado (controle), p.60
- Fig. 13 Representação gráfica dos dados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado na dose de 1kGy, p.60
- Fig. 14 Representação gráfica dos dados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado na dose de 2kGy, p.61
- Fig. 15 Representação gráfica dos dados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado na dose de 3kGy, p.61
- Fig.16 Representação gráfica dos resultados das análises de Índice de Substâncias Reativas ao TBA em amostras de leite cru irradiadas nas doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (controle – amostra não irradiada; A1 – irradiada com 1 kGy; A2 – irradiada com 2 kGy e A3 - irradiada com 3 kGy), p.65

- Fig. 17 e 18 Amostras de leite cru integral irradiadas nas doses de 1, 2 e 3 kGy e amostra controle após reação com o ácido 2-TBA antes (A) e após a centrifugação (B) demonstrando maior intensidade de cor conforme aumento da dose de radiação gama, p.66
- Fig. 19 Representação gráfica dos picos de ácido carboxílico (180 ppm), ácidos graxos insaturados (130 a 132 ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra controle obtido na RMN utilizando o carbono 13, p.67
- Fig. 20 Representação gráfica dos picos de cetona (209 ppm), aldeído (202 ppm), ácido carboxílico (180 ppm), ácidos graxos insaturados (130 a 132ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra irradiada na dose de 1kGy obtido na RMN utilizando o carbono 13, p.68
- Fig. 21 – Representação gráfica dos picos de cetona (209 ppm), aldeído (202 ppm), ácido carboxílico (180 ppm), ácidos graxos insaturados (130 a 132 ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra irradiada na dose de 2kGy obtido na RMN utilizando o carbono 13, p.68
- Fig. 22 Representação gráfica dos picos de cetona (209 ppm), aldeído (202 ppm), ácidos graxos isaturados (130 a 132 ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra irradiada na dose de 3 kGy obtido na RMN utilizando o carbono 13, p.69

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Valores médios de BHAM em leite cru integral irradiado com doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (amostra controle), p. 54
- TABELA 2 - Resultados médios da contagem de Staphylococcus coagulase positiva em leite cru integral irradiado com doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (amostra controle), p.56
- TABELA 3 - Valores médios de coliformes 35-37C° (log de NMP/mL) do leite cru integral irradiado com doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (amostra controle), p.57
- TABELA 4 - Resultados médios das análises bacteriológicas das amostras de leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy, p.58
- TABELA 5 - Resultados das Contagens de BHAM (Log UFC/mL), médias e desvio padrão das amostras de leite cru integral irradiadas nas doses 1, 2 e 3 kGy e não irradiada (controle) mantidas a 5°C durante 60 dias, p.59
- TABELA 6 - Resultados da taxa de crescimento microbiológico, tempo de geração bacteriana, e Log inicial e final em UFC/mL das bactérias das amostras irradiadas nas doses de 1, 2 e 3 kGy e da amostra controle, p.62
- TABELA 7 - Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral não irradiadas (controle) realizadas em um período compreendido

entre 0 e 60 dias após a irradiação, p.63

TABELA 8 - Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral irradiado na dose de 1 kGy realizadas em um período compreendido entre 0 e 60 dias após a irradiação, p.63

TABELA 9 - Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral irradiadas na dose de 2 kGy realizadas em um período compreendido entre 0 e 60 dias após a irradiação, p. 64

TABELA 10 - Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral irradiadas nas doses de 3 kGy realizadas em um período compreendido entre 0 e 60 dias após a irradiação, p.64

TABELA 11 - Resultados, Médias e Desvio Padrão da análise de substâncias reativas ao 2-TBA (mg MA/mL) obtidos em amostras de leite cru refrigerado não irradiadas e irradiadas com doses de 1, 2 e 3 kGy, p.66

TABELA 12 - Resultados da análise sensorial do leite pasteurizado irradiado para cada nível de irradiação comparado com a amostra controle, p.70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância;
BHAM	Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas;
CDCl_3	Clofórmio Deuterado;
CIA	Companhia;
CO_2	Anidrido Carbônico;
Cs^{137}	Césio 137;
Co^{60}	Cobalto 60;
CPP	Contagem Padrão em Placas;
CG	Cromatografia Gasosa;
$^{\circ}\text{D}$	Graus Dornic;
DNA	“Desoxirribonucleic Acid”
DTA	Doenças Transmitidas pelos Alimentos;
EM	Espectroscopia de Massa;
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
IC	Índice Crioscópico;
IME	Instituto Militar de Engenharia;
IPTG	Isopropil β -D-1- tiogalactopiranosídeos;
kGy	Kilogray;
Log	Logaritmo;
MDA	Malonaldeído;
μL	Microlitros;
M	Molar;
NaCl	Cloreto de Sódio;
NMP	Número Mais Provável.

nm	Namômetro;
OH ⁻	Íon Hidroxila
O ₂ ⁻	Íon Oxigênio;
PCA	Plate Count Agar”;
PTN	Proteína;
p	Probabilidade;
RJ	Rio de Janeiro
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SNG	Sólidos Não Gordurosos;
SSP	Solução Salina Peptonada;
RMN	Ressonância Magnética Nuclear;
TBA	Ácido Tiobarbitúrico;
UAT	Ultra-Alta Temperatura;
UFC	Unidade Formadora de Colônia;
UFF	Universidade Federal Fluminense;
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

A contaminação do leite cru é um dos principais problemas da indústria de laticínios. Neste experimento amostras de leite cru integral foram submetidas à radiação gama de Co^{60} nas doses de 1, 2 e 3 kGy. Foi feito um estudo sobre o efeito da radiação gama sobre os principais grupos de bactérias contaminantes do leite cru (mesófilos, psicrotóxicos, *Staphylococcus* spp. e coliformes a 30-45 °C). Ocorreu redução significativa da contagem bacteriológica ($p \leq 0,5\%$) das amostras irradiadas frente à amostra controle. Também foi verificado o efeito desse tratamento na produção de ranço oxidativo por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico (2-TBA) e análises sensoriais. Verificou-se que os valores de TBARS foram maiores em função da intensidade da dose de irradiação aplicada às amostras, demonstrando correlação entre a dose de radiação e a produção de oxidação lipídica. Este fato foi confirmado pela RMN com a formação dos picos de aldeídos e de carbonilas cetônicas que foram pequenos e semelhantes nas doses de 1 e 2 kGy; na dose de 3 kGy verificou-se total degradação da gordura do leite. Tanto a RMN quanto o teste das Substâncias Reativas ao ácido 2-TBA demonstraram boa correlação entre si e com os resultados das análises sensoriais. Os resultados da análise sensorial demonstraram que o ranço foi detectado pelos provadores em todas as doses e que não houve aprovação do leite pelos provadores.

Palavras-chave: leite; radiação gama; bacteriologia; ranço; análises físico-químicas; análise sensorial.

ABSTRACT

Raw milk contamination is one of the main concerns of the dairy industry. In this experiment samples of raw milk were submitted to the gamma radiation (Co^{60}), in the doses of 1, 2 and 3 kGy. The effect of the gamma radiation in main groups of bacteria of raw milk (mesophilic, psychotropic, *Staphylococcus* spp. and coliform 30-45°C) was studied. A significant reduction of bacteriological count in the radiated samples was observed ($p \leq 0.5\%$). Also the effect of radiation treatment in rancidity production was verified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Thiobarbituric Acid Test (2-TBARS) and sensorial analyses. To all doses, a gradual increase in color in milk samples was verified using 2-TBA method. Using NMR, to 1 and 2 kGy, the peaks of aldehydes and ketones were similar; but in the dose of 3 kGy was verified the total degradation of milk fat. A correlation among NMR, 2-TBA and sensorial analyses was detected. The sensory panelists were able to detect rancid developed in all tested doses and radiated milk was not approved.

Key words: milk; gamma radiation; bacteriology; rancidity; physical chemical analyses; sensorial analyses.

1 INTRODUÇÃO

A ingestão de alimentos contaminados afeta grande parte da população mundial, inclusive nos países desenvolvidos. A incidência de DTA nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos é alarmante, apesar de todos os avanços tecnológicos e sanitários voltados para esta área. Robbs e Campelo (2002) citam que além das DTA, certos gêneros de bactérias podem ocasionar a deterioração dos produtos levando a grandes perdas econômicas pela indústria de alimentos. Em 1997, as perdas estimadas na agroindústria do leite por problemas de sanidade animal e contaminação por microrganismos foram na ordem de R\$ 610 milhões de reais.

Dentre os principais gêneros envolvidos na contaminação do leite encontram-se bactérias lácticas (especialmente *Streptococcus* spp.), bactérias do grupo dos coliformes, bactérias aeróbias psicrófilas, mesófilas e termoresistentes, destacando as pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. como causadores de problemas relacionados à saúde dos consumidores e alterações de leite e derivados (FRAZIER, 1993). Além dos riscos potenciais de saúde pública, essa contaminação faz com que o leite pasteurizado no Brasil tenha uma validade comercial inferior quando comparada aos países desenvolvidos.

Na tentativa de atender um público que tem exigido produtos mais saudáveis, além de seguros do ponto de vista microbiológico e toxicológico, a indústria alimentícia tem buscado novos tratamentos que atendam seus interesses e de seus consumidores. Pesquisas utilizando a irradiação demonstram que essa tecnologia é uma das opções mais convenientes para melhorar a qualidade higiênica dos alimentos e para reduzir as enfermidades causadas por produtos contaminados com

agentes microbianos e parasitários. Esse tratamento possui diversas vantagens sobre os tratamentos térmicos convencionais, pois mantém o frescor e as características sensoriais na maioria dos produtos.

Entretanto, trabalhos que determinam os efeitos da radiação gama sobre os microrganismos que podem contaminar o leite e os derivados lácteos, principalmente o leite fluido, podem ser considerados escassos, se comparados com os demais produtos de origem animal, sendo considerado um processamento inadequado devido às reações químicas que acontecem durante o processamento, podendo acelerar a oxidação dos lipídios e, conseqüentemente, o processo de rancificação, tornando os produtos inaceitáveis para o consumo.

Existem atualmente diversos métodos para detecção de ranço em produtos alimentícios. O ácido 2-tiobarbitúrico (2-TBA) é o preferido para se detectar a oxidação de lipídios em sistemas biológicos, quando se busca rapidez e diminuição dos custos, além de possuir boa reprodutibilidade e correlação com as análises sensoriais.

Outra técnica que fornece bons resultados em relação às alterações dos componentes do leite é a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (ANDREOTTI et al., 2000), pois não é uma metodologia invasiva, preservando a estrutura dos alimentos, sendo capaz de extrair informações úteis de sistemas muito complexos e altamente heterogêneos (HU et al., 2004).

Com relação ao desenvolvimento de rancificação nos alimentos sempre será necessária à realização de análises sensoriais dos produtos, pois, a validade de qualquer análise físico-química dependerá em grande parte da correlação entre estes aspectos (NAWAR, 1983).

Portanto o foco deste estudo foi: verificar a eficácia da radiação gama na eliminação das bactérias contaminantes do leite cru integral refrigerado envasado em embalagens plásticas de polietileno, comparando os resultados com os padrões da legislação de leite pasteurizado e UAT (BRASIL, 2002; BRASIL, 1996); avaliar a validade comercial do leite cru refrigerado após a irradiação; avaliar a formação de produtos secundários de oxidação lipídica no leite cru pelos métodos de TBA e RMN; verificar a aceitação sensorial do leite irradiado; fazer uma correlação entre os resultados obtidos no TBAR, RMN e análises sensoriais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A qualidade do leite e derivados é uma constante preocupação de técnicos e autoridades ligadas às áreas de saúde e laticínios, principalmente pelo risco de veiculação de microrganismos patogênicos e deteriorantes (CARMO, 2001), uma vez que o leite é um meio de cultura ideal para o crescimento bacteriano (CORTEZ; CORTEZ, 2008).

O leite contém proteínas, glicídios, lipídios, sais minerais e vitaminas em concentrações apropriadas para satisfazer as necessidades de crescimento e multiplicação celular. Os microrganismos encontram os substratos ideais para seu desenvolvimento, mesmo aqueles mais exigentes e difíceis de cultivar em outros meios menos completos (LARPENT, 1996).

No Brasil, de um modo geral, a qualidade do leite é baixa, caracterizando-se por elevada contagem microbiana ocasionando diversas alterações no leite e nos seus derivados (CERQUEIRA et al., 1999). Alguns microrganismos apresentam atividade deteriorante, caracterizada basicamente pela ação enzimática de seu metabolismo. Outros apresentam diferentes níveis de patogenicidade, caracterizando risco para a saúde pública (CORTEZ; CORTEZ, 2008).

A contaminação começa a ocorrer nos canais galactíferos e vai aumentando gradativamente à medida que o leite segue seu trajeto ao exterior do animal através das tetas (OLIVEIRA, 1986). Estes microrganismos podem estar localizados no úbere e no canal da teta (FONSECA; FONSECA, 2001).

Segundo Larpent (1996) tratam-se de bactérias saprófitas do úbere e dos canais galactíferos, sobretudo os gêneros *Micrococos*, *Streptococos Lácticos* e *Lactobacilos*. O leite cru obtido de forma higiênica e proveniente de animais sadios contém poucos microrganismos, na ordem de 10^2 a 10^3 UFC/mL (HARRIGAN,

1998). Esses microrganismos ficam alojados principalmente nos tecidos das cisternas da glândula, cisterna do teto e nos ductos, após a saída dos alvéolos (POTTER; HOTCHKISS, 1998). Após a obtenção e transporte adequados, é possível obter leite com contaminação máxima na ordem de 10^4 a 10^5 UFC/mL (FONSECA; FONSECA, 2001).

Em uma ordenha não higiênica, muitos microrganismos são introduzidos ao leite através da superfície do úbere e tetas, das fezes do animal, do solo, dos alimentos, das mãos do ordenhador, etc. O leite também poderá sofrer contaminação devido à má higienização das superfícies de equipamentos de transporte e armazenamento do leite (FONSECA; SANTOS, 2000; CORTEZ; CORTEZ, 2008).

Os microrganismos contaminantes do leite e suas fontes de contaminação são: *Salmonella* spp., coliformes, *Bacillus* spp. e *Clostridium*, spp. provenientes das fezes e da pele do animal; *Streptomyces* spp., bactérias esporuladas e esporos de fungos encontrados nos solos; bactérias banais, principalmente os lactobacilos, além do *Clostridium butyricum* presentes nas camas dos animais; bactérias lácteas, micrococos, lactobacilos, *Chromobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Acinobacter* spp. e leveduras provenientes de equipamentos de ordenha e armazenamento do leite e *Staphylococcus* spp. ou outros microrganismos encontrados nas mãos dos manipuladores ou como produtos de expectoração destes (LARPENT, 1996).

Os principais microrganismos envolvidos na contaminação do leite são as bactérias, tendo os vírus, fungos e bolores uma participação reduzida (FRAZIER, 1993). Em relação às bactérias, a legislação brasileira (BRASIL, 2001b; BRASIL, 2002) determinou padrões para alguns grupos com a finalidade de assegurar a qualidade do leite fluido que é fornecido a população.

Para o leite cru refrigerado, a Instrução Normativa número 51 (BRASIL, 2002) estabelece padrões de contagem para as Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (BHAM) por meio da Contagem Padrão em Placas (CPP) para o leite tipo A (máx. 1×10^4) e B (máx. 5×10^5); para o leite pasteurizado devem ser realizadas em cinco amostras a CPP (Tipo A: máx. $1,0 \times 10^3$; Tipo B: máx. $> 8,0 \times 10^4$; Tipo C: máx. $3,0 \times 10^5$), enumeração de coliformes a 30-35°C (Tipo A: $c > 0$, $m < 1$; Tipo B: $c < 2$, $m > 2$, $M < 5$; Tipo C: $c > 2$, $m > 2$, $M > 4$), coliformes a 45°C (Tipo A: ausência; Tipo B: $c > 1$, $m > 1$, $M > 2$; Tipo C: $c > 1$, $m > 1$, $M > 2$) e isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

(ausência em cinco amostras para todos os tipos de leite); já para o leite Ultra Alta Temperatura (UAT), o Regulamento Técnico específico (BRASIL, 1996) estabelece padrões de contagem somente para BHAM (máx. 100 UFC/mL).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001b) estabelece a enumeração de coliformes a 45°C ($n=5$, $c<1$, $m<2$, $M<4$) e isolamento e identificação de *Salmonella* spp. em leite pasteurizado (ausência em cinco amostras). Para o leite UAT, somente especifica que este leite não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e sensoriais do produto, em condições normais de armazenamento.

Apesar de não existir para o leite cru fluido um padrão de microrganismos heterotróficos aeróbios psicotróficos e *Staphylococcus* coagulase positiva, previstos pelas legislações brasileiras (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001b; BRASIL, 2002) as bactérias psicotróficas tem grande importância na deterioração de produtos lácteos enquanto *Staphylococcus* coagulase positiva estão relacionados a DTA.

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2007), no entanto estabelece que o número de germes termófilos e psicrófilos não deve ultrapassar de 10% (dez por cento) o número de mesófilos.

Contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva superiores a 10^5 são suficientes para a produção de enterotoxinas estafilocócicas resistentes aos tratamentos térmicos utilizados normalmente pela indústria de alimentos (NEWSOME, 1988; PARK; SZABO, 1986) e altas contagens de psicotróficos ocasionam alterações sensoriais e tecnológicas em diversos produtos tais como leite UAT (SANTOS et al., 1999; SCHOKEN-ITURRINO et al., 1996).

2.1 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS

As bactérias mesófilas são aquelas que crescem bem em uma faixa de temperatura entre 20°C e 45°C e possuem temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 40°C (JAY, 2005). Seu aumento no leite está relacionado principalmente à falhas de higiene e refrigeração. A presença destes microrganismos em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições

inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos. Destacam-se os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas enterobactérias (FONSECA; SANTOS, 2000).

As bactérias mesófilas são aquelas que crescem bem em uma faixa de temperatura entre 20°C e 40°C e o seu aumento no leite está relacionado principalmente à falhas de higiene e refrigeração. A presença destes microrganismos em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos. Destacam-se os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas enterobactérias (FONSECA; SANTOS, 2000).

O principal problema relacionado à multiplicação destes gêneros bacterianos é a acidificação do leite através da degradação da lactose em glicose e galactose, liberando ao final do processo grande quantidade de ácido láctico. O leite ácido apresenta deficiência na resistência térmica com precipitação de proteínas durante o aquecimento. A liberação de ácido láctico faz com que o leite torne-se progressivamente mais ácido, impossibilitando sua utilização pela indústria (HAMMER; BABEL, 1957). A transformação de lactose em ácido láctico provoca queda do pH do leite, de 6,6 para 4,5, que é o ponto isoelétrico da caseína e ocasionado a sua coagulação (PRATA, 2001).

Além dos problemas relacionados à baixa resistência térmica, a multiplicação de microrganismos pode significar a presença de bactérias patogênicas que podem levar a problemas de saúde pública (VIEIRA et al., 1995).

Para a quantificação da contaminação do leite tem sido utilizada a contagem padrão em placas (CPP) que serve como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre a validade comercial de conservação (SILVA; JUNQUEIRA, 1997).

2.2 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS PSICROTRÓFICAS

Com as mudanças nos processos de coleta e armazenamento do leite, ou seja, o resfriamento e a manutenção do leite em seguida da coleta à uma temperatura entre 4 e 7°C por no máximo 48 horas, verificou-se uma mudança da

microbiota presente. Onde antes havia a predominância da microbiota mesofílica acidificante, passou a predominar microrganismos psicotróficos, originando outros tipos de alterações em leite e derivados, podendo ocasionar grandes prejuízos para a indústria de laticínios (CASTRO; PORTUGAL, 2000; LANPERT, 1996). No Brasil, este aumento ocorreu após as exigências estabelecidas pela Instrução Normativa n° 51 (BRASIL, 2002).

