



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ESTUDO DA AÇÃO DA RADIAÇÃO GAMA DE  $^{60}\text{Co}$  SOBRE**  
***Salmonella poona, Escherichia coli e Alicyclobacillus***  
***acidoterrestris* EM POLPA DE MANGA CONGELADA**

**MARCO ANTÔNIO DOS SANTOS PEREIRA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:  
Dra. Nélida Lúcia del Mastro

SÃO PAULO  
2009

*À minha mãe, Maria Elizabeth dos Santos Pereira,  
pelo apoio incondicional, que,  
espero um dia, poder retribuir com a mesma  
intensidade.*

## *Agradecimentos*

À minha orientadora, **Nélida Lúcia Del Mastro**.

Pelo carinho, dedicação, liberdade, paciência e, principalmente pela confiança.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, representado pelo **Dr. Wilson Aparecido Pajero Calvo**, gerente do CTR.

À **Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)**, pela tão necessária bolsa de estudos.

À **Sueli Ivone Borrely**,

Por estar sempre à disposição em todos os momentos importantes do trabalho.

Aos engenheiros **Carlos Gaia da Silveira** e **Elizabeth Somessari**.

Pela irradiação das amostras.

À **Iize Puglia**.

Pela disposição em esclarecer todas as dúvidas a respeito da parte “burocrática”.

À **Magali Barbieri**.

Pela ajuda na parte da documentação da bolsa de estudos.

Aos colegas do IPEN, **Michel Mozeica, Thaize, Antônio, Marcos Ronaldo, Patrícia Inamura, Adriana e Icimone**.

Pela troca de idéias, apoio e sugestões dadas.

Aos funcionários do IPEN, especialmente os secretários **Marcos Cardoso Silva** e **Claudia Regina Nolla**.

Pelo apoio e esclarecimentos em todos os momentos.

Aos amigos e familiares:

À minha mãe, **Maria Elizabeth dos Santos Pereira**,  
Minha eterna heroína e exemplo de amor, dedicação e perseverança,  
obrigado pelo apoio, carinho e proteção dados por toda a minha vida.

Ao meu avô, **Joaquim Damião Pereira** (*in memoriam*),  
Onde quer que esteja, espero que esteja orgulhoso do seu neto  
problemático.

À minha esposa, **Ana Rosa Moura Leôncio**,  
Pelo carinho, e principalmente pela paciência que tem mostrado em todo  
esse tempo de convivência.

Aos meus filhos, **Pedro Lucas Araújo Pereira** e **Sophia Leôncio Pereira**,  
Minhas fontes inesgotáveis de alegria, preocupação e amor.

Ao meu amigo eterno, **Humberto “Beto” Aparecido Pereira**,  
Pela fidelidade e amizade ao longo de quase vinte anos.

À minha amiga, **Rosamaria Loureiro Guedes**,  
Por ter me levado ao IPEN, e pela amizade.

À minha amiga, **Anna Lucia Joviniana Pereira**,  
Pelos anos de amizade e apoio que jamais serão esquecidos.

Ao meu amigo, **Adriano “magro” Dias**,  
Pela amizade e descontração em todos esses anos.

À minha amiga, **Thaize Catarine Silva**,  
Pela amizade e carinho de muito tempo.

À minha amiga, **Anastácia Sobrinho Carvalho**,  
Pelo apoio, conselhos e compreensão, dos quais sempre me lembrarei.

À **Hitomi Kubo**.  
Pela troca de experiências e apoio durante os momentos iniciais do  
Trabalho.

À **Paula Oliveira Alves**.  
Pelos inúmeras conversas informais, sugestões e intercâmbio de  
experiências.

À minha amiga, **Christiane Asturiano Ristori**,  
Pela paciência e disposição em esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aos colegas e profissionais do Instituto Adolfo Lutz,

Pelo interesse, amizade e ajuda.

Aos colegas e profissionais da Refricon Mercantil,  
Pelo entendimento, amizade e apoio.

Aos colegas da Topcine,  
Pela amizade duradoura e vários momentos de descontração.

# ESTUDO DA AÇÃO DA RADIAÇÃO GAMA DE $^{60}\text{Co}$ SOBRE *Salmonella poona*, *Escherichia coli* E *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM POLPA DE MANGA

