

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INFLUÊNCIA DAS MICROONDAS SOBRE
**ESCHERICHIA COLI, BACILLUS CEREUS E
CLOSTRIDIUM SPOROGENES P.A. 3679 EM
SOPA DE VEGETAIS.**

Parcer

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Hebe Ana Maria Caletti
de Marengo e aprovada pela Comissão Julga-
dora em 21.11.94.*

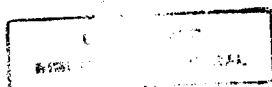
Mirtha N. Eiroa

Hebe Ana Maria Caletti de Marengo

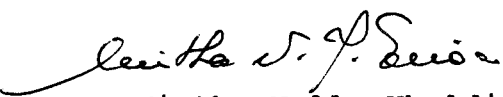
Orientador: Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa
Co-orientador: Dra. Pilar Rodriguez Massaguer

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

1994



BANCA EXAMINADORA


Orientadora : Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa


Membro : Dr. Jose Luiz Pereira


Membro : Dr. Antonio Marsaioli Jr.


Membro : Dr. Edir Nepomuceno da Silva

Dedico este trabalho aos meus
queridos pais, irmão, esposo e
filhos.

AGRADECIMENTOS

Dra. Mirtha N. Uboldi Eiroa, pela orientação e pela oportunidade oferecida de realizar estudos sobre microbiologia no ITAL.

Dra. Pilar Rodriguez Massaguer, pelas orientações sobre a tese e anteriores a ela.

Dres. Alfredo Vitali, Emilia Mori e Vera Pupo, pesquisadores do ITAL, pela utilização de equipamentos e instalações dos seus laboratórios.

Dr. Antonio Marsaioli Jr., pelo auxílio técnico.

Dr. Ernani Porto, pela revisão do texto

Sres. Juan Domec, Mark Timms, e os amigos de Horacio, Daniel e Alfredo, pela colaboração.

Engs. Sandra Mian e Arlindo Valdez Jr. da companhia BRASTEMP de São Bernardo do Campo, pelas informações sobre fornos de microondas.

Gabriel de Oliveira, Reginaldo Guiraldelli e colegas do departamento de Microbiologia do ITAL.

Fátima Valentino e Creusa Nomura da FEA da UNICAMP.

E um agradecimento muito especial para meu esposo e meus filhos pela ajuda no preparo da tese e, fundamentalmente, pela compreensão e paciência que tiveram comigo durante estes anos do curso de mestrado

SUMARIO

RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 O forno de microondas	6
3.2 As ondas eletromagnéticas e as microondas	10
3.3 Polarização dielétrica e aquecimento por microondas	14
3.4 Parâmetros que afetam o aquecimento dos alimentos por microondas	17
3.4.1 Freqüência das microondas	18
3.4.2. Potência das microondas	19
3.4.3 Massa	20
3.4.4 Conteúdo de umidade	21

3.4.5	Densidade	21
3.4.6	Temperatura	22
3.4.7	Tamanho e forma do alimento	24
3.4.8.	Condutividade elétrica	25
3.4.9	Calor específico	28
3.5	Distribuição da temperatura	29
3.6	Efeitos das microondas em sistemas biológicos	30
3.6.1	Fatores que influenciam os efeitos das microondas sobre os microrganismos presentes nos alimentos	31
3.6.1.1	Fatores intrínsecos	31
3.6.1.2	Fatores extrínsecos	33
3.6.1.3	Fatores relativos aos microrganismos presentes	36
3.6.2	Mecanismo do efeito das microondas na inativação dos microrganismos	36
3.6.2.1	Efeitos subletais	41
3.6.3	Diferenças na resistência as microondas entre microrganismos	44
3.7	Comparação dos efeitos letais do aquecimento convencional e do aquecimento com microondas	45
3.8	Vantagens e desvantagens do aquecimento com microondas	49
3.9	Reaquecimento de alimentos em fornos de microondas	51

4.	MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1	Materiais	54
4.2	Métodos	55
4.2.1	Preparação da sopa creme de vegetais	55
4.2.2	Preparação das suspensões de microrganismos	56
4.2.2.1	Preparação da suspensão de E. coli	57
4.2.2.2	Preparação da suspensão de esporos de B. cereus	58
4.2.2.3	Preparação da suspensão de esporos de C. sporogenes	60
4.2.3	Ensaio preliminar	62
4.2.3.1	Calibração do termômetro do forno	62
4.2.3.2	Medição da temperatura da amostra no interior do forno	62
4.2.3.3	Inoculação da sopa	64
4.2.4	Ensaio definitivo	65
4.2.4.1	Avaliação da população de E.coli e de esporos de B. cereus e C.sporogenes após exposição às microondas	68

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	Resultados dos ensaios preliminares	71
5.2	Resultados dos ensaios definitivos	74
6.	CONCLUSÕES	81
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Penetração da energia das microondas em diversos materiais	19
Tabela 2	Valor da constante dielétrica e do fator de perda da batata crua	22
Tabela 3	Propriedades dielétricas da água e do gelo a 2450 MHz	23
Tabela 4	Influência do aquecimento convencional e por microondas sobre a atividade de algumas enzimas	42
Tabela 5	Tratamento das amostras de sopa inoculadas	67
Tabela 6	Temperatura da solução salina fisiológica. Potência média	83
Tabela 7	Temperatura da sopa de vegetais. Potência média	84
Tabela 8	Sobrevivência de <i>E.coli</i> em sopa de vegetais .Potência média	85
Tabela 9	Sobrevivência de <i>E. coli</i> em sopa de vegetais. Potência alta	86
Tabela 10	População de <i>E. coli</i> em sopa de vegetais em TSA e VRB	87
Tabela 11	Sobrevivência de <i>B. cereus</i> em sopa de vegetais nos meios TSA e PE	88

Tabela 12	Sobrevivência de <i>B. cereus</i> em sopa de vegetais. Potência alta	90
Tabela 13	População de <i>B.cereus</i> em sopa de vegetais nos meios TSA e PE por 6 minutos	92
Tabela 14	Sobrevivência de <i>C. sporogenes</i> em sopa de vegetais	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho simplificado do forno de de microondas	6
Figura 2	Esquema do magnetron	8
Figura 3	Espectro das radiações eletromagnéticas	10
Figura 4	Onda eletromagnética	12
Figura 5	Relação entre calor específico, peso, potência e tempo de aquecimento	20
Figura 6	Relação entre constante dielétrica, fator de perda e profundidade de penetração	27
Figura 7	Curva de crescimento de <i>E. coli</i>	95
Figura 8	Sobrevivência de <i>E. coli</i> em sopa de vegetais. População inicial 2,66 log UFC/ml	96
Figura 9	Sobrevivência de <i>E. coli</i> em sopa de vegetais. População inicial 4,68 log UFC/ml	97
Figura 10	Sobrevivência de <i>E. coli</i> em sopa de vegetais. População inicial 6,69 log UFC/ml	98
Figura 11	Sobrevivência de <i>B.cereus</i> em sopa de vegetais. População inicial 2,11 log UFC/ml	99

Figura 12	Sobrevivência de <i>B. cereus</i> em sopa de vegetais. População inicial 4,11 log UFC/ml	100
Figura 13	Sobrevivência de <i>B. cereus</i> em sopa de vegetais. População inicial 6,18 log UFC/ml	101
Figura 14	Sobrevivência de <i>Clostridium sporogenes</i> em sopa de vegetais. População inicial 2,20 log UFC/ml	102
Figura 15	Sobrevivência de <i>Clostridium sporogenes</i> em sopa de vegetais. População inicial 4,20 log UFC/ml	103
Figura 16	Sobrevivência de <i>Clostridium sporogenes</i> em sopa de vegetais. População inicial 5,90 log UFC/ml	104

RESUMO

O forno de microondas vem sendo utilizado com frequência crescente no descongelamento e preparação de refeições no âmbito doméstico bem como em centros de saúde e estabelecimentos comerciais , sendo a rapidez do processo um dos atributos mais apreciados.

Por esta característica, foi conduzido um número significativo de pesquisas no campo da Microbiologia, visando obter informações a respeito da resposta dos microrganismos à ação das microondas.

Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito das microondas sobre células vegetativas de *Escherichia coli* e esporos de *Bacillus cereus* e *Clostridium sporogenes* PA 3679 em sopa constituída de vegetais, margarina e ovos.

As condições de trabalho no laboratório foram semelhantes às da operação de um forno de microondas doméstico.

Amostras de sopa previamente esterilizadas foram inoculadas individualmente com cada um dos microrganismos citados nos níveis de 2 log UFC/ml (unidades formadoras de colônias/ml), 4 log UFC/ml e 6 log UFC/ml e, a seguir, colocadas no centro do prato giratório do forno de microondas e aquecidas em potência alta por diferentes períodos de tempo. A intervalos de um minuto foram retiradas amostras para determinar a temperatura alcançada pela sopa e avaliar o número de microrganismos sobreviventes por inoculação em placa nos meios convenientes.

A inativação total de *E. coli* foi observada após 3 minutos de aquecimento seguido de 3 minutos de tempo de espera. Populações de esporos de *B. cereus* da ordem de 2,1 log UFC/ml foram inativadas após 4 minutos de aquecimento seguido de 4 minutos de tempo de espera. Para populações da ordem de 4,1 log UFC/ml e 6,2 log UFC/ml, a inativação de esporos ocorreu após 5 minutos e 6 minutos de aquecimento seguido de 4 minutos de tempo de espera, respectivamente. Populações de *C. sporogenes*, nos três níveis de inoculação, não apresentaram evidências de injúria após 10 minutos de aquecimento.

SUMMARY

The microwave oven is being increasingly used to defrost and reheat prepared meals for domestic consumption as well as in hospitals and commercial establishments, primarily because of the speed of operation. Due to the widespread usage of microwave ovens, much research has been conducted in the field of microbiology to obtain information on the influence of microwave radiation upon microorganisms.

The present work has been conducted to evaluate the influence of microwaves upon *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* spores and *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores in soup composed of vegetables, eggs and margarine. The experiment was carried out at the laboratory simulating domestic use of the microwave oven. The samples of soup were sterilized and individually inoculated with each one of the microorganisms in concentrations of 2 log CFU/ml (colony formers units/ml) , 4 log CFU/ml and 6 log CFU/ml. Afterwards, they were placed in the center of the giratory plate of a microwave oven and heated at high power for

different periods of time. Samples were taken every minute to determine temperature, and to evaluate the number of survivors by plating.

It was necessary to heat for 3 minutes followed by 3 minutes of resting time to inactivate completely *E. coli* . When the contamination level of *B. cereus* spores was 2,1 log CFU/ml the total inactivation was observed after 4 minutes of heating and 4 minutes of resting time. When the population was 4,1 log CFU/ml and 6,2 log CFU/ml the spores inactivation was observed after 5 minutes and 6 minutes of heating followed by 4 minutes of resting time respectively. Heating for 10 minutes showed no effect on spores of *C. sporogenes*.

1. *INTRODUÇÃO*

Nas últimas décadas dois aparelhos mudaram os hábitos alimentares de grande parte dos habitantes dos centros urbanos : o "freezer" e o forno de microondas.

A utilização do forno de microondas, tanto em forma doméstica quanto industrial, tem permitido o consumo de alimentos frescos com considerável economia de tempo e energia. Estudos de mercado indicam que a tendência atual está direcionada para o consumo de alimentos frescos e congelados em contraposição à tendência dos tempos que sucederam à Segunda Guerra Mundial, quando o consumo estava direcionado para aqueles produtos de alta durabilidade como os enlatados (MICROWAVE magic, 1988).

A participação cada vez maior da mulher no mercado de trabalho forçou a procura de sistemas mais rápidos e práticos de preparação de alimentos. Assim, várias pesquisas têm indicado uma relação direta entre o aumento do número de mulheres trabalhando fora do lar e a venda de fornos de microondas (MICROWAVE magic, 1988).

A Associação Brasileira da Indústria Elétrica e Eletrônica (ABINEE) registrou, em 1992, a venda de 306.000

fornos de microondas no Brasil. Comparando as vendas registradas no primeiro trimestre de 1992 com as do primeiro trimestre de 1993 verificou-se, neste último, um aumento de 47,8%. Por outro lado, o preço dos fornos foi diminuindo com o tempo. Segundo informações fornecidas por gerentes de lojas, o valor de uma unidade passou de aproximadamente U\$S 1.000 para aproximadamente U\$S 300 em pouco mais de cinco anos (FOLHA de SÃO PAULO, 1993).

Nos Estados Unidos estudos de mercado apontaram um aumento de 80 % nas vendas de fornos no período compreendido entre 1982 e 1990 (HOFFMAN, 1985). Outras pesquisas revelaram que a maioria dos possuidores de forno de microondas o utilizavam, em primeiro lugar, para aquecer pratos prontos, em segundo, para descongelar e, em terceiro, para cozinhar. Neste último caso constatou-se que era mais utilizado para a cocção de vegetais (51 %) do que para a cocção de carnes (26 %) (HARRISON, 1980). Esta tendência tem-se mantido com poucas variações até a atualidade (GEORGE, 1993). Também foi observado que era mais utilizado nas refeições noturnas (86 %) do que nas diurnas (69%) (BAKER, 1983). Atualmente estima-se que em 92% dos lares americanos há um forno de microondas e em 40% há dois (GIESE, 1992). Dados referentes a outros países indicam que há um forno de microondas em 85 % dos lares no Japão, 80 % na Austrália, 64 % na Inglaterra , 56 % na Alemanha e 55 % na França (GEORGE, 1993).

A American Can Company entrevistou donas de casa que utilizavam normalmente o forno de microondas. Registrou que 95 % delas valorizavam as características de rapidez, praticidade, facilidade de limpeza, economia de energia elétrica e facilidade para descongelar alimentos preparados enquanto foram apontados como fatores negativos por 5% das entrevistadas a falta de cor dourada, de formação de crosta superficial nos alimentos e alto custo para uma utilização limitada (HARRISON, 1980).

2. O B J E T I V O

Este trabalho teve por objetivo avaliar a sobrevivência de *Escherichia coli* e esporos de *Bacillus cereus* e de *Clostridium sporogenes* PA 3679 em sopa de vegetais após exposição às microondas geradas por forno doméstico.

3. *REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

O método de aquecimento por microondas tem a patente americana No.2 495 429 registrada em 8 de outubro de 1945 por P. L. Spencer. Nos Estados Unidos, os fornos de microondas domésticos começaram a ser comercializados em 1955 e vinte anos depois existiam trinta marcas diferentes no mercado (ANNIS, 1980).

No método convencional, os alimentos recebem calor por condução, convecção ou radiação. A forma de transferência da energia de uma certa fonte para o alimento determina o tipo de cozimento. No processo do assado, a transferência de calor se realiza em forma convectiva; na fritura, a transferência é condutiva e no grelhado, a transferência de calor se realiza em forma de radiação. No processo de grelhado a radiação infravermelha é diretamente convertida em aumento do movimento molecular no alimento.

As microondas também interagem com as moléculas do alimento, convertendo sua energia em aumento de temperatura enquanto o cozimento com microondas é mais rápido porque estas últimas penetram mais profundamente (BAKANOWSKI, 1984).

O FORNO DE MICRONDAS

O forno de microondas consta basicamente de:

- a) uma fonte de energia elétrica;
- b) um sistema de conversão de energia elétrica de 60 Hz em energia eletromagnética de 2450 MHz;
- c) um transmissor da energia gerada;
- d) um distribuidor da energia dentro do forno;
- e) uma cavidade dentro da qual se coloca o alimento
- f) estruturas que impedem o vazamento de microondas durante o funcionamento do forno;
- g) controles de segurança que permitem selecionar condições de aquecimento e também interromper o fluxo de energia em caso de necessidade.

Um desenho simplificado de um forno está ilustrado na Figura 1.

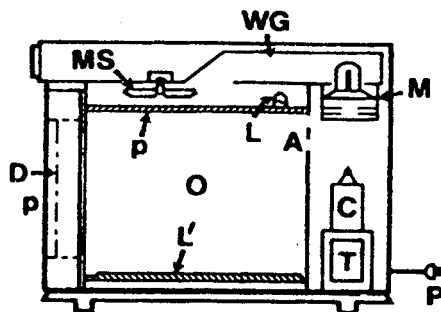


FIGURA 1. Desenho simplificado do forno de microondas

WG: guia de ondas
MS: antena
O : cavidade
p : cobertura plástica
D : porta
L': prato de vidro
A : sistema de resfriamento
T : transformador
C : capacitor
M : magnetron
L : lâmpada

As microondas geradas pelo magnetron são acopladas à cavidade do forno (O) pelo guia de ondas (WG). Uma antena giratória (MS) distribui as ondas ao longo da cavidade. Este sistema está protegido da projeção de partículas de gordura e do vapor por uma cobertura plástica (p) atrás da qual há uma lâmpada (L). Existe um sistema de resfriamento com ar para o magnetron (A). O prato de vidro (L') favorece a uniformidade de distribuição do calor. Quando se abre a porta por meio de chaves inativa-se o circuito T_C_M do magnetron, evitando, assim, a geração de microondas (VOSS, 1981).

O magnetron é constituído por um ânodo cilíndrico oco, no eixo do qual se encontra um cátodo aquecido por um filamento helicoidal de tório ou tungstênio. Transversalmente ao eixo do tubo há dois ímãs e no interior do ânodo há pequenos orifícios que são as cavidades ressonantes.

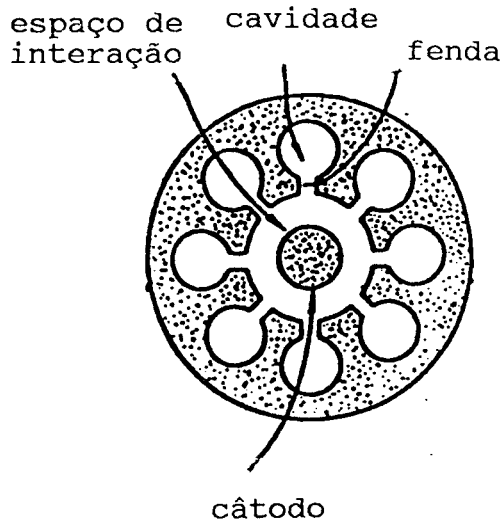


FIGURA 2 .Esquema do magnetron

Quando um campo elétrico é aplicado entre o cátodo e o ânodo, os elétrons que abandonam o cátodo são acelerados pelo campo elétrico e desviados da sua trajetória radial pelo campo magnético gerado pelo ímã. Os elétrons, em suas trajetórias circulares, quando passam frente às cavidades, induzem tensões que criam um campo elétrico oscilante. Este fenômeno também acaba alterando a trajetória dos elétrons por redução ou aumento da sua velocidade. A nuvem eletrônica interage com as cavidades ressonantes que passam a ser o suporte das oscilações eletromagnéticas. As dimensões das cavidades são calculadas de forma tal a obter a frequência de ressonância desejada . Entende-se por ressonância o comportamento do circuito que permanece oscilando em determinada frequência (THUERY, 1983; VALDEZ, 1992).

O guia de onda é um duto metálico que conduz as microondas em direção à cavidade. Como as suas paredes devem refletir as ondas eletromagnéticas, as suas dimensões são escolhidas em função do comprimento de onda utilizado. A largura deve ter um valor que seja múltiplo de meio comprimento de onda.

O forno geralmente tem a forma de um hexaedro, já que várias reflexões de ondas ocorrem com este formato. As paredes são feitas de metal como aço inox, alumínio, aço ou zinco, sendo que estes dois últimos devem estar revestidos por uma camada de acrílico ou esmalte epoxi. As paredes praticamente não se aquecem e, assim quando o forno é operado sem carga a energia que não é transformada em calor retorna à antena do oscilador, podendo ocasionar superaquecimento e diminuição da sua vida útil.

A porta do forno tem uma tela opaca às microondas mas permite visualizar o que está no interior dele. Por sua vez esta tela está coberta por um plástico ou vidro como medida de proteção ante a eventualidade de ocorrer inserção acidental de objetos durante o funcionamento. O sistema de fechamento da porta é o mecanismo mais importante no que diz respeito à segurança de operação, no desenho de um forno de microondas. Existem vários sistemas mas todos eles têm o objetivo de evitar o vazamento das radiações (ANNIS, 1980).

As microndas são radiações compreendidas entre os comprimentos de onda de 1mm a 1 m (frequências de 300 MHz à 300 GHz) do espectro eletromagnético, como ilustra a figura 3 (DECAREAU, 1985).

