

## **CONTROLE ALTERNATIVO DE *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis EM MANGA (*Mangifera indica* L.) PÓS-COLHEITA.**

CLARA C. TOKIMATU<sup>1</sup>; MARIA FERNANDA P. P. M. de CASTRO<sup>2</sup>; JOSÉ M. M. SIGRIST<sup>3</sup>; VALÉRIA D. A. ANJOS<sup>4</sup>; ELIANE A. BENATO<sup>5</sup>; DANIEL TERAO<sup>6</sup>; SILVANA B. de OLIVEIRA<sup>7</sup>; ALFREDO A. VITALI<sup>8</sup>; SILVIA R. de T. VALENTINI<sup>9</sup>; ANA CAROLINA B. REZENDE<sup>10</sup>; ANA L. PENTEADO<sup>11</sup>; FLÁVIO L. SCHMIDT<sup>12</sup>

**Nº11248**

### **RESUMO**

A manga é uma fruta de grande expressão na exportação brasileira de frutas frescas, principalmente para os países do hemisfério Norte. No entanto, esta fruta foi implicada como veículo de *Salmonella*, em surtos de origem alimentar que ocorreram nos Estados Unidos, sendo que a água utilizada para o tratamento hidrotérmico foi a responsável pela contaminação das frutas. Esse procedimento é uma exigência das autoridades sanitárias americanas para eliminação de larvas de moscas. Não existem dados sobre a eficácia da adição do etanol no banho hidrotérmico visando o controle de *Salmonella* Enteritidis (SE) em manga, apenas para fitopatógenos em outras frutas. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da adição de etanol no banho hidrotérmico, visando o controle de SE, assim como os efeitos deste tratamento nas características físico-químicas da manga cv. 'Tommy Atkins'. Com relação às análises físico-químicas observou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos com as diferentes concentrações de etanol. Os ensaios *in vitro* utilizando tratamento hidrotérmico indicaram que as concentrações de 5,0%, 7,0% e 9,0% podem ser uma

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, clara\_tokimatu@hotmail.com.

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisadora, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

<sup>5</sup> Colaborador: Pesquisadora, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

<sup>6</sup> Colaborador: Pesquisador, Semiárido/EMBRAPA, Petrolina-PE.

<sup>7</sup> Colaborador: Doutoranda, FEA/UNICAMP, Campinas-SP.

<sup>8</sup> Colaborador: Pesquisador, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

<sup>9</sup> Colaborador: Pesquisadora, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

<sup>10</sup> Colaborador: Doutoranda, FCF/USP, São Paulo-SP.

<sup>11</sup> Colaborador: Pesquisadora, CTAA/EMBRAPA, Rio de Janeiro-RJ.

<sup>12</sup> Colaborador: FEA/UNICAMP, Campinas-SP.

alternativa viável para o controle de SE, já que houve reduções logarítmicas significativas do patógeno nessas concentrações.

## ABSTRACT

The mango fruit has great expression in Brazilian exports of fresh fruits, particularly for northern hemisphere countries. However, this fruit has been implicated as a vehicle of *Salmonella* in food-borne outbreaks that occurred in the United States, and the water used for hydrothermal treatment was responsible for the contamination of fruits. This procedure is a requirement of the American health authorities for the fly larvae elimination. There are no data on the effectiveness of adding ethanol into the hydrothermal bath for the control of *Salmonella* Enteritidis (SE) in mangoes, only for phytopathogens in other fruits. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of adding ethanol into the hydrothermal bath, for the control of SE. As well as the effects of this treatment on the physicochemical characteristics of mango cv. 'Tommy Atkins'. In relation to the physico-chemical analyses no significant differences between treatments with different concentrations of ethanol. The *in vitro* tests using hydrothermal treatment indicated that concentrations of 5.0%, 7.0% and 9.0% can be a viable alternative for the control of SE, since there were significant reductions of the pathogen in these logarithmic concentrations.