MARCO ANTÔNIO DOS SANTOS PEREIRA

## RESUMO

A aplicação de tratamentos não-térmicos têm se mostrado eficiente na inibição de bactérias como *Salmonella* spp e *Escherichia coli*. A manga é uma fruta de consumo nacional que possui grande potencial de exportação. Entretanto, surtos de doenças transmitidas por alimentos relacionados a essa fruta provocaram desconfiança sobre o grau de segurança alimentar oferecido pelo produto. O objetivo deste trabalho foi determinar a radiorresistência das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella poona* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* na polpa de manga através do cálculo do valor  $D_{10}$  e conhecer o efeito da radiação gama sobre as características organolépticas de polpa de manga. Foi também estabelecido o perfil microbiológico de polpas de manga congeladas disponíveis no mercado utilizando métodos convencionais de plaqueamento e Número Mais Provável (NMP). As polpas contaminadas experimentalmente com as bactérias citadas acima foram irradiadas com doses de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 kGy, em fonte de  $^{60}\text{Co}$ . A análise sensorial foi feita utilizando dose de 5 kGy, aplicando o teste triangular e o teste de aceitação com escala hedônica. Os resultados deste trabalho mostram que a qualidade das polpas de manga comercializadas não é satisfatória de acordo com os padrões estabelecidos pela lei brasileira e pela literatura, mostrando a necessidade da implantação de outras ferramentas para se alcançar níveis de qualidade aceitáveis. Os valores de  $D_{10}$  obtidos se situaram entre 1,01 e 1,09kGy para *E. coli* ATCC 8739, entre 0,6 e 0,98kGy para *S. poona* e entre 0,72 e 0,88kGy para *A. acidoterrestris* respectivamente. A análise sensorial mostrou que a dose de 5kGy alterou as características sensoriais da polpa de manga. Entretanto, quando a polpa irradiada foi utilizada como ingrediente, o produto obteve boa aceitação nos atributos de aparência geral, sabor e aroma.

**STUDY OF THE ACTION OF  $^{60}\text{Co}$  GAMMA RADIATION ON *Salmonella poona*, *Escherichia coli* AND *Alicyclobacillus acidoterrestris* IN MANGO PULP**

MARCO ANTÔNIO DOS SANTOS PEREIRA

ABSTRACT

The application of non-thermal treatments has proven effective in inhibiting bacteria such as *Salmonella* and *Escherichia coli*. Mango is a fruit of national consumption with a great exportation potential. Meanwhile, outbreaks of food-borne disease related to mango consumption caused mistrust on the degree of food security offered by the product. The objective of this work was to establish the radioresistance of bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella Poona* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* on the mango pulp by the calculation of the  $D_{10}$  values and to know the radiation effect on the sensory characteristics of the fruit pulp. The microbiological profile of frozen mango pulp available at the local market was also established using conventional methods of plating and Most Probable Number (MPN). The pulps experimentally inoculated with the bacteria listed above were irradiated with doses of 0, 1, 2, 3, 4 and 5kGy in a  $^{60}\text{Co}$  source. The sensory analysis was performed using a dose of 5 kGy, using the triangular test and the test of acceptance with hedonic scale. The results of this study show that the quality of mango pulp sell in the local market is not satisfactory in accordance with the standards established by the Brazilian law and the literature, showing the need of using other tools to achieve acceptable levels of quality. The  $D_{10}$  values obtained are in the range of 1.01 and 1.09kGy for *E. coli* ATCC 8739, 0.60 and 0.98kGy for *S. poona* and 0.72 e 0.88kGy for *A. acidoterrestris* respectively. The triangular test showed that a 5kGy radiation dose changed the sensory characteristics of mango pulp. Nevertheless, sensory analysis of a food product prepared with the irradiated pulp obtained good acceptance in the attributes of global appearance, flavor and aroma.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	12
1.0 INTRODUÇÃO .....	13
2.0 OBJETIVO .....	15
3.0 REVISÃO DA LITERATURA .....	16
3.1 O mercado de frutas e derivados no Brasil .....	16
3.2 Manga e derivados .....	18
3.3 Tecnologias não térmicas de preservação de alimentos .....	23
3.4 Processo de Irradiação .....	25
3.5 Irradiação de alimentos .....	27
3.6 Efeito da Irradiação nos Alimentos .....	28
3.7 Radiorresistência de Microrganismos .....	31
3.8 Dose de inativação e valor $D_{10}$ .....	33
3.9 <i>Salmonella</i> spp e sua importância em alimentos .....	35
3.10 <i>Escherichia coli</i> e sua importância em alimentos .....	36
3.11 <i>Alicyclobacillus acidoterrestis</i> e sua importância em alimentos .....	39
3.12 Microbiologia de alimentos .....	41
3.12.1 Microrganismos indicadores .....	43
3.13 Análise sensorial de alimentos .....	45
3.13.1 Testes discriminativos – teste triangular .....	47
3.13.2 Testes afetivos – Testes de aceitação por escala hedônica.....	48
4.0 MATERIAL E MÉTODOS .....	49
4.1 Materiais .....	49
4.1.1 Microrganismos .....	49
4.1.2 Polpa de manga .....	49
4.2 Métodos .....	49
4.2.1 Caracterização microbiológica das polpas provenientes dos hipermercados .....	49
4.2.2 Irradiação da polpa de manga contaminada em laboratório .....	51