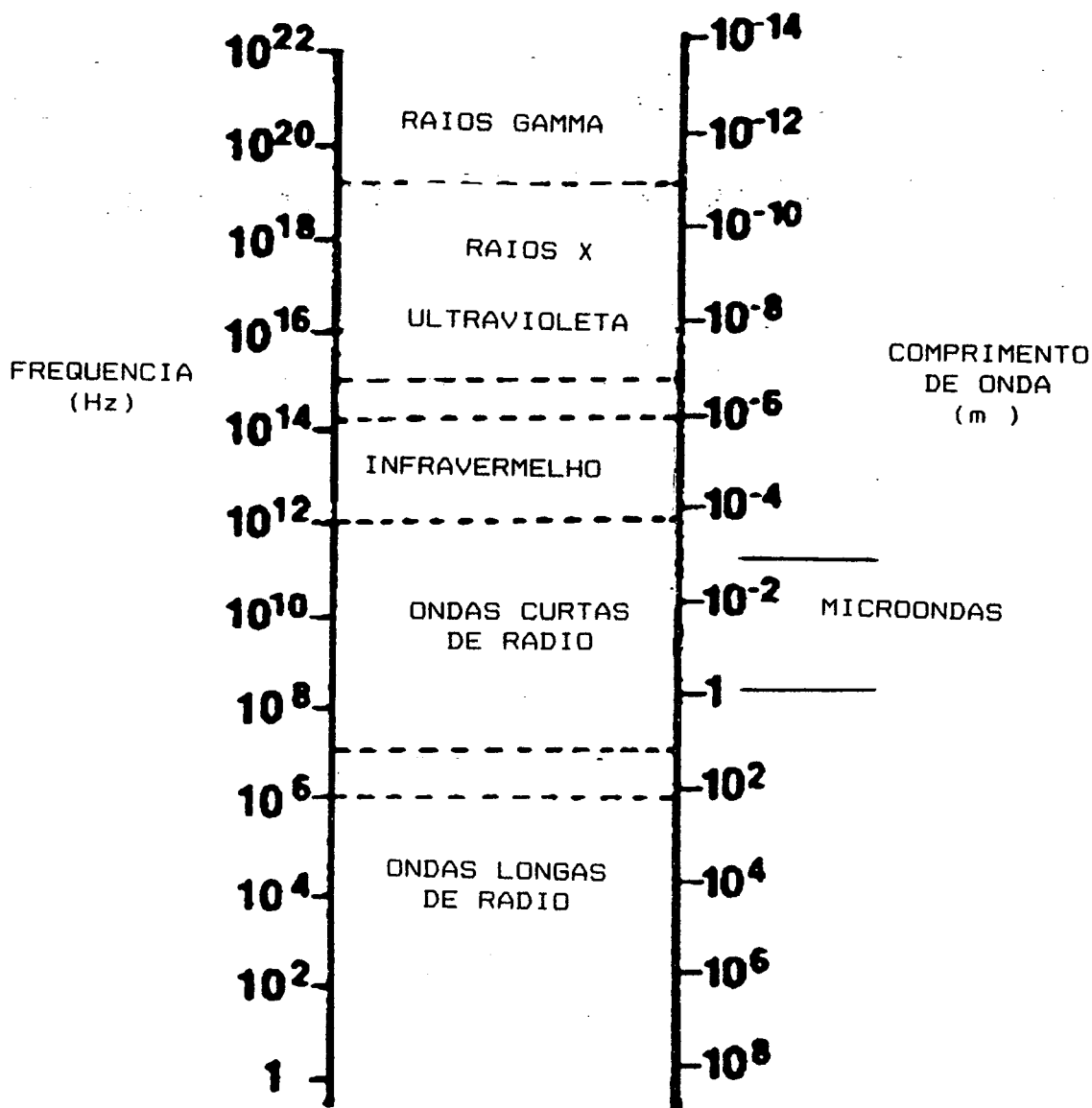


FIGURA 3. Espectro das radiações eletromagnéticas

Os estudos das ondas eletromagnéticas começaram no século XVIII com Euler, que foi o primeiro físico a formular hipóteses sobre a natureza ondulatória da luz. As pesquisas prosseguiram com os estudos de Ørsted (que descobriu a existência de campos magnéticos gerados por cargas elétricas em movimento), Biot, Savart, Ampère e Faraday. Em 1864 James Maxwell estabeleceu as equações que descreviam a interação dos campos elétrico e magnético. Observando que cargas elétricas vibráteis davam origem a campos elétricos não estacionários e que campos elétricos variáveis produziam campos magnéticos variáveis, chegou à conclusão de que uma onda elétrica se propagaria no espaço acompanhada de uma onda magnética com a velocidade da luz (Figura 4). Em 1886 Heinrich Hertz comprovou a existência de campos eletromagnéticos e construiu circuitos elétricos oscilatórios gerando ondas eletromagnéticas e medindo a sua velocidade. Em 1917 Tesla estabeleceu as bases da detecção eletromagnética e inventou um aparelho capaz de produzir ondas hertzianas. Com os trabalhos de Bohr, Plank e Einstein verificou-se que a luz e todas as outras radiações eram ondas eletromagnéticas e as manifestações que elas produziam na matéria estavam relacionadas com o comprimento de cada onda (THUERY, 1983 ; VALDEZ, 1992). A absorção de ondas da frequência correspondente à região do infravermelho se traduz numa modificação das vibrações das ligações moleculares; a da região do ultravioleta, em mudanças nos estados eletrônicos dos átomos e moléculas e os raios X e gama produzem ionização atômica.

Para gerar ondas eletromagnéticas de uma frequência dada, as cargas elétricas devem oscilar nessa frequência.

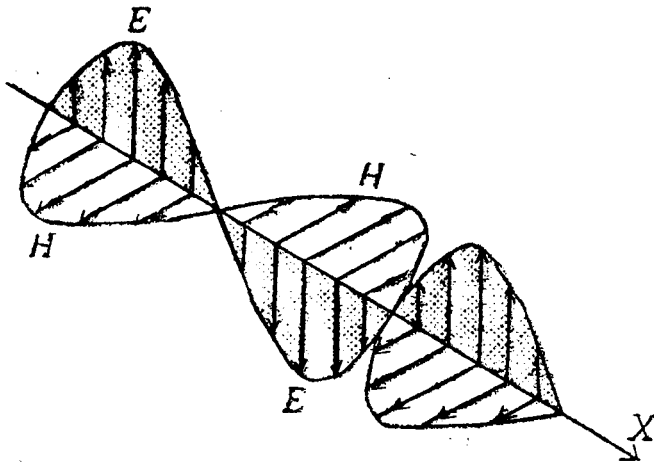


FIGURA 4. Variação dos campos elétricos, E, e magnéticos, H, na propagação da onda eletromagnética

A natureza quântica das ondas eletromagnéticas foi estabelecida por Max Planck e pode ser interpretada considerando que as ondas eletromagnéticas são emitidas ou absorvidas em quantidades discretas de energia denominadas fótons. A energia de cada fóton depende da frequência da radiação e está determinada pela equação de Planck

$$E : h.f$$

onde h : constante de Planck= $6.625 \cdot 10^{-34}$ Joule/seg

f : frequência da radiação (1/seg) (CURNUTE, 1980)

Como as frequências das microondas estão próximas as de rádio e podem interferir com as de radar, seu uso, nos

Estados Unidos da América do Norte, está regulamentado pela Federal Communications Commission (GIESE, 1992). O Regulamento Internacional de Radiocomunicações permite que algumas frequências sejam exclusivamente destinadas a aplicações industriais, científicas e médicas (I S M). As frequências usualmente adotadas são : 915 MHz \pm 25 MHz; 2450 MHz \pm 50 MHz; 5800 MHz \pm 75 MHz e 22125 MHz \pm 125 MHz sendo as de 915 MHz e 2450 MHz as utilizadas nos fornos domésticos e industriais. Nos fornos domésticos a mais utilizada é a segunda porque apresenta uma boa relação entre economia de energia e penetração da radiação (KHALIL & VILLOTA, 1988). A eficiência de conversão da energia elétrica fornecida em aquecimento do produto é de 80% a 90%, no caso de frequências de 896 MHz e de 40% a 48%, no caso de frequências de 2450 MHz (BURFOOT, 1988).

3.3 POLARIZAÇÃO DIELÉTRICA E AQUECIMENTO POR MICROONDAS

A polarização dielétrica é o efeito observado quando um material dielétrico é submetido a um campo elétrico estático ou alternado. Todos os materiais dielétricos têm em comum a propriedade de armazenar energia elétrica. Este fenômeno é possível devido ao deslocamento de cargas positivas e negativas que se opõem às forças de ligação atômicas ou moleculares. A fonte de energia é o campo elétrico aplicado e o mecanismo de deslocamento de cargas é

diferente segundo o tipo de material dielétrico e segundo a frequência do campo (DECAREAU, 1985).

A polarização dielétrica pode ser do tipo polarização por carga no espaço ou polarização por orientação bipolar.

a) Polarização por carga no espaço .

Corresponde a frequências baixas. Aparece quando o material contém elétrons livres mas sua movimentação está limitada por certas características do material. Este tipo de polarização encontra-se fundamentalmente em semi-condutores .

b) Polarização por orientação bipolar.

Ocorre numa faixa de frequências mais elevadas. Na ausência de campo elétrico, os dipolos se orientam de forma aleatória dando um momento dipolar total igual a zero. Quando se aplica um campo elétrico, os dipolos tendem a se orientar seguindo sua direção . Aparece, assim, um momento dipolar global. A este fenômeno de orientação se opõem vários tipos de ligações químicas responsáveis pela coesão do material. Estas ligações são as forças de van der Waals e as ligações por ponte de hidrogênio. As forças de van der Waals, por sua vez, devem-se a três efeitos diferentes :

- Forças de Keesom, devidas à atração entre moléculas que possuem momento dipolar permanente;

- Forças de Debye, devidas à atração entre uma molécula dipolar e outra não polar, na qual o campo elétrico da molécula cria um momento induzido;

c) Forças de London, que aparecem quando há atração entre moléculas apolares com dipolos instantâneos induzidos (THUERY, 1983)

As microondas são uma forma de energia que se manifesta como calor quando há interação com um material como resultado de um ou mais mecanismos de transferência de energia. Para que esta energia apareça como calor ela deve ser transferida por meio das vibrações de cada molécula junto às moléculas vizinhas. Esta redistribuição de energia acontece através das forças que os movimentos internos de uma molécula exercem sobre as moléculas vizinhas, denominado efeito de fricção molecular. Uma vez que a energia tenha sido transformada em energia térmica, a entropia do sistema aumenta de maneira irreversível.

O mecanismo de aquecimento com microondas pode ser denominado dissipação de energia num meio "lossy". A palavra "lossy" (derivada de "loss"= perda) se refere à absorção da radiação dentro do material dielétrico. Quando esse dielétrico é submetido a um campo eletromagnético alternado, parte da energia pode ser convertida em calor dentro do dielétrico. Isto é denominado como perda dielétrica (DECAREAU, 1985).

Uma propriedade básica dos dielétricos é o tempo de relaxamento ou seja o tempo que as partículas demoram para responder a uma mudança de campo ou para voltar a situação de desorientação. Neste processo estão as bases da perda

dielétrica e sua relação com os efeitos de dissipação de energia e deslocamentos que ocorrem sob mudanças no campo aplicado. O tempo de relaxamento depende da viscosidade e , portanto, também da temperatura.

As propriedades básicas de interesse no processo de aquecimento de alimentos foram estudadas por Hippel em 1954 e Mudgett em 1982 em termos de permissividade de materiais biológicos. A permissividade do material está relacionada com sua capacidade de acoplar a energia fornecida por um gerador de microondas (MUDGETT, 1986).

A constante dielétrica é uma medida da capacidade do material para armazenar energia elétrica e o fator de perda é uma medida da sua capacidade para dissipar a energia elétrica. A relação entre a perda dielétrica (K'') e a constante dielétrica (K') é definida como a tangente de perda:

$$\text{tangente de perda} = K''/K \quad (\text{MUDGETT, 1986})$$

O valor da tangente está relacionado com a capacidade que o material tem para permitir a penetração de um campo elétrico e transformar essa energia em calor.

Na tentativa de descrever o processo de aquecimento de alimentos em fornos de microondas em condições de estado não-estacionário têm-se encontrado semelhanças com os processos térmicos convencionais exceto no fato de que no alimento irradiado, o calor é gerado dentro dele e não transmitido desde o exterior. O aquecimento de alimentos

líquidos e semi sólidos pode ser descrito pelas equações clássicas de transferência de calor em estado não estacionário, porém incluindo um termo que se refere à geração interna de calor e que pode ser determinado em função da potência incidente e das propriedades características do alimento (MUDGETT, 1986). A equação proposta por Mudgett para a transferência de calor em uma direção é :

$$\frac{d^2T}{dx^2} + \frac{q'}{k} = \frac{1}{@} \frac{dT}{dt}$$

onde @ : difusividade térmica (cm*2/seg)

k : condutividade térmica (cal/seg cm oC)

T : temperatura (oC)

t : tempo (segundos)

q' : velocidade de geração de calor interno
(cal/seg cm*3)

x : distância (cm)

3.4 PARÂMETROS QUE AFETAM O AQUECIMENTO DE ALIMENTOS POR MICROONDAS

Os parâmetros que afetam o aquecimento de alimentos por microondas são: frequência, potência das microondas, massa, conteúdo de umidade, densidade, temperatura, geometria, condutividade e calor específico do alimento. A frequência e a intensidade do campo elétrico são propriedades do forno e o fator de perda dielétrica, densidade e calor específico são propriedades do material a

ser aquecido, em consequência existe uma interrelação entre material e equipamento. (SCHIFFMAN, 1986)

3.4.1 Frequência das microondas

A absorção de microondas por um material é proporcional à frequência. SCHIFFMANN (1986) utiliza a equação a seguir para descrever esta relação.

$$P_v = k f K'' E^2$$

onde P_v : potência por unidade de volume do material

k : constante para determinar unidades de potência e volume

f : frequência das microondas (Hz)

K'' : perda dielétrica

E : intensidade do campo elétrico (volt/cm)

O mesmo autor define a magnitude da profundidade de penetração como aquela na qual o nível de potência tem diminuído em 50 % do seu valor inicial ; outros autores, como OHLSSON (1983), consideram que é a profundidade na qual 67 % da potência transmitida tem sido absorvida.

$$D_{50} = \frac{0,347 \cdot \lambda \sqrt{k''}}{k'' \pi}$$

onde λ = comprimento de onda

O inverso da profundidade de penetração é definido como fator de atenuação. A profundidade de penetração a 915 MHz é maior que a 2450 MHz (Tabela 1).

TABELA 1 Penetração da energia das microondas em
vários materiais *

Material	Temperatura (°F)	Penetração (cm)	
		915 MHz	2450 MHz
Gelo	10,4	1600	780
Água	34,7	4,1	0,6
	77,0	9,0	1,3
	131,0	13,8	2,0
	203,0	29,5	4,8
Bife magro	40,0	1,7	1,8
	0,0	9,8	7,6
	- 60,0	70,0	46,0

* Decareau, 1965

Em geral a espessura máxima do produto deve estar limitada à profundidade de penetração para obter um aquecimento mais uniforme.

3.4.2 Potência das microondas

Quanto maior é a potência mais rápido resulta o aquecimento. Uma consequência do aquecimento rápido é a falta de uniformidade na distribuição da temperatura. Isto acontece porque o curto tempo do processo faz menos efetiva a transferência de calor por condução desde os pontos mais quentes aos mais frios (OHLSSON, 1983)

$$Q = m \text{ cp } \Delta T \quad (1)$$

onde Q = quantidade de calor (cal)

m = massa (g)

cp = calor específico (cal/g °C)

ΔT = temperatura final-temperatura inicial (°C)

$$Q = \text{potência} \times \text{tempo} \quad (2) \quad \text{de (1) e (2)}$$

resulta (3)

$$\text{tempo de aquecimento} = m \text{ cp } \Delta T / \text{potência} \quad (3)$$

3.4.3 Massa

Existe uma relação direta entre a massa e a energia aplicada para atingir determinada temperatura como se observa na Figura 5

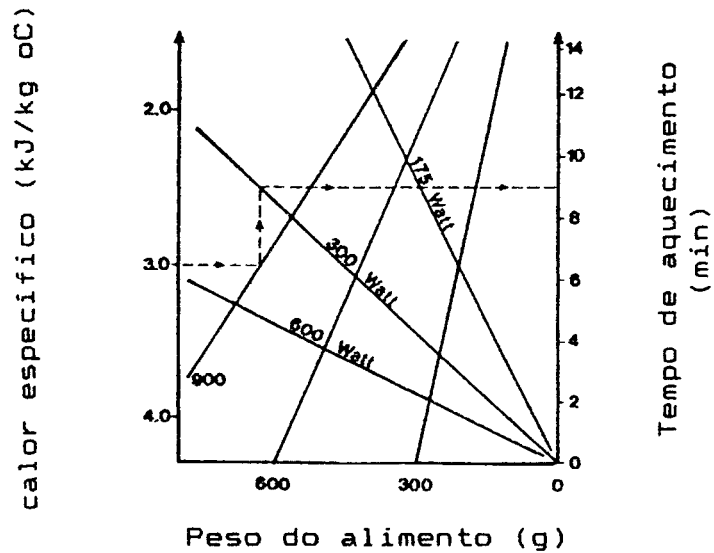


FIGURA 5. Relação aproximada entre calor específico e peso de um alimento com a potência de saída do forno e o tempo de aquecimento. (OHLSSON, 1983)

3.4.4 Conteúdo de umidade

A água é o componente de maior influência no aquecimento de um alimento no forno de microondas. Geralmente quanto maior a quantidade de água presente maior é o fator de perda dielétrica e, em consequência, mais efetivo é o aquecimento. Quando a água está ligada não é afetada pelo campo magnético oscilatório, mas quando é ultrapassado um certo valor crítico, o fator de perda aumenta e o produto pode ser aquecido por ação das microondas. A perda dielétrica aumenta proporcionalmente com a umidade. Em sistemas com componentes de constantes dielétricas diferentes, a constante dielétrica do sistema apresenta um valor intermediário com relação aos valores individuais (SCHIFFMAN, 1986).

3.4.5 Densidade

A densidade de um produto afeta a constante dielétrica. A constante dielétrica do ar é igual a 1 e o ar é transparente às microondas, por conseguinte, a presença de ar num alimento irá reduzir o valor da sua constante dielétrica. Generalizando, quando a densidade de um alimento aumenta, também aumenta a sua constante dielétrica. Em materiais porosos como o pão, devido à inclusão de ar, a transferência de calor é lenta. (SCHIFFMAN, 1986)

3.4.6 Temperatura

A perda dielétrica pode aumentar ou diminuir com a temperatura dependendo do material (Tabela 2).

TABELA 2. Valor da constante dielétrica e do fator de perda dielétrica da batata crua em diferentes temperaturas a 2450 MHz. *

Temperatura (oC)	Constante dielétrica (K')	Fator de perda (K'')
0	67	21
20	64	15
40	59	13
60	54	14
80	49	17
100	45	18

* Mudgett, 1986

Como a temperatura e o nível de umidade variam durante o aquecimento, eles podem ter um efeito importante nos valores da constante dielétrica, do fator de perda dielétrica e da tangente de perda. A profundidade de penetração da energia é diferente em alimentos que se encontram à temperatura de congelamento ou estão descongelados. O congelamento tem um efeito muito grande no aquecimento por microondas porque as propriedades dielétricas da água e do gelo são muito diferentes (Tabela 3).

TABELA 3 Propriedades dielétricas da água e do gelo a 2450 MHz *

Meio	Cte. dielétrica	tg perda	Fator perda
Água (25 oC)	78	0,16	12,48
Gelo	3,2	0,0009	0,0029

* Schiffmann, 1986

A água que se encontra em forma de gelo absorve pouca energia (a absorção de energia pela água que se encontra em forma de gelo é muito baixa). A água que não está congelada forma soluções concentradas de solutos presentes nos alimentos como sais e açúcares. Estas soluções absorvem as microondas e se aquecem muito mais que o seu contorno, produzindo-se, então, o efeito denominado de "runaway heating" ou avalanche térmica, que consiste no aquecimento preferencial de alguns pontos da massa do alimento. Resulta, assim, um alimento com partes aquecidas e partes congeladas.

A temperatura inicial do produto a ser aquecido deve ser conhecida para poder ajustar as condições de operação do forno de forma tal a obter um aquecimento uniforme.

3.4.7 Tamanho e forma do alimento

Há uma série de efeitos particulares no aquecimento por microondas. Estudos experimentais e teóricos têm demonstrado que o alimento, com sua geometria e composição, é o fator mais importante na distribuição da temperatura (HARRISON, 1980; OHLSSON, 1983; DECAREAU, 1985).

Se o tamanho do alimento é maior que a profundidade de penetração, o aquecimento não resulta uniforme; por isso, dentro do possível, o tamanho do alimento deve estar relacionado com o comprimento da onda.

O formato regular favorece a uniformidade do aquecimento. Quando as microondas atravessam uma superfície curva, como a de um alimento de forma esférica ou cilíndrica, por sucessivas reflexões se concentram no seu interior, podendo resultar em um alimento frio por fora e quente por dentro. As formas irregulares resultam em um aquecimento também irregular como o observado em cantos e esquinas de peças aquecidas no forno de microondas.

Supondo um modelo esférico para o alimento é possível estabelecer que a energia transmitida ao produto desde uma superfície refletora seja ligeiramente atenuada dentro do material, atinja a superfície oposta e torne a se refletir até a superfície de incidência. Isto pode produzir ondas estacionárias dentro do produto causadas por interação entre as ondas transmitidas e refletidas interiormente;

originam-se, assim, zonas de aquecimento heterogêneo denominadas pontos quentes e pontos frios . Estes fenômenos também acontecem na interfase de alimentos com componentes que apresentam valores de absorção de microondas diferentes como carne e gordura. Os elementos gordurosos absorvem menos energia que a água mas os valores de calor específico são menores, então aquecem mais rapidamente. (Exemplo: o calor específico da água é 4,2 kJ/kg oC e o do óleo é 2,0 kJ/kg oC) (OHLSSON, 1983). A presença de pontos quentes e frios num alimento tem como conseqüências mais importantes a palatabilidade não aceitável do produto e a destruição desuniforme dos microrganismos contaminantes . A presença de ossos em pedaços de carne afeta a uniformidade do aquecimento com microondas. O cálcio e outros minerais constituintes dos ossos causam reflexão das ondas que penetram no músculo; assim o aquecimento resulta maior na região próxima da superfície do osso que em outras partes da carne.

3.4.8 Condutividade elétrica

A condutividade descreve a capacidade de um material para conduzir corrente elétrica originada por deslocamento de elétrons e íons. A adição de sal, por exemplo, afeta o aquecimento por microondas. Em alguns casos pode aumentar a velocidade de aquecimento, mas a sua presença afeta a profundidade de penetração, podendo ocasionar um aquecimento mais intenso perto da superfície e deixando o interior frio.

DEHNE (1991) estudou a influência do conteúdo de sal na eficiência do aquecimento com microondas. Utilizando purê de batatas instantâneo observou que a profundidade de penetração das ondas diminuía com o aumento do conteúdo de sal no purê. Nas camadas externas do alimento, a temperatura era consideravelmente maior que nas internas e assim este efeito não permitiria eliminar totalmente os microrganismos contaminantes presentes.

A incorporação de diversos aditivos se reflete em variações no aquecimento com microondas. DEALLER (1992) observou que a incorporação de quantidades elevadas de sais como cloreto de potássio, cloreto de amônia, glutamato monossódico, citrato de sódio, nitrito de sódio ou nitrato de potássio ocasionou um aumento de temperatura menor do que quando se adicionaram sacarose, glucose, aspartato, glutamina ou então quando não foram adicionados sais. O fato foi interpretado como uma diminuição da penetração das microondas no alimento. O aquecimento inadequado no centro do alimento poderia ser causado por indução de fluxo elétrico (iônico) na sua superfície. O efeito mínimo dos açúcares seria indicativo de que a sua adição não reduz o aumento de temperatura na parte central dos alimentos aquecidos. As moléculas ionizadas que formam pontes de hidrogênio, como ácido aspártico e glutamina, atuam de forma semelhante àquelas que não estão ionizadas. Este efeito poderia explicar por que alimentos prontos preparados comercialmente, quando aquecidos no forno de microondas chegam a ferver na superfície, estando frios no interior. O

trabalho demonstrou que a penetração das microondas se viu reduzida pela presença de grandes quantidades de produtos ionizados.