Segundo Cousin et al. (1992), psicotróficos podem ser definidos como microrganismos que possuem capacidade de crescimento a $7^{\circ}\text{C} \pm 1$ dentro de 7 a 10 dias, apesar da temperatura ótima de crescimento ser superior a 20°C , sendo considerados um subgrupo dos microrganismos mesofílicos. Estão comumente associados à deterioração de alimentos refrigerados, pois metabolizam carboidratos, proteínas e lipídios durante o tempo de estocagem dos alimentos.

Os principais representantes no leite são os microrganismos dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Listeria*, *Yersinia*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* e *Clostridium* (COUSIN et al., 1992; LAMPERT, 1996).

Estes microrganismos estão presentes no leite “in natura” de forma ubíqua. São raramente encontrados na superfície interna do úbere da vaca, sendo este contaminado externamente através do solo, água, ar, vegetação, fezes, poeira, palhas velhas, ordenhadores e instrumentos e equipamentos mal higienizados utilizados na ordenha (SHAH, 1994).

O leite também poderá ser contaminado no armazenamento, transporte e após o processamento térmico na indústria. As condições higiênico-sanitárias na obtenção e transporte da matéria-prima irão determinar as contagens iniciais destas bactérias, que irão multiplicar-se rapidamente sob refrigeração. Durante a sua multiplicação, produzem enzimas termoresistentes que poderão ocasionar a deterioração do produto (SANTOS et al., 1999; SCHOKEN-ITURRINO et al., 1996).

Conforme Shah (1994), a maioria dos psicotróficos não sobrevive à pasteurização e ao tratamento UAT. Contudo, durante seu crescimento irão produzir enzimas termoresistentes causando gelatinização do leite UAT, desenvolvimento de sabor e aroma indesejáveis em leite pasteurizado, diminuição no rendimento de queijos e alterações sensoriais no iogurte. Cousin et al., (1992) relata que espécies de *Pseudomonas* spp. podem causar defeitos na manteiga como odor de fruta e ranço além de modificações da coloração e deteriora.

2.3 BACTÉRIAS DO GRUPO DOS COLIFORMES TOTAIS (35-37°C) E FECAIS (45°C)

As bactérias do grupo coliforme são membros da família *Enterobacteriaceae* sendo incluídas nesta família bactérias patogênicas tais como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia* spp.. Os coliformes diferem de outros membros da mesma família pela capacidade de fermentação da lactose com produção de ácido e gás dentro de 24-48 h (APHA, 2001; JAY, 2005).

Algumas bactérias habitam o trato gastrointestinal do homem e de animais de sangue quente e outras são bactérias não entéricas como *Serratia* spp. e *Aeromonas* spp.. Como coliformes não sobrevivem às temperaturas de pasteurização, sua presença vai indicar falhas no processo de higiene e sanitização de equipamentos ou contaminação após o beneficiamento do alimento. Comumente são encontrados no leite cru por meio de contaminação dos canais das tetas por forragens ou materiais da cama, podendo ocasionar mastite nos animais e, em consequência, a liberação deste grupo bacteriano no leite; o leite também poderá ser contaminado após a ordenha pelo ar, pelo contato de equipamentos mal higienizados e pelas mãos do homem (BANWART, 1981).

O gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme, consideradas como enterobactérias. Todavia os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* eventualmente são de origem fecal. Por isso, a presença de coliformes fecais em um alimento é menos representativa do que a enumeração direta de *Escherichia coli* (FRAZIER, 1993; SILVA; JUNQUEIRA, 1997).

Quando se detecta *E. coli* em um alimento, pode-se esperar que exista a presença de outros patógenos, evidenciando que este produto não seja seguro em relação à saúde coletiva, podendo ocasionar quadros de gastroenterites severas (PRATA, 2001).

Vários surtos de DTA têm sido reportados no mundo, tendo como principal agente a *Escherichia coli* O:157 H7 que produz uma toxina muito potente (CONEDERA et al., 2004). Além da patogenicidade, Mousaoui et al. (2004) constataram que a *E. coli*, pode estar associada à proteólise no leite.

Tratando-se dos problemas relacionados à saúde do consumidor, os coliformes fecais podem ocasionar diversas alterações em derivados lácteos tais como: estufamento precoce pela fermentação da lactose e produção de gás, má estrutura dos coágulos e limosidade em queijos; alterações de sabor, produção de ácido ou coagulação do leite por ação desses ácidos, e produção de odores desagradáveis em diversos produtos e, mais raramente, o aparecimento de pigmentos (FURTADO, 2005).

2.4 *Staphylococcus* spp.

Entre os microrganismos que podem contaminar leite e derivados, *Staphylococcus* spp. têm sido considerado um dos mais freqüentemente envolvidos em surtos de DTA, juntamente com *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (DAVIS; WILBEY, 1990).

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* apresentam-se na forma de cocos Gram positivos, isolados ou agrupados em cachos, pares ou tétrades. Estes microrganismos são anaeróbios facultativos, não esporulados, imóveis e produtores usuais de catalase. *Staphylococcus* spp. estão amplamente distribuídos na natureza (ar, água, esgoto, leite entre outros) e o corpo humano é o seu principal reservatório (BERGDOLL, 1989).

Os *Staphylococcus* spp. possuem ótimo crescimento em concentrações de cloreto de sódio (NaCl) acima de 10% diminuindo em concentrações de 15% (MURRAY et al., 1986). A temperatura ótima de crescimento e produção de enterotoxinas encontra-se em torno de 37°C, podendo crescer em ampla faixa de temperatura que vai de 10 até 45°C. Este é um fator preocupante para as indústrias e está ligado à estocagem de alimentos, principalmente de leite e derivados (CARMO, 1997).

O crescimento de *S. aureus* enterotoxigênicos a uma população de pelo menos $5,0 \times 10^5$ células/g de alimento geralmente é considerado necessário para a produção de quantidade suficiente de enterotoxina para causar intoxicação (NEWSOME, 1988; PARK; SZABO, 1986). A contagem média de *S. aureus* em leite cru no Brasil está em torno de 10^5 UFC/mL, o que constitui risco de produção de enterotoxinas e desenvolvimento de DTA (BERGDOLL, 1989; LAMAITA, 2003).

Um dos maiores surtos relatados no Brasil envolvendo *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas ocorreu em 1998 na cidade de Santana do Manhuaçu-MG, onde foi servido um jantar a 8000 pessoas com cardápio constituído de arroz, feijão, farofa de miúdos de frango e carne de boi cozida e desfiada. Em um período que variou de 15 minutos a seis horas após a ingestão dos alimentos, 2.000 pessoas apresentaram os seguintes sintomas: náuseas, vômito, diarréia intensa, cólicas abdominais e dores de cabeça. Trezentas e setenta pessoas foram hospitalizadas, sendo mais tarde registrados 17 óbitos. Os resultados das análises demonstraram a presença de *Staphylococcus aureus* nos alimentos em uma população de $6,4 \times 10^7$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/g e na orofaringe dos manipuladores. Havia também a presença de coliformes fecais com contagens superiores a 1.100 NMP/g. As toxinas detectadas foram as enterotoxinas estafilocócicas A, C e D (SOUZA et al., 1999).

Gomes e Gallo (1995) observaram em leite cru e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba (SP), contagens de $1,2 \times 10^3$ a $7,4 \times 10^5$ UFC/mL e de $4,78 \times 10^4$ a $1,4 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente.

2.5 IRRADIAÇÃO EM ALIMENTOS

A radiação pode ser definida como a emissão e a propagação de energia através do espaço ou através de um meio material (ADAMS; MOSS, 1995; JAY, 2005).

A descoberta do raio-X aconteceu em 1895 por W.K.Röntgen e a radioatividade dos sais de urânio foi descoberta em 1896 por Henri Becquerel, conduzindo a diversas pesquisas para verificar os efeitos biológicos da radioatividade. Como o processo utilizado era extremamente dispendioso, as aplicações práticas deste tipo de processamento eram inviáveis (BRYNJOLFSSON, 1989). Em 1929 foi emitida a patente para uso da irradiação como método de preservação em alimentos. Entretanto, somente depois da II Guerra Mundial é que esta técnica recebeu a devida importância (GAVA, 1999; IFT, 1983; JAY, 2005). Em 1959 ocorreu a aprovação pelas autoridades em saúde de 24 países (IFT, 1983) e, segundo Pszczola (1990), de acordo com dados colhidos em 1983 pela "Association of Official Agricultural Chemists" (AOAC) 36 países aprovaram este tratamento para 49 tipos de alimentos.

Entre 1964 e 1997, a Organização Mundial de Saúde acompanhou o resultados desses estudos, em conjunto com Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), através de uma série de reuniões com especialistas de diversos países do mundo. Na última reunião em setembro de 1997, a conclusão final foi divulgada: “ A OMS aprova e recomenda a irradiação de alimentos, em doses que não comprometam suas características sensoriais, sem a necessidade de testes toxicológicos”. Após essa declaração a irradiação de alimentos foi aprovada pelas autoridades de saúde de 40 países (MELLO, 2008).

Atualmente, cerca de 50 países permitem o uso da radiação gama para tratamento de no mínimo um ou mais alimentos ou classes de alimentos e mais de 30 países estão aplicando a radiação gama em mercadorias comerciais em estado bruto para propósitos comerciais (FARKAS, 2006).

A irradiação de alimentos é um processo físico de conservação que consiste na exposição de alimentos à fontes de radiação ionizantes para satisfazer quatro objetivos principais: esterilização, pasteurização, desinfestação e inibição da germinação (GAVA, 1999).

2.5.1 Tipos de radiação para alimentos

Existem várias formas de energia radiante, emitidas de várias maneiras, que pertencem ao chamado espectro eletromagnético de radiações. Essas formas de energia diferem no comprimento de onda, frequência, força de penetração e outros efeitos que exercem sobre sistemas biológicos (GAVA, 1999).

Nos dias atuais, os tipos de radiações utilizadas no tratamento de alimentos são as radiações ionizantes, que são eletromagnéticas, formadas pela combinação de campos elétricos e magnéticos, perpendiculares entre si, que se propagam no vácuo com uma velocidade constante de $3,0 \times 10^8$ m/s. São procedentes dos raios gama de alta energia emitidos pela fissão atômica do núcleo de elementos excitados tais como o Cobalto-60 (Co^{60}) e Césio-137 (Cs^{137}), dos raios X com energia máxima de 5 milhões de elétron (MeV) e dos elétrons acelerados com energia máxima de 10 MeV, também denominadas radiações ionizantes. A energia dessas fontes de

radiação são muito baixas para induzir radioatividade em quaisquer materiais, incluindo os alimentos (FERREIRA, 1999; JAY, 2005).

Os raios X foram as primeiras fontes utilizadas em radiação de alimentos, porém, devido a baixa potência das máquinas daquela época, seu uso foi descartado. Com o advento dos reatores nucleares na década de 50, os raios gama passaram a ser utilizados para esta finalidade (FERREIRA, 1999).

As ondas eletromagnéticas de raios gama Co^{60} são similares à luz, porém possuem energia muito mais alta. Esta fonte de energia tem sido utilizada para desinfestação, retardo do amadurecimento de frutas, eliminação de bactérias patogênicas e parasitas e destruição de microrganismos (URBAIN, 1986). Possuem um excelente poder de penetração e que segundo Adams e Moss (1995) são capazes de penetrar até uma profundidade de 20 cm, enquanto o Cs^{137} pode penetrar até 5 cm. O Co^{60} possui uma meia-vida de aproximadamente cinco anos; o Cs^{137} possui meia-vida aproximada de 30 anos.

As partículas beta também são utilizadas para alimentos obtidas através de aceleradores de elétrons do tipo Van de Graff, lineares, etc. Os raios ou partículas beta, ao contrário dos raios gama, podem ser orientados em uma só direção, podendo-se paralisar a operação quando se desejar. Possuem menor penetrabilidade que os raios gama, aproximadamente 2,5 cm, mas ionizam a matéria com mais facilidade (GAVA, 1999).

2.5.2 Efeitos da radiação sobre os microrganismos

A dose de radiação é usualmente medida em uma unidade denominada Gray (Gy). Essa é a medida da quantidade de energia transferida para um alimento, microrganismo ou outra substância irradiada. Dez kilo Gray (10 kGy) ou dez mil Grays (10.000 Gy), significam o mesmo que um megaRad (1 Mrad). Para medir a quantidade de irradiação à qual uma substância qualquer é exposta um filme de fotografia é exposto ao mesmo tempo. A quantidade de vapor emitida pelo filme é proporcional ao nível de irradiação (CDC, 1999).

O efeito letal da radiação para microrganismos é medido em valor-D10 que representa a quantidade de irradiação necessária para destruir 90 % dos

microrganismos. Os valores-D10 são diferentes para cada microrganismo. Também variam com a temperatura e com o tipo de alimento (ibid).

A radiação ionizante pode afetar diretamente os microrganismos pela interação com moléculas específicas no interior das células ou indiretamente por meio de efeitos inibidores de radicais livres produzidos pela radiólise da água (ADAMS; MOSS, 1995).

No efeito direto, durante a irradiação as moléculas de DNA sofrem intumescência e ocorre quebra ao longo da cadeia, fazendo com que a célula deixe de funcionar normalmente. Consequentemente, tanto as bactérias como os parasitas não são capazes de se reproduzirem e morrem (URBAIN, 1986). No efeito indireto, as moléculas de água são alteradas para produzir radicais altamente reativos, como os radicais hidroxila (OH) e hidrogênio (H). Estes radicais podem reagir entre si, com oxigênio dissolvido na água e com várias moléculas orgânicas e inorgânicas, fornecendo vários compostos radicais (GAVA, 1999).

Este efeito indireto desempenha um papel muito importante, já que na ausência de água são necessárias doses de radiações duas a três vezes mais intensas para se obter o mesmo resultado sobre os microrganismos (ADAMS; MOSS, 1995).

2.5.3 Benefícios da utilização da radiação em alimentos

Alimentos irradiados, produzidos sob as normas de boas práticas de fabricação, podem ser considerados nutricionalmente adequados e seguros pelo fato da irradiação não provocar mudanças na composição do alimento do ponto de vista toxicológico, o que poderia ocasionar problemas na saúde dos consumidores (IFT, 1983; LEE, 1994). É tão segura que foi escolhida pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA), agência espacial americana, como forma de tratamento das refeições servidas em seus vôos (RELA, 2001).

Segundo CDC (2001), no momento da irradiação, o alimento não entra em contato com a fonte de radiação. Quando a fonte de raios gama não está sendo utilizada, está submersa em um tanque de água, com a finalidade de absorver a radiação. No momento da sua utilização, a fonte é retirada da água, dentro de uma câmara com espessa parede de concreto para evitar que os raios escapem.

Alimentos ou produtos médicos são colocados dentro da câmara sendo expostos aos raios por um período determinado. Depois do uso, a fonte é recolocada dentro do tanque.

A radiação pode induzir a formação de substâncias denominadas “produtos radiolíticos”. Estas substâncias não são radioativas e não são exclusivas dos alimentos irradiados, sendo encontradas nos alimentos naturalmente ou após a realização de tratamentos térmicos. Pesquisas sobre essas substâncias não encontraram associação entre a sua presença e efeitos nocivos aos seres humanos (IFT, 1983).

Alimentos submetidos à esterilização por irradiação têm sido aprovados para a utilização em refeições de hospitais, para pacientes que necessitam de alimentos estéreis devido a problemas de imunidade (DONG et al., 1992; IFT, 1983). A irradiação também pode ser utilizada no lugar da fumigação química para controlar infestação de insetos em cereais, farinha, frutas secas e frescas e outros produtos vulneráveis ao ataque destes agentes (IFT, 1983). Doses tão pequenas quanto 1 a 3 kGy são suficientes para redução de microrganismos deteriorantes presentes nos alimentos. Esta redução poderá aumentar a validade comercial de produtos, tais como frutas, carne e pescado (KILCAST, 1994).

Segundo a FAO (1992), cerca de 25 % de toda produção mundial de alimentos se perde pela ação de microrganismos, insetos e roedores. A germinação prematura de raízes e tubérculos condena à lata de lixo, toneladas desses produtos, sendo este fenômeno mais intenso nos países de clima quente, como o Brasil.

A aplicação da irradiação em carnes, frangos e peixes, a dosagens inferiores a 1 kGy eliminam parasitas. Doses intermediárias eliminam bactérias patogênicas e reduzem a contagem bacteriana total (GIROUX; LACROIX, 1998).

A irradiação de alimentos possui diversas vantagens sobre os tratamentos térmicos convencionais, pois permite um melhor controle que o aquecimento, uma vez que a penetração da radiação é mais profunda, instantânea e uniforme; utilizando-se doses pequenas na maioria dos produtos, mantém o seu frescor. O método de preservação dos alimentos por irradiação é considerado “frio” porque implica em um pequeno aumento da temperatura durante o processamento. Essa característica faz com que seja um método atrativo para alimentos sensíveis ao calor, levando-se em consideração a retenção de nutrientes (ADAMS; MOSS, 1995).

Outros benefícios deste processo são a possibilidade do alimento ser embalado a seco; de se utilizar recipientes maiores no envase; melhor controle no empacotamento; os produtos podem ser tratados na embalagem final sem manipulação posterior ou necessidade de envase asséptico e não necessitar de adição de conservantes (ADAMS; MOSS, 1995; IFT, 1983). A radiação também pode evitar a utilização de pesticidas químicos, pois alguns deles (como o metilbrometo) são extremamente nocivos para o meio ambiente (FAO, 1992).

Altas doses de radiação esterilizam alimentos, eliminando todos os microrganismos, com exceção dos vírus. Este processo produz resultados similares aos tratamentos que utilizam apertização de enlatados (DONG et al., 1992). Além dessas vantagens, em trabalho realizado por Byun et al. (2002), verificou-se que a radiação gama nas doses de 3, 5 e 10 kGy reduz alergias alimentares em leite, ovos e camarões pela modificação dos epitopos alergênicos das proteínas deste alimentos (betalactoglobulina do leite, albumina do ovo e tropomiosina do camarão).

Existem diversas pesquisas no Brasil e no mundo verificando o efeito da radiação sobre os microrganismos contaminantes nos alimentos, o aumento da validade comercial e as possíveis alterações sensoriais e nutritivas dos produtos irradiados (FROEHLICH, 2000; GURGEL, 2000; HASHISAKA et al., 1990; SANTOS, 1997; VALENTE, 2004).

Muitos fatores interferem neste tipo de processamento tais como a composição do meio, a temperatura do alimento durante a irradiação, a presença ou ausência de oxigênio, o estado físico do produto irradiado, a quantidade e a espécie dos microrganismos presentes (FARKAS, 2006).

Jay (2005) cita que uma das desvantagens do uso da irradiação em alimentos é a continuidade da atividade enzimática durante a estocagem. Hobbs e Roberts (1998) confirmam este fato e apontam à necessidade de se fazer tratamento térmico antes da irradiação com a finalidade de destruir essas enzimas.

2.5.4 Desenvolvimento de ranço oxidativo ocasionado pela radiação

Do ponto de vista bioquímico, radiações elevadas (elétrons acelerados, radiação gama e raios-X) são capazes de ionizar moléculas de água, levando à formação de radicais livres como o OH^\bullet e O_2^\bullet . Estes radicais livres possuem a

vantagem de serem microbiocidas, entretanto, apresentam relação com a oxidação lipídica (DONNELLY; ROBINSON, 1995), principalmente das gorduras insaturadas, embora o processo possa ser retardado, por exemplo, irradiando alimentos embalados a vácuo ou sob atmosfera modificada (KILCAST, 1995).