4.2.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de <i>Salmonella poona</i> ..	53
4.2.4 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 .....	54
4.2.5 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	54
4.2.6 Determinação da radiorresistência dos microrganismos .....	55
4.3 Análise sensorial .....	55
4.3.1 Recrutamento de julgadores .....	56
4.3.2 Teste de diferença – triangular .....	56
4.3.3 Teste de aceitação – escala hedônica.....	56
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
5.1 Avaliação da qualidade microbiológica da polpa de manga congelada ....	58
5.2 Determinação do D <sub>10</sub> de <i>Salmonella poona</i> , <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 e <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em polpa de manga irradiada .....	64
5.3 Análise sensorial da polpa de manga irradiada .....	74
6.0 CONCLUSÕES .....	80
7.0 ANEXOS .....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Produção e área cultivada de manga no Brasil no período de 2001–2007 (FAO, 2009) .....	18
TABELA 02 - Composição da polpa de manga (nutrientes/100 g) .....	19
TABELA 03 – Unidades de dose de radiação e radioatividade .....	27
TABELA 04 – Aplicações da irradiação de alimentos .....	30
TABELA 05 – Valor $D_{10}$ para <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada em vegetais minimamente processados e tratados com radiação gama .....	34
TABELA 06 – Percentual de conformidade para coliformes totais das amostras de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeverica da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.....	58
TABELA 07 – Percentual de conformidade para coliformes fecais das amostras de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeverica da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.....	59
TABELA 08 - Percentual de conformidade para <i>E. coli</i> das amostras de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeverica da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.....	60
TABELA 09 - Percentual de conformidade para mesófilos aeróbios das amostras de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeverica da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.....	62
TABELA 10 – Efeito da dose de radiação em <i>Escherichia coli</i> inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada.....	65
TABELA 11 - Efeito da dose de radiação em <i>Salmonella poona</i> inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada .....	65
TABELA 12 - Efeito da dose de radiação em <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada .....	66
TABELA 13 - Valores de $D_{10}$ para <i>Escherichia coli</i> inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada .....	70
TABELA 14 - Valores de $D_{10}$ para <i>Salmonella poona</i> inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada .....	71
TABELA 15 - Valores de $D_{10}$ para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> inoculado experimentalmente em polpa de manga congelada .....	72

TABELA 16 - Distribuição % de consumidores segundo a faixa etária .....	74
TABELA 17 - Distribuição percentual de consumidores segundo o grau de escolaridade.....	75
TABELA 18 - Média das respostas em escala hedônica aos atributos sabor, aroma e aparência geral dos julgadores e intenção de compra do mousse de manga.....	76

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01 – Produção de derivados de frutas no Brasil	17
FIGURA 02 – Variedades de manga cultivadas no Brasil	21
FIGURA 03 – Fluxograma de produção da polpa de manga	22
FIGURA 04 –. Rota do alimento até o cérebro	46
FIGURA 05 –. Análise microbiológica de polpa de manga congelada	50
FIGURA 06 –Irradiador Gammacell 220	52
FIGURA 07 – Curvas de inativação de <i>Escherichia coli</i> em polpa de manga inoculada em laboratório em função da dose de irradiação	.67
FIGURA 08 – Curvas de inativação de <i>Salmonella poona</i> em polpa de manga inoculada em laboratório em função da dose de irradiação	68
FIGURA 09 – Curvas de inativação de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em polpa de manga inoculada em laboratório em função da dose de irradiação	.69
FIGURA 10 - Freqüência dos valores de aceitação de sabor do mousse de manga	77
FIGURA 11 – Freqüência dos valores de aceitação de aroma do mousse de manga	78
FIGURA 12 - Freqüência dos valores de aceitação de aparência geral do mousse de manga.	78

## 1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) é uma das principais preocupações das autoridades sanitárias em todo o mundo. Além disso, o desenvolvimento econômico e a globalização, as mudanças nos hábitos alimentares, entre outros fatores, alteram o perfil epidemiológico das DVAs, expondo a população a maiores riscos de contrair essas doenças (BESSER *et al*, 1993; MORGAN *et al*, 1993; DUNCAN & HACKNEY, 1994; TAUXE, 1997).

Nos EUA, foi descrito pela United States Public Health Service, a ocorrência anual de 9000 mortes provenientes de 81 milhões de casos envolvendo doença diarréica, devido a patógenos alimentares como *Salmonella spp* e *Escherichia coli* O157 H7 (MEAD, 1999).

Para os países da América Latina e Caribe, o custo calculado das DVAs em 1990 foi de 261,1 milhões de dólares, incluindo as despesas com hospitalização, tratamentos ambulatoriais e ausência no trabalho (FDA/CFSAN, 2002).

A sobrevivência de um patógeno em frutas depende de muitos fatores, entre eles incluem-se as características físico-químicas, como pH e atividade da água ( $a_w$ ), o processamento pós-colheita e as práticas de manipulação do consumidor (RAGHUBEER *et al*, 1995; PENTEADO, 2003).

Dados do CDC (Center for Disease Control and Prevention) dos EUA (DOYLE *et al*, 2001), registram que o alimento mais frequentemente envolvido em surtos provocados por cepas de *E. coli* enteropatogênica, no período de 1993 à 1997, foi a carne bovina, com 25% dos casos registrados, tornando-se um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreia bacteriana da costa de Pacífico (FDA/CSFAN. 2000).