BUFFER & STANFORD, citados por GEORGE (1993) representaram graficamente o aumento da profundidade de penetração das microndas em uma solução salina como uma relação inversa à concentração de NaCl (Figura 6).

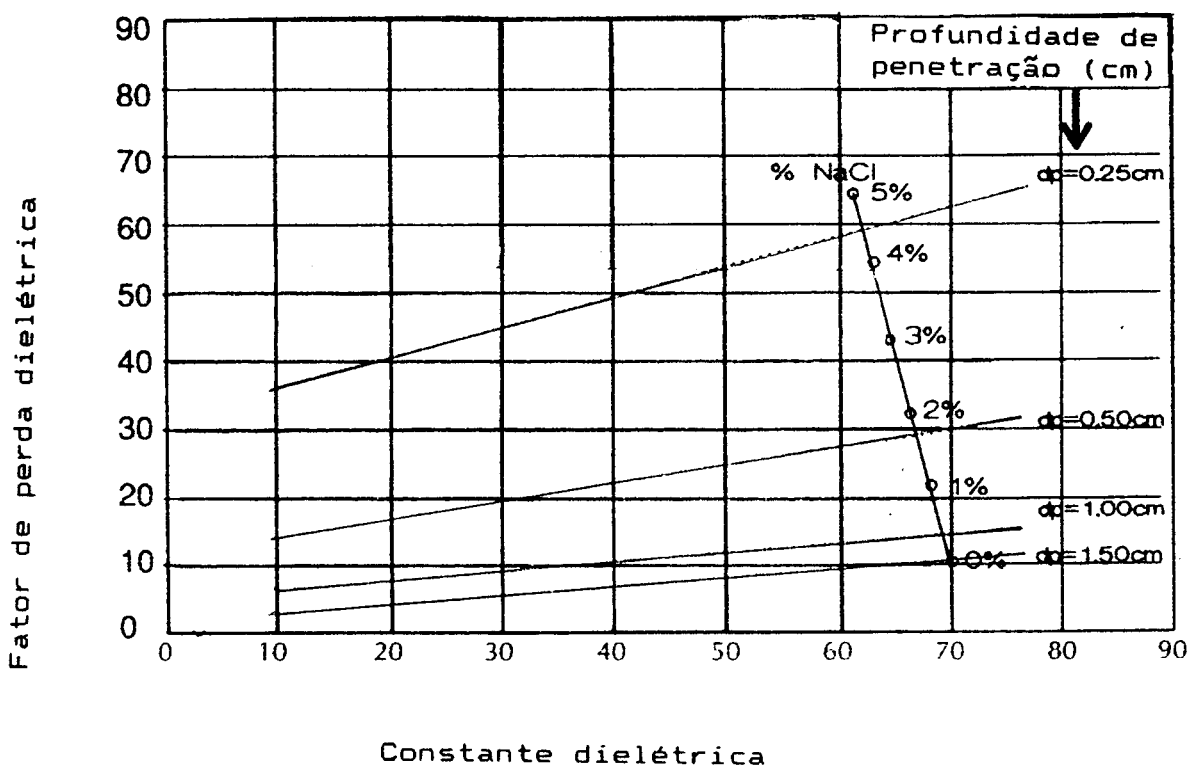


FIGURA 6 Relação entre constante dielétrica, fator de perda e profundidade de penetração para uma solução salina com diferentes concentrações de NaCl a 25 °C e 2450 MHz.

HEDDLESON et alii (1993) testaram a sobrevivência de *Salmonella* em soluções de diversos sais. Sendo a temperatura média final da solução suficiente para eliminar o microrganismo, a presença de sal poderia dar origem a gradientes de temperatura de importância tal que não mais seria possível tal destruição em alguns pontos próximos da superfície. Compararam os perfís de temperatura obtidos com soluções de NaCl, KCl, CaCl₂ e MgCl₂ e observaram que as diferenças de temperatura entre a superfície e o centro da massa eram maiores nas soluções de NaCl e menores nas soluções de MgCl₂. Coincidentemente, o grau de destruição de *Salmonella* detectado em ordem crescente foi NaCl, KCl, CaCl₂ e MgCl₂.

3.4.9 Calor específico

O calor específico de um alimento é a relação entre a quantidade de calor necessária para elevar em 1 oC a temperatura de uma massa de alimento e a requerida para elevar a temperatura de uma massa igual de água também em 1 oC. Os diferentes valores de calor específico dos componentes de um alimento preparado são de grande utilidade quando se deseja estabelecer um determinado padrão de aquecimento. Como o calor específico está relacionado com o conteúdo de umidade de um alimento, tem considerável influência no processo com microondas, já que altera a velocidade de aquecimento por microondas em diferentes materiais. Por causa desta propriedade, um material de perda

dielétrica baixa pode ser aquecido corretamente quando submetido à ação das microondas. SCHIFFMANN (1986) cita como exemplo interessante uma experiência realizada com rosquinhas recheadas com geléia e congeladas. Ao aquecer as rosquinhas no forno de microondas, a geléia fervia e a rosquinha, ainda congelada, estourava. O problema foi solucionado mudando a composição da geléia; diminuiu-se a quantidade de sólidos, aumentando, assim, o valor do calor específico. Desta maneira, os dois componentes da rosquinha adquiriram uma velocidade de aquecimento mais próxima, resultando num alimento com temperatura uniforme.

3.5 DISTRIBUIÇÃO DA TEMPERATURA

Quando as microondas atravessam a matéria vão sendo atenuadas desde a camada externa até o interior; também o campo elétrico decresce exponencialmente até o centro do produto. O incremento na profundidade de penetração é inversamente proporcional à frequência e ao fator de perda dielétrica. Isto significa que, em altas frequências, quanto maior o fator de perda, mais importante é a atenuação do campo nas camadas externas e mais fraco é o campo no centro do alimento. Quanto maior é a quantidade de energia absorvida pelo produto, menor é a profundidade de penetração (ROSENBERG, 1991). A distribuição da temperatura no forno de microondas é diferente da observada no processo convencional. Neste último, as temperaturas mais elevadas ocorrem na superfície e as mais baixas, no centro do

alimento. A temperatura da superfície do alimento é freqüentemente menor que a das camadas interiores devido à dissipação de calor (DECAREAU, 1985). O ar que se encontra na cavidade do forno de microondas é frio e produz a diminuição da temperatura superficial dos alimentos processados. Como resultado, a temperatura máxima se encontra nas camadas intermediárias próximas da superfície do alimento, deixando a camada externa mais fria e úmida que quando o aquecimento é feito num forno convencional (BAKANOWSKI & ZOLLER, 1984).

3.6 EFEITOS DAS MICROONDAS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Os efeitos destas radiações em sistemas biológicos podem ser térmicos ou não-térmicos.

Os efeitos térmicos acontecem quando a energia das microondas é transformada em calor. Como a absorção da energia das microondas depende da constante dielétrica e este parâmetro tem valor elevado para a água, os sistemas orgânicos com alto conteúdo aquoso são os mais afetados pelas microondas.

Os efeitos não-térmicos ocorrem quando uniões moleculares são submetidas a tensões. Efeitos não-térmicos podem incluir arranjos em macromoléculas e estruturas subcelulares suficientemente importantes para causar

perturbações metabólicas e funcionais a nível celular. Como exemplo de efeitos biológicos causados pelas microondas podem-se mencionar : formação de catarata devido à denaturação de proteínas do cristalino; alterações no sistema nervoso central, como inibição de reflexos condicionados e perturbações genéticas, como aberração cromossômica (LAMBERT,1980).

3.6.1 Fatores que influenciam os efeitos das microondas sobre os microrganismos presentes nos alimentos

O efeito das microondas sobre microrganismos está influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos e por fatores relativos aos microrganismos presentes.

3.6.1.1 Fatores intrínsecos

Os fatores intrínsecos são aqueles inerentes à própria natureza do alimento, tais como umidade, composição química, tamanho e forma do alimento. Entre eles a umidade tem importância relevante.

VELA & WU (1979), estudando o mecanismo de ação das microondas sobre bactérias, fungos e bacteriófagos, observaram que o efeito letal era devido à presença de água, já que as células de levedura liofilizadas sobreviveram em estado desidratado quando submetidas às radiações. Em

ausência de água, a energia das microondas não foi absorvida pelo material biológico. Concluíram que a destruição dos microrganismos só se devia à ação térmica, resultando improvável a existência de efeito não-térmico. ISHITAMI et alii (1982) estudaram a influência da radiação com microondas em esporos de *Aspergillus niger*, *Aspergillus restrictus*, *Paecilomyces varioti* e *Cladosporium herbarum*. As amostras foram tratadas por irradiação de duas maneiras: em suspensão aquosa e adsorvidas em vidro. Em paralelo foram submetidas a tratamento convencional usando água quente. Após o tratamento com microondas, as amostras adsorvidas em vidro não apresentaram sinais de injúria e as amostras em suspensão aquosa só apresentaram o efeito letal devido ao calor.

PAGE & MARTIN (1985) irradiaram filmes inoculados com *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e esporos de *Bacillus subtilis* em fornos de microondas a 2450 MHz. Depois de 10 minutos observaram diminuição nas populações de leveduras e células vegetativas mas não de esporos. O aquecimento dos mesmos organismos, mas em solução salina, resultou numa diminuição da população de microrganismos evidentemente mais acentuada. Os autores também assinalaram a importância de uma correta higiene das paredes do forno, especialmente nos lugares onde ele é utilizado para serviço ao público e onde o manuseio é freqüente.

3.6.1.2 Fatores extrínsecos

São os fatores externos ao alimento como temperatura, umidade relativa, frequência e intensidade da radiação aplicada, tempo de exposição à radiação e posição do alimento no campo magnético.

A influência da temperatura interna final de alimentos preparados em forno de microondas tem sido estudada visando estabelecer critérios de qualidade microbiológica.

CRAVEN & LILLARD (1974) verificaram que o reaquecimento de frangos pré-cozidos em forno de microondas até uma temperatura de 84 oC não eliminou as células vegetativas mas estimulou a germinação de esporos permanecendo, assim, o desenvolvimento de *Clostridium perfringens* em amostras previamente inoculadas.

STRONG & RIPP, citados por BLANCO (1974) aqueceram carne de peru inoculada com *C. perfringens* até 74 oC e 85 oC encontrando um número maior de microrganismos viáveis nas amostras que atingiram esta última temperatura, provavelmente por ativação dos esporos bacterianos.

BALDWIN et alii (1981) aqueceram carne de carpa inoculada superficialmente com *S.typhimurium* até ser atingida uma temperatura interna de 55 oC durante 195 segundos, mas só conseguiram eliminar a bactéria após tratamento durante 390 segundos e temperatura superior a 74 oC.

LINDSAY (1986) recomendou aquecer carne de frango até uma temperatura interna de 85 oC para garantir ausência de *Salmonella typhimurium*.

BRUNCH et alii (1977) observaram que o aquecimento até 80 oC de carne de soja pré-cozida não foi suficiente para eliminar a toxina estafilocócica eventualmente presente, devido à sua estabilidade frente a temperaturas elevadas.

SAWYER et alii (1983) estudaram a qualidade microbiológica de alimentos aquecidos por condução, convecção e microondas, comprovando que as bactérias não resistiam a condições de temperatura interna final superior a 74 oC. Quando é aplicado o sistema Análise de Risco e Controle de Pontos Críticos (HACCP), com a finalidade de conservar a qualidade microbiológica, sensorial e nutricional de um alimento recomenda-se que a sua temperatura interna final, após reaquecimento, seja superior a 74 oC mas inferior a 77 oC. Recomenda-se também a supervisão cuidadosa no aquecimento com microondas já que o tempo necessário para atingir 74 oC em todos os pontos do alimento varia segundo a sua constituição.

HUANG et alii (1993) aqueceram amostras de peixe inoculadas superficialmente com *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*. O aquecimento até temperaturas de 55 oC a 60 oC no interior das amostras foi suficiente para eliminar *A. hydrophila*, mas para eliminar a contaminação por *L. monocytogenes* foi necessário atingir uma temperatura

mínima de 70 oC no interior do peixe ou temperaturas variando entre 80 oC e 99 oC na superfície.

Uma pesquisa feita nos Estados Unidos em 1981 entre usuários de fornos de microondas revelou que um número muito baixo deles utilizava freqüentemente o termômetro do forno. Com base nestes dados CARLIN et alii (1982), trabalhando com carne de porco contaminada com larvas de *Trichinella spiralis*, conduziram uma pesquisa que auxiliasse no uso correto do forno. Utilizando aparelhos de diversas procedências observaram que cada um deles possuía seu próprio padrão de aquecimento e que este se modificava conforme o aumento da temperatura do alimento. Este fato os impediu de fornecer uma recomendação geral confiável para cozimento de carne de porco.

WATANABE & TAPE (1969) chamaram a atenção sobre a importância da correta utilização do forno de microondas e do tempo de espera. Salsichas inoculadas com bactérias coliformes, aquecidas a 2450 MHz durante 20 segundos e aquecidas uma segunda vez durante 18 segundos, após um tempo de espera de 2 minutos, atingiram uma temperatura interna final de 60 oC e apresentaram uma redução de dois ciclos logarítmicos na contagem de microrganismos. Outro lote aquecido durante 48 segundos atingiu uma temperatura interna final de 56 oC e apresentou uma redução de um ciclo logarítmico na contagem das bactérias.

FAHKOURI et alii (1993) detectaram uma diferença de temperatura de 70 oC entre as esquinas e o centro de um pastel congelado e aquecido segundo instruções da embalagem. Após 5 minutos de tempo de espera a temperatura no centro do alimento aumentou em aproximadamente 10 oC e nas esquinas diminuiu também aproximadamente 10 oC.

3.6.1.3 Fatores relativos aos microrganismos presentes

Estes fatores referem-se à composição química da célula microbiana, tipo de microrganismo (esporo ou célula vegetativa), fase de desenvolvimento, grau de desidratação e quantidade de células presentes (FUNG & CUNNINGHAM, 1980).

3.6.2 Mecanismo do efeito das microondas na inativação dos microrganismos

Existe uma divergência de opiniões a respeito do mecanismo pelo qual os microrganismos são destruídos. Um grupo de pesquisadores tem indicado que a destruição só se deviu a um efeito térmico enquanto outro grupo tem confirmado a existência de um efeito adicional das radiações. Um terceiro grupo obteve resultados variados, alguns atribuídos a efeitos das microondas "per se" e outros decorrentes de injúria ocasionada por tratamentos a temperaturas subletais. Com o objetivo de estabelecer o mecanismo correto devem ser incrementadas pesquisas na área.

Um dos primeiros trabalhos realizados para estudar a influência das microondas sobre microrganismos foi conduzido por BROWN em 1954, que constatou que a simples aplicação de campos de radiofrequências de até 600 megaciclos, independentemente do efeito térmico, era insuficiente para destruir bactérias em suspensão aquosa. GOLDBLITH & WANG (1967) realizaram vários estudos tentando verificar se existia outro fator, além do térmico, que fosse o responsável pela destruição dos microrganismos submetidos à ação das microondas. Utilizou como material biológico *E. coli* e esporos de *B. subtilis* em soluções tamponadas de fosfato. Submeteu as células a aquecimento convencional e aquecimento com microondas de frequência de 2450 MHz e chegou à conclusão de que a inativação observada deveu-se somente ao efeito térmico. Para confirmá-lo adicionou gelo aos recipientes que continham as suspensões microbianas de forma tal a permitir um tempo total maior de exposição às radiações.

Dois anos antes OLSEN tinha publicado um trabalho com o resultado das suas pesquisas sobre os efeitos das microondas. Comparou o tempo de desenvolvimento de *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigrificans* e *Penicillium* s.p. inoculados em pão na densidade de 10×8 microrganismos/g e submetidos a três tratamentos diferentes: conservados com propionato de sódio 1 %, irradiados com microondas e uma amostra sem nenhum tratamento que serviria como testemunha. O lote submetido a 2450 MHz por um período compreendido entre 5 e 10 minutos atingiu temperaturas entre 62,8 oC e

65,6 oC, apresentou uma drástica diminuição de fungos e vida de prateleira mais prolongada quando comparado com os outros dois lotes. O autor afirmou ter conseguido inativação celular após um tratamento com uma relação tempo-temperatura inferior à letal.

LECHOVICH et alii (1969) realizaram experiências tentando elucidar qual teoria seria mais acertada, se a de Goldblith & Wang ou a de Olsen. Com este objetivo submeteram suspensões de *S. cerevisiae* e de *Streptococcus faecalis* à ação de radiações de 2450 MHz num forno de microondas modificado. As amostras foram refrigeradas com querosene a fim de evitar que atingissem temperaturas muito elevadas. Em paralelo aqueceu em banho de água alíquotas das amostras até elas atingirem a mesma temperatura que a registrada quando utilizado o forno de microondas (52 oC). Comparando os resultados dos dois métodos concluiu que, aparentemente, as microondas não produziram nenhum efeito letal adicional ao simples aumento de temperatura.

CULKIN & FUNG (1975) sugeriram a existência de um outro fator letal, além do térmico, no tratamento com microondas. Trabalharam com *E. coli* e *S. typhimurium* inoculadas em sopas de vegetais. Construíram um cilindro de vidro com cinco bocas laterais de forma tal que pudessem colher amostras do alimento em diferentes camadas e registrar as diferentes temperaturas atingidas. Dessa maneira poderiam estabelecer a relação entre a sobrevivência dos microrganismos e a temperatura de cada camada do alimento. Registraram as temperaturas mais elevadas nas

camadas intermédias, as temperaturas intermédias na parte inferior do recipiente e a temperatura mais baixa, na camada superior. A letalidade foi maior na camada superior, intermédia na região central e menor na região inferior do cilindro. Segundo os autores, a menor sobrevivência na zona de menor temperatura sugeriu a existência de um fator letal que não poderia ser explicado somente em função da temperatura e que afetaria a estrutura celular dos organismos.

DAHL et alii (1981) formularam a hipótese de que, aparentemente, as microondas exerceriam algumas modificações nos sistemas biológicos que não poderiam ser explicadas exclusivamente como devidas à injúria térmica. DREYFUSS & CHIPLEY (1980) estudaram os efeitos letais da radiação das ondas de frequência de 2450 MHz em células de *S. aureus* e os compararam com os ocasionados por tratamento com água quente. Seguindo a mesma linha que os pesquisadores citados anteriormente estes últimos sugeriram que a forma na qual as microondas afetavam os microrganismos não poderia ser explicada como devida a um efeito exclusivamente térmico.

CHIPLEY (1980) , trabalhando com esporos de *Bacillus stearothermophilus* e de *Aspergillus niger* irradiados a 2450 MHz em ausência de água, afirmou que a sobrevivência não foi muito diferente da observada quando o aquecimento foi realizado na forma convencional. Concluiu que a causa da morte celular era a inativação térmica, já que a temperaturas inferiores à letal não foi observada inativação

e que a irradiação "per se" não danificou os componentes celulares.

WHITE & HOBBS, citados por FUNG & CUNNINGHAM (1980) usaram métodos convencionais e com microondas para aquecer um alimento contaminado e concluíram que ambos os métodos foram efetivos para eliminar células vegetativas mas não para esporos. Os próprios autores do citado artigo verificaram que o tratamento com microondas não eliminava completamente os microrganismos presentes em um alimento quando estes se encontravam em número elevado. O processo se tornava eficiente quando combinado com uma fonte convencional de calor ou quando o alimento estava coberto com um material isolante, como um filme plástico, para evitar dissipação do calor. Os resultados mostraram três pontos importantes:

- comparando o aquecimento por microondas com o convencional o primeiro esteve mais influenciado pela natureza do alimento do que o segundo devido ao mecanismo de geração de calor;

- os tempos recomendados pelos fabricantes dos fornos podiam não ser os adequados para a destruição de altos níveis de microrganismos em certos tipos de alimentos;

- as microondas exerceram diferente efeito letal nas espécies bacterianas. Os esporos foram mais resistentes que as células vegetativas e diferentes espécies apresentaram resistência diferente à irradiação.

KHALIL & VILLOTA (1988) estudaram os efeitos letais das microondas sobre o *S. aureus* e formularam várias

hipóteses: o maior poder letal das microondas residiu na sua capacidade de distribuir instantaneamente a energia térmica aos componentes celulares sensíveis ao calor. A energia das microondas podia quebrar a membrana celular e estruturas subcelulares liberando lipídios que se converteriam em substratos de reações oxidativas e/ ou enzimáticas. Também os componentes lipídicos da membrana celular poderiam sofrer um sobreaquecimento durante a irradiação e causar um dano ainda maior. O dano sofrido pela membrana se evidenciou pela presença de ácidos, peptídios, íons e lipídios da membrana no meio em que se desenvolveram as células. Foi observado o efeito da irradiação na diminuição da capacidade metabólica e na inibição da síntese de enterotoxina. No meio também foi detectada a presença de material liberado pela célula injuriada, que apresentou reação positiva com a ninidrina como purinas, pirimidinas e ácido nucléico.

3.6.2.1 Efeitos subletais

O efeito subletal das radiações foi objeto de estudo de vários pesquisadores. DREYFUSS & CHIPLEY (1980) compararam os efeitos subletais das microondas a 2450 MHz com os ocasionados pelo tratamento com água aquecida até 46 oC em células de *S. aureus* e sugeriram que a injúria ocasionada pelas microndas não poderia ser explicada apenas em função da temperatura. Foi observado o comportamento da atividade enzimática sob ação das microondas. Os resultados constam na Tabela a seguir.