## INTRODUÇÃO

A manga é uma fruta de grande expressão na exportação brasileira de frutas frescas, principalmente para os países do hemisfério Norte, sendo que o Brasil é um dos poucos países que produz manga na entressafra mundial, época de pouca oferta, que torna uma alternativa frutícola de excelentes perspectivas econômicas (PIMENTEL et al., 2000). Em função disso, ocorreu uma rápida expansão da cultura, principalmente na região Nordeste que se destaca no “ranking nacional”, ocupando a posição de principal produtor com uma produção de 949.610 toneladas, numa área estimada em 73.239 hectares, ocupando o nono lugar como produtor mundial e quinto lugar nas exportações brasileiras. De acordo com o ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA (2011), em 2009 foram exportados 110 mil toneladas de manga. Em 2010, as exportações alcançaram valores da ordem de US\$ 119.929.762 e volume de 124.694.284 kg (IBRAF, 2011).

No entanto, esta fruta foi implicada como veículo de *Salmonella*, em surtos de origem alimentar. O primeiro surto de salmonelose documentado pelo consumo de manga 'in natura' ocorreu em 1999 nos Estados Unidos, envolvendo 78 pessoas e 2 mortes (SIVAPALASINGAM et al., 2003). Em 2001, outro surto multiestado ocorreu nos Estados Unidos devido ao consumo de mangas contaminadas por *Salmonella* Saint Paul. Nos dois casos, as mangas foram importadas da América do Sul (Brasil e Peru, respectivamente), onde a água utilizada para o tratamento hidrotérmico foi a responsável pela contaminação das frutas (BEATTY et al., 2004), uma vez que para exportação, essas frutas precisam passar por tratamento de imersão em água quente para eliminação de larvas de mosca (BORDINI et al., 2007). Não existem dados sobre eficácia da adição de etanol no banho hidrotérmico visando o controle de *Salmonella* em manga, apenas para fitopatógenos e em outras frutas. Margosan et al. (1997), observaram reduções de 33,8% e 24,5% de míldio em pêssegos, após imersão das frutas em etanol 10% a 46°C ou 50°C por 2,5min, respectivamente. Para patógenos veiculados por frutas, estudos realizados por REZENDE et al. (2009), no GEPC do ITAL, indicaram que a imersão de goiabas inoculadas com *Salmonella* Enteritidis e *E. coli* em etanol (50%) por 2 minutos e em banho hidrotérmico (50°C/10min) reduziram em média 53% da população daqueles microrganismos. Desse modo, os objetivos desse estudo foram:

- (1) Verificar o efeito do tratamento hidrotérmico + etanol sobre os atributos físico-químicos e sensoriais do fruto (manga), bem como, sobre o seu tempo de conservação sob refrigeração e em condições ambiente.
- (2) Avaliar o efeito da adição de etanol (3,0%, 5,0%, 7,0% e 9,0%) no banho hidrotérmico à 46°C no controle de *Salmonella* em manga.

## MATERIAL E MÉTODOS

Testes *in vitro* foram realizados utilizando a cepa de *Salmonella* Enteritidis, inoculada ( $10^8$  UFC/mL) em tubos de ensaio contendo as concentrações de etanol estudadas e submetidos ao tratamento hidrotérmico (46,1°C/75min) e posterior resfriamento em banho a 21°C por 30 minutos. As contagens de *Salmonella* Enteritidis foram feitas pelo método da diluição seriada sobre o meio XLD (Xylose Lysine Deoxycholate). Foram realizadas cinco repetições por tratamento.

Na avaliação do efeito do etanol na manga cv. 'Tommy Atkins', as frutas foram imersas no banho hidrotérmico (46°C/75 minutos) com as concentrações de 0,3, 5, 7 e 9%

(v/v) de etanol e resfriadas em água (21°C/30'). As determinações físico-químicas foram feitas, em quintuplicata, no primeiro e sexto dia de estocagem (câmara a 25°C, UR 75%).

### **Análises Físico-químicas**

**Firmeza da polpa:** determinou-se pela leitura de dois pontos na região equatorial dos frutos, após a retirada da casca, através do texturômetro TA-XT2i, com os resultados expressos em N (Newton).

**Sólidos solúveis (°BRIX):** determinou-se pela medida em refratômetro digital, a qual consistiu em colocar gotas da polpa triturada no aparelho e obteve-se o resultado em °BRIX.

**pH:** utilizou-se o pHmetro digital com compensação de temperatura a 20°C.

**Acidez titulável:** com 10 gramas de polpa mais 90mL de água destilada realizou-se a titulação com NaOH (0,1N) até o pH atingir 8,1. Os resultados foram expressos pelo equivalente em gramas de ácido cítrico por 100 gramas de amostra.