Nos últimos 15 anos, entretanto, aumentou significativamente o número de surtos associados com outros veículos além da carne, particularmente as

frutas e sucos de frutas. Em 1991 ocorreu um surto nos EUA em que 23 pessoas foram atingidas através do consumo de suco de maçã não pasteurizada. Aparentemente, a cidra tinha sido produzida com maçãs recolhidas do chão e contaminadas com esterco de bovinos (FENG, 1995; DOGAN-HALKMAN *et al*, 2003).

Em 1999, foi registrado um surto de salmonelose nos EUA onde foram contabilizadas 78 vítimas em 13 estados, sendo que 15 foram hospitalizadas e duas morreram. Após a investigação, as autoridades descobriram que todos os patógenos eram do mesmo sorotipo (*Salmonella* Newport) e que o elemento comum aos casos era a manga, cujo fornecedor era da cidade de Petrolina, PE (PENTEADO, 2003; SIVAPALASINGAM *et al*, 2003).

Casos como esse de Petrolina, fazem com que aumentem as barreiras dificultando a exportação de alimentos produzidos por países em desenvolvimento, afetando ainda mais suas economias (GERMANO & GERMANO, 2003; BRANDÃO *et al*, 2003; PENTEADO, 2003; SOTO *et al*, 2007).

Nos últimos anos, tecnologias alternativas têm sido sugeridas e utilizadas para a produção de alimentos seguros, tais como, uso de atmosferas controladas, campo elétrico pulsado (“Pulsed Electric Field” – PEF) e irradiação. O interesse pelo processo de irradiação está crescendo em função dos diversos benefícios que apresenta, como por exemplo, a redução da microbiota deteriorante e também dos patógenos bacterianos, associada à manutenção das propriedades nutritivas e organolépticas (FARKAS, 1998; YOUSSEF *et al*, 2002).

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o estudo da ação da radiação gama sobre cepas de *Salmonella poona*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* e *Escherichia coli* ATCC 8739 em polpas de manga contaminadas experimentalmente e a avaliação sensorial de polpa irradiada, bem como, a avaliação do perfil microbiológico de polpa de manga congelada disponíveis no mercado.

### 3.0 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O mercado de frutas e derivados no Brasil

De acordo com TOFANELLI *et al* (2007), frutas são excelentes alternativas para o fornecimento de vitaminas, sais minerais e carboidratos na alimentação humana. Porém, nem sempre o consumo é suficientemente adequado às necessidades diárias, seja pela má educação alimentar, seja por dificuldades no sistema de comercialização dos produtos frutícolas ou problemas relacionados à qualidade. Dentre estas, citam-se como exemplo os preços de venda ao consumidor de muitas frutas nos mercados que, devido ao baixo poder aquisitivo do brasileiro, muitas vezes não chegam às mesas das residências, sendo o índice de consumo *per capita* de frutas no Brasil de 24,5 kg/habitante.

Em 2007, o Brasil exportou por volta de 910 mil toneladas de frutas frescas, atingindo um valor aproximado de US\$ 630 milhões (FERRAZ, 2007).

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção de, aproximadamente, 38 milhões de toneladas por ano (MONTEIRO, 2006).

A polpa de fruta congelada é um produto em expansão no mercado de frutas tropicais, cuja procura vem crescendo substancialmente tanto para consumo doméstico, como de lanchonetes e restaurantes (SEBRAE, 1997; SANTOS, 2003, BENEVIDES *et al*, 2008).

Segundo o SEBRAE (1997), verifica-se uma tendência no mercado que é a substituição dos sucos engarrafados pela polpa de fruta congelada, atribuída a dois fatores importantes (FIG. 1)

- a) não utilização de aditivos químicos na conservação do produto;
- b) menor preço de venda, em função de menor custo de produção.

O fator qualidade deve constituir-se na meta principal para quem pretende se estabelecer no mercado. Observa-se que a maioria dos fabricantes de polpa de frutas de Pernambuco, por exemplo, funciona ainda de forma artesanal, não apresentando condições de atender a clientes mais exigentes devido à inexistência de controle de qualidade, principalmente pela falta de fiscalização das exigências de análise físico-química e bacteriológica, bem como pelo uso de processos inadequados de embalagem (SEBRAE/PE, 1997, ABREU, 2003).

O mercado está exigindo qualidade, diversificação e diferenciação de produto, volume e regularidade no fluxo de produção e comercialização. Para atender a estas exigências, diante da elevada sazonalidade da produção, as empresas necessitam processar pelo menos 10 tipos de polpa de frutas diferentes. Esta lógica exige, portanto, plantas multiprodutos e expansão da oferta de frutas por meio de plantios racionais. O processo de ajuste na produção agroindustrial está em curso, porém de forma heterogênea e desarticulada (RYU & BEUCHAT, 1998; SANTOS, 2003).