TABELA 4 Influência do aquecimento convencional e por microondas sobre a atividade de algumas enzimas

ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	
	Forno de microondas	Forno convencional
Malato desidrogenase (alfa) Cetoglutarato desidrogenase	Aumento	Aumento menor
Citocromo oxidase	Aumento	Diminuição
ATP-ase citoplasma	Aumento	- - -
ATP-ase membrana	Sem variação	Aumento
Fosfatase alcalina	Sem variação	- - -
Lactato desidrogenase	Sem variação	Sem variação
Glucose 6-P desidrogenase	Diminuição	Diminuição
Termonuclease	Aumento	Aumento

Quando as enzimas irradiadas foram de procedência não microbiana não foi observada nenhuma alteração nas respectivas atividades. Este fato levou a formular a hipótese da existência de um efeito letal das microondas de caráter não-térmico.

KHALIL & VILLOTA (1989) examinaram a natureza da injúria subletal em *S. aureus*. Encontraram que células aquecidas por microondas sofreram uma injúria maior que as aquecidas em forma convencional. Após aquecimento de 30 minutos até uma temperatura de 50 oC, recuperaram um número menor de células quando o tratamento foi realizado com microondas. Também foi menor o número de células capazes de produzir enterotoxina, quando comparadas com as submetidas a

tratamento convencional. Concluíram que para exercer dita capacidade de injúria adicional era necessário alcançar uma temperatura de, no mínimo, 40 oC. CRAVEN & LILLARD (1974) estudaram o grau de recuperação de *C. perfringens* inoculado em frangos que foram aquecidos em fornos de microondas até temperaturas compreendidas na faixa de 49 oC a 84 oC e constataram que a germinação de esporos foi estimulada.

Outros pesquisadores observaram que o aquecimento com microondas apresentou uma taxa de destruição microbiana superior à registrada quando o aquecimento foi realizado mediante um sistema convencional (KHALIL & VILLOTA; DREYFUSS & CHIPLEY; OHLSSON; OLSEN ; etc). Formularam a hipótese de que os microrganismos absorveriam energia em forma seletiva e, conseqüentemente, sua temperatura seria superior à do meio circundante.

SASTRY & PALANIAPPAN (1991) examinaram esta situação analiticamente, baseando-se em princípios de transferência de calor. Assumiram que o microrganismo tinha forma esférica e que existia uma diferença de 1 oC entre este e o meio circundante. Utilizando este modelo concluíram que tinham encontrado um argumento sólido contra a possibilidade de maior produção de energia térmica (devida à ação das microondas) dentro do microrganismo.

3.6.3 Diferenças de resistência às microondas entre microrganismos

Os microrganismos apresentam diferentes níveis de resistência às microondas. CUNNINGHAM (1980) obteve drásticas diminuições nas contagens de coliformes, *Flavobacterium Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas synthaxa* e *Alcaligenes viscolactis* em caldo nutriente após períodos de aquecimento inferiores a 20 segundos, sendo a *P. aeruginosa* o psicotrófico mais resistente e *A. viscolactis* o mais sensível à irradiação. DAHL et alii (1978) em um estudo realizado sobre pães de carne preparados em forno convencional e reaquecidos em forno de microondas até 74 °C observaram resistência maior entre os estreptococos com relação aos coliformes e psicotróficos.

Segundo as pesquisas conduzidas por CULKIN & FUNG (1975) *Streptococcus faecalis* foi o microrganismo não esporogênico que apresentou maior resistência às microondas. Já LEON CRESPO e OKERMANN (1977) encontraram que, em carne moída, o *S. faecalis* foi mais resistente ao tratamento convencional e o *Leuconostoc mesenteroides* foi mais resistente às microondas. WHITE & HOBBS, citados por FUNG & CUNNINGHAM (1980), consideraram eficiente o aquecimento com microondas para destruir células vegetativas mas não esporos. GEVAUDAN (1987) obteve resultados semelhantes. BAKER (1983) aqueceu pães de frango e frangos inteiros previamente inoculados com *S. aureus* e *S. typhimurium*, encontrando que esta última foi mais sensível às microondas.

OKERMAN: et alii (1976) compararam a resistência de três microrganismos inoculados em lombo de porco , submetidos a aquecimento em forno de microondas e concluiu que *Bacillus subtilis* foi mais resistente que *Leuconostoc mesenteroides* e, por sua vez, este último mais resistente que *Pseudomonas putrefaciens*.

DAHL et alii (1981) procuraram um microrganismo resistente às microondas que pudesse ser utilizado como indicador de efetividade de aquecimento da mesma forma que o P.A.3679 foi utilizado na indústria de alimentos enlatados de baixa acidez. Estudou-se uma cepa de *Streptococcus faecium* R 5314 mas foi considerado pouco resistente para ser utilizado com tal finalidade. Desde que, aparentemente, os esporos germinam após o aquecimento, estes pesquisadores sugeriram a utilização de um microrganismo anaeróbio esporogênico como *Clostridium perfringens* nos testes de resistência. FUNG & CUNNINGHAM (1980) encontraram que entre as bactérias comumente presentes em alimentos, *Streptococcus faecalis* foi a mais resistente às microondas.

3.7 COMPARAÇÃO DOS EFEITOS LETAIS DO AQUECIMENTO CONVENCIONAL E DO AQUECIMENTO COM MICROONDAS

Não existe uma maneira simples de comparar o aquecimento convencional com o aquecimento em forno de microondas já que ambos operam seguindo princípios diferentes. Segundo OLSEN et alii (1966) um inconveniente

para realizar este tipo de estudos comparativos residiria no fato da elevada quantidade de calor dissipado da superfície dos alimentos porque o ar frio do forno de microondas funcionaria como um "sumidouro de calor". Para evitar este resfriamento superficial recomendaram a utilização de um envoltório plástico em torno do alimento. Também SAWYER et alii (1984) demonstraram a importância do envoltório ao obter contagens inferiores de *S. aureus* e *Salmonella senftenberg* em peças de carne protegidas por um filme de PVC e irradiadas em comparação com amostras igualmente irradiadas mas sem o envoltório .

LIN & SAWYER aqueceram pastéis de carne inoculados com *E. coli* e *S. aureus* e protegidos por uma película de PVDC (cloreto de polivinilo) e compararam a sobrevivência dos microrganismos com os de outro lote aquecido sem embrulhar, encontrando um número consideravelmente menor de sobreviventes no primeiro lote.

OCKERMAN et alii (1976) realizaram estudos comparativos de ambos os sistemas, quantificando a sobrevivência de *B. subtilis*, *L. mesenteroides* e *P. putrefasciens* em lombo de porco. Como critério de finalização do tratamento foi usada a temperatura interna atingida pelo alimento. Concluíram que o tratamento com microondas não foi tão efetivo quanto o convencional no que diz respeito à destruição microbiana. LEON CRESPO et alii (1977) estudaram a resistência de *S. faecalis*, *Lactobacillus plantarum* e *P. putrefasciens* ao tratamento

térmico convencional e à irradiação de 2450 MHz. Aquecendo amostras até uma temperatura interna de 74 oC concluíram que o efeito letal foi maior no processo convencional. ALEIXO et alii (1985) estudaram a resistência de *S. typhimurium*, *S. aureus* e *C. perfringens* em perus cozidos em forno convencional e em forno de microondas até atingirem uma temperatura interna de 76,6 oC e também chegaram à mesma conclusão a que os pesquisadores anteriormente citados chegaram. Consideraram como uma das possíveis causas deste comportamento o fato de os constituintes dos alimentos absorverem a energia das microondas com intensidades diferentes e o aquecimento depender da posição do alimento dentro do forno. BAKER et alii (1983) obtiveram resultados semelhantes estudando o comportamento de culturas de *S. aureus* e *S. typhimurium* em alimentos à base de frango e ovo. DESSEL, citado por BAKER (1983), demonstrou que o aquecimento com microondas foi mais efetivo que o convencional para diminuir o nível de contaminação por *S. aureus* .

ROSENBERG & BÖGL (1982), após conduzirem uma série de pesquisas, concluíram que a redução da carga microbiana foi semelhante quando se aplicou um tratamento com microondas ou com forno convencional e que, utilizando este último, foi obtido um grau de letalidade superior em um ou dois ciclos logarítmicos. Os pesquisadores também concluíram que a inativação bacteriana foi possível porque os produtos aquecidos continham água e os esporos não foram destruídos, porém ativados. Observaram que a composição do produto foi

importante por causa da diferença de valores de constante dielétrica dos seus componentes e pelo efeito protetor sobre os microrganismos apresentado por certos ingredientes.

LINDSAY et alii (1986) obtiveram qualidade microbiológica superior em frangos inoculados com *S.typhimurium* e posteriormente cozidos em forma convencional em relação aos frangos inoculados da mesma maneira mas preparados em forno de microondas. Em consequência, aconselharam seguir algum outro critério, além do recomendado pelo fabricante, como ponto final do processo a fim de garantir um produto seguro quanto à qualidade microbiológica .

FUJIKAWA et alii (1992) estudaram a cinética de destruição de *E. coli* em alimentos aquecidos em fornos de microondas. Observando que as curvas dos sobreviventes a este tratamento foram semelhantes às obtidas após aquecimento em banho de água, concluíram que a destruição de microrganismos submetidos à ação das microondas deveu-se a um fenômeno exclusivamente térmico .

DATTA & LIU (1992) traçaram curvas de destruição térmica de microrganismos para comparar o processo de aquecimento por microondas com o convencional. Verificaram que a falta de uniformidade no aquecimento com microondas aumentava com o tempo devido às diferentes velocidades de geração do calor dentro da massa do substrato. Em contraste, no aquecimento convencional a falta de uniformidade diminuía com o tempo, conforme a temperatura

da região interna do substrato ia se aproximando da temperatura da superfície.

3.8 VANTAGENS E DESVANTAGENS DO AQUECIMENTO COM MICROONDAS

CARROLL (1989) resumiu como algumas desvantagens a serem consideradas no tratamento com microondas, além dos já mencionados pontos quentes e frios, a falta de standardização de nomenclaturas e níveis de potência (fornos de diferentes fabricantes ou diferentes modelos têm uma variedade de níveis de potência que dificulta o estabelecimento de instruções gerais); o ambiente frio da cavidade do forno, que resulta na falta de formação de crosta e cor (os curtos tempos de aquecimento não permitem que a superfície fique dourada ou que a água superficial se evapore) e a forma irregular de um alimento, que resulta num aquecimento desuniforme. A limitação da falta de cor dourada tem sido contornada em fornos de fabricação mais recente pela adição de um sistema de radiação infra-vermelha. Outro ponto importante é o recipiente no qual é colocado o alimento, que deve ser resistente ao calor e transparente às microondas.

FUJIKAWA et alii (1992) assinalaram duas grandes desvantagens no aquecimento de alimentos em fornos de microondas: os alimentos não podiam ser aquecidos uniformemente e o aumento da temperatura de uma unidade de volume de alimento irradiado variava segundo a posição

daquela unidade no forno. Comprovaram também que altas concentrações de sal retardavam o aquecimento especialmente na região central e, conseqüentemente, a temperatura em algumas porções do alimento irradiado não era suficientemente elevada para eliminar os microrganismos eventualmente presentes.

FRANZESE (1977) enumerou uma série de vantagens na utilização do forno de microondas para preparar ou aquecer as refeições oferecidas a pacientes internados em hospitais. Entre elas: satisfação dos pacientes por receber comida quente; satisfação dos funcionários do refeitório pela redução do volume de trabalho nos horários de maior movimento; redução da carga microbiana do alimento por redução do tempo no qual ele permanece à temperatura ambiente; maior flexibilidade na arrumação de bandejas com alimentos mais elaborados ou de mudanças de dieta e menor investimento em equipamentos para cozinha.

Uma vantagem importante que apresenta o aquecimento em forno de microondas é o de retenção de nutrientes em um grau superior ao do aquecimento convencional por ser um processo mais rápido (DATTA & LIU, 1992). Segundo vários estudos, os níveis de tiamina não variaram significativamente com o método de preparação, porém foi constatado que toucinho defumado cozido em forno de microondas apresentou níveis de nitrosaminas inferiores ao toucinho preparado na forma convencional (HOFFMAN & ZABIK, 1985).

DEHNE et alii (1991) estudaram a influência do tratamento com microondas sobre o valor nutricional de vários alimentos e não encontraram nenhum efeito deletério.

Outra vantagem, assinalada por CUNNINGHAM (1977), foi o prolongamento da vida de prateleira de alimentos submetidos a uma breve exposição às microondas. Hambúrgueres de frango irradiado por um período de 10 a 20 segundos, quando comparados com amostras que não passaram por este tratamento, apresentaram sinais de deterioração após um período maior.

Atualmente estão sendo desenvolvidos processos contínuos nas indústrias de alimentos, de produtos farmacêuticos e de bebidas devido à possibilidade de retenção de constituintes termolábeis, redução de incrustações na superfície dos trocadores de calor e manutenção dos equipamentos (MUDGETT, 1986)

3.9 REAQUECIMENTO DE ALIMENTOS EM FORNOS DE MICROONDAS

SPITE (1984) estudou a influência da composição do alimento, homogeneidade, peso e relação tempo /temperatura, na sobrevivência dos microrganismos presentes em alimentos congelados e reaquecidos em fornos de microondas. *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* inoculados em concentrações superiores a 5 log UFC/g sobreviveram a um tratamento de 4 minutos de aquecimento , após o qual a temperatura interna final fora de 88 oC. Nas mesmas condições de trabalho

Salmonella cubana e *S. aureus* não foram detectadas após 3 minutos de aquecimento. A adição de ervilhas na relação 1:1 deu como resultado uma sobrevivência maior de *S. cubana* mesmo tendo sido atingida uma temperatura interna final superior à anterior. O fato foi explicado como uma possível modificação na transferência de calor. Aparentemente formar-se-ia uma camada mais fria em torno das ervilhas o que permitiria a sobrevivência dos microrganismos presentes nessa porção do alimento. Do mesmo modo que outros pesquisadores anteriormente citados, SPITE (1984) comprovou que, seguindo as instruções de aquecimento fornecidas nas embalagens de produtos congelados, os microrganismos eventualmente presentes não puderam ser eliminados.

COOTE et alii (1991) alertaram sobre o risco que representava controlar a temperatura de aquecimento em um único ponto. Compararam a letalidade do aquecimento convencional e com forno de microondas sobre *Listeria monocytogenes* inoculada em frango. Assinalaram a necessidade de determinar a temperatura em vários pontos da peça do alimento, quando aquecido no forno de microondas devido à falta de homogeneidade na distribuição de calor. Os seus resultados ilustram a necessidade de se tomar cuidado ao interpretar valores de inativação térmica em alimentos sólidos, onde se registram diferenças de temperatura consideráveis entre dois pontos e que podem resultar em diferenças no grau da injúria sofrida pelos organismos presentes.

A utilização do forno de microondas para reaquecer alimentos destinados a pessoas doentes, convalescentes ou imunodeprimidas cria uma situação bastante particular porque esta população está incluída na categoria de maior risco de contrair doenças de origem alimentar. Por este motivo é importante obter o máximo de informações sobre a existência de injúria e seu grau de intensidade como consequência do processo de aquecimento com microondas. (DAHL, 1981)

=====

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Cepas bacterianas

O material em estudo esteve constituído de suspensões de *Escherichia coli* 010 (da coleção da Seção de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos), *Bacillus cereus* CCT 0240 (cedida pela Fundação Tropical de Pesquisas André Tosello), de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 da coleção da Seção de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos e de sopa creme de vegetais preparada no laboratório.

4.1.2 Forno de microondas

O forno de microondas utilizado foi da marca Sharp digital modelo Carousel MW 615 com prato giratório e termômetro removível ligado ao painel de leitura, com potência de saída de 700 Watts, frequência de trabalho de 2450 MHz e capacidade de 42 litros.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação da sopa creme de vegetais

A sopa teve a seguinte composição :

Batata	3,90 kg
Cenoura	0,90 kg
Chuchu	0,60 kg
Vagem	0,50 kg
Margarina	0,25 kg
Sal	0,03 kg
Ovos	três unidades
Água	7,00 l

Os vegetais foram cozidos na água com sal e após esfriamento foi repostada a água perdida por evaporação. As hortaliças, a margarina e os ovos foram homogeneizados em liquidificador doméstico. A seguir a sopa foi dividida em porções de 300 g acondicionadas em frascos de vidro com tampa de plástico rosqueável perfurada para permitir vazão do vapor durante o aquecimento. Os recipientes com a sopa foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Previamente as tampas foram cobertas com uma fina camada de algodão e duas folhas de papel manilha para evitar recontaminação.

A sopa apresentou um valor de pH de aproximadamente 5,4; viscosidade de 612 cps a 25 °C; umidade de 88,9 % e densidade de 0,99.

O alimento escolhido foi a sopa pastosa por ser homogênea. HARRISON (1980) tem assinalado a importância da homogeneidade no processo de aquecimento por microondas já que em alimentos com esta característica ocorre uma distribuição de temperatura mais uniforme que em alimentos sólidos.

4.2.2 Preparação das suspensões de microrganismos

Os microrganismos em estudo foram escolhidos segundo características de resistência térmica. *E. coli*, por ser uma bactéria não esporogênica de simples detecção, sensível ao calor (JAY, 1992); *B. cereus* por ser um aeróbio esporogênico de resistência térmica superior (ROITMAN et alii, 1988) e *C. sporogenes* PA 3679 por ser um anaeróbio produtor de esporos muito resistentes ao calor (LAKE et alii, 1992).

A pureza das cepas foi comprovada do seguinte modo:

- *E. coli* foi estriada no meio de ágar eosina azul de metileno (HITCHINS, 1992). Colônias com aspecto característico (transparentes com brilho verde metálico no centro) apresentaram o comportamento típico de *E. coli* tipo I às provas de IMViC -indol; vermelho de metila; Voges Proskauer ; citrato- (HITCHINS, 1992) .

- Colônias típicas de *B. cereus* desenvolvidas no meio ágar vermelho de fenol-gema de ovo-polimixina segundo Mossel (PE) (HARMON, 1992) foram testadas nas reações de Gram; catalase ; motilidade ; manitol e as provas bioquímicas

de fermentação de glicose, redução de nitrato, decomposição de tirosina e produção de acetil metil carbinol a partir de glicose (HARMON,1992).

- *C. sporogenes* foi estriado no meio de ágar fígado de vitela com gema de ovo (LVA) (KAUTTER et alii, 1984). A partir de colônias típicas foram observadas ao microscópio células apresentando forma de raquete de tênis com esporos terminais.

As culturas dos microrganismos utilizados foram ativadas por transferências sucessivas nos meios indicados acima. Para avaliar aproximadamente a população de microrganismos e poder calcular a concentração do inóculo foi utilizada a curva de crescimento, para *E. coli* e contagem na câmara de Petroff- Hausser para os esporos de *B. cereus* e *C. sporogenes*. A quantificação definitiva foi realizada por plaqueamento nos meios de ágar tripticase soja (TSA) para *E. coli* (incubação a 35 oC por 24-48 horas) e *B. cereus* (30 oC por 24 horas) e de ágar fígado de vitela (LVA) para *C. sporogenes* (30 oC por 72 horas).

4.2.2.1 Preparação da suspensão de *Escherichia coli*

Determinação da curva de crescimento

Para o traçado da curva de crescimento de *E.coli* realizaram-se três ensaios independentes com duplicata. Foram utilizados três frascos Erlenmeyer de 125 ml de capacidade contendo 99 ml de caldo tripticase soja (TSB) e

pérolas de vidro estéreis. Os microrganismos foram ativados por transferência de uma cultura pura de 24 horas para tubo contendo ágar TSA , seguido de incubação a 35 oC por 24 horas. Uma alçada da cultura foi transferida para novo tubo com o mesmo meio, seguido de incubação a 35 oC por 24 horas. Após incubação uma alçada desta última cultura foi transferida para um tubo contendo aproximadamente 10 ml de caldo TSB e incubada a 35 oC por 24 h em agitador New Brunswick Scientific Company com controle de temperatura, modelo G 25, a 140 rpm. Após incubação 1 ml da suspensão em TSB foi transferido para Erlenmeyer contendo 99 ml do mesmo meio e pérolas de vidro e incubado com agitação a 35 oC. A intervalos regulares de duas horas foram retiradas alíquotas de 1 ml, preparadas diluições decimais sucessivas até 10⁻⁷ e efetuada a contagem em profundidade em placas em meio de agar TSA com incubação à 35 oC por 24-48 horas. Em continuação foi traçada a curva de crescimento representando graficamente valores de população versus tempo de incubação. A concentração de E.coli em alíquotas obtidas de culturas nas mesmas condições puderam ser estimadas através da curva obtida (Figura 7)

4.2.2.2 Preparação da suspensão de esporos de Bacillus cereus

Para obter uma produção maciça de esporos, a cepa de *B. cereus* foi inoculada em tubos (25 x 200 mm) contendo ágar nutriente inclinado e incubados a 35 oC + 1 oC por 48

horas. Após a incubação foi retirado o crescimento superficial de cada tubo adicionando-se 3 ml de água destilada estéril e agitando-se delicadamente. O conteúdo de todos os tubos foi reunido em tubo estéril e a suspensão final submetida a aquecimento em banho-maria a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos (para destruir as células vegetativas e ativar os esporos) e, a seguir, colocada em banho de gelo por 2 minutos (STUMBO, 1965). Duas garrafas de Roux contendo 150 ml de ágar nutriente adicionado de 1% de sulfato de manganês foram inoculadas com 2 ml da suspensão de esporos de *B. cereus* e incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dez dias com uma inclinação de 45 ° (STUMBO, 1965). Após incubação, foram adicionados 2 ml de água destilada em cada garrafa e, com o auxílio de uma bagueta de vidro em forma de cotovelo foi raspada cuidadosamente a superfície do agar para retirar o crescimento superficial. O crescimento remanescente foi retirado adicionando-se 3 ml de água destilada estéril. A suspensão foi distribuída em tubos de centrífuga com tampas estéreis e centrifugada a 1000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em água destilada estéril e centrifugado novamente.