**Coloração da casca e da polpa:** observou-se a evolução da coloração pelo colorímetro MINOLTA CR-300, com sistema L\* a\* b\*, sendo L\*, luminosidade, +a\*/-a\*, cor vermelha ou verde e +b\*, cor amarela. Realizou-se quatro leituras em diferentes pontos para a casca e polpa.

### **Análises Estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em delineamento inteiramente casualizado. A discussão dos resultados foi efetuada a 5% de significância. Utilizou-se o software ESTAT, versão 4.0.

### **Determinação do efeito do etanol na parte externa da fruta**

Os frutos foram imersos em banho-maria a 46°C por 75 minutos, contendo 5L de solução com 3,0%, 5,0%, 7,0% e 9,0% de etanol. Foram realizadas cinco repetições por tratamento. Após esse período, as frutas foram analisadas visualmente.

### **Preparo do inóculo**

A cultura bacteriana de *Salmonella* Enteritidis utilizada neste estudo foi proveniente da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias) e mantida em Ágar Trypticase de Soja (TSA) inclinado a 7°C até o início dos experimentos. O inóculo foi transferido para TSA inclinado e incubado a 35°C por 24h. Após esse período, passou-se uma alçada para um tubo contendo caldo Trypticase de

Soja (TSB) duas vezes consecutivas, em intervalos de 24h, a 35°C. Depois desse tempo, o tubo de TSB foi centrifugado a 5000xg, por 15 minutos a 20°C. Descartou-se o sobrenadante e diluiu-se o inóculo em 100mL de água destilada esterilizada.

### **Contagem de *Salmonella***

Na determinação da quantidade de unidades formadoras de colônias presentes no inóculo, realizou-se a diluição em série, que consiste em adicionar 1mL da solução do inóculo a um tubo com 9mL de água peptonada estéril, tendo um total de 6 tubos, sendo um deles apenas para controle de temperatura. De cada diluição semeou-se, em duplicata, 0,1mL em meio XLD (Xylose Lysine Deoxycholate). As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 24h. Observou-se o crescimento da bactéria e realizou-se a contagem das colônias nas placas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análises Físico-químicas**

Nas análises físico-químicas realizadas nas mangas, após o tratamento com etanol em diferentes concentrações (0, 3,0%, 5,0%, 7,0% e 9,0%), não houve mudanças significativas provocadas pela adição de etanol.

### **Determinação do efeito do etanol na parte externa da fruta**

A casca da manga não foi danificada pela adição das diferentes concentrações de etanol (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Frutos após tratamento hidrotérmico sem adição de etanol.

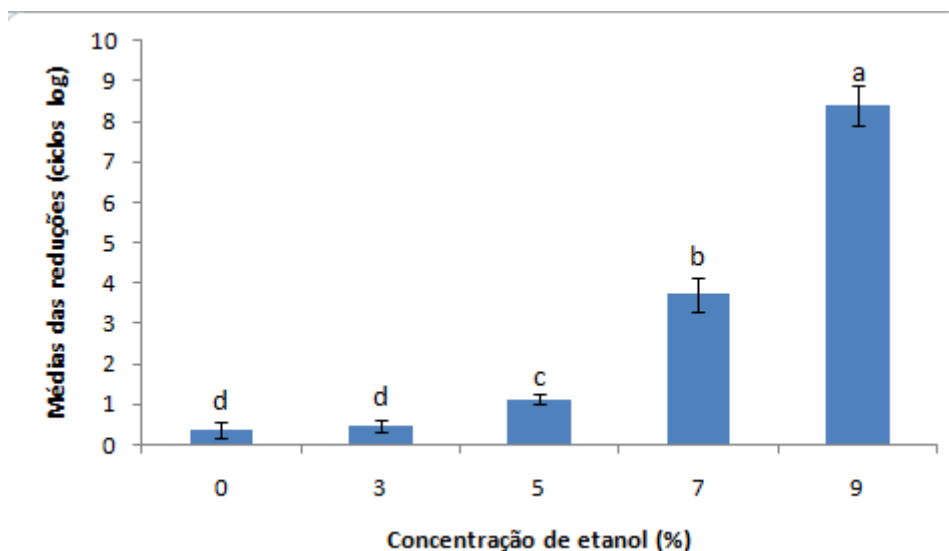


**Figura 2.** Frutos após tratamento hidrotérmico com adição de 3,0% (em cima a esquerda), 5,0% (em cima a direita), 7,0% (em baixo a esquerda) e 9,0% (em baixo a direita) de etanol.