O mecanismo do ranço ocasionado pela irradiação ocorre da seguinte maneira: íons e moléculas excitadas são as primeiras espécies formadas quando a radiação ionizante é absorvida pela matéria. Quebras químicas são ocasionadas pela decomposição das moléculas excitadas e dos íons, ou pela reação entre as moléculas vizinhas. A conseqüência da excitação molecular é a formação de radicais livres. Os radicais livres formados por possuírem elétrons desemparelhados são instáveis e podem se combinar com outros em locais de alta concentração de radicais ou poderão se difundir dentro do meio com outras moléculas na tentativa de retornar ao número par de elétrons, a sua forma mais estável. Radicais livres acumulados darão início ao processo de rancificação oxidativa (KILCAST, 1994; MERRITT et al., 1978; NAWAR, 1993).

Estes radicais estão também presentes em alimentos não irradiados, advindos da ação de enzimas como a lipoxigenase e peroxidase; da oxidação de lipídios e ácidos graxo e da degradação de vitaminas e pigmentos solúveis em óleo (FELLOWS, 1997).

Devido as características de composição, ou seja, alta quantidade de água e a presença de gorduras saturadas e insaturadas, o leite e derivados possuem susceptibilidade ao ranço oxidativo após o tratamento por irradiação, o que torna em muitas ocasiões os produtos inaceitáveis para o consumo pela presença de sabores e odores indesejáveis

Porém, o alto teor de água deste alimento é uma característica favorável à utilização da radiação para eliminação de microrganismo, pois necessitará de doses muito mais baixas para destruição de bactérias patogênicas e deteriorantes (PIETRANERA, et al., 2003).

Estudos têm demonstrado a viabilidade deste tipo de tratamento em diversos produtos lácteos, sem alterações sensoriais ou modificações químicas importantes em sua composição (GUIMARÃES et al., 2005; GURGEL, 2000; NAGHMOUSH et al., 1983; PIETRANERA et al., 2003).

Por este motivo, pesquisas utilizando a radiação em leite fluido e derivados lácteos têm sido escassas, apesar de nas últimas décadas, trabalhos terem sido

realizados para verificar a eficiência de irradiação na diminuição de microrganismos contaminantes e deteriorantes do leite fluido (NAGHMOUSH et al., 1983; ROSENTHAL et al., 1983; SCHOONMAKER, 2001; SEARLE; McATHEY, 1989), sobre as características físico-químicas e sensoriais do leite irradiado (CIÉSLA, et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2005) e sobre seus efeitos em derivados lácteos (GURGEL, 2000; HASHISAKA et al., 1990; PIETRANERA et al., 2003; SILVA, 2003).

2.6 OXIDAÇÃO LIPÍDICA E SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBA)

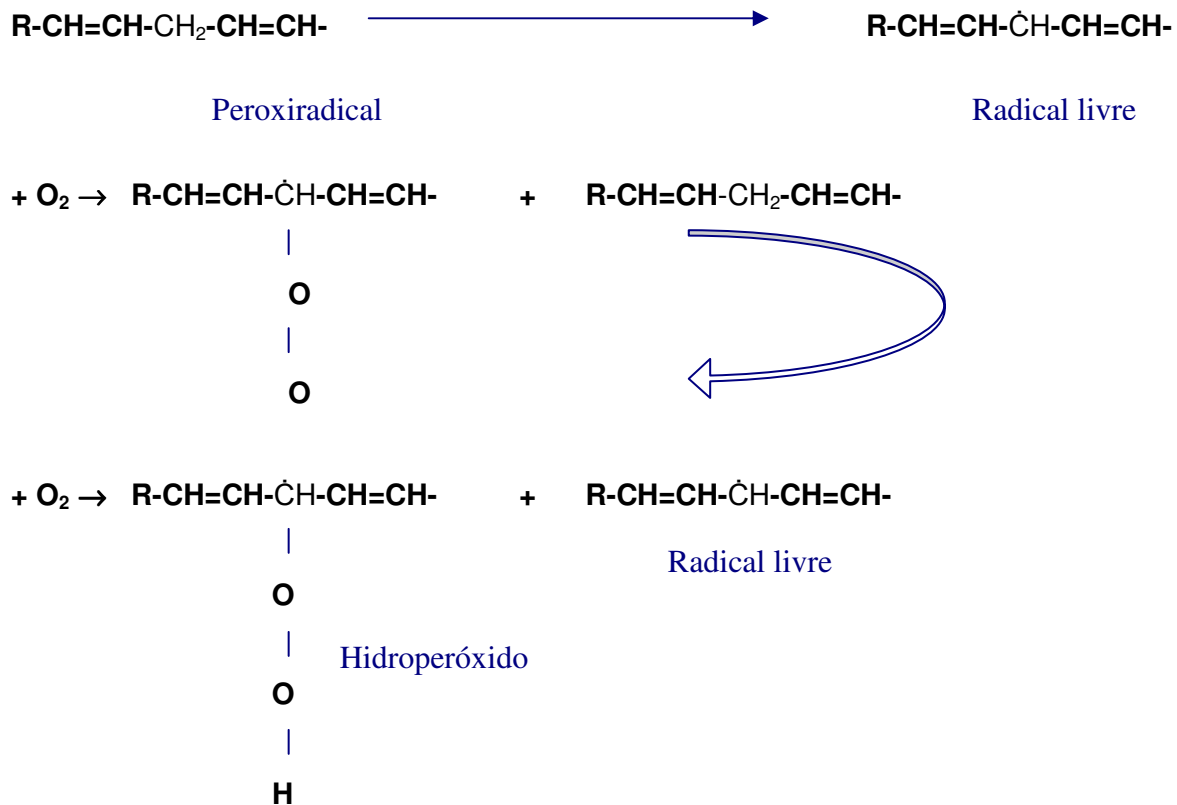
A deterioração oxidativa dos lipídios presentes nos alimentos envolve primariamente reações auto-oxidativas as quais são acompanhadas por várias reações secundárias que tem caráter oxidativo e não oxidativo. Os lipídios que têm maior probabilidade de sofrer oxidação são os insaturados, principalmente o oléico, linoléico e linolênico (GRAY, 1978).

De acordo com Araújo (1995), Cheftel e Cheftel (1976), Laszlo (1986) e Wong (1989), a oxidação dos lipídios nos alimentos se deve à reações do oxigênio com lipídios insaturados e possuem três fases distintas: a iniciação ou indução, a propagação e a terminação (Figura 1).

REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DAS GORDURAS

1 – Iniciação ou indução

Radiação, Radical livre, metais pesados, luz



2- Propagação: Propagação da formação de hidroperóxidos.

3- Terminação:

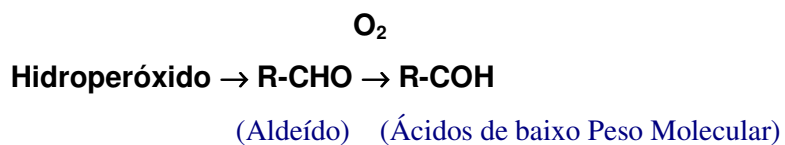


Figura 1 - Fases da rancificação oxidativa da gordura.

Fonte: modificado de Cheftel; Cheftel (1976).

Na iniciação ocorre a remoção de hidrogênio de um átomo de carbono adjacente a uma dupla ligação tipo *cis* de um ácido graxo poli-insaturado. Esta reação é catalisada pela presença de metais, por atividades enzimáticas, pela degradação da matéria-orgânica ou pela absorção de energia (térmica, luz visível com fotossensibilizadores, radiação ultravioleta e radiação ionizante) com a

formação de um radical livre. O radical livre se liga ao oxigênio formando um radical peróxido que pode retirar hidrogênio de outra molécula insaturada, gerando mais um radical livre e um hidroperóxido (produto primário da auto-oxidação dos lipídios). Estes radicais livres formados reagem novamente com outra molécula de oxigênio repetindo a seqüência de reações descritas e a reação se propaga. Na propagação mesmo com os hidroperóxidos produzidos não há alteração de sabor e odor nos produtos. Esta reação pode acontecer indefinidamente a partir da fase anterior. Como os hidroperóxidos são instáveis, eles se decompõem em radicais livres que reagem entre si formando uma grande variedade de compostos secundários, que vão causar alterações sensoriais nos produtos, sendo esta fase classificada como terminação.

Os aldeídos (malonaldeídos, hexanal, hidroxinonenal, pentanal) são os compostos típicos majoritários obtidos da oxidação dos lipídios, entretanto, não estão presentes unicamente a partir da ruptura clássica dos hidroperóxidos (NAWAR, 1983). Além dos aldeídos, outros compostos também são formados sendo constituídos por moléculas de alcanos, cetonas álcoois, furanos e lactonas e servem como indicadores de oxidação lipídica nos alimentos (ibid).

Estes compostos podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis ou pela promoção de reações com outros constituintes tais como proteínas (GRAY, 1978). De acordo com Rosenthal (1991), pequenas concentrações de aldeídos e cetonas – menos de 1ppb – são necessárias para ocasionar sabores e odores indesejáveis.

Além das alterações sensoriais, os radicais livres por serem moléculas muito reativas podem penetrar nas células e dar início a reações em cadeia prejudiciais que resultam em vários danos, como alterações do código genético (DNA) e formação de células cancerígenas (ROUBOS, 1997).

Nunes et al. (2003) relatam que produtos rançosos causam inúmeros problemas à saúde do consumidor, por serem tóxicos às células, ao fígado, aos rins, afetando também o sistema cardiovascular e produzindo carcinogênese.

Existem diversas técnicas utilizadas para determinação da oxidação dos lipídios tais como: Índice de Peróxido; substâncias reativas ao TBARS; Teste de Kreis; Ultravioleta; Índice de Iodo; Fluorescência; Métodos Cromatográficos dentre outros (ARAÚJO, 1995; CECCHI, 1999; NAWAR, 1983).

Entretanto nenhuma prova individual pode medir todas as reações de oxidação de uma vez; tampouco existem análises que possam ser realizadas em todos os processos de oxidação dos alimentos ou em todas as etapas de processamento. Na melhor das hipóteses, uma análise poderá controlar uma ou poucas alterações que proporcionem informações suficientes para um sistema específico em dadas condições (GRAY, 1978; NAWAR, 1983; ROSENTHAL, 1991).

A escolha do método dependerá de um número de fatores incluindo a natureza e o histórico de oxidação da amostra, o tipo de informação requerida, o tempo disponível e as condições de teste (GRAY, 1978).

O TBA foi sugerido primeiramente por Patton e Kurtz (1951), para leite e produtos lácteos, porém tem sido reconhecido como bom método para gorduras vegetais e animais, sendo preferido para se detectar a oxidação de lipídios em sistemas biológicos. É expresso em miligramas por quilo de amostra (número de TBARS ou valor de TBARS) (ARAÚJO, 1995; NAWAR, 1993).

As vantagens deste método são a sua rapidez e facilidade de execução, além de ser uma prova relativamente barata quando comparada aos métodos mais modernos. (ARAÚJO, 1995; NAWAR, 1993). Além disso, segundo diversos autores (DUNKLEY; JENNINGS, 1951; KING, 1962, SOUZA et al., 2007) a técnica de TBA possui boa reprodutibilidade e existe uma boa correlação entre o TBA e as análises sensoriais.

O pigmento produzido na reação colorimétrica é resultante da condensação de duas moléculas de TBA em uma de aldeído malônico ou malonaldeído, formado durante o processo oxidativo (Figura 2) - o MDA é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3 (CECCHI, 1999).

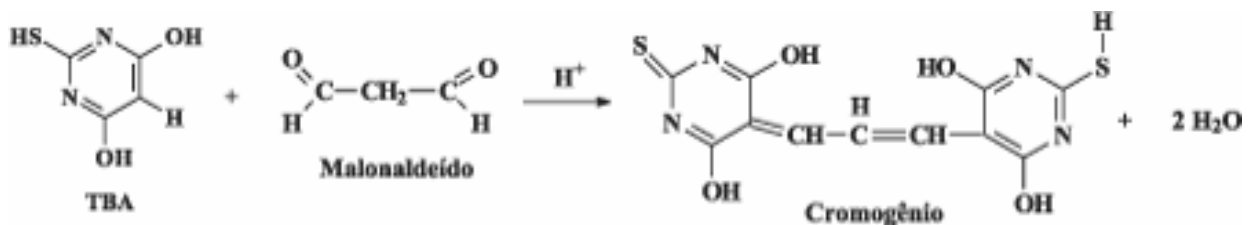


Figura 2 – Reação do Teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 535 nm. (Fonte: NAWAR, 1993).

A reação não é específica, pois vários compostos, além daqueles produzidos pela reação de oxidação tais como aldeídos, sacaroses, proteínas, nitrito e compostos presentes na fumaça, apresentam reação positiva ao teste, requerendo, portanto, correções em produtos curados e defumados (NAWAR, 1993).

Baixos valores podem erroneamente ser detectados, em face da interação covalente do malonaldeído com os grupos aminas livres presentes em proteínas. Por essa razão, o teste deve ser usado para medir a extensão geral da oxidação de lipídios ao invés de quantificar o malonaldeído. Portanto, a terminologia substâncias reativas com TBA deve ser utilizada em substituição ao número de TBA ou valor de TBA (ARAÚJO, 1995).

A amostra contendo TBA é aquecida, e o produto da reação é medido fotometricamente a 532 nm. Durante o aquecimento, o qual é realizado em condições ácidas, o malonaldeído é liberado a partir do peróxido e reage com o ácido tiobarbitúrico. O teste pode ser realizado diretamente no produto, seguido da extração do pigmento colorido ou, alternativamente, a partir do destilado obtido (ibid).

De modo geral, substâncias reativas ao TBA são produzidas em quantidades substanciais somente a partir de ácidos graxos contendo três ou mais insaturações. Isto porque as insaturações beta e gama do grupo peróxido resultantes da oxidação podem ciclizar-se, formando anel contendo cinco carbonos e, posteriormente, formando também, malonaldeído. Tal configuração está ausente nos radicais isoméricos oriundos do ácido linoléico (ibid).

Essencialmente, para produtos cárneos, o método compreende a dissolução da amostra de gordura em um solvente orgânico como benzeno, clorofórmio ou tetracloreto de carbono e extração do material reativo com uma solução de ácido acético - ácido tiobarbitúrico - água. O extrato aquoso com o aquecimento desenvolverá uma coloração vermelha se a gordura estiver oxidada (OSAWA et al., 2005).

Para o leite, não existe necessidade de extração da fase gordurosa e o reagente TBA é adicionado diretamente na amostra como na metodologia descrita por Dunkley e Jennings (1951). O método torna-se quantitativo quando a intensidade da cor é medida no espectrofotômetro, através da medida da absorvância (CHECCHI, 2003), com 532nm de comprimento de onda, podendo variar de 500 a 550 de acordo com a metodologia empregada (OSAWA et al., 2005).

2.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

É difícil a verificação das alterações dos componentes do leite por métodos físico-químicos oficiais de rotina. Atualmente, entretanto, existem técnicas que nos fornecem resultados confiáveis em relação à modificação que ocorre com os componentes químicos dos alimentos quando estes estão sujeitos à degradação. Uma dessas técnicas é a Espectroscopia de Massa (JÚNIOR et al., 2006), sendo muito utilizada, se o espectrômetro estiver acoplado a um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (EM-CLAE) ou a um Cromatógrafo de Gás (EM-CG)/, pois, nestes casos, os componentes podem ser separados, facilitando a visualização.

Todavia essas análises requerem extração específica a qual poderá ocasionar problemas tais como perdas de compostos voláteis ou sensíveis e desnaturação protéica. Também possui a desvantagem da necessidade de tempo prolongado para execução e de ser mais complicada, necessitando de pessoal especializado (Hu et al., 2004).

Outra técnica bastante utilizada é a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (ANDREOTTI et al., 2000), pois fornece bons resultados em relação ao ambiente químico que está sendo analisado apesar de ser uma metodologia dispendiosa. Segundo Pomeranz e Meloan (1994), a RMN foi inicialmente testada em 1945, embora os conceitos de spin nuclear e de momentos magnéticos tenham sido verificados em 1925.

A RMN é reconhecidamente a técnica mais importante para a investigação a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. É um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido. Ocupa, igualmente, um lugar saliente no campo da análise qualitativa, de componentes metabólicos em produtos alimentares, ou em fluidos biológicos e metabólicos, em tecidos e órgãos de seres vivos intactos, de um modo não invasivo e não destrutivo (GIL; GERALDES, 1987).

A vantagem da ressonância em relação a outras técnicas analíticas está relacionada ao grande número de aplicações tais como: na identificação estrutural das substâncias, onde estão incluídas macromoléculas como polímeros e biomoléculas; no estudo da mobilidade e flexibilidade das moléculas; na cinética de

reações químicas e no estudo de processos de biossíntese e metabolismo utilizando os núcleos magnéticos como marcadores (ibid).

Esta técnica é considerada não invasiva preservando a estrutura dos alimentos, sendo capaz de obter informações úteis de sistemas muito complexos e altamente heterogêneos (SACCHI et al., 1995).

Em experimentos anteriores com café, sucos, óleos e drogas, a RMN, era conduzida com a extração de água das amostras, o que poderia ocasionar perdas de substâncias voláteis e substâncias de baixo peso molecular. No leite existiam ainda dois tipos de problemas: a alta quantidade de água presente ocasionava picos de sinais que mascaravam os sinais dos outros componentes; além disso, o leite por ser uma emulsão complexa, dificultava a leitura do espectro de RMN (HU et al., 2004).

Até 2004, os experimentos utilizavam pré-tratamento do leite, com extração dos triacilgliceróis, remoção dos íons metálicos e ajuste do pH. Com o avanço da tecnologia e dos equipamentos de RMN foi possível analisar o leite sem necessidade do pré-tratamento, sendo o primeiro trabalho realizado com sucesso por Hu et al. (2004) em uma e duas dimensões (ibid).

A RMN não detecta a presença de radicais livres ou peróxidos. Como consegue detectar a formação de vários compostos, a verificação da β -oxidação da gordura se dá por meio da detecção de elementos de degradação tais como picos de carbonila de cetonas, como observado no trabalho realizado por Guimarães et al. (2005) com amostras de leite cru integral submetidas ao tratamento por radiação gama.

2.8 RANÇO OXIDATIVO NO LEITE E AVALIAÇÃO SENSORIAL

Os lipídios puros dos alimentos são praticamente inodoros. Todavia, além de serem precursores de vários compostos aromáticos, também são responsáveis pelas modificações no sabor e no aroma global em muitos alimentos, pela sensação que produzem na boca e pela influência na volatilidade e no valor inicial dos compostos aromáticos presentes (NAWAR, 1983).

A natureza qualitativa dos aromas de oxidação varia de forma significativa de produto para produto, inclusive dentro do mesmo tipo de alimento. Por exemplo, os

odores de ranço desenvolvidos em alimentos cárneos são diferentes daqueles encontrados na manteiga (ibid).

Quando ocorre a oxidação lipídica no leite e no creme de leite frescos verifica-se o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis descritos como rançoso, sabor de papel, a peixe, metálico, seboso, a giz (NAWAR, 1983; ROSENTHAL, 1991). A rancidez no leite pode provocar uma percepção de sabor amargo ocasionado pela presença de mono ou diglicerídeos. Também pode ser originado pelo rearranjo de ácidos graxos nas moléculas de glicerídeos que contêm ácido butírico na posição alfa. O sabor e o aroma de ranço do leite e do creme de leite possuem outra característica que pode ser descrita como sentimento que se desenvolve lentamente produzindo uma sensação estranha na boca e irritação da língua. Normalmente é descrito como forte sensação desagradável, com queixas e reclamações tais como: não gosto, desaprovo, horrível (HERRINGTON, 1956).