O processo de lavagem foi realizado três vezes com a finalidade de deixar a suspensão com o mínimo número de células vegetativas possível. Após a limpeza dos esporos, estes foram ressuspensos em água destilada estéril e conservados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em Erlenmeyer com pérolas de vidro (STUMBO, 1965). A observação microscópica da suspensão evidenciou a presença de um número praticamente desprezível

de células vegetativas. A seguir os esporos foram contados com o auxílio da câmara de Petroff-Hausser, sendo a fórmula utilizada para calcular o seu número :

$$\text{número de esporos/ml} = 20.10^6 \cdot \text{diluição} \cdot n / N$$

onde n: número total de esporos contados

N: número de quadrados pequenos contados na câmara de Petroff-Hausser

4.2.2.3 Preparação da suspensão de esporos de Clostridium sporogenes

A cepa de *C. sporogenes* PA 3679 foi ativada por inoculação em meio de carne moída (CMM) e incubada a 35 oC por 48 horas. Adaptando o esquema utilizado por SANTO GOLDONI et alii (1980), dois tubos contendo 9 ml de CMM foram inoculados com 0,1 ml da suspensão de esporos, adicionados de vaspar (vaselina-parafina 1:1) para cobrir a superfície e aquecidos a 82 oC durante 13 minutos. Os tubos foram rapidamente esfriados e incubados a 30 oC por 18 horas. No fim da incubação, de cada tubo foram transferidas duas alíquotas de 2 ml da suspensão e inoculados em dois tubos contendo 18 ml de meio CMM estéril. A superfície foi coberta com vaspar e, a seguir, os tubos foram incubados a 30 oC por 4 horas. Após este período, o conteúdo total dos dois tubos foi transferido assepticamente para um frasco com 150 ml de meio CMM estéril. A suspensão foi coberta com vaspar e incubada a 30 oC por 3 horas. Finalmente, a cultura

foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 500 ml de meio CMM estéril, selada com vaspar e incubada durante 8 dias a 30 oC e 4 dias a 20 oC.

Após incubação, o meio foi filtrado assepticamente utilizando funil de vidro contendo seis camadas de gaze. O filtrado foi transferido para frascos Nalgene de centrifuga estéreis e centrifugado por 10 minutos a 8000 rpm a 0 oC. O líquido sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em água estéril e centrifugado. Após nova suspensão e centrifugação obteve-se um líquido bastante escuro, por este motivo realizou-se uma nova filtração seguida de centrifugação. O sedimento assim obtido foi novamente suspenso em água destilada estéril e mantido a 4 oC em Erlenmeyer com pérolas de vidro estéreis.

Após diluições adequadas, a população de esporos foi estimada por contagem na câmara de Petroff-Hauser como já descrito para *B. cereus*.

A contagem de microrganismos foi realizada em meio ágar LVA. Da suspensão mãe foi tomada uma alíquota, diluída, submetida a choque térmico a 80 oC durante 10 minutos e rapidamente esfriada em água com gelo durante 2 minutos. Após diluições convenientes, as amostras foram inoculadas em profundidade. Uma vez solidificado o meio foi colocada superficialmente uma fina camada de meio fundido. As placas foram incubadas em jarros Gaspak a 30 oC por 72 horas (POLVINO et alii, 1982; MELLO SERRANO et alii, 1991).

4.2.3 Ensaio preliminares

A primeira parte do trabalho consistiu no estudo das características do forno de microondas. Com este propósito foram realizados alguns ensaios preliminares.

4.2.3.1 Calibração do termômetro do forno

O primeiro passo foi a calibração do termômetro do forno, utilizando um termômetro de mercúrio aferido. No centro do prato giratório foi colocado um frasco de vidro contendo 450 ml de água. O termômetro foi situado no centro geométrico da massa de água e segurado por meio de um batoque de cortiça com algumas perfurações para permitir a saída do vapor. A profundidade de introdução do termômetro foi fixada com um tubinho de borracha colocado por cima do batoque. O forno foi programado para se desligar automaticamente ao atingir uma determinada temperatura. Cada amostra de água foi aquecida, retirada rapidamente do forno e agitada, sendo sua temperatura imediatamente medida com termômetro de mercúrio e comparada com a registrada pelo termômetro do forno.

4.2.3.2 Medição da temperatura da amostra no interior do forno

Procurando-se estabelecer quais eram os pontos mais frios na cavidade do forno, realizou-se uma série de

ensaios de aquecimento com água de torneira nas potências baixa, média e alta. Em cada esquina da base interna do forno foi colocado um béquer contendo 150 ml de água, mantendo-se o aparelho ligado durante diversos períodos de tempo. Observou-se que as temperaturas mais baixas registraram-se nos recipientes mais próximos da porta. Em ensaios sucessivos foi constatado que após o mesmo tempo de aquecimento e nas mesmas condições, as temperaturas registradas em cada béquer foram diferentes.

Também foi procurado o ponto mais frio sobre o prato giratório, que se encontrou na região média, ou seja, entre o centro e a região periférica do prato; mas, por razão de praticidade, decidiu-se trabalhar no centro do prato.

Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se solução salina fisiológica, tentando observar como se produzia o aquecimento com o forno programado para desligar-se automaticamente aos 76 °C. Registrou-se o tempo necessário para as amostras atingirem 76 °C no centro geométrico da massa, tendo como referência de temperatura aquela indicada no painel do forno. Alguns autores citados na revisão bibliográfica, como OLSEN (1965) e SAWYER (1984) têm considerado que a mencionada temperatura garantiria um produto de qualidade microbiológica satisfatória.

Observou-se, porém, que os tempos necessários para atingir 76 °C eram bastante variáveis.

Amostras de 300 g de solução salina foram aquecidas por períodos de 1 a 4 minutos em potência média. O

termômetro do forno foi fixado de forma tal que medisse a temperatura do centro da amostra. Os valores indicados no visor do forno foram registrados minuto a minuto (Tabela 6).

Uma vez completo o aquecimento programado, o forno se desliga automaticamente e não é possível obter informação da temperatura no visor. Deixando a amostra em tempo de espera só se pode medir a temperatura final com algum outro instrumento diferente do termômetro do forno. Por este motivo, nos ensaios preliminares, as amostras de material foram colhidas sem aguardar pelo tempo de espera.

4.2.3.3 Inoculação da sopa

Nos primeiros ensaios procedeu-se do seguinte modo: uma amostra de 500 g de sopa foi colocada em bolsa de plástico estéril, inoculada com a suspensão de microrganismos e homogeneizada em "stomacher" durante 30 segundos. A ponta da bolsa foi cortada assepticamente e 300 g do seu conteúdo foram transferidos para um vidro de 500 ml de capacidade com batoque de cortiça perfurado e coberto com uma camada de algodão (todo o conjunto previamente esterilizado). No centro da tampa do vidro foi colocado o termômetro do forno e o conjunto foi colocado no centro do prato giratório para ser aquecido. Foram encontradas dificuldades para homogeneizar corretamente a amostra após o aquecimento. Além disso, houve uma grande demora entre os ensaios por causa da limpeza e desinfecção

do termômetro. Os manuais de instruções de fornos de microondas consultados (Panasonic, Sharp) recomendavam tempos de aquecimento e não temperaturas. Levando em consideração todos estes aspectos mencionados e tentando estabelecer uma temperatura média do alimento após o tratamento com microondas, a amostra passou a ser homogeneizada com agitador magnético por 1 minuto e sua temperatura a ser medida com termômetro de mercúrio. Como parâmetro de referência fixou-se o tempo de aquecimento em minutos por ser mais fácil de acompanhar e medir de forma padronizada.

Os batoques de cortiça que serviram para segurar o termômetro foram substituídos pelas próprias tampas plásticas dos frascos (devido à praticidade e facilidade de limpeza) com as perfurações necessárias e protegidas do modo já descrito.

4.2.4 ENSAIOS DEFINITIVOS

4.2.4.1 Inoculação da sopa

Para estudar a influência das microondas sobre os microrganismos escolhidos foram realizadas as diluições necessárias a partir da suspensão mãe de cada bactéria, de modo a atingir, para cada um deles, níveis de contaminação

na sopa da ordem de 2 log UFC/ml, 4 log UFC/ml e 6 log UFC/ml. A temperatura da sopa foi levada até 25 oC \pm 1 oC utilizando banho-maria.

Assepticamente foi introduzido um agitador de barra magnético estéril e logo depois a suspensão do inóculo. Agitou-se cuidadosamente para distribuir o inóculo na massa do alimento. O frasco contendo 300 ml de sopa foi colocado no centro do prato giratório do forno e aquecido por um minuto na potência máxima. Imediatamente depois foi retirado do forno, colocado sobre a placa do agitador magnético e homogeneizado por um minuto. Da maneira mais rápida possível foi medida a temperatura com termômetro de mercúrio aferido e retirada uma alíquota da amostra, que foi transferida para tubo estéril e mantida em banho de gelo até o momento da análise. Procedeu-se do mesmo modo com uma segunda amostra de sopa estéril, mas desta vez aquecendo-a por dois minutos. Após aquecimento, a amostra permaneceu durante 1 minuto dentro do forno desligado, visto o tempo de espera ser fundamental para a equalização da temperatura. Uma vez retirada do forno, a amostra foi homogeneizada com o auxílio de agitador magnético durante um minuto. Da mesma maneira procedeu-se com uma terceira amostra mas aquecendo por três minutos, sendo o tempo de espera de dois minutos e agitando por um minuto. Resumindo, cada amostra foi aquecida por um determinado período de tempo e permaneceu durante o mesmo período denominado tempo de espera, sendo que o último minuto foi sob agitação (Tabela 5), (MIAN, 1992).

Em cada ensaio também foi realizada a contagem de uma amostra inoculada mas não submetida à ação das microondas, que serviu de testemunha.

Devido à resistência térmica dos esporos, as amostras inoculadas com *B.cereus* e *C. sporogenes* foram aquecidas por um período de tempo superior, 10 minutos. As amostras aquecidas por períodos de até 3 minutos foram tratadas da forma já descrita. As amostras aquecidas por períodos de 4 até 10 minutos permaneceram dentro do forno, após irradiação, durante 3 minutos e posteriormente foram homogeneizadas durante 1 minuto, evitando-se, assim, queda de temperatura na massa da sopa (Tabela 5).

TABELA 5 Tratamento das amostras de sopa inoculadas

Tratamento dentro do forno (minutos)		Homogeneização (minutos)
Aquecimento	Tempo de espera	Agitação
1	0	1
2	1	1
3	2	1
4	3	1
.
10	3	1

4.2.4.2 Avaliação da população de Escherichia coli e de esporos de Bacillus cereus e Clostridium sporogenes após exposição às microondas

Após exposição às microondas a população de E. coli foi avaliada retirando-se alíquotas de sopa, realizando as diluições decimais necessárias e inoculando em profundidade no meio agar TSA, seguido de incubação a 35 oC por 24 horas (HITCHINS,1992)

Para poder avaliar a injúria subletal na população da bactéria devida ao tratamento também foram inoculadas alíquotas das amostras de sopa em meio de agar violeta vermelho bile (VRB) (Difco, Barueri, São Paulo, Brasil) com incubação à 35 oC por 24 horas. Como é um meio seletivo, apenas permite o desenvolvimento das células não injuriadas. (JAY, 1991, FOEGEDING, 1992)

A contagem da população de B. cereus sobrevivente foi realizada nos meios ágar TSA e PE. O meio TSA permite contar todos os microrganismos viáveis incluindo aqueles que sofreram injúria subletal, o ágar PE, pelo fato de ser seletivo, permite contar aqueles microrganismos que não sofreram injúria subletal. A incubação foi feita a 30 oC por 24 horas (STEVENSON, 1992, STUMBO, 1965).

Seguindo o mesmo esquema indicado no caso de inoculação de E. coli foi tomada uma alíquota de cada frasco

com sopa, realizada a diluição conveniente e avaliado o número de microrganismos sobreviventes por inoculação em placa.

A contagem da população de *C. sporogenes* sobrevivente foi realizada utilizando ágar LVA, recomendado para recuperação de anaeróbios putrefativos pela sua composição. Este meio, entre outros ingredientes, contém amido solúvel, citado por diversos autores como conveniente para realizar contagem de esporos de clostrídios devido à sua ação neutralizante de inibidores que podem ser encontrados no meio (FOEGEDING, 1992, DENNY & CORLETT, 1992). Porém, este meio apresenta algumas desvantagens. Quando a população é elevada, devido à intensa produção de gás, pode ocorrer desprendimento total ou parcial do ágar, que se deposita na tampa. Mesmo em casos em que as placas apresentaram baixas contagens de esporos foi observado este problema. Em outros casos, o ágar apresentou bolhas de gás circundadas por um anel opaco leitoso e outro mais fino e transparente. As bolhas de gás presentes em placas com populações bacterianas mais numerosas não estavam rodeadas de halos opacos. Estas observações estão em desacordo com alguns dados publicados na bibliografia consultada (Manual Difco, 1984).

Contagens feitas em plaqueamento em superfície de ágar normalmente apresentam variações maiores que o esperado entre as duplicatas (FOEGEDING, 1992). Mesmo assim foi utilizada esta técnica, visto que a do número mais provável (NMP), que também poderia ter sido usada, apresenta a

desvantagem de requerer longos períodos de incubação pela lenta germinação dos esporos, além de ser uma técnica demorada devido ao elevado número de amostras a serem examinadas e com resultados menos precisos quando comparada com a contagem em placa (GRICHY et alii, 1983).

Os esporos injuriados pelo calor requerem períodos de incubação mais prolongados que os não injuriados ; por isso, as placas foram incubadas por 72 horas a uma temperatura de 35 oC dentro de jarros anaeróbios sistema Gas-Pak (FOEGEDING, 1992). POLVINO (1982) também recomenda um tempo de 72 horas, já que um período menor , como 48 horas, pode levar a resultados incorretos devido à presença de esporos viáveis mas em estado de dormência que não chegaram a germinar. A atmosfera gasosa foi obtida utilizando envelopes para anaerobiose e para conferir estas condições foram utilizadas fitas indicadoras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DOS ENSAIOS PRELIMINARES

Na Tabela 6 constam os valores de temperatura registrados no visor do forno durante o aquecimento de 300 ml de uma solução salina na potência média.

A diferença de temperatura resultante de períodos de aquecimento iguais e nas mesmas condições foi grande. No período compreendido entre 1 e 2 minutos observaram-se diferenças de 4 oC (como no segundo ensaio : 42 oC - 38 oC) até 10 oC (como no terceiro ensaio: 51 oC - 41 oC).

No período compreendido entre 2 e 3 minutos observaram-se diferenças de 7 oC (como no quarto ensaio: 54 oC- 47 oC) até 24 oC (como no primeiro ensaio:70 oC - 46 oC).

Observa-se, claramente, que o registro da temperatura tem sido pontual sem refletir exactamente a temperatura média da amostra. No primeiro ensaio após 3 minutos a temperatura foi de 70 oC e após 4 minutos, de 65 oC.

Com o propósito de acompanhar as variações da temperatura realizaram-se ensaios de aquecimento de sopa anotando os valores lidos no visor do forno a intervalos de

1 minuto (Tabela 7). Observa-se que quanto maior foi o tempo de aquecimento maior foi a temperatura alcançada, porém, sem se poder estabelecer uma relação entre estes dois parâmetros. A diferença de temperatura da sopa entre 1 minuto e 4 minutos de aquecimento foi de 2 oC (42 oC-44 oC) na prova 4 do ensaio VI e de 34 oC (40 oC-74 oC) na prova 4 do ensaio VII, com diferenças entre 16 oC e 22 oC nos outros ensaios. Na prova 3 do ensaio VI, a temperatura após 2 minutos foi a mesma que após 3 minutos. Na prova 4 do ensaio VI as temperaturas lidas após 2 minutos (37 oC) e 3 minutos (40 oC) foram inferiores àquela correspondente a 1 minuto (42 oC).

Os resultados dos ensaios preliminares de sobrevivência de *E. coli* constam na Tabela 8 onde estão apresentados os valores obtidos com este tratamento, sendo as temperaturas registradas aquelas indicadas pelo termometro do forno, sem agitação e sem dar tempo de espera.

Após 1 minuto e 4 minutos de aquecimento houve diversas variações de temperatura. No ensaio 1 a temperatura registrada após 4 minutos de aquecimento (56 oC) foi menor que a correspondente a 3 minutos (59 oC). A diferença entre valores de temperatura final para ensaios similares é maior quanto maior for o tempo de aquecimento. Após 1 minuto houve uma diferença máxima de 11 oC (35 oC e 46 oC) entre os ensaios realizados. Após 4 minutos, a diferença já foi de 30 oC (44 oC no ensaio 6 e 74 no ensaio 7). O registro da temperatura foi pontual e não refletiu o estado térmico

da massa de sopa como um todo. Pode-se dizer que a diferença de temperatura entre dois pontos da massa do alimento, após um determinado período de aquecimento, foi bastante significativa. Visto que os valores obtidos podem ser os correspondentes a pontos quentes ou frios da massa, percebe-se a necessidade de aguardar o tempo de espera correspondente e homogeneizar mecanicamente a amostra. Este problema tem sido mencionado por vários pesquisadores, entre eles CARLIN (1982) e DATTA & HU (1992).

Analisando os valores da coluna correspondente ao número de sobreviventes na Tabela 8 concluiu-se que as condições de operação realizadas não alteraram a população microbiana, ou seja, o aquecimento da sopa por 4 minutos em potência média e sem tempo de espera não foi suficiente para inativar as células de *E. coli* presentes. Em consequência foi planejada uma série de ensaios operando com o forno em potência alta e aguardando um tempo antes de retirar a amostra do forno (tempo de espera).

Na Tabela 11 estão reunidos os dados de nove ensaios de aquecimento em potência alta da sopa inoculada com três níveis de *B. cereus*. Ensaios realizados com amostras de sopa inoculadas com populações da ordem de 6,33 log UFC/ml e aquecidas durante 3 minutos revelaram uma redução média de 0,86 ciclos logarítmicos no número de sobreviventes mas o mesmo não aconteceu com amostras de uma população de 2,52 log UFC/ml e 4,69 log UFC/ml.

Os ensaios preliminares realizados demonstraram que 3 minutos de aquecimento não foram suficientes para inativar completamente esporos de *B. cereus*. Foram programados, então, ensaios de períodos de aquecimento mais prolongados com a finalidade de verificar quando ocorreu a inativação .

5.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS DEFINITIVOS

Na Figura 8 podem ser observados os resultados de três ensaios do aquecimento da sopa inoculada com *E. coli* na concentração de 2,66 log UFC/ml, com tempo de espera (Tabela 9).

No ensaio 1 após os primeiros 2 minutos de aquecimento, não houve diminuição acentuada da população. Nos ensaios 2 e 3, a população bacteriana teve uma ligeira diminuição após o primeiro minuto, mas após 2 minutos não foram evidenciados microrganismos viáveis, indicando inativação total da população. No ensaio 1 ao cabo de 3 minutos de aquecimento houve uma marcada diminuição de *E. coli*, não sendo detectadas bactérias viáveis.

Segundo os dados da Tabela 9, a temperatura atingida pela sopa após 2 minutos de aquecimento no ensaio 1 foi de 51 oC ,no entanto no ensaio 2 foi de 70 oC e no ensaio 3, de 69 oC. Esta diferença de temperatura, à primeira vista ,

poderia explicar por que no ensaio 1 o número de sobreviventes foi mais elevado.

Na Figura 9 estão representados os dados dos ensaios 4, 5 e 6. Quando a população inicial de *E. coli* foi da ordem de 4,68 log UFC/ml, não foi observada nenhuma alteração acentuada após 1 minuto de aquecimento nos três ensaios (Tabela 9).

Na curva correspondente ao ensaio 6 observou-se uma diminuição mais acentuada no número de microrganismos em função do tempo. Após 2 minutos de aquecimento, a população teve uma redução de 3,64 log UFC/ml enquanto no ensaio 4 essa redução foi de 2,25 log UFC/ml e no ensaio 5 foi de 2,68 log UFC/ml. Após 3 minutos de aquecimento, não foram evidenciados microrganismos viáveis nas amostras examinadas.

As amostras atingiram temperaturas muito próximas nos três ensaios.

Os valores da população de *E. coli* na Figura 10 indicam que após 1 minuto de aquecimento o inóculo permaneceu praticamente no mesmo nível inicial, mas após 2 minutos a inativação foi completa. É interessante comparar estes valores, que correspondem a um inóculo da ordem de 6,69 log UFC/ml, com os da Figura 8, que são aproximadamente 100 vezes menores. Neste caso, a destruição dos microrganismos se completou num período menor quando a população foi mais elevada.

As amostras aquecidas por 1 minuto apresentaram, nos meios TSA e VRB valores da mesma ordem de grandeza (Tabela 10). Desde que o meio VRB permite avaliar o número de bactérias que não sofreram injúria subletal pode-se supor, a partir da observação da Tabela 10, que o aquecimento pelo período de 1 minuto não tenha ocasionado este efeito. A possibilidade de ocorrência de injúria subletal só se manifestou nos ensaios 4, 5 e 6 após 2 minutos de exposição às microondas. A população dos microrganismos injuriados variou entre 1,00 e 2,40 ciclos logarítmicos.

O meio VRB também permitiu superar as dificuldades de leitura das colônias de *E. coli* na presença de partículas de alimento devido à cor rosa característica daquelas.

A Figura 11 representa os dados obtidos a partir de três ensaios de aquecimento da sopa, nas mesmas condições supracitadas, porém inoculados com *B. cereus* na concentração de 2,11 log UFC/ml.

Após o primeiro minuto de aquecimento não foi observada uma diminuição pronunciada na população, em nenhum dos três ensaios mas, após 2 minutos, houve diminuição de 0,63 ciclos logarítmicos no ensaio 1. Isto não foi observado nos outros dois ensaios mesmo que a temperatura atingida tenha sido praticamente a mesma (Tabela 12). Os resultados dos ensaios 2 e 3 foram bastante semelhantes após 2 minutos de aquecimento, mas após 3 minutos a população evidenciada no ensaio 3 foi 1,81 log UFC/ml e no

ensaio 2 teve o valor de 1,48 log UFC/ml. As temperaturas registradas após cada período de aquecimento para cada um dos três ensaios, têm apresentado pouca variação, com diferenças só de 1 °C. Após 4 minutos não foram evidenciados microrganismos viáveis em nenhum dos ensaios.

Nos ensaios 4, 5 e 6 da Figura 12 observa-se que a população de *B. cereus* não foi praticamente afetada pelo aquecimento durante 2 minutos. A partir do terceiro minuto pôde-se observar uma diminuição média de 0,61 ciclos logarítmicos nos três ensaios (Tabela 12).