Fonte: Estimativas do IBRAF com dados do Latin Panel/Trends Nielsen/TetraPak

Figura 1. Produção de derivados de frutas no Brasil

### 3.2 Manga e derivados

A manga (*Mangifera indica* L.) pertence à família *Anacardiaceae* e figura entre as frutas tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional (BRANDÃO *et al*, 2003; BENEVIDES *et al*, 2008). É uma fruta com grande quantidade de polpa, de tamanho e formato variável, aroma e cor muito agradáveis que faz parte do elenco das frutas tropicais de importância econômica não só pela aparência exótica, mas também por ser uma rica fonte de carotenóides e carboidratos (TASSARA *et al*, 2004; BRANDÃO *et al.*, 2003; SANTOS, 2003; THARANATHAN *et al*, 2006; BENEVIDES *et al*, 2008).

O Brasil, junto com a Índia, China e México e Tailândia, está entre os principais países produtores de manga do mundo e sua produção em 2007 chegou a 1.546.000 toneladas FAO (2008), conforme descrito na TAB. 1.

Tabela 1. Produção e área cultivada de manga no Brasil no período de 2001–2007 (FAO, 2009)

Manga no Brasil	Ano						
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<b>Produção (Mt)</b>	782.308	842.349	845.000	845.000	1.002.211	1.545.442	1.546.000
<b>Área cultivada (Ha)</b>	67.226	66.676	67.000	69.617	68.141	89.764	89.800

A manga quando madura é rica em vitamina A, importante para a função da retina. Sua polpa é digestiva e ligeiramente laxante, além disso, é recomendada contra resfriados, pois contém uma quantidade razoável de vitaminas B e C, sais minerais, como cálcio, ferro, potássio, cobre e magnésio (TAB. 2). Graças ao seu alto teor de fibra, a manga também ajuda na normalização da função intestinal. Protege a pele e a mucosa e ajuda

pacientes debilitados, anêmicos e com tumores cancerígenos (EMPAER, 1996).

Na Índia, a manga é a fruta mais importante comercialmente e responsável por um aumento de 50% na exportação de frutas entre 1971 e 2001 (THARANATHAN *et al*, 2006).

Tabela 2. Composição da polpa de manga (nutrientes/100 g)

NUTRIENTES	QUANTIDADE
Calorias	66,60 g
Água	83,80 g
Hidratos de carbono	15 g
Proteínas	0,40 g
Gorduras	0,30 g
Sais minerais	0,50 g
Vitamina A (Retinol)	2.200 U.I.
Vitamina B <sub>1</sub> (tiamina)	51,00 mcg
Vitamina B <sub>2</sub> (riboflavina)	56,00 mcg
Vitamina B <sub>5</sub> (niacina)	0,50 mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	43,00 mcg

Fonte: EMPAER, 1996

Os frutos da mangueira são colhidos manualmente, cortando-se o pedúnculo com uma tesoura apropriada, sendo que os frutos da parte alta da planta podem ser retirados com uma vara de colheita ou com o auxílio de uma escada. O pedúnculo é cortado com um tamanho mínimo de 3 cm para evitar o vazamento do látex. Os frutos colhidos são colocados em caixas plásticas de colheita que ficam à sombra até o momento de serem levadas ao galpão de embalagem (EMPAER, 1996).

A manga é um fruto climatérico que deve ser colhido antes do seu amadurecimento completo. Em contraste com outros frutos é difícil determinar

o estágio ótimo de maturação para colheita, principalmente para as variedades pouco coloridas (EMPAER, 1996). De acordo com a EMPAER (1996), o estágio de maturação no momento da colheita deve ser tal que:

- Permita que o fruto complete o amadurecimento até que se desenvolvam todas as características físico-químicas e organolépticas correspondentes à variedade;
- Suporte o armazenamento, transporte e o manuseio;
- Chegue em condições satisfatórias de comercialização ao local de destino.

A decisão do momento de colheita da manga é baseada em indicadores físicos e químicos. A mudança de cor da polpa de creme para amarelo e a firmeza do fruto são indicadores físicos e objetivos do ponto de colheita. Na identificação da cor da polpa deve-se tomar como referência a escala e definições a seguir (EMPAER, 1996):

1. Cor creme: quando a polpa apresentar cor creme por completo, podendo variar de creme-claro a creme-escuro. Deve-se atentar para não confundir a cor creme com a branca.
2. Mudança da cor creme: quando se verifica uma mudança em até 30% da área com cor creme para a cor amarela, partindo do centro do fruto.
3. Amarelo: quando 30% a 60% da área da polpa apresentar cor amarela.
4. Amarelo-laranja: quando mais de 60% da polpa apresentar cor amarela e menos de 30% de cor laranja.
5. Laranja: quando mais de 90% da polpa mostrar cor laranja.