Hoff et al. (1959), observaram que a modificação de sabor e aroma com desenvolvimento de ranço em leite submetido a irradiação gama é conseqüência da modificação de ácidos graxos, tais como o ácido linoléico, onde verifica-se a produção de sabor e odor a peixe, enquanto que quando ocorre modificação na mistura de ácidos graxos que contem o grupo vinil, o sabor fica semelhante a vela. Day e Papaioannou (1963) identificaram alcanos, metil cetonas e aldeídos como os principais compostos produzidos na rancificação oxidativa do leite após o tratamento pela irradiação, sendo que os aldeídos foram considerados como responsáveis pelo sabor de vela.

Essas alterações são verificadas mediante análises físico-químicas, que são consideradas como testes objetivos sendo complementados por meio de testes sensoriais, denominados de subjetivos (AMERINE et al., 1965; STONE; SIDEL, 1992). Segundo Nawar (1983) e Rosenthal (1991) com relação ao desenvolvimento de rancificação nos alimentos sempre será necessária à realização de análises sensoriais dos produtos, pois, a validade de qualquer análise físico-química dependerá em grande parte da correlação entre estes aspectos. Oliveira (1996) ressalta que as técnicas de avaliação sensorial são tão específicas quanto outros métodos de análises.

A análise sensorial é conceituada como a disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características de alimentos e outros materiais da forma como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato

e audição (IFT, 1981). Pode fornecer informações que permitam melhorar ou manter a qualidade dos alimentos, desenvolver novos produtos ou determinar aspectos de venda com auxílio dos sentidos humanos como paladar e olfato. Para avaliar a qualidade, deve-se levar em conta as propriedades sensoriais aceitáveis, como essenciais no momento da venda e consumo do produto (AMERINE et al., 1965).

Os métodos sensoriais classificam-se em três grandes grupos: métodos discriminativos, métodos afetivos e métodos de descritivos (CHAVES, 1993). Os métodos discriminativos, ou de diferença, se baseiam na diferença perceptível entre duas ou mais amostras de um produto. Os métodos afetivos medem atitudes subjetivas como aceitação ou preferência do consumidor, de forma individual ou em relação a outros produtos; os métodos descritivos descrevem e quantificam os atributos sensoriais de aparência, sabor, textura e aroma percebidos nos produtos (STONE; SIDEL, 1992).

Um dos testes bastante utilizado no controle de qualidade dos alimentos, interessante para se determinar diferença em mudanças de processamento, ingrediente, embalagem ou armazenamento é o Teste Triangular que é considerado como um teste monocaudal ou unilateral, pois já existe *a priori* uma expectativa de resposta (AMERINE et al., 1965; BRASIL, 2005).

Trata-se de um teste discriminativo que detecta pequenas diferenças entre as amostras. Neste caso são apresentadas simultaneamente três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. Cabe ao julgador identificar a amostra diferente (ibid). Esse método não indica nem a magnitude nem a razão da diferença entre as amostras, somente se existe ou não diferença detectável. Também é muito utilizado em controle de qualidade para garantir que as amostras ou um lote de produções diferentes sejam semelhantes e para determinar se a substituição de ingredientes, a modificação de processamento. O tipo de embalagem e as condições de armazenamento resultam em diferença detectável nos produtos (CHAVES; SPROESSER, 1996).

A escolha é forçada e, segundo Amerine et al. (1965), a grande vantagem deste teste, em relação aos demais e que a probabilidade de acerto ao acaso é de $1/3$ ($p=1/3$). O número de julgadores deve ser de 20 a 40, embora apenas 12 possam ser utilizados quando a diferença entre as amostras é grande.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de leite cru integral utilizadas neste experimento foram cedidas pela Indústria de Laticínios Companhia do Leite – Maraporã Cooperativa Agropecuária Industrial Ltda, SIE/RJ n° 638 (Figura 3) localizada no município de Cachoeiras de Macacu – RJ, Brasil, que recebia na data da coleta, leite de estabelecimentos produtores da região geográfica da baixada litorânea, microrregião Vale do Macacu, RJ.



Figura 3 – Vista frontal da CIA do leite localizada em Cachoeiras de Macacu, RJ, Brasil.

As amostras foram subdivididas em quatro grupos experimentais: Controle (amostra não irradiada), amostra irradiada na dose de 1 kGy; 2 kGy e 3 kGy. Para

cada grupo foram realizadas seis repetições, perfazendo, portanto, 24 amostras de leite cru integral, contendo cada uma delas 200 mL, sendo submetidas as análises bacteriológicas e físico-químicas. Para avaliação da validade comercial foram obtidas 15 amostras de leite cru integral de cada grupo experimental em um único dia perfazendo o total de 60 amostras. Para realização da análise sensorial foram coletados 08 litros de leite pasteurizado, dois para cada grupo experimental.

3.2 IRRADIAÇÃO DAS UNIDADES AMOSTRAIS DE LEITE

As amostras dos grupos experimentais (Controle, 1kGy; 2kGy e 3kGy) foram transportadas refrigeradas a 5-7°C em potes plásticos previamente esterilizados.

Chegando ao Laboratório de Instrumentação Nuclear da Coordenação de Programas de Pós-graduação em Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no município do Rio de Janeiro foram irradiadas, sob refrigeração com auxílio de gelo reciclável, no irradiador Cobalto 60 modelo Gammacell Nordion – Canadá (Figura 4), nas doses de 1, 2 e 3 kGy (taxa 45 Grays/minuto) de acordo com o grupo experimental correspondente. A amostra controle permaneceu sob refrigeração e não foi irradiada.



Figura 4 – Irradiador Gama pertencente ao Laboratório de Instrumentação da COPPE/UFRJ, (Co 60 modelo Gammacell Nordion – Canadá).

Após a irradiação as amostras de leite foram transportadas à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), para os

Laboratórios de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, Laboratório de Controle Físico-Químico de Produtos de Origem Animal, Laboratório de Análises Sensoriais e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto Militar de Engenharia (IME).

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Análises bacteriológicas

A fim de averiguar o efeito da radiação gama, utilizando-se o isótopo radioativo Co^{60} sobre as bactérias contaminantes do leite cru integral, foram realizadas as seguintes análises bacteriológicas: contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas pela técnica de semeadura por profundidade em *Plate Count Agar* (PCA) (APHA, 2001), contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva pela técnica de espalhamento em superfície (APHA, 2001) e Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, fecais e *E coli*, utilizando-se o Método Rápido Fluorocult LMX (MERCK;1996) modificado por Franco e Mantilla (2004) (Figura 5). Os resultados das análises das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, psicrotróficas e *Staphylococcus* coagulase positiva, foram expressos em Log UFC/mL.

A análise do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais foi realizada a partir das amostras de leite, as quais sofreram diluições seriadas de 10^{-4} a 10^{-6} para a amostra controle (leite cru não irradiado) e 10^0 a 10^{-2} para as amostras de leite irradiado, por meio da subamostra de 25 mL de leite em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% (SSP 0,1%), obtendo-se diluição a 1:10. Desta diluição foi pipetado 100 μL sendo inoculado em tubo “ependorf” contendo 900 μL de SSP 0,1%, obtendo-se diluição 1:100 e assim sucessivamente até as diluições desejadas. De cada uma das diluições, 100 μL foi pipetado e inoculado em três séries de três tubos “ependorf” contendo 1.000 μL do meio “Florocult LMX Broth” (MERCK n° 10.620), com incubação a 35-37°C/24 horas. Após a incubação foi realizado o cálculo do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais com base na tabela de Mac Crady. Os tubos considerados positivos para coliforme total foram aqueles que apresentaram mudança de coloração do meio de amarelo para verde-azulado. Após

a contagem os tubos positivos foram iluminados com uma lâmpada que emite radiação ultravioleta de 366nm de comprimento de onda. Aqueles que apresentaram fluorescência foram considerados positivos para coliformes fecais. O teste baseia-se no princípio no qual o 1-isopropil β -D-1- tiogalactopiranosídeos (IPTG) atua como substância intensificadora na síntese enzimática do β -D-galactosidase formando 4-metilumbeliferona a qual possui fluorescência azul quando irradiada com luz ultravioleta de onda longa (366nm de comprimento de onda) (MERCK, 1996). Para confirmação da presença de *E. coli*, nos tubos que apresentaram fluorescência, foi adicionado 0,5 mL do Reativo de Kovács. O aparecimento de um anel vermelho carmim na superfície do tubo confirma a positividade, pois o triptofano presente na composição do meio é desdobrado pela enzima triptofanase da *E. coli*, produzindo Indol (ibid).

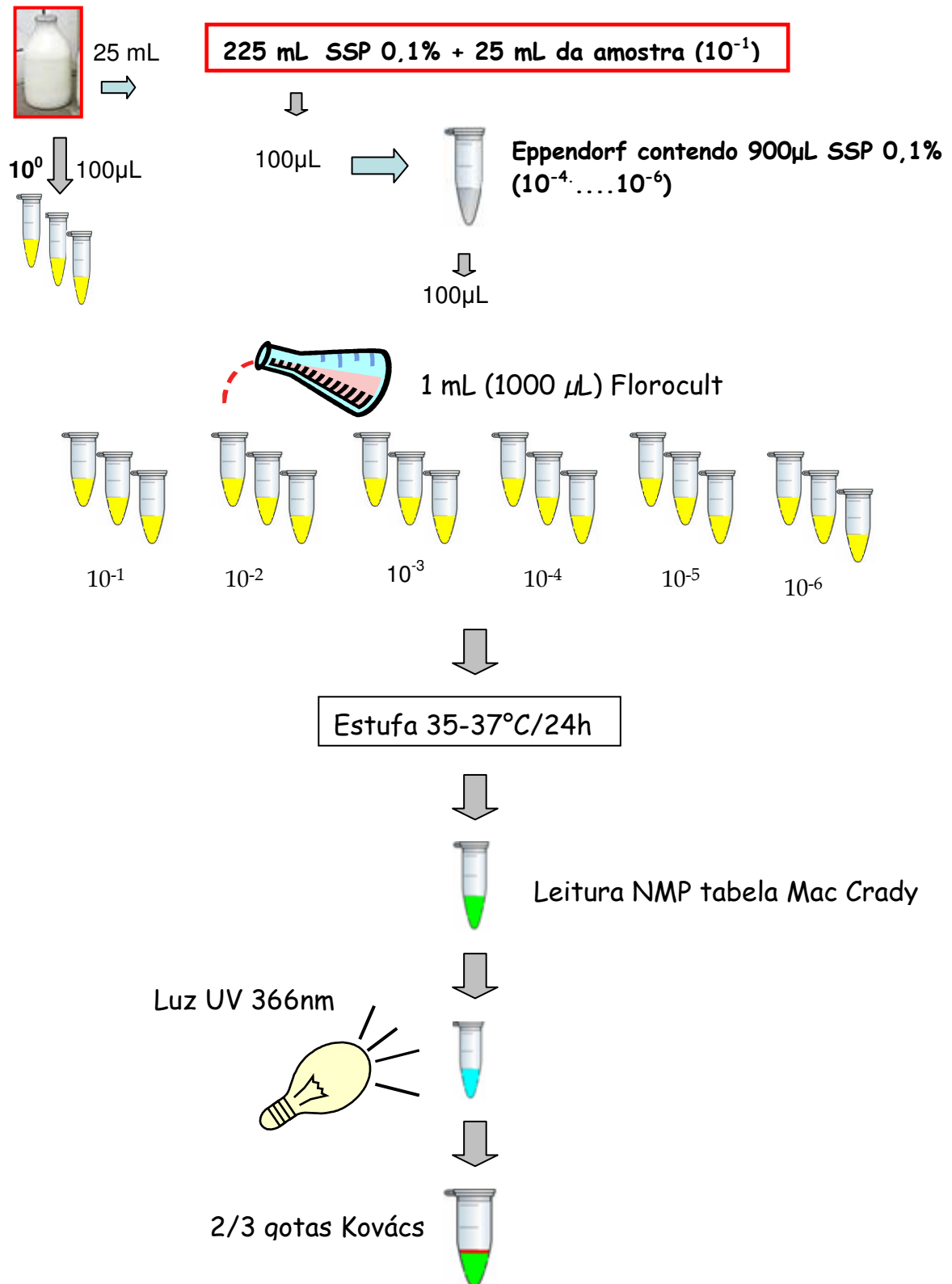


Figura 5 – Metodologia da determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais, Fecais e *E. coli* Método Rápido Fluorocult LMX (MERCK, 1996), modificado por Franco e Mantilla (2004)

3.3.2 Validade Comercial

Para determinar se a radiação gama de Co^{60} aumenta a validade comercial do leite irradiado, foram coletadas 15 amostras de leite cru integral para cada grupo experimental (Controle, 1 kGy; 2 kGy e 3 kG) totalizando 60 amostras de 200 mL. Os intervalos entre as análises foram variáveis, pois dependia do comportamento da microbiota presente, frente aos diferentes tratamentos. A análise bacteriológica realizada foi a Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (APHA, 2001). Concomitantemente também foram realizadas análises físico-químicas (densidade, pH, teor de gordura, sólido não gorduroso - SNG, acidez, índice crioscópico - IC, proteína, sais minerais e teor de lactose). Os resultados microbiológicos e físico-químicos foram comparados aos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa n° 51 (BRASIL, 2002).

3.3.3 Determinação do Ranço pelo TBA

Para averiguar a ocorrência de alterações degradativas de oxidação no leite cru integral irradiado desencadeado pela aplicação do isótopo radioativo Co^{60} , as amostras foram submetidas à análise com o ácido 2-tiobarbitúrico imediatamente após a chegada ao laboratório, segundo metodologia descrita por Dunkley e Jennings (1951). Para realização desta análise, foram pipetados 10 mL de leite que foram transferidos para um tubo de centrifuga de aproximadamente 40 mL. Em seguida, 5 mL do reagente TBA ¹ foram adicionados aos tubos que foram homogeneizados vigorosamente. Os tubos foram colocados em ebulição durante 10 minutos e, posteriormente, resfriados em água fria. Após o completo resfriamento foram adicionados 15 mL do reagente de extração ao tubo ² sendo agitado vigorosamente durante no mínimo 30 segundos. Para obtenção de extrato límpido os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 3.600 rpm. A leitura foi realizada a 535nm em espectrofotômetro (marca SHIMADZU, Modelo UV 160A). Foram realizadas seis repetições.

¹ TBA: 0,025M de TBA em ácido fosfórico. Preparo: volumes iguais de 0,05 M TBA a 2 M de ácido fosfórico.

² 2:1 de álcool isoamílico e piridina.

3.3.4 Determinação de Produtos Secundários de Oxidação Lipídica por RMN (HU et al., 2004)

3.3.4.1 Extração dos lipídios

Após a chegada ao Laboratório de Controle Físico-Químico (UFF) as amostras de leite cru refrigerado (irradiadas e controle) foram submetidas à centrifugação, durante 45 minutos a 3.600 RPM em centrífuga (marca SIGMA, modelo 6-15) para facilitar a separação da gordura do leite. Essa operação foi repetida três vezes. Em seguida o sobrenadante (gordura) foi congelado a -20°C para o transporte até o Instituto Militar de Engenharia (IME).

3.3.4.2 RMN

A gordura do leite foi analisada no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto Militar de Engenharia (IME) no espectrômetro Unity-300 da VARIAN com frequência de 75,429 MHz para carbono 13. O material analisado foi solubilizado em clorofórmio deuterado (CDCl_3) da marca SIGMA e colocados em tubos especiais para RMN com 5mm de diâmetro. Todos os experimentos foram feitos à temperatura ambiente (25°C), utilizado o tempo de aquisição de uma hora para cada amostra. A janela espectral utilizada na análise foi de 230 ppm, levando em conta que os picos de interesse para a observação, relacionados aos de carbonila de cetona e aldeído se encontram acima de 200 ppm.

3.3.5 Análise sensorial

Para observar o efeito da radiação gama sobre as características sensoriais do leite foram coletados oito litros de leite pasteurizado integral, dois para cada grupo experimental correspondente (1, 2 e 3 kGy e controle). A escolha da utilização de leite pasteurizado teve a finalidade de assegurar a saúde dos provadores do experimento. Foram selecionados aleatoriamente, 40 provadores consumidores de

leite na Faculdade de Medicina Veterinária da UFF, sendo realizada a comparação do grupo controle com os grupos irradiados pela Análise Sensorial Discriminativa – Teste Triangular de Diferença de acordo com o protocolo descrito por Chaves (1993).

Os provadores receberam três amostras refrigeradas, cada uma contendo 20 mL, na temperatura de 7°C, codificadas em cabines individuais com luz vermelha, sendo informados de que se tratava de uma amostra diferente e duas iguais. A ficha de avaliação que foi entregue seguiu o modelo utilizado por Chaves (1993) (Figura 6).

Figura 6 – Ficha de análise sensorial utilizada no Teste Triangular

Amostra: _____ Julgador: _____ Data: __/__/____ Você está recebendo três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e indique a amostra diferente. <div style="text-align: center;"> _____ _____ _____ </div> Comentários: _____ _____

As amostras foram oferecidas simultaneamente, em ordem casualizada no seguinte delineamento: ABA, BAB, AAB, BBA, ABB e BAA, sendo codificadas com três dígitos. Juntamente com as amostras foi oferecido um copo de água para limpeza da boca entre as análises.

3.3.6 Tratamento Estatístico dos Resultados

Nas análises bacteriológicas foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA). Para a comparação de médias foi utilizado o teste de média de Dunckan a 5% de significância.

Os resultados da validade comercial do leite irradiado obtidos na bacteriologia foram analisados pelo método dos quadrados mínimos. Para a obtenção dos

parâmetros de crescimento (fase de latência e tempo de duplicação), utilizou-se a equação de Baranyi e Roberts (1994) através do programa computacional (DMFit) idealizado pelo Dr. József Baranyi do “Institute of Food Research (Reading Laboratory, UK)”.

Na determinação das substâncias reativas ao 2-TBA os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, para a comparação de médias foi utilizado o teste de média de Duncan a 5% de significância utilizando o software SAS (1999).

Os dados obtidos na análise sensorial foram comparados com a tabela do Teste Triangular de Diferença (unilateral, $p=1/3$) (CHAVES, 1993). Considerando 40 julgamentos, ao nível de significância 0,1 % de probabilidade são necessários no mínimo 24 acertos.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Os dados brutos observados nas análises bacteriológicas do leite cru integral encontram-se nas tabelas A a F (Apêndice 1).

Os resultados observados na contagem das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas caracterizam que houve uma diminuição acentuada na contagem das amostras do leite irradiado quando compara-se com os resultados encontrados do grupo controle (figura 7). A amostra controle obteve a média de contagem de BHAM na ordem de 7,1 log (variação 7,0 a 7,2); houve diminuição de três ciclos logaritmos utilizando-se a dose de 1kGy (média 4,1 log – variação 3,5 a 4,7) e de 5 ciclos logaritmos nas doses de 2 kGy (média 2,7 log – variação 2,5 a 3,0) e de 3kGy (média 2,2 log – variação 2,0 a 2,5).