Após 4 minutos houve inativação total do microrganismo no ensaio 5 e diminuição de 2,70 e 2,00 ciclos logarítmicos nos ensaios 4 e 6, respectivamente. Após 5 minutos não foram recuperadas células viáveis de *B. cereus* nos ensaios 4 e 6.

Na Figura 13 observa-se que após 1 minuto de aquecimento, os valores dos ensaios 7 e 8 resultaram bastante próximos, tanto em número de microrganismos quanto em temperatura (Tabela 12). Após 2 minutos de aquecimento praticamente não houve diminuição na população de *B. cereus*. Já a partir do terceiro minuto observou-se uma diminuição média de 1,30 log UFC/ml. Após 3 minutos no ensaio 7 a redução foi de 1,30 log UFC/ml; no ensaio 8, de 1,38 log UFC/ml e no ensaio 9, de 1,42 ciclos logarítmicos. A redução entre o quarto e o quinto minutos foi mais acentuada, superior a dois ciclos logarítmicos para os três ensaios, sendo para o ensaio 9 praticamente de

três ciclos logarítmicos. A inativação total da bactéria ocorreu após 5 minutos no ensaio 9 e após 6 minutos nos ensaios 7 e 8.

Esses resultados estiveram de acordo com os relatados por PAGE & MARTIN (1985), de redução drástica de células de *E. coli* em 45 segundos e esporos de *B. subtilis* em 10 minutos. Também foram compatíveis com os reportados por CRAVEN & LILLARD (1974), que observaram sensível diminuição nas contagens de células vegetativas de *B. cereus* presentes em frangos aquecidos até 70 oC mas não na contagem de esporos. SPITE (1984) recuperou células de *B. cereus* após 4 minutos de aquecimento até uma temperatura interna de 88 oC, a partir de populações da ordem de 5 log UFC/ml mas não de *S. aureus* ou *Salmonella cubana* após 3 minutos. Segundo GEVAUDAN et alii (1987) tratamento de alimentos pré-cozidos por 4 minutos até uma temperatura interna final de 80 oC eliminou a flora contaminante não-esporogênica, mas não foi efetivo para bactérias esporogênicas

As Tabelas 11 e 13 apresentam os resultados do estudo de injúria subletal nas populações de *B. cereus*. Na Tabela 11 as contagens de microrganismos nos meios TSA e PE são da mesma ordem de magnitude para cada ensaio. Em consequência não há evidências de injúria subletal para as provas de diferentes concentrações de inóculo. Na Tabela 13, nos ensaios correspondentes a inóculos da ordem de 4,11 log UFC/ml e 6,18 log UFC/ml, não houve diferença entre as contagens realizadas nos dois meios e em todos os

tempos de aquecimento que permitisse inferir a existência deste tipo de injúria. Porém, na série de ensaios realizada com populações da ordem de 2,11 log UFC/ml foi observada uma situação diferente. As amostras aquecidas por 2 e 3 minutos apresentaram valores menores em PE do que em TSA o que é indicativo de possível injúria subletal.

As Figuras 14, 15 e 16 representam a sobrevivência de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 ao tratamento com microondas. Trata-se de três diferentes níveis de contaminação; a Figura 14 representa uma população inicial de aproximadamente 2,20 log UFC/ml; a Figura 15, de 4,20 log UFC/ml e a Figura 16, de 5,90 log UFC/ml (Tabela 14)

Em todos os ensaios, a temperatura atingida pela sopa, após 3 minutos de aquecimento, foi igual ou superior a 80 oC (Tabela 14). Pode-se observar que, independentemente da temperatura da sopa e do inóculo, a população bacteriana não sofreu alterações significativas. As pequenas diferenças registradas podem ser atribuídas a variações inerentes ao próprio aquecimento.

É importante ressaltar que a temperatura registrada após cada ensaio não refletiu exatamente os valores atingidos pela amostra na totalidade da sua massa. Durante o processo de aquecimento dentro do forno observaram-se pontos de ebulição. Uma vez retirada do forno, a amostra sofreu uma certa queda de temperatura que não teve condições de ser registrada. Estes fatos inviabilizam que se descreva uma história térmica da

amostra, que é o que determina o efeito letal sobre os microrganismos. A única temperatura que se conhece a rigor é aquela determinada uma vez concluído o tempo de espera. Quando o tratamento foi de um minuto e, conseqüentemente, a temperatura da sopa foi mais baixa, a diferença entre dois pontos da massa de sopa foi de 1 oC a 2 oC. Quando o tratamento foi mais prolongado e a temperatura final mais elevada, a diferença de temperatura entre dois pontos da sopa também foi maior (aproximadamente de 6 oC a 9 oC).

Desde que *C. sporogenes* e *Clostridium botulinum* são fisiologicamente semelhantes, porém apresentando o primeiro uma resistência térmica superior, torna-se evidente a importância de pesquisar o comportamento de *C. botulinum* quando submetido à ação das microondas.

6. *CONCLUSÕES*

- O aquecimento da sopa de vegetais preparada para a presente pesquisa, pelo período de 1 minuto na potência alta e colocada no centro do prato giratório do forno de microondas não foi suficiente para eliminar a contaminação por *E. coli* mesmo quando esta foi da ordem de 2 log UFC/ml.

- A inativação total nos três níveis de população de *E. coli* foi observada após 3 minutos de aquecimento e 3 minutos de tempo de espera.

- Um minuto de aquecimento da sopa colocada no centro do prato giratório em potência alta foi insuficiente para eliminar esporos de *B.cereus* nos três níveis de população estudados. Para níveis de contaminação de 2,11 log UFC/ml, a inativação foi observada após 4 minutos de aquecimento e 4 minutos de tempo de espera; para níveis de 4,11 log UFC/ml e 6,18 log UFC/ml, após 5 minutos e 6 minutos de aquecimento, seguido de 4 minutos de tempo de espera, respectivamente.

- Esporos de *C. sporogenes* não foram afetados quando inoculados na sopa nos níveis de 2,20 log UFC/ml, 4,20 log UFC/ml e 5,90 log UFC/ml, submetidos à ação das microondas por 10 minutos e mantidos por 4 minutos em tempo de espera.

TABELA 6. Temperatura (oC) da solução salina fisiológica durante o aquecimento em forno de microondas em potência média por 4 minutos no centro do prato giratório.

Tempo de aquecimento (minutos)				
0	1	2	3	4
22	41	46	70	65
20	38	42	63	76
22	41	51	62	72
21	44	47	54	68

TABELA 7. Temperaturas registradas no visor do forno de microondas durante o aquecimento em potência média de 300 g de sopa de vegetais com intervalos de 1 minuto. Temperatura inicial da sopa: 25 oC \pm 1 oC

Ensaio	Prova	Tempo de aquecimento (minutos)			
		1	2	3	4
I	1	36			
	2	38	47		
	3	41	52	59	
	4	34	44	50	56
II	1	39			
	2	37	46		
	3	34	41	48	
	4	32	39	45	50
III	1	39			
	2	37	44		
	3	37	45	50	
	4	36	44	51	55
IV	1	35			
	2	32	39		
	3	34	41	46	
	4	35	42	47	54
V	1	39			
	2	36	49		
	3	40	50	57	
	4	39	45	50	55
VI	1	46			
	2	48	59		
	3	50	59	59	
	4	42	37	40	44
VII	1	42			
	2	50	62		
	3	40	52	63	
	4	40	56	66	74

TABELA 8. Sobrevivência de *Escherichia coli* (log UFC/ml) em sopa de vegetais e temperatura atingida (oC) durante o aquecimento em forno de microondas em potência média por 4 minutos. Temperatura inicial da sopa = 25 oC \pm 1 oC

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)							
		1		2		3		4	
		E. coli	T oC	E. coli	T oC	E. coli	T oC	E. coli	T oC
1	4,50	4,78	36	4,90	47	4,57	59	3,90	56
2	4,80	4,91	39	4,84	46	4,87	48	4,72	50
3	4,79	4,74	39	4,74	44	4,78	50	4,61	55
4	4,48	4,47	35	4,53	39	4,38	46	4,34	54
5	4,38	4,39	39	4,41	49	4,38	57	4,25	55
6	4,39	4,38	46	4,39	59	4,41	59	4,18	44
7	4,48	4,48	41	4,68	62	4,80	63	*	74

* = perdido por acidente de laboratório

TABELA 9. Sobrevivência de *Escherichia coli* (log UFC/ml) em sopa de vegetais e temperatura T atingida (oC) durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta por 3 minutos. Temperatura inicial da sopa = 25 oC ± 1 oC

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)					
		1		2		3	
		<u>E.coli</u>	<u>T</u> (oC)	<u>E.coli</u>	<u>T</u> (oC)	<u>E.coli</u>	<u>T</u> (oC)
1	2,66	2,64	43	2,41	51	< 1	89
2	2,66	2,46	49	< 1	70	< 1	82
3	2,66	2,46	51	< 1	69	< 1	83
4	4,68	4,80	46	2,43	70	< 1	87
5	4,68	4,36	44	2,00	71	< 1	87
6	4,68	4,63	48	1,04	72	< 1	87
7	6,69	6,61	45	< 1	67	< 1	83
8	6,69	6,25	46	< 1	70	< 1	84
9	6,69	6,58	48	< 1	69	< 1	80

TABELA 10. População de *Escherichia coli* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta por 3 minutos nos meios TSA e VRB.

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)					
		1		2		3	
		TSA	VRB	TSA	VRB	TSA	VRB
1	2,66	2,64	2,52	2,41	2,30	< 1	< 1
2	2,66	2,46	2,34	< 1	< 1	< 1	< 1
3	2,66	2,46	2,38	< 1	< 1	< 1	< 1
4	4,68	4,80	4,53	2,43	< 1	< 1	< 1
5	4,68	4,36	4,30	2,00	< 1	< 1	< 1
6	4,68	4,63	4,50	1,04	< 1	< 1	< 1
7	6,69	6,61	6,57	< 1	< 1	< 1	< 1
8	6,69	6,25	6,32	< 1	< 1	< 1	< 1
9	6,69	6,58	6,42	< 1	< 1	< 1	< 1

TABELA 11. Sobrevivência de esporos de *Bacillus cereus* (log UFC/ml) nos meios TSA e PE e temperatura T (oC) atingida durante o aquecimento de sopa de vegetais em forno de microondas em potência alta por 3 minutos. Temperatura inicial da sopa = 25 oC \pm 1 oC

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)					
		1			2		
		TSA	PE	T (oC)	TSA	PE	T (oC)
1	2,52	2,52	2,52	48	2,50	2,68	71
2	2,52	2,52	2,00	47	2,38	2,52	69
3	2,52	2,38	2,34	48	2,30	2,25	69
4	4,69	4,89	4,00	48	4,68	4,81	71
5	4,69	4,92	4,00	49	4,72	4,80	70
6	4,32	4,26	4,33	46	4,29	4,33	70
7	6,33	6,30	6,32	46	6,26	6,32	70
8	6,33	6,44	6,41	47	6,28	6,48	71
9	6,33	6,47	6,41	46	6,42	6,32	67

=====
continua...

TABELA No 11 (continuação...)

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)		
		3		
		TSA	PE	T (°C)
1	2,52	2,25	2,30	84
2	2,52	2,36	2,00	83
3	2,52	< 1	2,22	81
4	4,69	3,92	3,85	84
5	4,69	4,55	4,69	85
6	4,69	4,22	4,17	85
7	6,33	5,51	5,08	83
8	6,33	5,52	5,66	85
9	6,33	5,39	5,50	83

TABELA 12. Sobrevivência de esporos de *Bacillus cereus* (log UFC/ml) em sopa de vegetais e temperatura T (oC) atingida durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta por 6 minutos. Temperatura inicial da sopa = 25 oC ± 1 oC

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)					
		1		2		3	
		TSA	T (oC)	TSA	T (oC)	TSA	T (oC)
1	2,11	1,95	44	1,48	67	1,48	84
2	2,11	2,11	45	1,98	67	1,48	83
3	2,11	2,15	45	2,00	67	1,81	84
4	4,11	4,08	48	4,11	69	3,86	83
5	4,11	4,15	49	3,93	70	3,32	85
6	4,11	4,00	46	4,04	65	3,58	82
7	6,18	6,11	46	6,04	73	4,88	81
8	6,18	6,05	47	5,98	71	4,80	80
9	6,18	5,65	46	5,36	71	4,76	82

continua...

TABELA 12 (continuação...)

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)					
		4		5		6	
		TSA	T (°C)	TSA	T (°C)	TSA	T (°C)
1	2,11	<1	87				
2	2,11	<1	85				
3	2,11	<1	87				
4	4,11	1,54	88	<1	86		
5	4,11	<1	88	<1	87		
6	4,11	2,08	87	<1	88		
7	6,18	3,77	86	1,81	86	<1	84
8	6,18	3,61	85	1,28	86	<1	83
9	6,18	3,04	89	<1	88	<1	86

TABELA 13. Sobrevivência de esporos de *Bacillus cereus* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta por 6 minutos observada nos meios TSA e PE

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)					
		1		2		3	
		TSA	PE	TSA	PE	TSA	PE
1	2,11	1,89	#	1,55	1,02	1,50	<1
2	2,11	2,12	2,18	2,00	<1	1,50	1,00
3	2,11	2,12	2,00	2,08	2,00	1,78	<1
4	4,11	4,08	4,00	4,10	3,92	3,95	3,92
5	4,11	4,10	4,00	3,87	3,74	3,31	3,31
6	4,11	4,02	4,00	3,96	4,08	3,63	3,64
7	6,18	6,15	6,03	5,99	6,03	4,95	4,90
8	6,18	6,01	6,06	6,07	6,06	4,88	4,72
9	5,99	5,62	5,55	5,38	5,60	4,82	5,05

continua ...

= perdido por acidente de laboratório

TABELA 13 (continuação...)

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)					
		4		5		6	
		TSA	PE	TSA	PE	TSA	PE
1	2,11	<1	<1				
2	2,11	<1	<1				
3	2,11	<1	<1				
4	4,11	1,41	1,85	<1	<1		
5	4,11	<1	<1	<1	<1		
6	4,11	2,15	2,28	<1	<1		
7	6,18	3,78	3,81	2,82	3,35	<1	<1
8	6,18	3,64	3,55	1,29	1,00	<1	<1
9	5,99	3,01	3,35	<1	<1	<1	<1

TABELA 14 Sobrevivência de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 em sopa de vegetais e temperatura (°C) atingida durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta. Temperatura inicial da sopa 25 °C ± 1°C

Ensaio	Inóculo (log UFC/ml)	Tempo de aquecimento (minutos)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
		PA 3679 (°C)	T 3679 (°C)	PA 3679 (°C)	T 3679 (°C)	PA 3679 (°C)	T 3679 (°C)	PA 3679 (°C)	T 3679 (°C)	PA 3679 (°C)	T 3679 (°C)	PA 3679 (°C)	T 3679 (°C)	PA 3679 (°C)	T 3679 (°C)						
1	2,20	2,04	48	2,77	73	2,15	82	2,23	85	2,15	86	2,17	83	2,11	87	2,11	83	1,97	84	2,17	86
2	2,20	2,25	44	2,00	67	2,00	83	2,11	84	2,00	85	2,11	86	2,50	85	2,11	83	2,30	83	2,17	86
3	2,20	2,43	47	2,46	70	2,41	83	2,43	83	2,50	87	2,36	88	2,34	87	2,20	86	2,34	86	2,48	86
4	4,20	4,04	47	4,04	71	4,00	87	4,04	86	3,97	86	3,92	83	3,99	86	4,04	86	4,04	87	4,00	86
5	4,20	4,50	47	3,87	68	4,08	84	4,04	86	4,04	89	4,04	86	4,08	88	x	84	x	83	x	86
6	4,20	4,15	47	4,17	67	4,15	82	4,12	83	4,11	87	4,12	87	4,11	87	4,18	86	4,20	85	4,28	86
7	5,90	5,75	46	x	71	5,85	81	5,81	84	5,88	85	6,00	85	6,00	85	5,96	83	5,99	84	6,02	86
8	5,90	5,87	45	5,82	69	5,85	80	5,84	86	5,83	89	5,85	86	5,80	86	5,81	86	5,87	84	5,81	86
9	5,90	5,80	46	5,81	68	5,85	81	5,94	85	5,82	84	5,86	83	5,85	85	5,73	84	5,78	82	5,75	86

x= perdido por acidente de laboratório

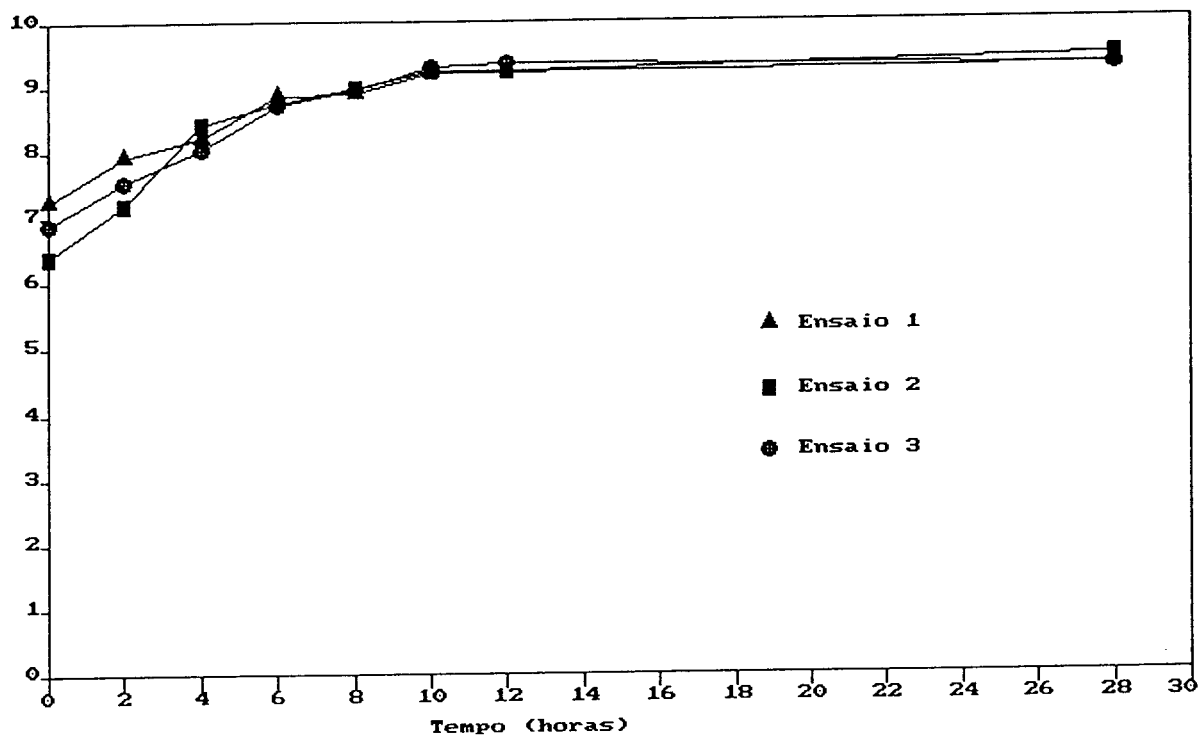


FIGURA 7. Curva de crescimento de *Escherichia coli* em caldo T.S.B. a 35 oC \pm 1 oC.