Segundo SUGAI (2002), no Brasil são cultivadas diferentes variedades de manga como a Bourbon, Espada, Coqueiro e Ouro e outras de ampla aceitação no mercado como Tommy Atkins, Haden, Keitt, Palmer (FIG. 2).



Figura 2. Variedades de manga cultivadas no Brasil (Todafruta, 2003)

A polpa de manga tem grande importância como matéria-prima em indústrias de conservas de frutas, que podem produzi-las durante as épocas de safra, armazená-las e reprocessá-las em períodos mais propícios, ou segundo a demanda do mercado consumidor, como doces em massa, geléias, sucos e néctares. Ao mesmo tempo são comercializadas para outras indústrias que utilizam a polpa de fruta como parte da formulação de iogurtes, doces, biscoitos, bolos, sorvetes, refrescos e alimentos infantis (BENEVIDES *et al*, 2008; ABREU, 2003; BUENO, 2002).

No Brasil, a legislação (BRASIL, 2000) que trata de polpa ou purês é direcionada ao consumo como bebida, ou seja, avaliado com base nos indicadores do suco de manga. A polpa de frutas é definida como o produto

não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido de frutos polposos, através de processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais proveniente da parte comestível do fruto, devendo apresentar cor amarela, sabor doce, levemente ácido, além de sabor e aroma próprios da fruta.

De um modo geral a produção de polpa congelada segue o fluxograma descrito na FIG. 3.

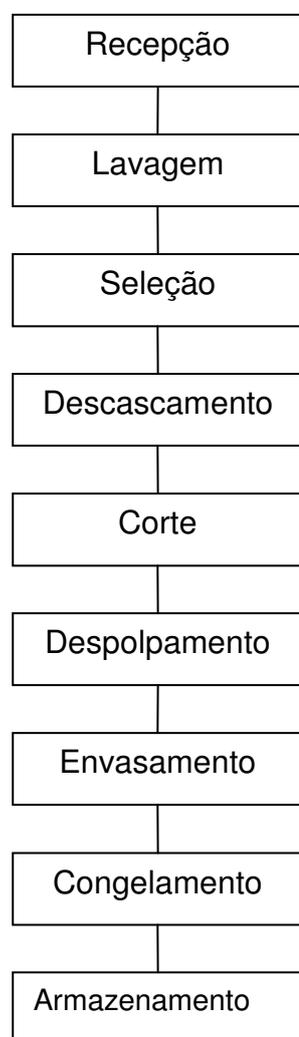


Figura 3. Fluxograma de produção da polpa de manga

O Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Manga (BRASIL, 2000) estabelece parâmetros como:

- pH mínimo de 3,30 e máximo de 4,50;
- sólidos solúveis totais em °Brix, a 20 °C: mínimo de 11,0;
- acidez total expressa em ácido cítrico (g.100 g<sup>-1</sup>): mínimo de 0,32;
- açúcares totais, naturais da manga (g.100 g<sup>-1</sup>): máximo de 17,0;
- sólidos totais (g.100 g<sup>-1</sup>): mínimo de 14,0.

A RDC 12 (ANVISA, 2002), estabelece parâmetros microbiológicos para polpa de frutas como descrito a seguir:

- *Salmonella* spp: ausência em 25g de polpa
- Coliformes à 45°C (coliformes fecais): 100 NMP/g

### **3.3 Tecnologias não térmicas de preservação de alimentos**

Os consumidores têm uma preocupação crescente com os benefícios e riscos à saúde devido ao consumo de alimentos. Para satisfazer todas essas expectativas, a indústria alimentícia tem dedicado grande esforço técnico e financeiro em busca de produtos mais seguros (LADO & YOUSEF, 2002).

A adoção de uma nova tecnologia de processamento alimentar depende, em boa parte, de uma estimativa confiável da eficiência contra microrganismos patógenos e/ou deteriorantes alimentares e acima de tudo, da aceitação do consumidor final (LADO & YOUSEF, 2002; ROSS *et al*, 2003; JEYAMKONDAM *et al*, 1999).

O uso de tratamento térmico (pasteurização, por exemplo) é predominante na indústria pela sua eficácia em programas de segurança alimentar e garantia da qualidade. Entretanto, o uso massificado dessa

tecnologia em determinados grupos de alimentos pode causar efeitos indesejados, como desnaturação protéica, escurecimento não enzimático, perda de vitaminas e das características sensoriais (LADO & YOUSEF, 2002, MONTEIRO, 2006).

Tecnologias alternativas para inativação microbiana não são conceitos novos, mas o desenvolvimento para o uso na preservação de alimentos tem recebido atenção apenas nos últimos anos, em resposta a demanda por produtos mais “naturais” e “frescos” (JEYAMKONDAM *et al*, 1999; FARKAS, 2006; FEITOSA *et al*, 1999).

Essas opções não térmicas têm a capacidade de inativar microrganismos a temperatura ambiente, evitando os efeitos deletérios que o calor tem sobre o sabor, cor e o valor nutricional dos alimentos (LADO & YOUSEF, 2002).