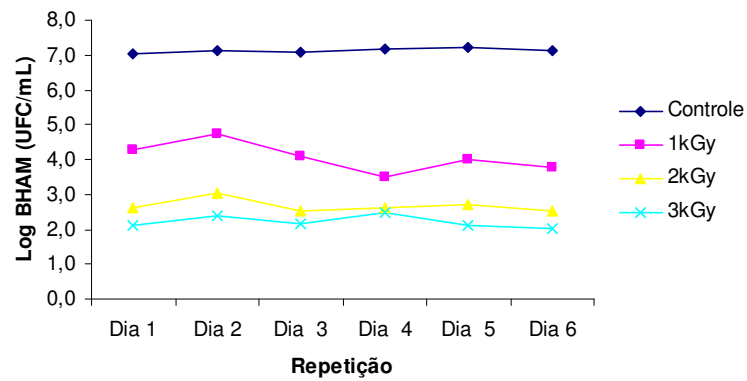


Figura 7 – Representação gráfica da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral não irradiado e irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy.

A tabela 1 fornece os valores das médias de BHAM em log/mL das amostras de leite cru integral controle e irradiadas com doses de 1, 2 e 3 kGy e a comparação entre as médias.

Tabela 1 – Valores médios de BHAM em leite cru integral irradiado com doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (amostra controle).

Microrganismo	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
BHAM	$\bar{x} = 7,1^a$	$\bar{x} = 4,2^b$	$\bar{x} = 2,7^c$	$\bar{x} = 2,2^d$

* Letras diferentes indicam que as amostras diferenciam entre si estatisticamente ao nível de 5%.

Os resultados indicaram que todas as amostras irradiadas (1, 2 e 3 kGy) diferiram estatisticamente da amostra controle ($p < 0,05$) e entre si.

Na figura 8 observa-se que ocorreu crescimento de microrganismos aeróbios heterotróficos psicrotóxicos somente na amostra controle, obtendo a média em Log UFC/mL igual a 6,1 (variação 6,0 – 6,1).

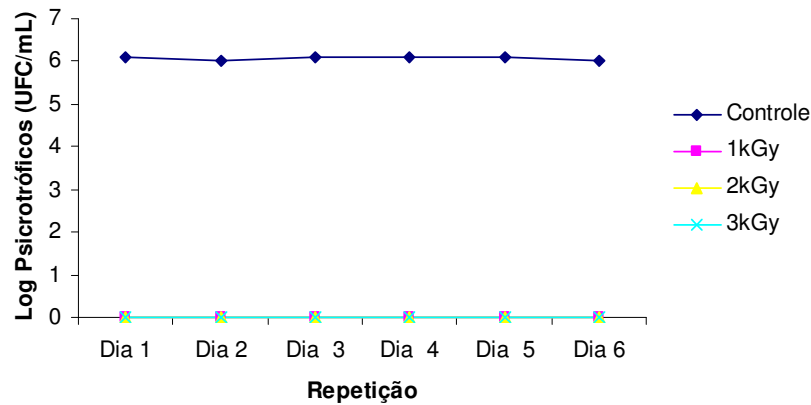


Figura 8 - Representação gráfica da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotóficas (Log UFC/mL) do leite cru integral não irradiado e irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy.

Como pode ser visualizado na figura 9 os resultados da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, diminuíram de dois ciclos logaritmos entre as amostras controle (média 5,1 log – variação 4,9 a 5,3) e as amostras irradiadas com 1 kGy (média 3,7 log – variação 3,6 a 3,8). Utilizando-se as doses de 2 e 3 kGy houve redução de 5 ciclos logaritmos, pois não houve crescimento bacteriano após a irradiação.

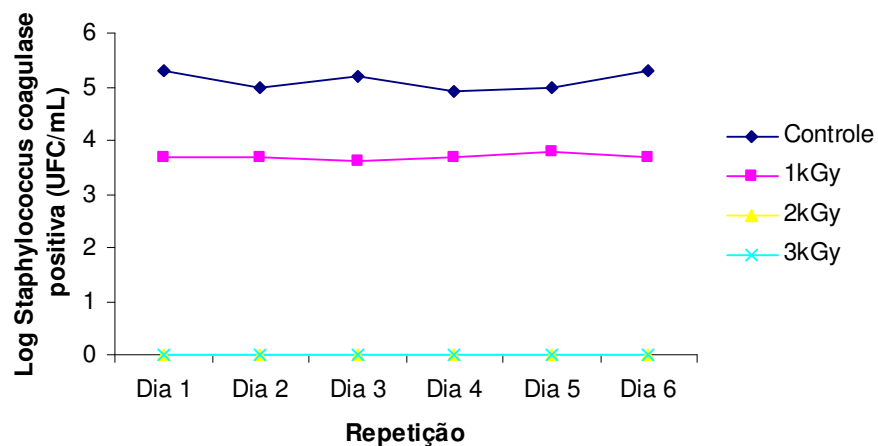


Figura 9 – Representação gráfica da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (controle).

Na tabela 2 verifica-se que todas as amostras irradiadas (1, 2 e 3 kGy) diferiram estatisticamente da amostra controle ($p < 0,05$); as amostras irradiadas na

dose de 2 e 3 kGy também diferiram estatisticamente da amostra irradiada com 1 kGy ($p < 0,05$), entretanto não ocorreu variação ($p > 0,05$) entre as doses de 2 e 3 kGy.

Tabela 2 – Resultados médios da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em leite cru integral irradiado com doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (amostra controle).

	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	X = 5,1 ^a	X = 3,1 ^b	ausência	ausência

* Letras diferentes indicam que as amostras diferenciam entre si estatisticamente ao nível de 5%.

Pela observação dos resultados do Número Mais Provável de Coliformes a 35-37°C e Coliformes a 45°C, constata-se que ocorreu uma diminuição bastante acentuada destes microrganismos, após as amostras terem sido submetidas à radiação gama (figuras 10 e 11).

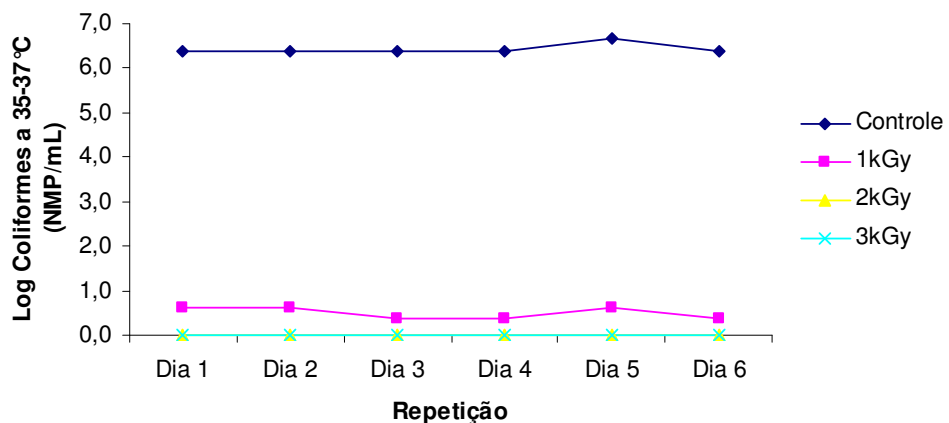


Figura 10 – Representação gráfica do Número Mais Provável de Coliformes 35-37°C (log NMP/mL) do leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (controle).

Os resultados médios obtidos de coliformes a 35-37°C em log de NMP/mL foram os seguintes: amostra controle - 6,4 log (variação 6,4 a 6,7); amostra irradiada com 1 kGy - 0,5 log (variação 0,4 a 0,6); amostra irradiada com 2 kGy e 3 kGy < 0,3, obtendo variação estatisticamente significativa ao nível de 5% entre a amostra controle e as amostras irradiadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios de coliformes 35-37C° (log de NMP/mL) do leite cru integral irradiado com doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (amostra controle).

Microrganismo	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
Coliforme 35-37C°	X= 6,4 ^a	X = 0,5 ^b	ausência	ausência

* Letras diferentes indicam que as amostras diferenciam entre si estatisticamente ao nível de 5%.

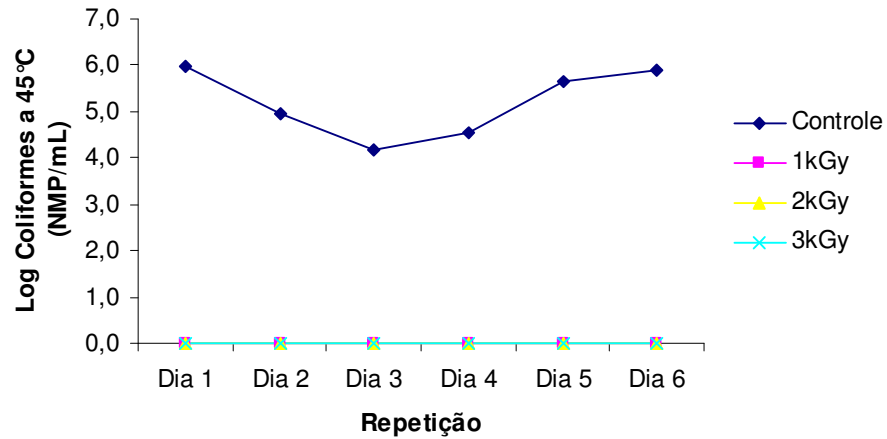


Figura 11 – Representação gráfica do Número Mais Provável de Coliformes a 45°C (log NMP/mL) do leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy e não irradiado (controle).

Com relação ao NMP dos coliformes a 45°C e *E.coli*, a amostra controle obteve média 5,6 Log NMP/mL (variação 4,2 a 6,0) e 5,1 Log NMP/mL (variação 4,5 a 5,4), enquanto as amostras irradiadas nas dose de 1, 2 e 3 kGy não apresentaram crescimento destes microrganismos.

Na tabela 4 são apresentados os resultados médios das análises bacteriológicas de todas as amostras tratadas pela radiação gama.

Tabela 4 – Resultados médios das análises bacteriológicas das amostras de leite cru integral irradiado nas doses de 1, 2 e 3 kGy.

Tratamento	BHAM Log UFC/mL	Coliformes 35-37°C Log NMP/mL	Coliformes 45°C Log NMP/mL	<i>E. coli</i> Log NMP/mL	Psicrotróficos Log UFC/mL	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva Log UFC/mL
1kGy	4,2	0,5	<0,3	<0,3	ausência	3,1
2kGy	2,7	<0,3	<0,3	<0,3	ausência	ausência
3kGy	2,2	<0,3	<0,3	<0,3	ausência	ausência

4.2 AVALIAÇÃO DA VALIDADE COMERCIAL

4.2.1 Análises bacteriológicas

Os resultados das amostras de leite cru (irradiadas e não irradiadas) estocadas sob refrigeração à temperatura de 5°C, durante 60 dias, são apresentados na tabela 5, onde observa-se que a amostra controle obteve a média igual a 7,2 log UFC/mL (DP=0,14), e as amostras irradiadas com 1kGy, 2 kGy e 3 kGy obtiveram respectivamente as médias de BHAM em 4,1 log (DP=0,26), 2,4(DP=0,13), e 2,1 UFC/mL (DP=0,11).

Tabela 5 – Resultados das Contagens de BHAM (Log UFC/mL), médias e desvio padrão das amostras de leite cru integral irradiadas nas doses 1, 2 e 3 kGy e não irradiada (controle) mantidas a 5 °C durante 60 dias.

Dia de análises	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
0	7,00	4,20	2,50	2,20
1	7,10	4,50	2,20	2,20
2	7,00	3,50	2,60	2,30
5	7,20	4,00	2,40	2,20
7	7,20	4,10	2,40	2,20
9	7,20	4,20	2,50	2,10
10	7,20	4,20	2,60	2,20
14	7,30	4,20	2,60	2,40
17	7,30	3,60	2,60	2,00
24	7,30	4,20	2,60	2,20
31	7,30	4,20	2,40	2,30
38	7,40	4,30	2,50	2,40
45	7,40	4,30	2,60	2,40
52	7,40	4,20	2,60	2,30
60	7,40	4,30	2,70	2,30
Média	7,2	4,1	2,5	2,2
Desvio Padrão	0,14	0,26	0,13	0,11

Pela observação das figuras 12, 13, 14 e 15 verifica-se que ocorreu maior desenvolvimento bacteriano somente da amostra controle, enquanto as amostras irradiadas nas doses de 1, 2 e 3 kGy, permaneceram praticamente com as contagens iniciais inalteradas. As figuras estão representadas em escalas diferentes para melhor visualização do crescimento bacteriano da amostra controle.

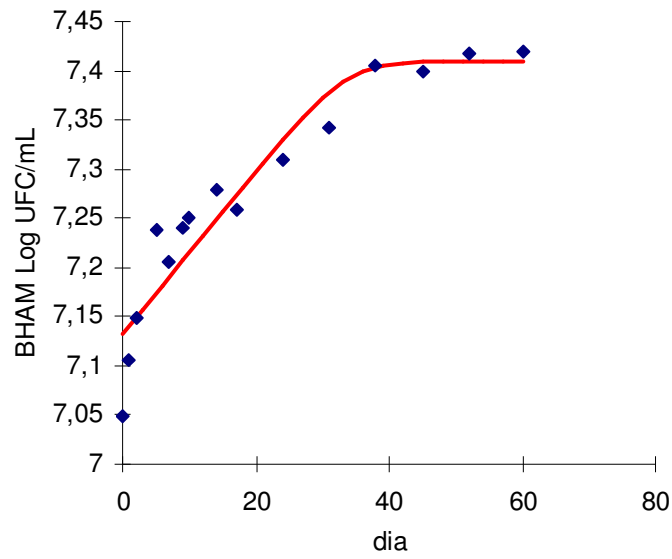


Figura 12 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral não irradiado (controle).

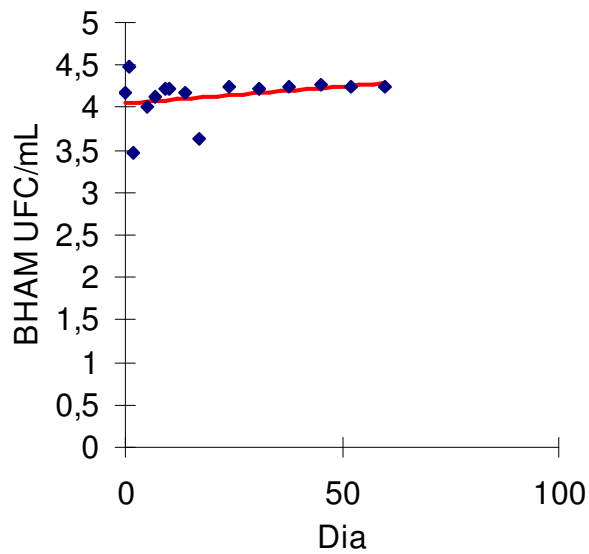


Figura 13 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado na dose de 1kGy.

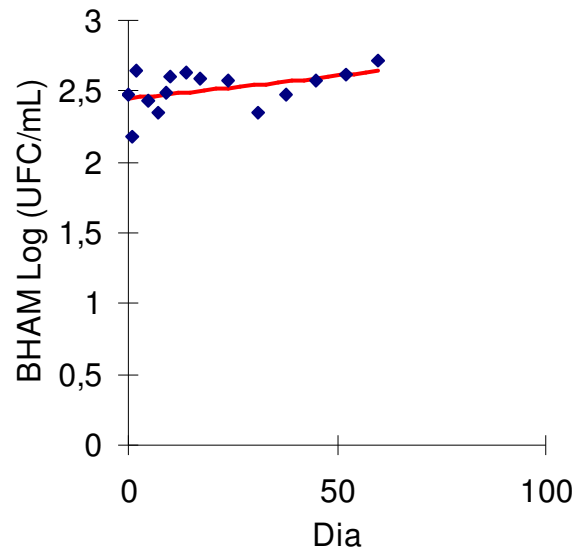


Figura 14 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbicas mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado na dose de 2kGy.

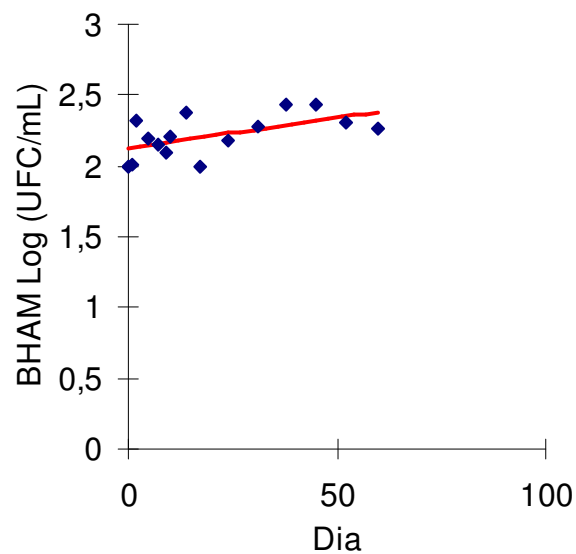


Figura 15 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio dos quadrados mínimos da contagem de bactérias heterotróficas aeróbicas mesófilas (log UFC/mL) do leite cru integral irradiado na dose de 3kGy .

A taxa de crescimento potencial das bactérias, o tempo de geração bacteriano necessário para que a população dobrasse de tamanho e as fases inicial e final deste crescimento durante os 60 dias de armazenamento a 5°C encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da taxa de crescimento microbiológico, tempo de geração bacteriana, e Log inicial e final em UFC/mL das bactérias das amostras irradiadas nas doses de 1, 2 e 3 kGy e da amostra controle.

Tratamento	Taxa de crescimento	Tempo de Geração (horas)	Log inicial (UFC/mL)	Log final (UFC/mL)
Controle	0,083	866	7,13	7,40
1kGy	0,0039	1860	4,25	4,28
2kGy	0,0032	2258	2,44	2,64
3kGy	0,0049	1967	2,13	2,38

Pela taxa de crescimento e pelo tempo de geração conclui-se que o crescimento bacteriológico da amostra controle foi maior do que o das amostras submetidas à radiação gama. Entretanto, este tempo foi bastante longo para todas as amostras (irradiadas e não irradiadas), sendo considerado irrelevante.

4.2.2 Análises Físico-Químicas

Os resultados das análises físico-químicas do leite cru integral encontram-se nas tabelas 7, 8, 9 e 10. Na tabela 7 os resultados da amostra controle demonstram que a partir do quinto dia de estocagem sob refrigeração iniciou-se um aumento da acidez (17,8 °D). No sétimo dia, verifica-se que o limite de 18 °D é ultrapassado segundo a IN 51 (BRASIL, 2002), para leite de consumo.

A partir do décimo quarto dia esse valor aumenta consideravelmente (21 °D), sendo observada pequena precipitação protéica, que segundo o RIISPOA (BRASIL, 2007) é característico de leite anormal. Após o trigésimo primeiro dia, além da acidez, observa-se uma diminuição do índice crioscópico, abaixo do limite permitido pela IN 51 (BRASIL, 2002).

Os parâmetros referentes às amostras de leite irradiadas nas doses de 1, 2 e 3kGy demonstram que apesar do ligeiro aumento da acidez durante o período de 60 dias de estocagem, todos os parâmetros permaneceram dentro da normalidade.

Tabela 7 – Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral não irradiadas (controle) realizadas em um período compreendido entre 0 e 60 dias após a irradiação.

Dia	Análises Físico-Químicas	
	Acidez Titulável	Índice Crioscópico
0	15,5	-0,524
1	15,2	-0,513
2	15,6	-0,512
5	17,8	-0,528
7	18,1	-0,518
9	18,5	-0,522
10	19,4	-0,521
14	21,0	-0,521
17	21,3	-0,527
24	21,2	-0,530
31	22,4	-0,531
38	24,4	-0,533
45	25	-0,531
52	26,6	-0,532
60	27,6	-0,535
X	20,64	-0,525
DP	4,0	0,0

X= média; DP= desvio padrão.

Tabela 8 – Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral irradiado na dose de 1 kGy realizadas em um período compreendido entre 0 e 60 dias após a irradiação.