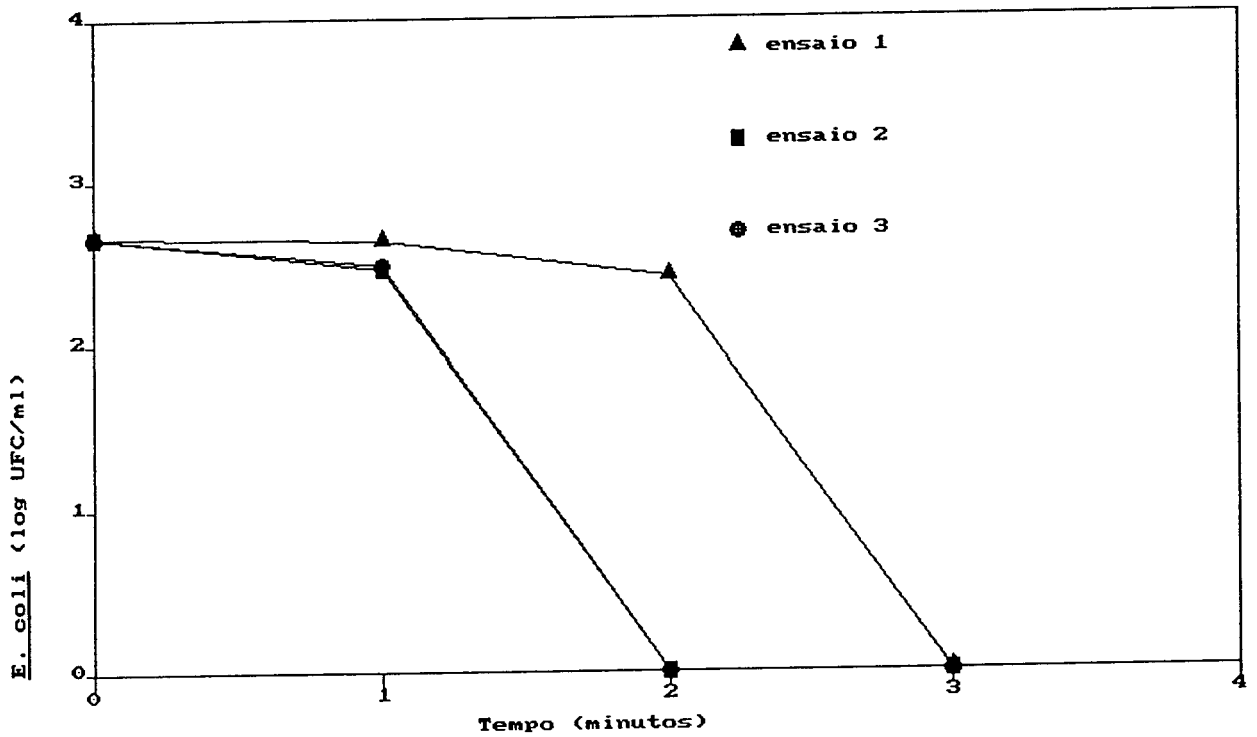


FIGURA 8. População de *Escherichia coli* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta. Temperatura inicial da sopa: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. População inicial: 2.66 log UFC/ml

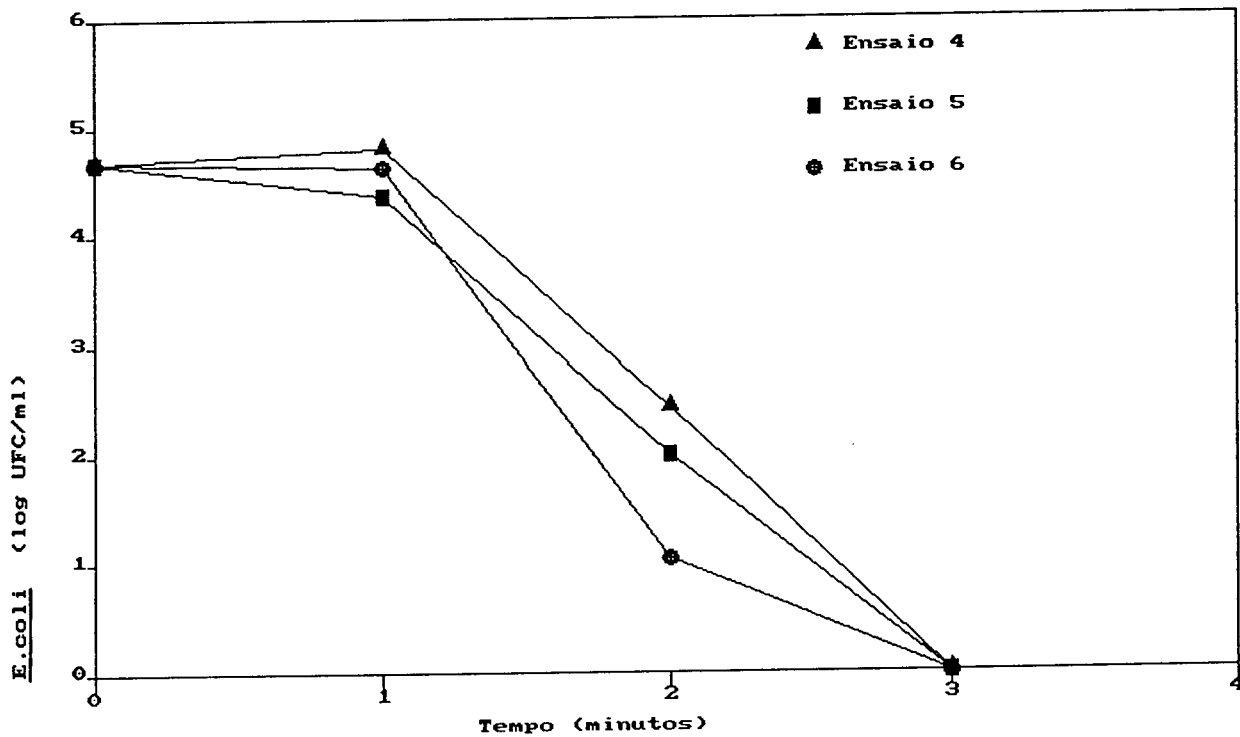


FIGURA 9. População de *Escherichia coli* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta. Temperatura inicial da sopa: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. População inicial: 4.68 log UFC/ml

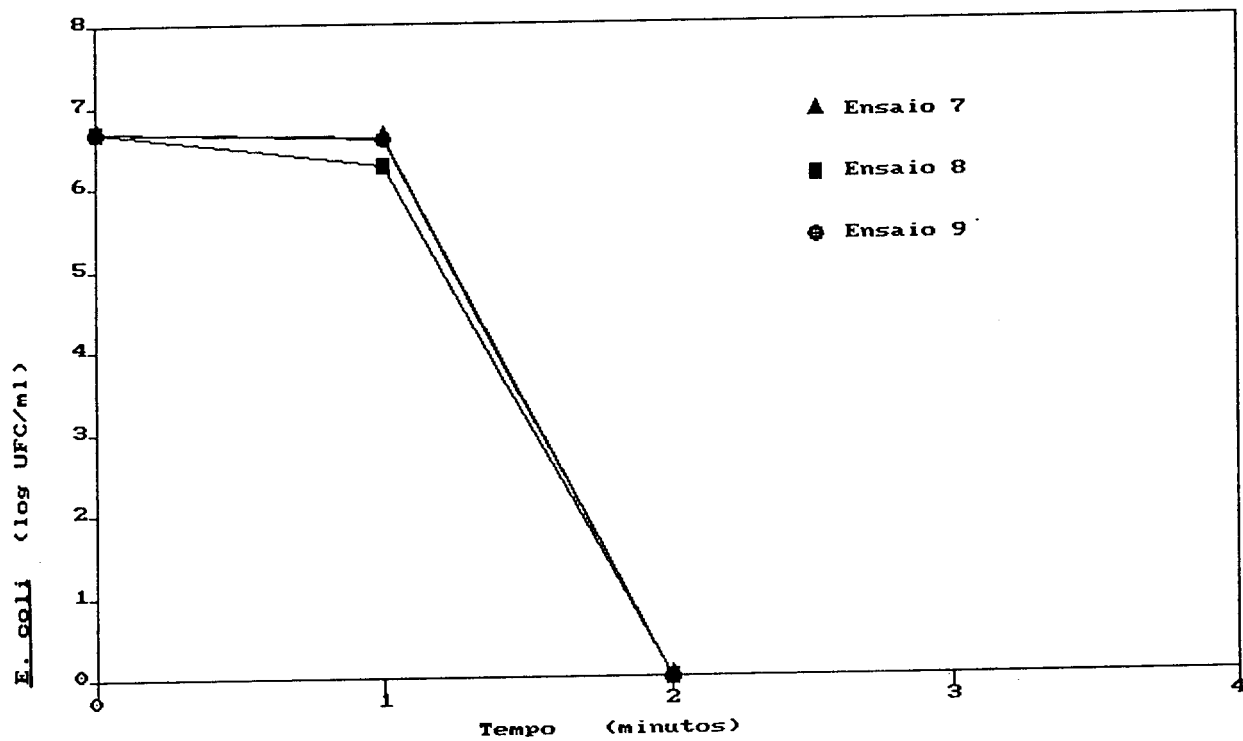


FIGURA 10. População de *Escherichia coli* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta. Temperatura inicial da sopa: 25 °C ± 1 °C. População inicial: 6.69 log UFC/ml

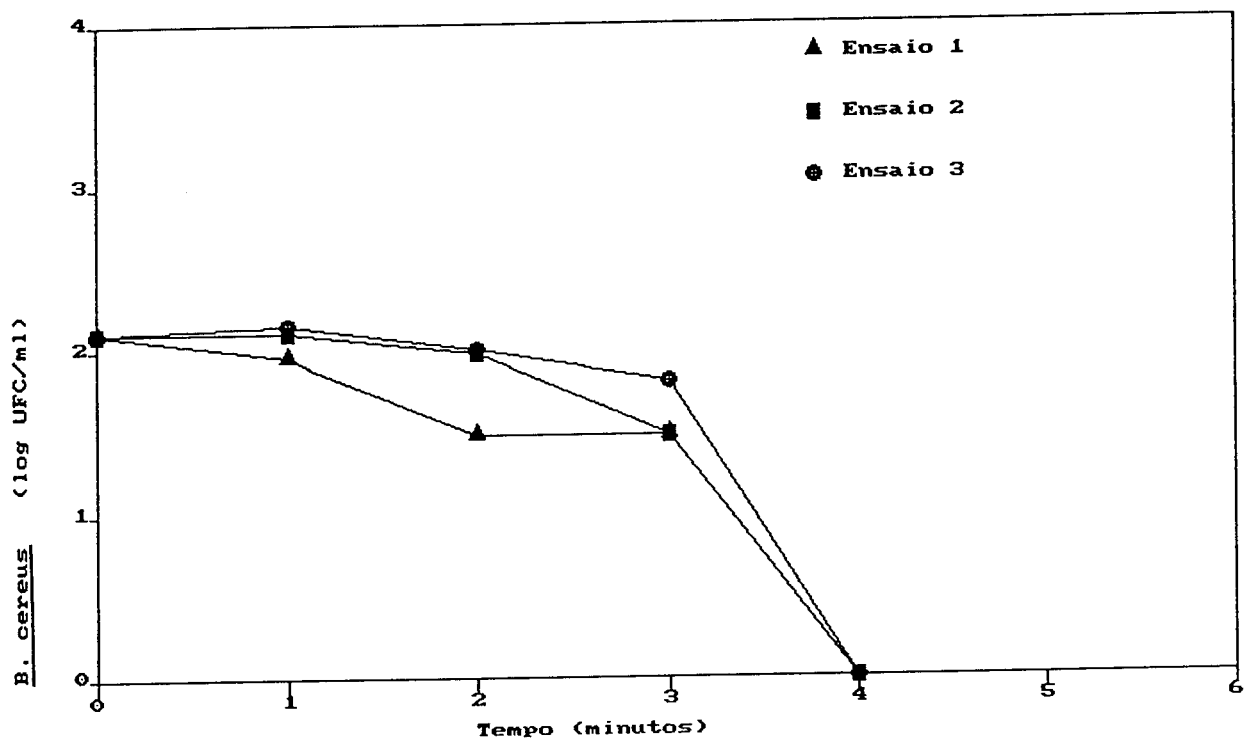


FIGURA 11. População de esporos de *Bacillus cereus* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta.
 Temperatura inicial da sopa : $25\text{ oC} \pm 1\text{ oC}$
 População inicial: 2.11 log UFC/ml

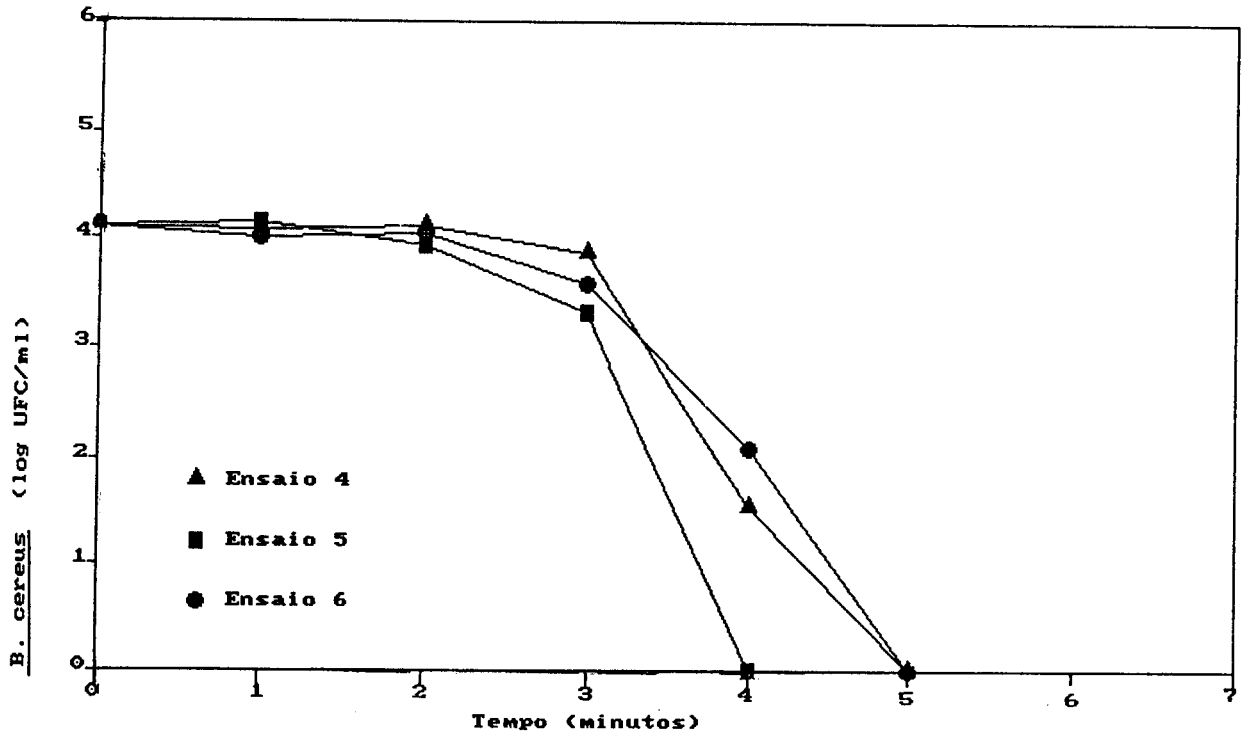


FIGURA 12. População de esporos de *Bacillus cereus* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta. Temperatura inicial da sopa: 25 °C ± 1 °C. População inicial: 4.11 log UFC/ml

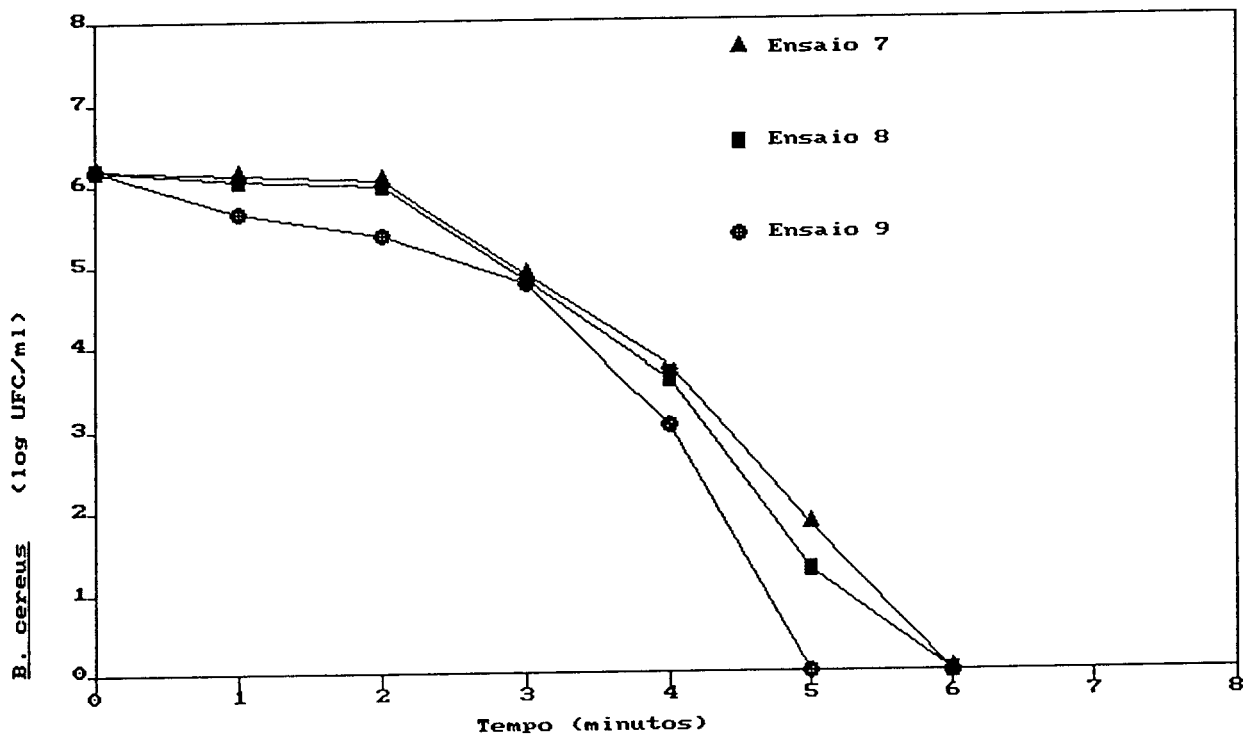


FIGURA 13. População de esporos de *Bacillus cereus* (log UFC/ml) em sopa de vegetais durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta. Temperatura inicial da sopa: 25 °C ± 1 °C. População inicial: 6.18 log UFC/ml

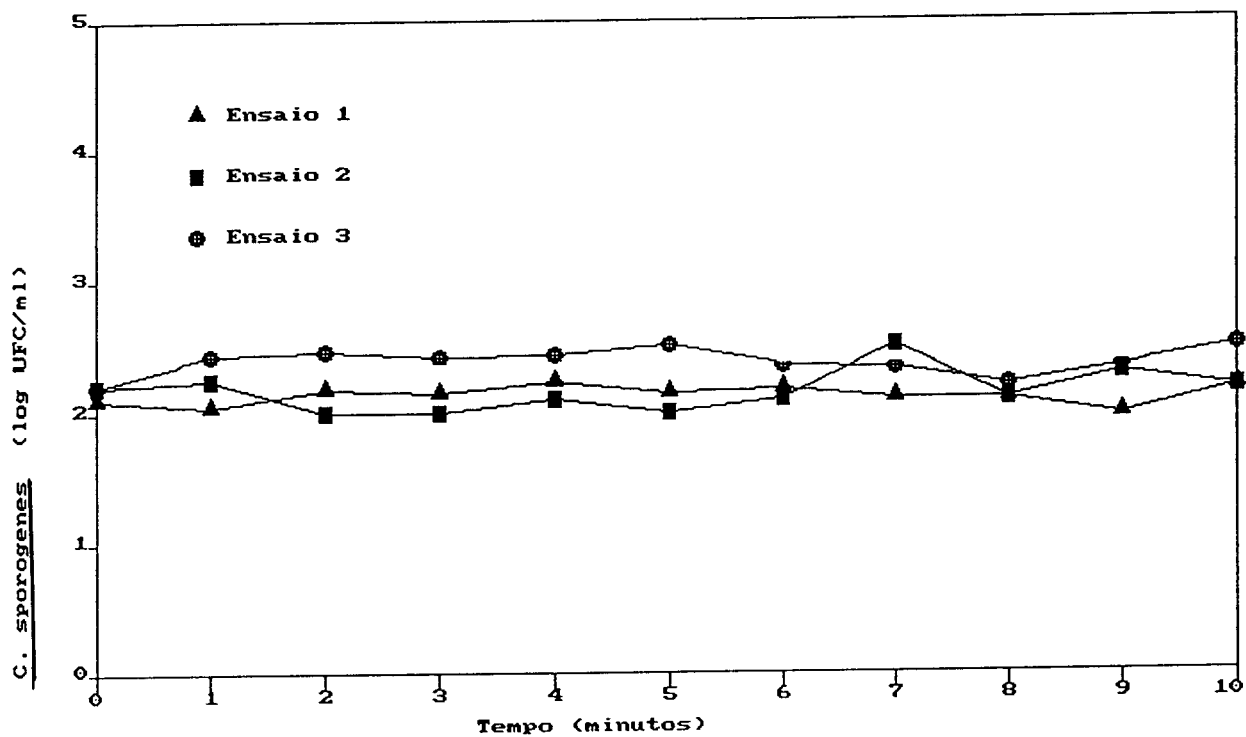


FIGURA 14. População de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 (log UFC/ml) em sopa de vegetais de pH= 5,4 durante o aquecimento em forno de microondas em Temperatura inicial da sopa: 25 oC \pm 1 oC. População inicial: 2.2 log UFC/ml

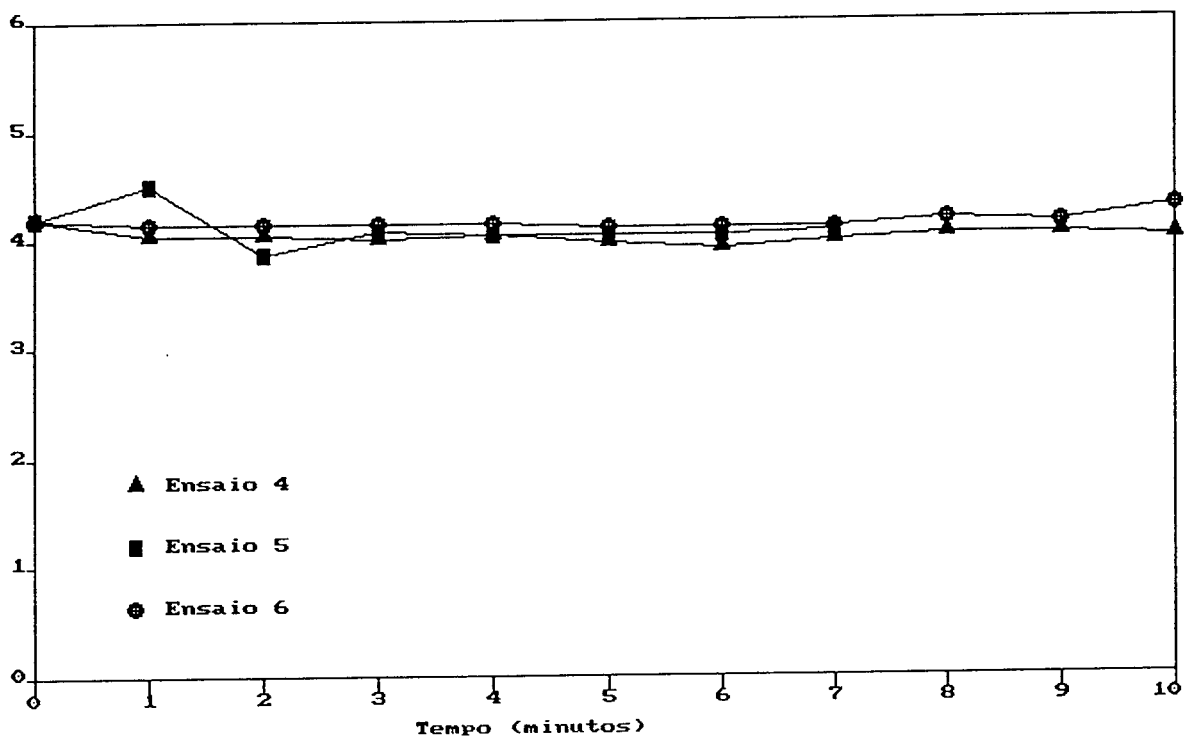


FIGURA 15. População de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 (log UFC/ml) em sopa de vegetais de pH= 5,4 durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta.
 Temperatura inicial da sopa: 25 oC \pm 1 oC.
 População inicial: 4.2 log UFC/ml