De acordo com LADO & YOUSEF (2002) e FARKAS (2006), entre os métodos estudados estão: a irradiação, campos elétricos pulsantes e a tecnologia de alta pressão.

A irradiação é uma técnica eficiente na conservação dos alimentos pois reduz as perdas naturais causadas por processos fisiológicos (brotamento, maturação e envelhecimento), além de eliminar ou reduzir microrganismos, parasitas e pragas, sem causar qualquer prejuízo ao alimento, tornando-o também mais seguro para o consumidor. O alimento é exposto a uma fonte de radiação ionizante, normalmente  $^{60}\text{Co}$ , em uma câmara especial. A dose de irradiação é controlada pelo tempo de contato do alimento com a fonte de energia ionizante.

O alimento pode ser também conservado pela utilização de campos elétricos gerados por diferencial de voltagem, acarretando a formação de poros nas membranas celulares e a consequente destruição dos microrganismos (JEYAMKONDAM *et al*, 1999).

O tratamento à alta pressão foi reconhecido como uma técnica potencial de preservação há aproximadamente um século atrás desde os trabalhos de Hite em 1889. A alta pressão foi aplicada por muitos anos na produção de cerâmicas, materiais compostos, diamante artificial e plástico. Esses desenvolvimentos tecnológicos aumentaram as possibilidades de aplicação comercial na área alimentícia. Uma grande variedade de produtos tratados por pressão foi elaborada no mercado japonês por vários anos, incluindo preparados de frutas, bolinhos de arroz e lula crua. Na França, sucos de frutas tratados por pressão estão disponíveis no mercado.

O tratamento à alta pressão utiliza pressões de 100 a 1000 MPa para provocar a destruição microbiológica e para retardar significativamente as taxas de reações enzimáticas.

### **3.4 Processo de Irradiação**

A radiação é a energia que atravessa espaço ou a matéria, enquanto que a irradiação é o processo de aplicação dessa energia em um material. O objetivo da aplicação é submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidade sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica (RADOMYSKY *et al*, 1994; FARKAS, 2006).

As fontes de radiação utilizadas em alimentos são elétrons de alta energia, obtidos a partir de aceleradores lineares com energia que pode atingir até 10 mega elétron volt (MeV); os raios X, gerados por máquinas que trabalham com energia de até 5 MeV e os raios gama obtidos de radioisótopos como cobalto e césio (RADOMYSKY *et al.*, 1994, FARKAS, 2006; GUEDES, 2005).

O  $^{60}\text{Co}$  é o radioisótopo artificial mais utilizado na área de alimentos, produzido num reator nuclear via bombardeamento de nêutrons do elemento cobalto (RADOMYSKY *et al.*, 1994).

Dentro do espectro eletromagnético, são consideradas radiações ionizantes aquelas com energia suficiente para deslocar elétrons dos átomos ou moléculas sobre as quais incidem. Quando uma radiação de alta energia incide sobre os átomos, provoca uma excitação e ionização, causando uma separação de elétrons e a formação de pares de íons constituídos por elétrons com carga negativa e positiva (FARKAS,1998).

A excitação e ionização de moléculas gera radicais livres, que provocam reações químicas que afetam as funções estruturais e metabólicas das células, que podem induzir retardo no brotamento em bulbos e tubérculos, retardo do amadurecimento (frutas), inativação de microrganismos, destruição de parasitas e pragas e outras alterações tecnológicas (FARKAS, 1998; DIEHL, 1990, GUEDES, 2005; YOUSSEF *et al*, 2002).

Vários estudos indicam que a causa primordial da letalidade de microrganismos induzida pelo processo de irradiação é a alteração sofrida pelo DNA microbiano, que perde a capacidade reprodutora, além de afetar outras moléculas importantes, como a membrana celular, por exemplo. A radiação interage com as diversas substâncias, principalmente água (radiólise da água), formando radicais livres que são altamente reativos (DIEHL, 1990).

A dose de radiação é a quantidade de energia absorvida por unidade de massa do material irradiado. A unidade utilizada para expressar esta energia é denominada gray (Gy). Essa unidade foi adotada a partir de 1986, pelo Sistema Internacional de Unidades em substituição ao rad.

Um Gy é definido como 1 joule de energia absorvida por quilograma de material (TAB. 3). Um Gy equivale a 100 rads (RADOMYSKY, 1994, DIEHL, 1990).

Tabela 3. Unidades de dose de radiação e radioatividade

	Dose absorvida	Radioatividade
Unidade	Gray (Gy)	Bequerel (Bq)
Definição	1Gy = 1 J/kg	1Bq = 1 desintegração/seg
Unidade antiga	Rad	Curie (Ci)
	1 rad = 0,01Gy	1 Ci = 3,7x10 <sup>10</sup> Bq = 37 GBq
Conversão	1 krad = 10 Gy	1 kCi = 37 TBq
	1Mrad = 10 kGy	1mCi = 37 PBq

Fonte – ICGFI, 1999.