### Controle de *Salmonella* Enteritidis com tratamento térmico e etanol

#### Testes *in vitro*

A adição de etanol em diferentes concentrações no tratamento hidrotérmico provocou diferenças significativas em relação à redução de *Salmonella* entre todos os tratamentos, com exceção da concentração de 3% de etanol, que não houve diferença significativa. Os tratamentos com 5,0% e 7,0% e principalmente o de 9,0% de etanol reduziram significativamente a população de *Salmonella*. Nesse último caso, uma redução de praticamente 100% foi observada. (Figura 3).



**Figura 3.** Reduções obtidas (médias de 5 repetições) após o tratamento hidrotérmico com as diferentes concentrações de etanol.



\* Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

## CONCLUSÃO

O tratamento hidrotérmico associado ao etanol nas concentrações de 5,0, 7,0 e 9,0% pode ser uma alternativa para o controle de SE em manga, visto ter causado redução significativa na população desse patógeno nos testes *in vitro* e na fruta, não ter afetado os atributos de qualidade.

Adição de etanol ao banho hidrotérmico em concentração superior a 9,0% pode causar danos à fruta e maior predisposição ao ataque por fitopatógenos.

Estudos *in vivo*, com fruta inoculada, devem ser conduzidos para que se possam confirmar os resultados obtidos em nossa pesquisa, bem como, para indicação desse procedimento a nível de *packing-house*.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq - PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao GEPC - ITAL, pelo estágio.

À FAPESP- Processo 10/08065-6, pelo auxílio financeiro a pesquisa

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Disponível em: <[http://www.anuarios.com.br/port/anuario\\_capa.php?idAnuario=8](http://www.anuarios.com.br/port/anuario_capa.php?idAnuario=8)>. Acesso em: 01 Jul. 2011.

BEATTY, M. E.; LAPORTE, T. N.; PHAN, Q.; VAN DUYNE, S. V.; & BRADEN, C. A multistate outbreak of *Salmonella* enterica serotype Saintpaul infections linked to mango consumption: a recurrent theme. **Clinical Infectious Disease**, v.38, p.1337-1338, 2004.

BORDINI, M. E. B.; RISTORI, C. A.; JAKABI, M.; GELLI, D. S. Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. **Food Control**, Guildford, v.18, p.1002-1007, 2007. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 5 Set. 2008.

IBRAF – INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exporta%C3%A7%C3%A3o/Comparativo\\_da\\_Exporta%C3%A7%C3%B5es\\_Brasileiras\\_de\\_Frutas\\_frescas\\_2010-2009.pdf](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exporta%C3%A7%C3%A3o/Comparativo_da_Exporta%C3%A7%C3%B5es_Brasileiras_de_Frutas_frescas_2010-2009.pdf)>. Acesso em: 01 Jul. 2011.



MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L.; SIMMONS, G. F.; HENSON, D. J. Combination of water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. **Plants Disease**, v.81, n.12, p.1405-1409, 1997.

PIMENTEL, C. R. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. **Mercado internacional de manga: situação atual e perspectivas**. In: FILGUEIRAS, H. A. C. (Org). Manga pós-colheita. Brasília: Embrapa-SPI, p.9-13, 2000.

REZENDE, A. C. B.; CASTRO, M. F. P. M. de; PORTO, E.; UCHIMA, C. A.; BENATO, E.; PENTEADO, A. L. Occurrence of *Salmonella* spp. In persimmon fruit (*Diospyros kaki*) and growth of *Salmonella* Enteritidis on the peel and in the pulp of this fruit. **Food Control**, v. 20, p. 1025-1029, 2009.

SIVAPALASINGAM, S.; BARRET, E.; KIMURA, A.; VAN DUYNE, S.; DE WITT, W.; YING, M., et al. A multistate outbreak of *Salmonella* enterica serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfestations technology. **Clinic Infectious Disease**, v.37, p.1585-1590, 2003.