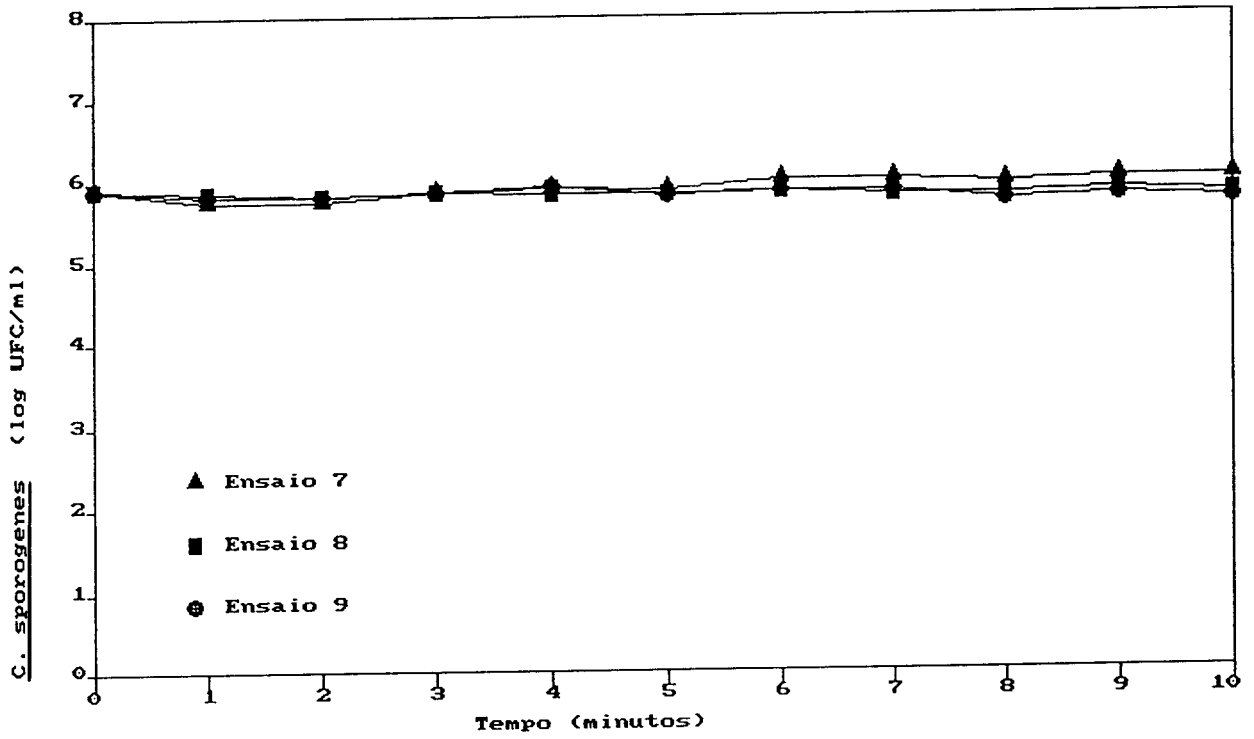


FIGURA 16. População de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 (log UFC/ml) em sopa de vegetais de pH= 5,4 durante o aquecimento em forno de microondas em potência alta.
 Temperatura inicial da sopa: 25 oC \pm 1 oC.
 População inicial: 5.9 log UFC/ml

R E F E R Ê N C I A S B I B L I O G R Â F I C A S

- 1) ALEIXO, J.A.G.; SWAMINATHAN, B.; JAMESEN, K.S.; PRATT, D
E. Destruction of pathogenic bacteria in turkey
toasted in microwave ovens. Journal of Food Science
50 (4):873-876, 1985

- 2) ANNIS, P.J. Design and use of domestic microwave
ovens. Journal of Food Protection 43 (8): 629-632,
1980

- 3) BAKANOWSKI, S.M. & ZOLLER, J.M. Endpoint temperature
distributions in microwave and conventionally
cooked pork. Food Technology 38 (2): 45-51, 1984

- 4) BALDWIN, R.E.; FIELDS, M.L.; POON, W.C. ; KORSCHGEN,
B. Destruction of *Salmonella* by microwave heating
of fish with implications for fish products.
Journal of Milk Food Technology 43 (10): 467-470,
1981

- 5) BAKER, R.C.; POON, W.; VADEHA, D.V. Destruction of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in poultry products cooked in a conventional and a microwave oven. Poultry Science 62 (5): 805-810, 1983
- 6) BLANCO, J.F. & DAWSON, L.E. Survival of *Clostridium perfringens* on chicken cooked with microwave energy. Poultry Science 53: 1820-1830, 1974
- 7) BROWN, G.H. & MORRISON, W.C. An exploration of the effects of strong radio-frequency fields on microorganisms in aqueous solutions. Food Technology 8: 361-363, 1954
- 8) BRUNCH, W,L.; MATTHEWS, M.E. & MARTH, E.H. Fate of *Staphilococcus aureus* in beef-soy loaves subjected to procedures used in hospital chill food service systems. Journal of Food Science 42 (2):55-56,1977
- 9) BURFOOT, D.; GRIFFIN, W.J. & JAMES, S.J. Microwave pasteurization of prepared meals. Journal of Food Engineering 8: 145-156, 1988
- 10) CARLIN, F.; ZIMMERMANN, W. ; SUNDBERG, A. Destruction of *Trichina* larvae in beef pork loaves cooked in microwave ovens. Journal of Food Science 47 (6): 1096-1099, 1982

- 11) CARROLL, L.E. Hydrocolloid functions to improve stability of microwavable foods. Food Technology 43 (6): 96-100, 1989
- 12) CHIPLEY, R. Effects of microwave irradiation on microorganisms-Review. Advances in Applied Microbiology 26: 129-145, 1980
- 13) COOTE, P.J.;HOLLYOAK, C.D.; COLE, M.B. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during a process simulating temperatures achieved during microwave heating. Journal of Applied Bacteriology 70 (6): 489-494, 1991
- 14) COPSON, D.A. *Microwave heating* Westpoint, Avi, 1975. 615 p.
- 15) CRAVEN, S.B. & LILLARD, H.S. Effect of microwave heating of precooked chicken on *Clostridium perfringens*. Journal of Food Science 39 (1): 211-212, 1974
- 16) CULKIN, K.A. & FUNG, D.Y.C. Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave cooked soups. Journal of Milk Food Technology 38 (1): 8-15, 1975

- 17) CUNNINGHAM, F.E. The effect of brief microwave treatment on numbers of bacteria in fresh chickens patties. Journal of Food Protection 40 (4): 296-297, 1977
- 18) CUNNINGHAM, F.E. Influence of microwave radiation on psychrotrophic bacteria. Journal of Food Protection 43 (8): 651-655, 1980
- 19) CURNUTE, B. Principles of microwave radiation. Journal of Food Protection 43 (8): 618-624, 1980
- 20) DAHL, C.A.; MATTHEWS, M.E.; MARTH, E.H. Cook/chill foodservice system: microbiological quality of beef loaf at five process stages. Journal of Food Protection 41 (10): 788-793, 1978
- 21) DAHL, C.A.; MATTHEWS, M.E.; MARTH, E.H. Fate of *Staphylococcus aureus* in beef loaf, potatoes and frozen and canned green beans after microwave heating in a simulated cook/chill hospital foodservice system. Journal of Food Protection 43 (12): 916-926, 1980
- 22) DAHL, C.A.; MATTHEWS, M.E.; MARTH, E.H. Survival *Streptococcus faecium* in beef loaf and potatoes after microwave heating in a simulated cook/chill foodservice system. Journal of Food Protection 44 (2): 128-133, 1981

- 23) DATTA, A.K. & HU, W. Optimization of quality in microwave heating. Food Technology 46 (12):53-56, 1992
- 24) DATTA, A.K. & LIU, J. Thermal time distributions for microwave and conventional heating of food. Food & Bioproducts Processing 70 (C2): 83-90, 1992
- 25) DEALLER, S.F.; ROTOWA, N.A.; LACEY, R.W. Ionized molecules reduce penetration of microwaves in foods. International Journal of Food Science and Technology 27 (2):153-157, 1992
- 26) DECAREAU, R.V. For microwave heating tune to 915 Mc or 2450 Mc. Food Engineering July: 54-56, 1965
- 27) DECAREAU, R.V. *Microwaves in the Food Processing Industry*. Academic Press, Inc. Food Science and Technology, 1985. 234 p.
- 28) DEHNE, L.I.; BÖGL, W. ; GROSSKLAUS, D. Einfluss der Mikrowellenerwärmung auf der Nährwert tierischer Lebensmittel. Fleischwirtschaft 63(2):231-237, 1983
- 29) DEHNE, L.I. The Role of cooking salt content in microwave heating: is there a hygienic risk? Bundesgesundheitsblatt 34 (8):361-363, 1991

- 30) DENNY, C.B. & CORLETT, Jr. D.A. Canned foods-tests for cause of spoilage. In: VANDERZANT, C & SPLITTOESER, D. F. ed. *Compendium of methods for the examination of foods*. 3.ed. Washington, D.C. APHA, 1992. p.231-244
- 31) DIAZ-CINCO, M. & MARTINELLI, S. The use of microwaves in sterilization. Dairy, Food and Environmental Sanitation 11 (12): 722-724, 1991
- 32) DIFCO LABORATORIES. *Difco manual* 10. ed. Detroit, 1984. 1155p.
- 33) DREYFUSS, M.S. & CHIPLEY, J.R. Comparison of effects of sublethal microwave radiation and conventional heating on the methabolic activity of *Staphylococcus aureus*. Applied & Environmental Microbiology 39 (1):13-16, 1980
- 34) FAHKOURI, M.O. & RAMASWAMY, H.S. Temperature uniformity of microwave heated foods as influenced by product type & composition. Food Research International 26 (2): 89-95, 1993
- 35) FOEGEDING, P.M. & RAY, B. Repair and detection of injured microorganisms In: VANDERZANT, C & SPLITTOESER, D. F. ed. *Compendium of methods for the examination of foods*. 3.ed. Washington, D.C. APHA, 1992. p.121-134

- 36) FRANZESE, R. A Microwave system for hospital food service. The Microwave Energy Applied Newsletter 10 (4):5-8, 1977
- 37) FUJIKAWA, H.; USHIODA, H.; KUNDO, Y. Kinetics of *Escherichia coli* destruction by microwave irradiation. Applied and Environmental Microbiology 58 (3):920-924, 1992
- 38) FUNG, D.Y.C. & CUNNINGHAM, F.E. Effect of microwaves on microorganisms in foods. Journal of Food Protection 43 (8):641-650, 1980
- 39) GEORGE, R.M. Recent progress in product, package and process design for microwavable foods. Trends in Food Science & Technology 4 (12):390-394, 1993
- 40) GEVAUDAN, M.J.; GULIAN, C.; BOURZEIX, S. A propos de l'utilisation des fours à micro-ondes et des auto cuissers pour la decontamination des aliments destinés aux malades immuno-déprimés. Revue Française de Dietetique 31 (120):23-29, 1987
- 41) GIESE, J. Advances in microwave food processing Food Technology 46 (9):118-123, 1992
- 42) GOLDBLITH, S. & WANG, D.I.C. Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology 15 (6):1371-1375, 1967

- 43) GRISCHY, R.O.; SPECK, R.V.; ADAMS, D.M. New media for enumeration and detection of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. Journal of Food Science 48 (6): 1466-1469, 1983
- 44) GROSS, C.E.; VINTON, C.; STUMBO, C.R. Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meat. Characteristics of putrefactive anaerobe used in thermal resistance studies. Food Research 11 (5): 405-410, 1946
- 45) HARMON, S.M.; GOEPFERT, J.M.; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus* In: VANDERZANT, C & SPLITTOESER, D. F. ed. *Compendium of methods for the examination of foods*. 3.ed. Washington, D.C. APHA, 1992. p.593-604
- 46) HARRISON, D.L. Microwave versus conventional cooking methods: effects on food quality attributes Journal of Food Protection 43 (8): 633-637, 1980
- 47) HAUSCHILD, A.H.W.; ARIS, B.J.; HILSHEIMER, R. *Clostridium botulinum* in marinated products. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 8 (2):84-87, 1975
- 48) HAUSCHILD, A.H.W. & HILSHEIMER, R. *Clostridium botulinum* spores in meats by a pour-plate procedure. Canadian Journal of Microbiology 23: 829-832, 1977

- 49) HEDDLESON, R.A.; DOORES, S.; ANANTHESWARAN, R.C.;
KUHN, G. Destruction of *Salmonella* species heated
in aqueous salt solutions by microwave energy.
Journal of Food Protection 56 (9):763-768, 1993
- 50) HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A.; TODD, E.C. Coliforms-
Escherichia coli and its toxins. In: VANDERZANT, C.
& SPLITTOESER, D. F. ed. *Compendium of methods for
the examination of foods*. 3.ed. Washington, D.C.
APHA, 1992. p.325-369
- 51) HOFFMAN, C.J. & ZABIK, M.E. Effects of microwave
cooking/reheating on nutrients and food systems:
A review of recent studies. Journal of the
American Dietetic Association 85 (8):922-926, 1985
- 52) HOLLYWOOD, N.W.; VARABIOFF, Y.; MITCHELL, G.E. The
effect of microwave and conventional cooking on the
temperature profiles and microbial flora of minced
beef. International Journal of Food Microbiology
14(1): 67-76, 1991
- 53) HUANG, Y.; LEUNG, C.; HARRISON, M.A.; GATES, K.W.
Fate of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas
hydrophila* on catfish fillets cooked in a microwave
oven. Journal of Food Science 58 (3):519-521, 1993

- 54) INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS.(ICMSF) Microorganisms in Foods: their significance and methods of enumeration. 2. ed. University of Toronto Press, 1978. 436 p.
- 55) INSTITUTO ADOLFO LUTZ, SÃO PAULO Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1976. v.1
- 56) ISHITAMI, T.; KOJO, T.; YANAI, S. Effects of microwave irradiation on mould spores. Report of the National Food Research Institute 38: 102-105, 1981
- 57) JAY, J.M. Modern food microbiology. 4.ed. New York, AVI/ van Nostrand Reinhold, 1991. 701p.
- 58) KAUTTER, D.A.; LYNT, R.; LAUDRY, W.L.; LANIER, J.M.; SCHAWB, A.H. Examination of canned food. In: Bacteriological Analytical Manual 6.ed. 1984 p. 23.01-23.19
- 59) KHALIL, H. & VILLOTA, R. Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating. Journal of Food Protection 51 (3):181-186, 1988

- 60) KHALIL, H. & VILLOTA, R. The effect of microwave sublethal heating on the ribonucleic acids of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection 52 (8): 544-548, 1989
- 61) KNUTSON, K.M.; MARTH, E.H.; WAGNER, M.K. Use of microwave ovens to pasteurize milk. Journal of Food Protection 51 (9):715-719, 1988
- 62) KRAMER, J.M. & GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species In: DOYLE, M.P. *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, 1989 p.21-63
- 63) LAKE, D.E.; BERNARD, D.T. & KAUTTER, D.A. Mesophilic anaerobic sporeformers. In: VANDERZANT, C. & SPLITTOESER, D.F. ed. *Compendium of methods for the examination of foods*. 3.ed. Washington, D.C. APHA, 1992. p.275-289
- 64) LAMBERT, J.P. Biological hazards of microwave radiation. Journal of Food Protection 43 (8): 625-628, 1980
- 65) LECHOWICH, R.V.; BEUCHAT, L.R.; FOX, K.I.; WEBSTER, F.H. Procedure for evaluating the effects of 2450 MHz microwaves upon *Streptococcus faecalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology 17 (1):106-110, 1969

- 66) LEON CRESPO, F.; OCKERMAN, H.W.; IRVIN, K.M.
Effect of conventional and microwave heating on
Pseudomonas putrefasciens, *Streptococcus faecalis*
and *Lactobacillus plantarum* in meat tissue.
Journal of Food Protection 40 (9):588-591, 1977
- 67) LEITÃO, M.F.F. Microbiologia da alimentos. In:
ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. ed.
Tratado de microbiologia. 1.ed. São Paulo.
Manole, 1987. p.31-75
- 68) LIN, W. & SAWYER, C. Bacterial survival and thermal
responses of beef loaf after microwave processing.
Journal of Microwave Power and Electromagnetic
Energy 26 (3): 183-194, 1988
- 69) LINDSAY, R.E.; KRISSENGER, W.; FIELDS, B.F.
Microwave versus conventional oven cooking of
chicken: relationship of internal temperature to
surface contamination by *Salmonella typhimurium*.
Journal of American Dietetic Association 83 (3):
373-374, 1986
- 70) MATTHEWS, M.E. Microwave ovens: effects on food
quality and safety. Journal of the American
Dietetic Association 85 (8):919-921, 1985
- 71) Mc GINLEY, E.J. Hydrocolloid functions to improve
stability of microwavable foods. Food Technology

- 72) MELLO SERRANO, A.M. & JUNQUEIRA, V.C.A. Toxigênese de *Clostridium botulinum* em patê de frango submetido à estocagem inadequada. Higiene Alimentar 5(18): 25-28, 1991
- 73) MIAN, S.M.; VALDEZ, A.J. Funcionamento do forno de microondas. São Paulo, Instituto do frio, março 1992 (palestra)
- 74) MICROWAVE magic Food Manufacture 63(5): 53-55, 1988
- 75) MUDGETT, R.E. Microwave properties and heating characteristics of food. Food Technology 40 (6): 84-93, 1986
- 76) OHLSSON, T. & RISMAN, P.O. Temperature distribution of microwave heating in spheres and cylinders. Journal of Microwave Power 13 (4):303-310, 1978
- 77) OHLSSON, T. Methods for measuring temperatures distribution in microwave ovens. Microwave World March/April: 14-17, 1981
- 78) OHLSSON, T. Fundamentals of microwave cooking. Microwave World 4 (2):4-9, 1983

- 79) OKERMAN, H.W.; CAHILL, V.R.; OLIMPTON, R.F.; PARRETT, N.A. Cooking inoculated pork in microwave and conventional oven. Journal of Milk Food Technology 39 (11):771-773, 1976
- 80) OLSEN, C.M. Microwaves inhibit bread mold. Food Engineering, July :51-53, 1965
- 81) OLSEN, C.M.; DRAKE, C.L.; BUNCH, S.L. Some biological effects of microwave energy. Journal of Microwave Power 1 (2): 45-56, 1966
- 82) PAGE, W.J. & MARTIN, W.G. Survival of microbial films in the microwave ovens. Canadian Journal of Microbiology. vol 24:1431-1433, 1985
- 83) PIERSON, M. & STERN, N., ed. Foodborne microorganisms and their toxins: developing methods. New York, Marcel Dekker, 1986. 475p. (IFT Basic Symposium Series)
- 84) PFLUG, I.J.; SCHEYER, G.M.; SMITH, G.M.; KOPELMAN, D. Evaluation of recovery media for heated *Clostridium sporogenes* spores. Journal of Food Protection 42 (12): 946-947, 1979
- 85) POLVINO, D.A. & BERNARD, D.T. Media comparison for the enumeration and recovery of *Clostridium sporogenes* P.A. 3679 spores. Journal of Food

- 86) ROSEN, C.G. Effects of microwaves on food and related materials. Food Technology 26 (7): 36-40,55, 1972
- 87) ROSENBERG, U. & BÖGL, W. Der Einfluss der Mikrowellenheizung auf der Keimgehalt von Lebensmitteln. Fleischwirtschaft 862 (9): 1182-1187, 1982
- 88) ROSENBERG, U. & BÖGL, W. Microwave thawing, drying and baking in the food industry. Food Technology 41 (6): 85-91, 1987
- 89) SANTO GOLDONI, J.; KOJIMA, S.; LEONARD, S.; HEIL, J.R. Growing spores of P.A.3679 in formulations of beef heart infusion broth. Journal of Food Science 45 (3):467-469, 1980
- 90) SASTRY, S.K. & PALANIAPPAN, S. The temperature difference between a microorganism and a liquid medium during microwave heating. Journal of Food Processing and Preservation 15 (3):225-230, 1991
- 91) SAYAO, F. Forno de microondas começa a se popularizar. Folha de São Paulo. Caderno 2, p.5 24 abr. 1993

- 92) SAWYER, C.A.; ANIDER, Y.M.; THOMPSON, S. Cook/Chill foodservice systems: microbiological quality and end-point temperature on beef loaf peas and potatoes after reheating by conduction, convection and microwave radiation. Journal of Food Protection 46 (12): 1036-1043, 1983
- 93) SAWYER, C.A.; BIGLARI, S.A.; THOMPSON, S.S. Internal temperature and survival of bacteria on meats with and without a polyvinylidene chloride wrap during microwave cooking. Journal of Food Science 49 (3):972-974, 1984
- 94) SCHIFFMANN, R.F. Food product development for microwave processing. Food Technology 40 (6):94-98, 1986
- 95) SPITE, G.T. Microwave inactivation of bacterial pathogens in various controlled frozen food compositions and in a commercially available frozen food product. Journal of Food Protection 47 (6): 458-462, 1984
- 96) STEVENSON, K.E. & SEGNER, W.P. Mesophilic aerobic sporeformers. In: VANDERZANT, C. & SPLITTOESER, D. F. ed. *Compendium of methods for the examination of foods*. 3.ed. Washington, D.C. APHA, 1992. p.265-274.

- 97) STUMBO, C.R. Thermobacteriology in food processing
New York, Academic Press, 1965. 236 p. (Food
Science and Technology. A serie of monographs)
- 98) THUERY, J. *Les microondes et leur effets sur la
matière : applications industrielles, agro-
alimentaires et medicales.* Paris, Technique et
Documentation, 1983. 366p. (Actualités
scientifiques et techniques dans les industries
agro-alimentaires, 32)
- 99) VALDEZ Jr. A. Funcionamento do forno de microndas.
São Bernardo do Campo, São Paulo, BRASTEMP
(Comunicação pessoal), 1992
- 100) VELA, G.R. & WU, J.F. Mechanism of lethal action
of 2450 MHz radiation on microorganisms. Applied
& Environmnetal Microbiology 37 (3):550-553, 1979
- 101) VOSS, W.A.G. Microwave safety: continuing
education is required. Microwave World. March/
April, 10-13, 1981
- 102) WATANABE, W. & TAPE, N.W. Microwave processing of
wieners. Effect on microorganisms. Canadian
Institute of Food Technology Journal 2 (3):104-
106, 1969

- 103) ZIMMERMANN, W.J. Evaluation of microwave cooking procedures and ovens for devitalizing *Trichinae* in pork roasts. Journal of Food Science 48 (4): 856-860, 1983