Dia	Análises Físico-Químicas	
	Acidez Titulável	Índice Crioscópico
0	15,8	-0,513
1	15,0	-0,513
2	14,9	-0,512
5	15,2	-0,518
7	15,2	-0,518
9	15,4	-0,517
10	16,3	-0,513
14	16,4	-0,513
17	16,3	-0,518
24	16,7	-0,512
31	17,1	-0,519
38	17,5	-0,518
45	18,0	-0,520
52	18,0	-0,521
60	17,9	-0,520
X	16,4	-0,516
DP	1,1	0,0

Tabela 9 - Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral irradiadas na dose de 2 kGy realizadas em um período compreendido entre 0 e 60 dias após a irradiação.

Dia	Análises Físico-Químicas	
	Acidez Titulável	Índice Crioscópico
0	15,7	-0,513
1	14,8	-0,518
2	15,3	-0,520
5	15,1	-0,523
7	15,5	-0,518
9	15,5	-0,517
10	16,4	-0,514
14	16,6	-0,523
17	16,5	-0,517
24	16,7	-0,521
31	16,9	-0,513
38	17,5	-0,514
45	17,3	-0,521
52	17,6	-0,520
60	17,3	-0,526
X	16,3	-0,519
DP	0,9	0,0

X= média; DP= desvio padrão.

Tabela 10 – Teores médios acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) e de índice crioscópico (°C) – em amostras de leite cru integral irradiadas nas doses de 3 kGy realizadas em um período compreendido entre 0 e 60 dias após a irradiação.

Dia	Análises Físico-Químicas	
	Acidez Titulável	Índice Crioscópico
0	15,8	-0,513
1	15,1	-0,513
2	14,9	-0,512
5	15,2	-0,523
7	15,2	-0,520
9	15,4	-0,524
10	16,3	-0,522
14	16,4	-0,518
17	16,3	-0,518
24	16,7	-0,517
31	16,6	-0,525
38	16,7	-0,518
45	17,2	-0,520
52	17,3	-0,521
60	17,1	-0,524
X	16,15	-0,519
DP	0,8	0,0

X= média; DP= desvio padrão.

4.3 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO TBA

Como pode ser observado na figura 16 o valor médio de substâncias reativas ao TBA determinadas foram maiores nas amostras de leite irradiado com 3 kGy (média 0,43), diminuindo conforme a dose de irradiação (média de 0,29 na dose de

2 kGy e média 0,19 na dose de 1kGy). Para a amostra controle obteve-se o valor médio de 0,11.

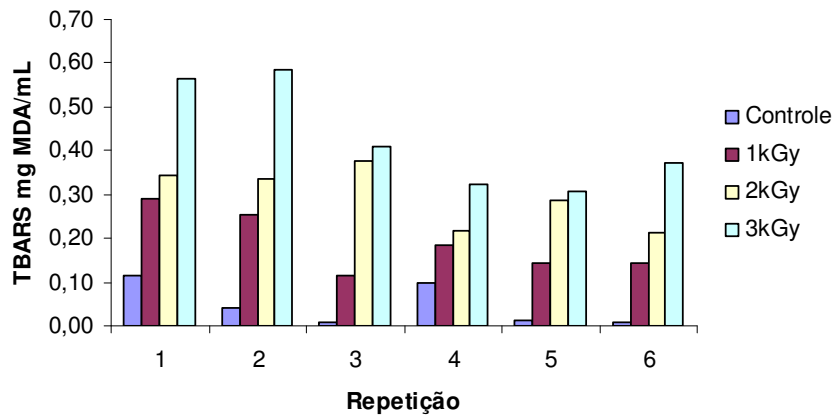


Figura 16 – Representação gráfica dos resultados das análises de Índice de Substâncias Reativas ao TBA de amostras de leite cru irradiadas nas doses 1, 2 e 3 kGy e não irradiada (controle)

A tabela 11 fornece as os valores médios de TBA das amostras de leite cru integral controle e irradiadas com doses de 1, 2 e 3 kGy. Os valores diferem significativamente entre si ao nível de 1% de probabilidade demonstrando que a irradiação influencia na produção de oxidação lipídica.

Tabela 11 – Teor médio (\pm DP) de TBARS em amostras de leite cru refrigerado não irradiadas e irradiadas com doses de 1, 2 e 3 kGy.

Repetições	AMOSTRAS			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
1	0,12	0,29	0,34	0,57
2	0,04	0,25	0,33	0,59
3	0,01	0,11	0,38	0,41
4	0,10	0,18	0,22	0,32
5	0,01	0,14	0,29	0,31
6	0,01	0,14	0,21	0,37
Média	0,05a	0,19b	0,29c	0,43d
DP	0,05	0,07	0,07	0,12

* Letras diferentes indicam que as amostras diferenciam entre si estatisticamente ao nível de 1%.

Observa-se que, empiricamente nas figuras 17 e 18, a formação do complexo colorimétrico foi mais intenso conforme o aumento da dose de radiação, fato constatado quantitativamente na curva padrão do espectrofotômetro.



Figuras 17 e 18 – Amostras de leite cru integral irradiadas nas doses de 1, 2 e 3 kGy e amostra controle após reação com o ácido 2TBA antes (A) e após a centrifugação (B) demonstrando maior intensidade de cor conforme aumento da dose de radiação gama.

4.4 RMN

Os dados obtidos por meio da Ressonância Magnética Nuclear mostraram que ocorreu modificação na estrutura molecular dos lipídios do leite, quando submetido a radiação gama em qualquer dose, como pode ser visualizado nas figuras 18, 19, 20 e 21. Os espectros utilizando núcleos de Carbono 13 das amostras irradiadas mostraram a presença de aldeídos e cetonas, ocorrendo o surgimento de picos em torno de 202 e 209 ppm decorrentes da β -oxidação da gordura, não existindo esses sinais na amostra controle. Os picos foram maiores na amostra irradiada com 3 kGy, demonstrando uma total degradação da gordura visualizado pela ausência do pico de ácido carboxílico na figura 19.

Como a variação do campo magnético entre as diferentes ressonâncias do próton presente em diferentes soluções é muito pequena, os campos magnéticos são expressos em partes por milhão de Teslas (ppm), ou seja, a unidade ppm no gráfico significa parte por milhão de campo magnético em Tesla. Cada unidade do gráfico se refere a 0,000001 Tesla, que é a unidade do Sistema Internacional para campo magnético.

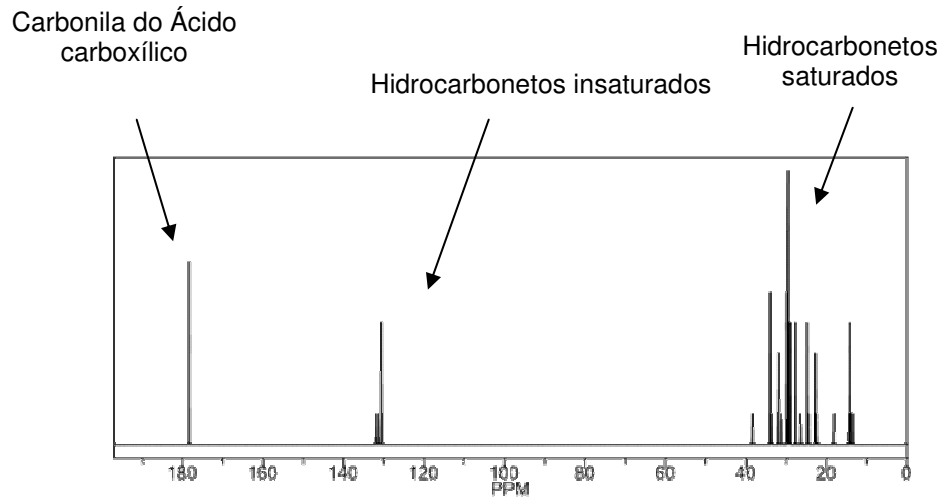


Figura 19 – Representação gráfica dos picos de ácido carboxílico (180 ppm), ácidos graxos insaturados (130 a 132 ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra controle obtido na RMN utilizando o carbono 13.

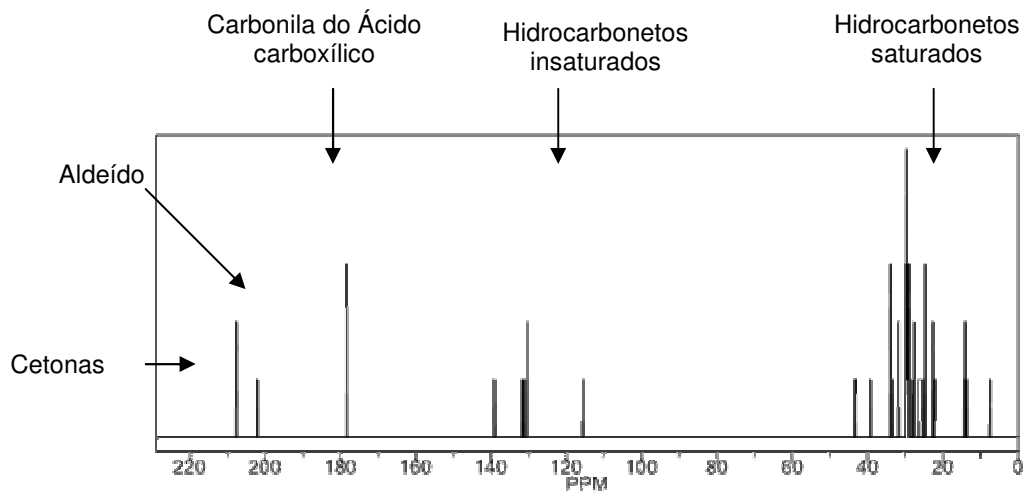


Figura 20 – Representação gráfica dos picos de cetona (209 ppm), aldeído (202 ppm), ácido carboxílico (180 ppm), ácidos graxos insaturados (130 a 132 ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra irradiada na dose de 1kGy obtido na RMN utilizando o carbono 13.

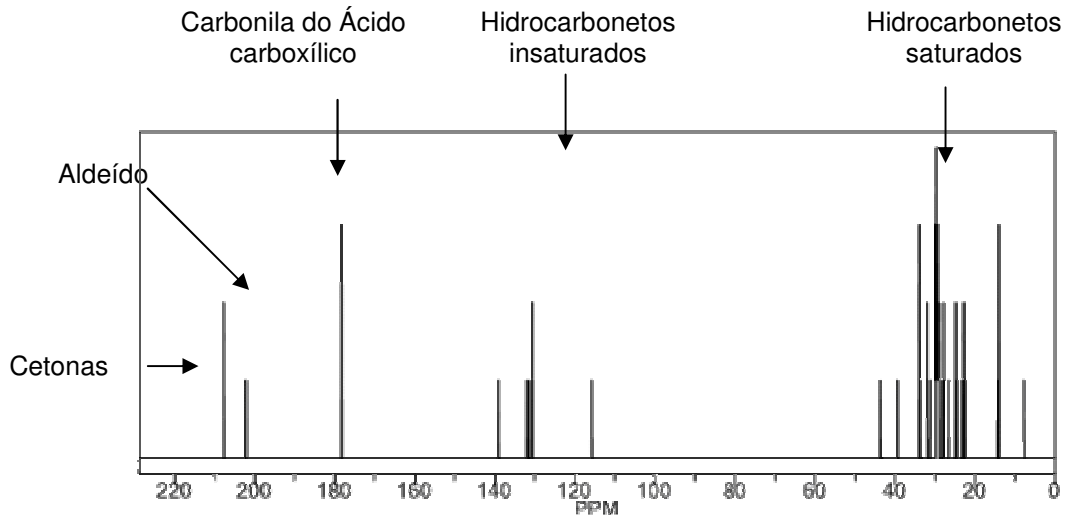


Figura 21 - Representação gráfica dos picos de cetona (209 ppm), aldeído (202 ppm), ácido carboxílico (180 ppm), ácidos graxos insaturados (130 a 132 ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra irradiada na dose de 2kGy obtido na RMN utilizando o carbono 13.

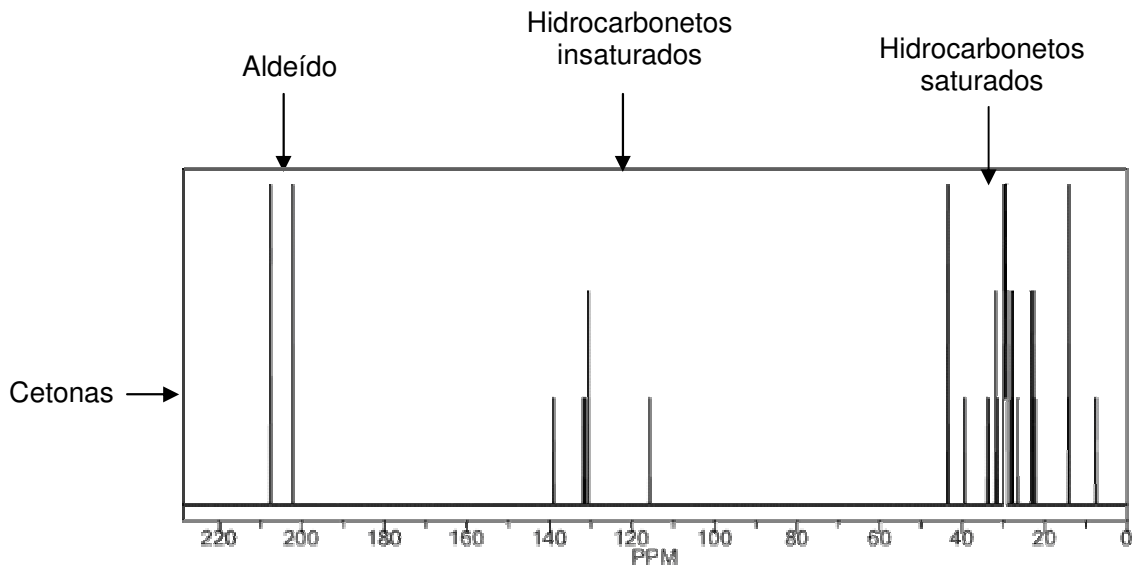


Figura 22 - Representação gráfica dos picos de cetona (209 ppm), aldeído (202 ppm), ácidos graxos insaturados (130 a 132 ppm) e ácidos graxos saturados (11 a 40 ppm) da amostra irradiada na dose de 3kGy obtido na RMN utilizando o carbono 13.

4.5 ANÁLISE SENSORIAL

Na tabela 12 é apresentado o resultado da análise sensorial obtido pelo método de teste triangular de diferença. Para os três níveis de irradiação foi

detectada diferença significativa ($P < 0,1\%$) entre as amostras controle e as amostras irradiadas.

Tabela 12 – Resultados da análise sensorial do leite pasteurizado irradiado para cada nível de irradiação comparado com a amostra controle.

*1 kGy		*2 kGy		*3 kGy	
Acertos	Erros	Acertos	Erros	Acertos	Erros
32	8	33	7	31	9

* significativo a 0,1% de probabilidade

Os dados brutos da análise sensorial são apresentados na tabela F (apêndice 2) onde verifica-se que alguns provadores preferiram a amostra irradiada à amostra controle, com comentários como gostei, melhor paladar e gostoso, mesmo tendo identificado corretamente a amostra irradiada. Porém, a maioria desgostou bastante das amostras de leite tratadas pela radiação.

A observação de que a amostra estava “rançosa” ou com sabor e odor a ranço foi especificada por poucos provadores. Muitos limitaram-se a descrição de horrível, desgostei muito, muito ruim, sabor repulsivo, sabor estranho.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a dosagem de 1 kGy foi suficiente para redução da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BHAM) em 3 ciclos logarítmicos (4,2 log), de 2 ciclos na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (3,1 log), de 5 ciclos para coliformes a 35°C (0,5 log) e de 6 ciclos para bactérias psicrófilas, coliformes a 45°C e *E. coli*, atingindo níveis bacteriológicos de aceitabilidade para este tipo de produto. Utilizando as doses de 2 e 3 kGy essa redução foi mais pronunciada, com diminuição na ordem de 5 ciclos na contagem de BHAM (2,7 e 2,2 log respectivamente) e eliminação das demais bactérias.

Outros trabalhos têm confirmado a eficiência da utilização da radiação gama na eliminação de bactérias mesofílicas, psicrófilas e coliformes em leite (FREEMAN, 1959; ROSENTHAL et al., 1983; SEARLE e MCATHEY, 1989) e derivados lácteos (DA ROSA, 2004; GURGEL, 2000; PIETRANERA et al., 2003; TSIOTSIAS et al., 2002; HASHISAKA et al., 1990) em doses tão baixas quanto 2 kGy, e em alguns casos, a redução bacteriana atinge valores microbiológicos aceitáveis para que os alimentos possam ser considerados seguros para alimentação de pacientes com baixa imunidade. Em recente pesquisa Kim et al. (2007) constataram que na dose de 1 kGy todos os microrganismos mesofílicos foram eliminados de sorvetes com diversas bases de preparo (água e leite).

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas foram comparados com os padrões estabelecidos pela Instrução Normativa número 51 (BRASIL, 2002) e pelo Regulamento Tecnológico de Identidade e Qualidade do leite UAT (BRASIL, 1996) concluiu-se que: o leite irradiado nas dosagens de 2 e 3kGy está próprio para o consumo para todos os tipos de leite pasteurizado (A, B e C), enquanto as amostras irradiadas na dose de 1kGy, apresentam-se dentro dos padrões apenas para o leite

tipo B e C, pois obteve média de microrganismos mesofílicos (BHAM) superior ao padrão estabelecido para o leite tipo A; as doses empregadas de 1, 2 e 3kGy não foram suficientes para que as amostras de leite obtivessem contagens tão baixas quanto as necessárias para serem classificadas como leite UAT, embora tratando-se de processamentos tecnológicos diferentes.

Com relação aos microrganismos psicrotróficos, apesar de não existirem padrões estabelecidos para o leite cru refrigerado (BRASIL, 1996; BRASIL, 2002), o Regulamento Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1997), estabelece no máximo 10% da quantidade de microrganismos mesofílicos. A amostra controle obteve média de 6,1 log UFC/mL, inferior aos 10% da quantidade de mesófilos. Após as amostras serem irradiadas, não houve crescimento de microrganismos psicrotróficos.

Os resultados do leite irradiado, também foram suficientes para diminuição da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. De acordo com diversos autores (NEWSOME, 1988; PARK; SZABO, 1986), o crescimento de *S. aureus* enterotoxigênicos a uma população de pelo menos $5,0 \times 10^5$ células/g ou mL de alimento (5 log), geralmente é considerado necessário para a produção de enterotoxina causadora de DTA.

A contagem média de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de leite cru obtidas antes da irradiação (5,1 log) seria suficiente para ocasionar DTA. No entanto, a irradiação na dose de 1 kGy obteve a média de 3 log UFC/mL, enquanto o leite irradiado nas doses de 2 e 3 kGy, não apresentaram crescimento desse microrganismo, diminuindo assim, as chances de produção de enterotoxina.

Durante a estocagem do leite sob refrigeração a 5°C por 60 dias observou-se que as alterações das contagens iniciais das amostras irradiadas foram pequenas. Entretanto houve crescimento bacteriano da amostra controle durante este período conforme observado na tabela 5.

Este desenvolvimento bacteriano na amostra controle refletiu nos resultados das análises físico-químicas, pois a partir do quinto dia após a irradiação, observou-se um aumento gradual da acidez do leite, conduzindo a sua acidificação com conseqüente desestabilização das micelas de caseína, observadas durante o processo de análise pela precipitação e formação de coágulos.

Segundo Larpent (1996), o limite crítico na população bacteriana para o início das alterações no leite é de 6 log UFC/mL (10^6 UFC/mL). Este fato não foi verificado

neste experimento, já que a contagem inicial bacteriana foi superior a este valor (7 log UFC/mL) e o leite apresentava-se com a acidez e os demais parâmetros dentro da normalidade. Apesar do aumento da acidez ter se iniciado no quinto dia, o limite normal para este parâmetro físico-químico foi ultrapassado após o sétimo dia de estocagem. As alterações de coagulação protéica somente se iniciaram a partir do 14º dia de estocagem do leite quando a contagem de BHAM atingiu 7,3 log UFC/mL.

A diminuição do índice crioscópico neste caso, também está associada ao aumento da acidez, pois uma molécula de glicose transforma-se em quatro moléculas de ácido láctico, aumentando a quantidade de substâncias dissolvidas no leite com conseqüente diminuição do índice crioscópico.

Pelos resultados das amostras irradiadas verifica-se que bacteriologicamente e fisicoquimicamente o leite permaneceu estável, dentro dos parâmetros permitidos pela Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002) durante os 60 dias de estocagem sob refrigeração, nas dosagens aplicadas. O baixo desenvolvimento da acidez durante este período está de acordo com a pequena contagem bacteriana obtida após a irradiação.

Estes dados são semelhantes aos encontrados por Freeman (1959), que durante 12 semanas (aproximadamente 84 dias) verificou o crescimento de BHAM, presentes no leite após a irradiação nas doses 2,5, 5,0 e 7,5 kGy. A contagem bacteriana total da amostra controle variou entre 3 log e 5 log; a sobrevivência dos microrganismos depois da irradiação foi menor do que 0,1% da quantidade original presente. Na dose de 2,5 kGy poucos microrganismos sobreviveram ao tratamento, na quantidade máxima de 10 UFC/mL. Nas doses mais altas, ocasionalmente poucas colônias apareciam, mas nunca mais do que 1 UFC/mL.

No presente experimento, com as doses de 2 e 3 kGy, obteve-se contagens superiores ao verificado por Freeman (1959), provavelmente devido as altas contagens observadas na amostra controle (não irradiada). Entretanto, a sobrevivência de microrganismos após a irradiação com estas doses, foi inferior a 0,02%.

Freeman (1959) também verificou que a contagem de BHAM aumentou gradualmente durante o período testado nas amostras irradiadas em doses baixas. Pelo oitavo dia após a irradiação, contagens variaram entre 4 UFC/mL a 5 log UFC/mL, essencialmente bactérias esporuladas. No presente experimento, estas

contagens praticamente permaneceram inalteradas durante os 60 dias de estocagem no leite irradiado.

Raj e Roy (1987) procuraram determinar a validade comercial do leite irradiado nas doses de 0,1, 0,5 e 1 kGy mantidos sob temperaturas de refrigeração (8-10°C), mensurando o prazo a partir dos resultados encontrados na acidez titulável. Estes autores observaram que houve aumento da validade comercial do leite irradiado de 33 horas para o leite irradiado na dose de 0, 1 kGy, de 120 horas na dose de 0,5 kGy e de 120 horas quando o leite foi submetido a 1 kGy.

O aumento da validade comercial no presente trabalho foi superior a 2 meses, sendo verificado pela contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e pela acidez titulável.

Com relação às alterações degradativas de oxidação avaliadas pelo TBA e RMN foi verificado que radiação gama mesmo em pequenas doses foi capaz de produzir alterações dos lipídios no leite cru integral, com liberação de malonaldeído e outras substâncias reativas ao ácido 2- TBA, aumentando proporcionalmente a intensidade da coloração produzida. Esta modificação demonstrou ser visualmente mais intensa conforme a dose aplicada indicando boa reprodutibilidade ($R^2 > 72\%$)³ e sensibilidade, como no trabalho realizado por King (1962).

Os picos de aldeídos e cetonas livres encontrados pela RMN, no entanto, demonstraram que as doses de 1 e 2 kGy foram muito semelhantes entre si, com pequenas alterações na estrutura lipídica e que na dose de 3 kGy a alteração foi intensa demonstrando a total degradação dos lipídios com este tratamento.

Estes dados não confirmam os resultados descobertos por Day e Papaioannou (1963) que não encontraram linearidade entre a quantidade de dose aplicada e a intensidade de cor detectada pela metodologia de 2-TBA e tampouco na quantidade de carbonilas livres pela técnica de Cromatografia Gasosa. Essa diferença pode ser explicada pelo fato destes autores terem empregado doses altas de radiação gama (15, 30 e 45 kGy) no leite, o que possivelmente ocasionou alterações muito intensas na estrutura dos lipídios. Entretanto os resultados encontrados no presente estudo foram semelhantes ao de Guimarães et al. (2005) que verificaram que as alterações na estrutura molecular da gordura do leite submetido à irradiação nas doses de 1 a 2 kGy foram pequenas e que nas doses de 3 e 4 kGy ocorreu a destruição dos lipídios.

³ R= Reprodutibilidade, determinado pelo software SAS.

Apesar de não ser uma metodologia quantitativa, os resultados encontrados no RMN conseguiram caracterizar de forma clara as alterações ocasionadas pela radiação gama na gordura do leite.

Outros autores confirmam a ocorrência de oxidação lipídica ocasionada pela irradiação em leite e derivados pelas metodologias de índice de peróxido e índice de iodo (DAY; PAPAIOANNOU, 1963) índice de peróxido (ABDEL BAKY et al., 1986; IBRAHIM et al., 1987; SEARLE; MCATHEY, 1989), e quantificação dos ácidos graxos saturados e insaturados após este tratamento (IBRAHIM et al., 1987). Nestes trabalhos verificou-se que no leite, a radiação gama conduziu a um aumento dos valores de peróxido e ácidos graxos saturados, embora tenha ocorrido o decréscimo do índice de iodo e dos ácidos graxos insaturados. No trabalho realizado por Rady e Badr (2003), o produto irradiado foi a manteiga onde também ocorreu um aumento de valores de peróxido, mas o índice de iodo não foi alterado.

A irradiação gama nas doses empregadas também modificou sensorialmente o leite, sendo que em todos os casos foi possível a identificação pelos provadores das amostras irradiadas das não irradiadas, como confirmado por diversos autores (DAY; PAPAIOANNOU, 1963; KING, 1962; IBRAHIM et al., 1987; ROSENTHAL, 1983; SEARLE; McaTHEY, 1989) onde em todas as doses, o sabor e odor de oxidados era bem acentuado.

No presente trabalho, alguns provadores preferiram as amostras irradiadas à amostra controle, entretanto, a maioria desgostou bastante daquelas tratadas pela irradiação. Estes dados podem ser comparados aos encontrados por Clardy et al. (2002) que irradiaram sanduíches de presunto e queijo. Os provadores conseguiram identificar as amostras irradiadas, mas ficaram divididos se a irradiação afetou de forma negativa ou não a qualidade do produto.

A observação de que a amostra estava “rançosa” ou com sabor e odor a ranço foi especificada por poucos provadores. Muitos limitaram-se a descrição de horrível, desgostei muito ou muito ruim. Esta descrição está de acordo com Herrington (1956) que afirma que o sabor e aroma em amostras rancificadas é apresentado por algumas pessoas como forte sensação desagradável, com queixas e reclamações (não gosto, desaprovo, horrível).

Estes resultados demonstraram que ocorreu boa correlação dos testes de TBA e RMN e as análises sensoriais. A identificação pelos provadores da

modificação do leite pela radiação complementou os resultados encontrados nestes testes.

Todos estes dados confirmam que a radiação gama reduziu de forma significativa a microbiota contaminante do leite, entretanto ocasionou oxidação lipídica no leite cru integral que foi detectada por metodologias diferentes. Pela RMN sugere-se que a alteração da gordura do leite utilizando doses inferiores a 1 kGy não pode ser considerada tão significativa a ponto de impedir a sua aplicação neste tipo de produto.

6 CONCLUSÕES

A radiação gama nas doses de 1, 2 e 3 kGy foi suficiente para diminuir a quantidade de bactérias que normalmente contaminam o leite cru integral, tornando-o bacteriologicamente próprio para consumo. Apesar de não ter tornado este leite “comercialmente estéril” a quantidade de microrganismos presentes aproxima o leite irradiado do leite pasteurizado e por isso, necessita de refrigeração.

A validade comercial do leite irradiado aumentou bastante, se comparada à validade do leite pasteurizado comercializado no Brasil, pois o leite irradiado apresentou padrões físico-químicos normais e a contagem bacteriana esteve de acordo com a legislação durante dois meses de estocagem sob refrigeração, o que não é observado para a validade comercial do leite pasteurizado.

Outro ponto a ser considerado é que o leite submetido à irradiação eliminou o risco potencial de re-contaminação após a redução dos microrganismos presentes, pois foi irradiado dentro da embalagem final; do mesmo modo, a ausência da pasteurização reduz uma etapa e conseqüentemente reduz a quantidade de água necessária para higiene e sanitização dos equipamentos para a produção de leite, tornando o processo com melhor rendimento do ponto de vista econômico.

Houve correlação entre às análises físico-químicas para detecção de ranço e as análises sensoriais.

Entretanto, o desenvolvimento de ranço oxidativo, apesar de ser considerado pequeno no leite tratado pela radiação gama nas doses de 1 e 2 kGy, tornou o produto sensorialmente inaceitável para consumo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL BAKY, A.; FARAHAT, S.M.; RABIE, A.M.; MOBASHER, S.A.. The manufacture of Ras cheese from gama irradiated milk. *Food Chemistry*, v. 20, p.201-212, 1986.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.R.. Microbiologia da la Conservación de los Alimentos. In: _____. *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 88-98.

AMERINE, M.A. PANGBORN, R.M.; ROESSLER, E.B.. E.. *Principles of Sensory Evaluation of Food*. New York: Academic Press, 1965. 602p.

ANDREOTTI, G; E. TRIVELLONE, LAMANNA, R.; DI LUCCIA, A.; MOTT, A.. Milk Identification of Different Species: ¹³C-NMR Spectroscopy Triacylglycerols from Cows and Buffaloes' Milks. *Journal of Dairy Science*, n. 11, v. 83,p. 2432-2437, 2000.

ARAÚJO, JÚLIO M. A.. Determinação de índice de TBA: ácido tiobarbitúrico. In: _____. *Química de Alimentos: teoria e prática*. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1995. p.60-64.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – Technical Comité on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of the Foods*. Washington: APHA, 2001.

BANWART, G.J.. *Basic Food Microbiology*. Connecticut: Avi Publishing Company, 1981.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A.. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, p.277-294, 1994.

BERGDOLL, M.S.. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 463-523.

BRASIL. Portaria 146, de 07 de março de 1996. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT*. Brasília, DF, 1996.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal* (RIISPOA). Aprovado pelo Decreto 30.691, 20/03/1952, alterados pelos decretos n. 1255 de 25/06/1962, 1236 de 01/09/1994, 1812 de 08/02/1996, 2244 de 04/06/1997. Brasília, 2007. 241p.

_____. *Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos*. Brasília: ANVISA. Resolução-RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001a.

_____. Resolução RDC nº 12, DE 2/01/2001. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*, 2001b.

_____. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel*, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa, Brasília, DF, 2002.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Análise Sensorial. *Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos*. Ministério da Saúde/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 281-298, 2005.

_____. Instrução Normativa Nº 68, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2006 Publicado no Diário Oficial da União de 14/12/2006 , Seção 1 , Página 8. *Métodos analíticos oficiais para análise físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos*. Brasília: MAPA, 2006.

BRYNJOLFSSON, A. Future Radiation Sources and Identification of Irradiated Foods. *Food Technology*, v.43, n.7, p. 84-89, 1989.

BYUN, M-W.; LEE, J. W.; YOON, H-S.; JO, C.; KIM, H-Y. . Application of gamma irradiation for inhibition of food allergy. *Radiations Physics and Chemistry*, v.63, p. 369-370, 2002.

CARMO, L.S.. *Produção e purificação de enterotoxinas estafilocócicas, SEA, SEB, SEC2 e SED*. Belo Horizonte, 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

CARMO, L.S.. *Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC₂, SED e toxina TSST1 para uso em ensaios imunoenzimáticos*. Belo Horizonte, 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CASTRO, M.C.D. PORTUGAL, J. A .B.. *Perspectivas e Avanços em Laticínios*. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2000. 278 p.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL. Frequently Asked Questions about Irradiation. Em <<http://www.cdc.gov>> Atualizado em setembro de 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL - CDC. Frequently Asked Questions about Irradiation. Disponível em <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em 26 set. 1999.

CERQUEIRA, M.M.O.P. et al.. Avaliação do leite estocado em tanques de imersão e expansão por 48 horas. *Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes*, v.54, n. 309, p. 251-254, 1999.

CHAVES, J.B.P. *Métodos de Diferença em Avaliação Sensorial de Alimentos e Bebidas*. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 92p.

CHAVES, J.B.P.; SPROESSER, R.L.. Práticas de Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas. Universidade Federal de Viçosa. Imprensa Universitária. 1996. 81p.

CHECCHI, H. M.. Caracterização da Rancidez de Óleos e Gorduras: índice de TBA. In: _____. *Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos*. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2003. 206p.

CHEFTEL, J.; CHEFTEL, H.. Oxidación de Lipidos. In: _____. *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia. 1976. p.265-290.

CIÉSLA, K.; SALMIERI, S.; LACROIX, M.; TIEN, C. L.E.. Gamma Irradiation Influence on Physical Properties of Milk Proteins. *Radiation Physics Chemistry*, v.71, p.93-97, 2004.

CLARDY, S.; FOLEY D. M.; CAPORASO F.; CALICCHIA, M. L.; PRAKASH, A.. Effect of gamma irradiation on *Listeria monocytogenes* in Frozen, artificially contaminated sandwiches. *Journal of Food Protection*, v.65, n.11, p.1740-1744, 2002.

CONEDERA, G.; DALVIT, P.; MARTINI, M.; GALIERO, G.; GRAMAGLIA, M.; GOFFREDO, E.; LOFFREDO, G.; MORABITO, S.; OTTAVIANI, D.; PATERLINI, F.; PEZZOTTI, G.; PISANU, M.; SEMPRINI, P.; CAPRIOLI, A.. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, v.96, n.1, p. 67-73, 2004.

CORTEZ, M.A.S.;CORTEZ, N.M.S.. Qualidade do leite: boas práticas agropecuárias e ordenha higiênica. Niterói: EDUFF, 2008. 79p.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C.. Psychrotrophic microorganisms. In: CARL VANDERZANT; DON F. SPLITTSTOESSER. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: Edwards Brothers, 1992. 1219 p. Cap 9: p.153-167.

- DA ROSA, V. P.. *Efeito da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas Frescal*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2004.
- DAVIS, J.G.; WILBEY, R.A.. Microbiology of cream and dairy desserts. In: ROBINSON, R.K. (ed). *Dairy Microbiology: The microbiology of Milk Products*. 2.ed. London: Elsevier, 1990. v.2, p.41-108.
- DAY, E.A.; PAPAIOANNOU, S.E.. Irradiation-Induced Changes in Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, v.46, n.,11, p.1201-1206, 1963.
- DONNELLY, J.K.; ROBINSON. D.S.. Invited Review Free Radicals in Food. *Free radical research*, v. 22, n.2, p. 147-176, 1995.
- DONG, FM.; HASHISAKA, AE.; RASCO, BA.; EINSTEIN, MA.; MAR, DR.; AKER, S. N.. Irradiated or aseptically prepared frozen dairy desserts: acceptability to bone marrow transplant recipients. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 6, p. 719-723, 1992.
- DUNKLEY, W. L.. Evaluation of Thiobarbituric Acid Test of Measure of Oxidized Flavor in Milk. *Food Technology*, v.5, p.342, 1951.
- DUNKLEY, W.L; JENNINGS, W.G.. A Procedure for Application of Thiobarbituric Acid Test to Milk. *Journal of Dairy Science*, v.34, p. 1064-1069, 1951.
- FAO/AIEA/OPS/OMS. Consulta técnica conjunta sobre El uso de irradiacion como medida de intervención de la salu publica par el control de las enfermedades transmitidas por alimentos en Latino America y el Caribe. Washington, USA, 1992.
- FAO, 2003. *Codex Alimentarius Standards ans Codes*. <www.codexalimentarius.net/download/standards>. Codex General for Irradiated Foods (CODEX-STAN 106-1983 – Ver.1-2003).
- FARKAS, J.. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science e Technology*, v.17, p.148-152, 2006.
- FELLOWS, P.. *Food Processing Technology: principles and practice*. Inglaterra: Woodwead: 1997. p.186-194.
- FERREIRA, C.L.L.. *Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos*. Juiz de Fora: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176 p.
- FONSECA, L.M.; FONSECA, C.S.P.. *Variação da Produção e da Composição do Leite*. Belo Horizonte, 2001.

FRAZIER, W.C.. *Microbiologia de los Alimentos*. 4.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FRANCO, R.M.; MANTILLA, S.P.S.. *Escherichia coli em corte de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade de antimicrobianos aos sorovares predominantes*. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 8., 2004, Rio de Janeiro. *Anais...*, Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2004. 1 CD-ROM.

FREEMAN, B. M.. Bacteriological Investigations of Liquid Milk Irradiated in Gamma-source. *Journal of Applied Radiation Isotopes*, v. 6, p. 160-163, 1959.

FROEHLICH, A.. *Efeitos do CO₂ supercrítico e da irradiação sobre esporos de Bacillus cereus em pimenta-do-reino*. Viçosa, 2000. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2000.

FURTADO, M. M.. *Principais problemas dos queijos: causas e prevenção*. São Paulo: Fonte, 2005. 176p.

GAVA, A.J. Conservação dos Alimentos pelo Uso de Irradiação. In: _____: *Princípios de Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Nobel. 1999. p. 271-277.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C.. *Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações*; (Ed): Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1987. p. 9, 39.

GIROUX; M; LACROIX, M. Nutricional adequacy of Irradiated Meat: a review. *Food Research International*, v. 31, p.257-264, 1998.

GRAY, J. I.. Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.55, n.6, 1978.

GOMES, H.A.; GALLO, C.R.. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" comercializado em Piracicaba, SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.15, n.2, p.158–161, 1995.

GUIMARÃES, C. F.M; SILVA, A. O. C.; COSTA, F. M.; JESUS, E. F. O.; MÁRSICO, E. T.. Efeito da radiação gama sobre os componentes sólidos do lei cru. In: II Congresso Latino Americano de Higienistas de Alimentos. VIII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, v. 19, 2005, Rio de Janeiro. *Anais...*Rio de Janeiro, 2005. 1 CD-ROM.

GURGEL, M.S.C.C.A.. *Efeito da radiação gama na resistência do Staphylococcus aureus (Rosembach, 1984) e nas propriedades físico-químicas e sensoriais do queijo "Minas Frescal"*. São Paulo, 2000. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

HAMMER, B.W.; BABEL, F.J. *Dairy Bacteriology*. 4 ed. New York: Jonh Wiley & Sons, 1957. 614 p.

HARRIGAN, W.F.. *Laboratory in Food Microbiology*. San Diego: Academic Press, 1998.

HASHISAKA, A.E.; MATCHES, J.R.; BATTERS, Y.; HUNGATE, F.P.; DONG, F.M.. Effects of Gamma Irradiation at – 78°C on microbial populations in dairy products. *Journal of Food Science*, v.55, n.5, 1990.

HERRINGTON, B. L.. Our Industry Today. Brief Reviews of Current Topics. *Journal of Dairy Science*, v.39, n.11, 1956.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D.. Deterioração e Preservação. In:_____. *Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário*. São Paulo: Varela, 1998. p. 137-138.

HOFF, E.; WERTHEIM, J. H.; PROCTOR, B. E.. Radiation Preservation of Milk and Milk Products. V. Precursors to the Radiation-Induced Oxidation Flavor of Milk Fat¹. *Journal of Dairy Science*, v. 42, n. 3, p. 468-475, 1959.

HU, F; FURIHATA, K.; ITO-ISHIDA, M.; KAMINOGAWA, S.; TANOKURA, M.. Nondestructive Observation of Bovine Milk by NMR Spectroscopy: Analysis of Existing States of Compounds and Detection of New Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 4969-4974, 2004.

IFT. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. Sensory Evaluation Division-Institute of Food Technologists. *Food Technology*, v.35, n.11, p.50-59, 1981.

IFT - INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY. Radiation Preservation of Foods. *Food Technology*, v.37, n.2, p. 55-60, 1983.

IBRAHIM, M.K. ; EL-BATAWY, M. A.; EL-SAYED, S.A.. Comparative studies on gamma irradiated fatty dairy products. *Egyptian Journal of Dairy Science*, v.15, n.2, p.221-228, 1987.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*, 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JÚNIOR, H.A.M; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M.A.F.; LEBRE, D. T.; WANG. A. Y.. Determinação de Resíduos de Cloranfenicol em Amostras de Leite e Mel Industrializados Usando a Técnica de Espectroscopia de Massas em “TANDEM” (CLAE-EM/EM). *Química Nova*, v. 29, n 3, p. 586-592, 2006.

KILCAST, D.. Effect of Irradiation on Vitamins. *Food Chemistry*, p.157-164, 1994.

KILCAST, D.. Food Irradiation: Current Problems and Future Potential. *International Biodeterioration and Biodegradation*, p. 279-296, 1995.

KIM, H.J.; HAM, J. S.; JEONG, S. G.; AHN, J. N.; BYUN, M. W.; JO, C.. Development of ice cream with improved microbiological safety and acceptable organoleptic quality using irradiation. *Journal of Animal Science and Technology*, v.49, n.4, p. 515-522, 2007.

KING, R.L.. I Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. *Journal of Dairy Science*, v.45, n. 10, p. 1165-1171, 1962.

LAMAITA, H.C.. *Freqüência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais*. Belo Horizonte, 2003. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

LACROIX, M.; OUTTARA, 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.

LAMB, J.L.; GOGLEY, J.M.; THOMPSON, M.J.; SOLIS, D.R.; SEN, S.. Effect of low-dose Gamma Irradiation on *Staphylococcus aureus* and Product Packaging in Ready-to-Eat Ham and Cheese Sandwiches. *Journal of Food Protection*, v.65, n.11, 2002.

LARPENT, J.P.. Leche y productos lácteos no fermentados. In: BOURGEIOS, C.M.; MESCLE, F. J.; ZUCCA, J. *Microbiologie Alimentaire: aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires*. v.1. Zaragoza: Acribia. 1996. 672p.

LASZLO, H.. *Química de alimentos: alteração dos componentes orgânicos*. São Paulo: Nobel, 1986.

LEE, P.R.. From the Assistant Secretary for Healthy, US Public Health Service. *Journal of American Medical Association*, v.272, n.4, p.261, 1994.

MELLO, L.C.. Alimentos Irrradiados. Disponível em <<http://www.nutriweb.org.br/n0202/irradiados.htm>>. Acesso em: 12 ago. 2008.

MERCK. *Microbiology Manual Merck*. Deutschland: Merck, 1996. 403p.

MERRITT; Jr, C.; ANGELINI, P.; GRAHAM, R.A.. Effect of Radiation Parameters on the Formation of Radiolysis Products in Meat and Meat Substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.26, p.29-35, 1978.

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

MOUSAOU, F.; VANGROENWEGHE, F.; HADDADI, K.; LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C.. Proteolysis in milk during experimental *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.87, n.9, p.2923-2931, 2004. [resumo].

MURRAY, G.G.. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. v.2, p.1015-1035.

NAGHMOUSH, M. R.; SHEHATA, T.E.; GIRGIS, E.S.; KAMAL, T.H.; IBRAHIM, M.K.. *Egyptian Journal of Dairy Science*, v. 11, n.1, p. 61-69, 1983.

NAWAR, W.W.. Radiolysis of nonaqueous components of foods. In: JOSEPHSON, E.S., PETERSON, M.S. (Eds.). *Preservation of Food by Ionizing Radiation*, v. 2. Boca Raton: CRC Press. 1983. p. 78–81.

NAWAR, W.W.. Lipids. In: FENNEMA, O.R. *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker. p.158-268, 1993.

NEWSOME, R.L.. *Staphylococcus aureus*. *Food Technology*, v.42, n.4, p.194-195, 1988.

NUNES, M.L. ; FIGUEIREDO, M.J. ; MADRUGA, M.S. ; LIMA, F.M.S. ; BISCONTINI, T.M.. Efeito de antioxidantes e das condições de estocagem na oxidação lipídica de lingüiças de frango. *Revista Nacional da Carne*, n.319, p.36-48, setembro, 2003.

OLIVEIRA, J.S.. *Queijo: Fundamentos Tecnológicos*. São Paulo: Ícone. 1986.

OLIVEIRA, V.M. Contribuição ao estudo da qualidade da carne de rã (*Rana catesbeiana*) fresca. Niterói, 1996. *Dissertação* (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 1997.

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

PARK, C.E.; SZABO, R.. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in foods. *Canadian Journal Microbiology*, v.32, p.723-727, 1986.

PATTON, S; KURTZ, G.W.. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *Journal of Dairy Science*, v.34, n.7, p.669-674, 1951.

PIETRANERA, M. S .A.; NARVAIZ, P.; HORAK, C.; KAIRIYAMA, E.. Irradiated Ice-creams for Immunosuppressed Patients. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 66, p. 357, 2003.

PIRES, R.V.P.. Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo minas frescal. Mestrado. *Dissertação*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2004.

POMERANZ, Y.; MELOAN, C. E.. *Food Analysis: theory and practice*. 3ed. New York: Chapman e Hall, 1994. 778p.

POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. *Food Science*. 5. ed. Aspen:Maryland, 1998. cap.7, p.113-136.

PRATA, Luiz. F. *Fundamentos de Ciência do Leite*. Jaboticabal/São Paulo: Editora Funep - Unesp, 2001. 287p.

PSZCZOLA, D.E. Food Irradiation: countering the tactics and claims of opponents. *Food Technology*, v.44, n.6,p.92-97, 1990.

RADY, A. H.; BADR, H. M.. Keeping the quality of cows' butter by γ -irradiation. *Grasas y aceites* vol. 54,n. 4, p.410-418, 2003.

RAJ, D; ROY, M.K.. Preservation of milk by gamma-irradiation. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, v. 16, n. 4, p. 227-229, 1987.

RELA, P.. Cardápio purificado. Separata de: *Época*, São Paulo: Editora Globo, 04 jun.2001., p.59, Caderno Agricultura, 2001.

ROBBS, P.G.; CAMPELO, J.C.F.. Produção segura na cadeia do leite. In: PORTUGAL et al. *Segurança Alimentar na Cadeia do Leite*. Juiz de Fora: ILCT/EPAMIG, 2002. p.51-76.

ROSENTHAL, I.; MARTINOT, M.; LINDNER, P.; JUVEN, B.J.; BEN-HUR, E.. A Study of Ionizing Irradiation of Dairy Products. *Milchwissenschaft*, v.38, n.8, p. 467-470, 1983.

ROSENTHAL, I.. Lipids. In:_____. *Milk and Dairy Products: properties and processing*. New York: Balaban. 1991. Cap1, p.9-21.

ROUBOS, D. . *Nexus Magazine*, v.4. n.2, 1997.

SANTOS, A.F.. *Determinação da dose de radiação gama para destruição de Salmonella spp. em carne de frango*. São Paulo, 1997. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1997.

SANTOS, E.S.; CARVALHO; E.P.; ABREU, L.R.. Psicotróficos: Conseqüência de sua presença em leites e queijos. *Boletim SBCTA*, v. 33, n. 2, 129-138, 1999.

SAS Institute. *SAS User's Guide*. 6.04 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1999. 956p.

SACCHI, R., ADDEO, F., MUSSO, S.S., PAOLILLO, L. AND GIUDICIANNI, I.. A high resolution ^{13}C -NMR study of vegetable margarine. *Italian Journal. Food Science.*, v.7, p. 27-36, 1995.

SCHOKEN-ITURRINO, R.; NADER FILHO; DIMENSTEIN, A.R.A.. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. *Higiene Alimentar*, v.10, n.42, p.25-27, 1996.

SCHOONMAKER, S.. Irradiation destroys Johne's in milk. *Dairy Herd Management*. Set. 2001.

SEARLE, A. J. F.; McATHEY, P.. Treatment of Milk by Gamma Irradiation – Effect of Anoxia on Lipid Peroxidation and the Survival of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the science of Food and Agriculture*, v. 48, n. 3, p. 361-367, 1989.

SHAH, N.P.. Psychrotrophs in milk: A review. *Milchwissenschaft*, v.49, n.8, p.432-437, 1994.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.. *Métodos de análise microbiológica de alimentos*. Campinas: ITAL, 1997. 228 p.

SILVA, A. C. O.. Efeito da radiação gama e do conservante nisina sobre a enterotoxina A produzida por *Staphylococcus aureus* adicionada ao leite usado na fabricação de queijo Minas frescal. 2003. 38 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal)– Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

SOUZA, J.M. et al. Isolamento de *Staphylococcus aureus* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas de alimentos envolvidos em surto de toxinfecção alimentar. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 20. 1999. Salvador. *Resumos...* Curitiba: FINEP, FIOCRUZ e CNPQ, 1999. p.352.

SOUZA, A. R. M.; VALTER, A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.. Efeito da radiação gama e do armazenamento na oxidação lipídica e no colesterol de carne de cordeiros da raça Santa Inês. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.1, 2007.

STOEN, H.; SIDEL, J.L. *Sensory Evaluation Practices*. California: Academic Press, 1992. 338p.

TSIOTSIAS, A.; SAVVAIDIS, I.; VASSILVA, A.; KONTOMINAS, M.; KOTZEKIDOU, P.. Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese “Anthotyros”. *Food Microbiology*, v. 19, n.2/3, p.117-126, 2002.

VALENTE, A. M.. Efeito da irradiação sobre mexilhões (*Perna perna* (Linnaeus) 1758): coliformes termotolerantes e enterococcus; ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras. Niterói, 2004. 85f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de POA) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Niterói. 2004.

VIEIRA, M.B.C.M.; DIAS, R.S.; SOUZA, J.M.; SILVA, S.O. Avaliação da qualidade microbiológica de leites, cru, pasteurizado, tipo C e pasteurizado integral/fazenda, comercializados em algumas cidades mineiras em 1994. In: XIII Congresso Nacional de Laticínios, 1995, Minas Gerais. Anais...Juiz de Fora, 1995.

URBAIN, W.M. *Food Irradiation*. Academic Press: Orlando, 1986.

WONG, D.. *Química de los Alimentos: mecanismo y teoría*. Acribia: Zaragoza, Espanha, 1989.

8 APÊNDICES

8.1 APÊNDICE 1 - RESULTADO DAS ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS DO LEITE CRU INTEGRAL IRRADIADOS NAS DOSES DE 1, 2 E 3 kGy E DA AMOSTRA CONTROLE

Tabela A – Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (Log) no leite cru integral irradiado nas doses de 0, 1, 2 e 3 kGy.

Repetições	UFC/mL			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
Dia 1	7,0	4,3	2,6	2,1
Dia 2	7,1	4,7	3,0	2,4
Dia 3	7,1	4,1	2,5	2,1
Dia 4	7,2	3,5	2,6	2,5
Dia 5	7,2	4,0	2,7	2,1
Dia 6	7,1	3,8	2,5	2,0
Média	7,1	4,1	2,7	2,2

Tabela B – Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas (Log) no leite cru integral irradiado nas doses de 0, 1, 2 e 3 kGy.

Repetições	UFC/mL			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
Dia 1	6,1	Ausência	Ausência	Ausência
Dia 2	6,0	Ausência	Ausência	Ausência
Dia 3	6,1	Ausência	Ausência	Ausência
Dia 4	6,1	Ausência	Ausência	Ausência
Dia 5	6,1	Ausência	Ausência	Ausência
Dia 6	6,0	Ausência	Ausência	Ausência
Média	6,1	Ausência	Ausência	Ausência

Tabela C – Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (Log) no leite cru integral irradiado nas doses de 0, 1, 2 e 3 kGy.

Repetições	UFC/mL			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
Dia 1	5,3	3,7	Ausência	Ausência
Dia 2	5,0	3,7	Ausência	Ausência
Dia 3	5,2	3,6	Ausência	Ausência
Dia 4	4,9	3,7	Ausência	Ausência
Dia 5	5,0	3,8	Ausência	Ausência
Dia 6	5,3	3,7	Ausência	Ausência
Média	5,1	3,7	Ausência	Ausência

Tabela D – Enumeração de coliformes a 35-37°C (totais) (Log) das amostras de leite cru integral irradiadas nas doses de 0, 1, 2 e 3 kGy.

Repetições	NMP/mL			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
Dia 1	6,4	0,6	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 2	6,4	0,6	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 3	6,4	0,4	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 4	6,4	0,4	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 5	6,7	0,6	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 6	6,4	0,4	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Média	6,4	0,5	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL

Tabela E – Enumeração de Coliforme 45 °C (log) das amostras de leite cru integral irradiadas nas doses de 0, 1, 2 e 3 kGy.

Repetições	NMP/mL			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
Dia 1	6,0	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 2	5,0	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 3	4,2	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 4	4,6	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 5	5,6	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 6	5,9	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Média	5,6	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL

Tabela F – Enumeração de *E. coli* (Log) das amostras de leite cru integral irradiadas nas doses de 0, 1, 2 e 3 kGy.

Repetições	NMP/mL			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
Dia 1	4,5	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 2	5,3	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 3	4,6	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 4	5,0	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 5	5,4	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Dia 6	5,3	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL
Média	5,1	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL	<0,3NMP/mL

8.2 APÊNDICE 2 - RESULTADO DA ANÁLISE SENSORIAL DO LEITE INTEGRAL PASTEURIZADO IRRADIADO

Tabela F – Resultado da análise sensorial da amostra irradiada com 1 kGy utilizando o teste triangular de diferença.

Amostra:		1 kGy				
N°	Nome do Julgador	Ordem de Apresentação	Resposta do Julgador* (C) ou (E)			Comentários
1		A	B	A	E	As três são ruins
2		A	A	B	C	Não é saboroso/ Ranço (irradiada)
3		B	A	A	C	Gostei
4		A	B	A	C	Sabor estranho (irradiada)
5		A	A	B	C	
6		B	A	A	E	Amostra mais adocicada (controle)
7		A	B	A	C	
8		A	A	B	C	Horrível (irradiada)
9		B	A	A	C	Sabor estranho (irradiada)
10		A	B	A	C	
11		A	A	B	C	
12		B	A	A	C	Rançoso (irradiada)
13		A	B	A	C	
14		A	A	B	C	Muito ruim (irradiada)
15		B	A	A	C	Muito ruim (irradiada)
16		A	B	A	E	
17		A	A	B	C	Sabor mais agradável (controle)
18		B	A	A	C	Muito ruim (irradiada)
19		A	B	A	C	
20		A	B	B	C	
21		B	B	A	C	Sabor estranho (irradiada)
22		B	A	B	C	
23		A	B	B	C	
24		B	B	A	E	
25		B	A	B	C	
26		A	B	B	C	
27		B	B	A	C	Ranço (irradiada)
28		B	A	B	E	
29		A	B	B	E	
30		B	B	A	C	
31		B	A	B	C	Gostei (irradiada)
32		A	B	B	C	
33		B	B	A	E	
34		B	A	B	C	
35		A	B	B	C	
36		B	B	A	C	
37		B	A	B	C	
38		A	B	B	C	
39		B	B	A	E	
40		B	A	B	C	Sabor pouco atrativo; aguado (irradiada)
P	40					
N° de julgamentos totais		40				
N° de julgamentos corretos		32				
Valor tabelado		24				

* (C) – correta; (E) – errado; P – número de julgadores.

Tabela G - Resultado da análise sensorial da amostra irradiada com 2 kGy utilizando o teste triangular de diferença.

Amostra:		2 kGy				
N°	Nome do Julgador	Ordem de Apresentação			Resposta do Julgador* (C) ou (E)	Comentários
1		A	B	A	C	Sabor diferente e ruim (irradiada)
2		A	A	B	C	
3		B	A	A	C	
4		A	B	A	C	Mais agradável (controle)
5		A	A	B	C	
6		B	A	A	C	Muito ruim (irradiada)
7		A	B	A	C	Rançoso
8		A	A	B	C	
9		B	A	A	C	
10		A	B	A	C	
11		A	A	B	C	
12		B	A	A	C	
13		A	B	A	C	
14		A	A	B	C	
15		B	A	A	C	
16		A	B	A	C	
17		A	A	B	E	
18		B	A	A	C	
19		A	B	A	C	Sabor repulsivo (irradiada)
20		A	B	B	C	
21		B	B	A	C	
22		B	A	B	C	Melhor paladar (irradiada)
23		A	B	B	C	
24		B	B	A	C	Gostoso (irradiada)
25		B	A	B	C	Os três são ruins
26		A	B	B	C	
27		B	B	A	C	
28		B	A	B	E	
29		A	B	B	E	
30		B	B	A	E	
31		B	A	B	C	Rançoso (irradiada)
32		A	B	B	E	
33		B	B	A	C	
34		B	A	B	C	
35		A	B	B	C	
36		B	B	A	C	
37		B	A	B	C	As amostras têm gosto ruim
38		A	B	B	E	
39		B	B	A	E	
40		B	A	B	C	Menos pior (irradiada)
P	40					
N° de julgamentos totais	40					
N° de julgamentos corretos	33					

Valor tabelado

* (C) – correta; (E) – errado; P – número de julgadores.

Tabela H – Resultado da análise sensorial da amostra irradiada com 3 kGy utilizando o teste triangular de diferença.

Amostra:			3 kGy			
N°	Nome do Julgador	Ordem de Apresentação			Resposta do Julgador* (C) ou (E)	Comentários
1		A	B	A	C	Gostei (irradiada)
2		A	A	B	E	
3		B	A	A	C	Rançoso (irradiada)
4		A	B	A	C	
5		A	A	B	C	
6		B	A	A	C	
7		A	B	A	C	
8		A	A	B	E	
9		B	A	A	C	
10		A	B	A	C	Sabor mais suave (irradiada)
11		A	A	B	C	Amostra mais saborosa (irradiada)
12		B	A	A	C	
13		A	B	A	E	
14		A	A	B	C	
15		B	A	A	E	
16		A	B	A	C	Rançoso (irradiada)
17		A	A	B	E	
18		B	A	A	C	
19		A	B	A	E	
20		A	B	B	C	Melhor (irradiada)
21		B	B	A	C	
22		B	A	B	C	Sabor repulsivo (irradiada)
23		A	B	B	E	
24		B	B	A	E	
25		B	A	B	C	
26		A	B	B	C	
27		B	B	A	C	
28		B	A	B	C	
29		A	B	B	C	
30		B	B	A	C	
31		B	A	B	C	
32		A	B	B	C	
33		B	B	A	C	Mais saborosa (controle)
34		B	A	B	C	Muito ruim (irradiada)
35		A	B	B	E	
36		B	B	A	C	Rançoso (irradiada)
37		B	A	B	C	Rançoso (irradiada)
38		A	B	B	C	
39		B	B	A	C	
40		B	A	B	C	Muito ruim (irradiada)
P	40					
N° de julgamentos totais	40					
N° de julgamentos corretos	31					
Valor tabelado						

* (C) – correta; (E) – errado; P – número de julgadores.