### 3.5 Irradiação de alimentos

A história da irradiação de alimentos é a história da própria aplicação da radiação. Roentgen descobriu os raios X em 1895 e não demorou muito até que se sugerisse em 1905 o tratamento de alimentos, especialmente cereais, com raios gama, beta e alfa (DIEHL, 1990).

As mudanças no modelo de consumo e nas técnicas de processamento industrial fizeram com que houvesse um aumento na preocupação com a questão de segurança alimentar. A irradiação é considerada como uma tecnologia a frio, muito eficiente para a redução e/ou eliminação de patógenos alimentares que podem estar presentes nos alimentos (DIEHL, 1990; FARKAS, 2006; FAN *et al*, 2008).

Vários estudos têm confirmado que a irradiação não produz nenhum efeito adverso e pode ser uma ferramenta valiosa para a redução de bactérias patogênicas e fungos, reduzindo os perigos para a Saúde Pública (RADOMYSKY, 1994; GUEDES, 2005; FAN *et al*, 2008; FARKAS, 2006; GERMANO & GERMANO, 2003).

Uma variedade de estudos avaliando aspectos toxicológicos e genéticos não demonstrou nenhuma evidência direta de atividade cancerígena ou toxicidade genética (RADOMYSKY, 1994, DIEHL, 1990; FARKAS, 2006; FAN *et al*, 2008).

Em relação aos aspectos econômicos, os custos de irradiação podem variar de 10 a 15 US\$ por tonelada para uma aplicação de baixas doses (para aumentar a vida de prateleira de frutos e inibir o crescimento de brotos de batatas e cebolas) até de 100 a 250 US\$ por tonelada para aplicação de altas doses em especiarias, por exemplo (DELINCÈE, 1998).

Dados da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), estimam que mais de 50 países já aprovaram o uso da irradiação de alimentos na guerra contra os patógenos alimentares (FARKAS, 1998; ROSS *et al*, 2003).

O tratamento por radiação ionizante é uma alternativa válida para a obtenção de alimentos seguros. Esta prática, em conjunto com as normas de qualidade, Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), resultará em uma importante redução de riscos para o consumidor (DIEHL, 1990; FARKAS, 2006; FAN *et al*, 2008).

No Brasil, a resolução RDC nº 21 de 26 de Janeiro de 2001, aprova o uso em alimentos desde que:

- a) a dose mínima absorvida dever ser o suficiente para alcançar a finalidade pretendida;
- b) a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou sensoriais.

### **3.6 Efeito da irradiação nos alimentos**

A procura por produtos de alta qualidade vem aumentando, o que obriga produtores e autoridades de Saúde Pública a buscar alternativas para oferecer alimentos seguros. Nesse cenário, a irradiação torna-se uma das principais opções (FARKAS, 1998).

O processo de irradiação de alimentos, como qualquer outro processamento, pode provocar alterações nos constituintes alimentares. Na realidade, essas alterações podem ser muito pequenas o que torna difícil estabelecer métodos para identificação de alimentos irradiados. Mesmo assim, hoje em dia existem normas européias para a detecção de alimentos irradiados (DIEHL, 1990).

Algumas mudanças do ponto de vista nutricional, consideradas insignificantes pela Organização Mundial de Saúde (OMS), podem ocorrer em alimentos irradiados. No entanto, são semelhantes às aquelas observadas em alimentos submetidos a outros processos, como o congelamento, a desidratação ou a esterilização pelo calor (FARKAS, 1998; FAN et al, 2008).

As principais alterações ocorrem em vitaminas e lipídeos, e em menor proporção em carboidratos e proteínas (FARKAS, 1998).

A água total (umidade) contida em um produto pode-se encontrar na forma de água ligada e não ligada. A água não ligada, disponível, é chamada de atividade de água, e citada como  $a_w$ . A  $a_w$  é fator muito importante no efeito da radiação em sistemas biológicos.

A temperatura e o estado físico do alimento influem no resultado da irradiação. O congelamento, por exemplo, tem efeito protetor para o alimento durante o processo, impedindo que os produtos radiolíticos reajam com o substrato (DIEHL, 1990; FARKAS, 2006).

As condições de anaerobiose também influenciam a natureza dos produtos radiolíticos formados (DIEHL, 1990).

Na presença de oxigênio, espécies reativas de oxigênio são formadas quimicamente, enzimaticamente, fotoquimicamente e pela irradiação de alimentos. Elas são formadas também pela decomposição e inter-reação das espécies reativas de oxigênio. O radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) é a espécie mais reativa, seguido do oxigênio singlete (CHOE & MIN, 2005).

As reações das espécies reativas de oxigênio com alimentos podem produzir componentes indesejáveis, destruir nutrientes essenciais, alterar funcionalidades de proteínas, lipídeos e carboidratos (DIEHL, 1990).

Na TAB. 4 estão descritas as principais aplicações da irradiação em alimentos.

Tabela 4. Aplicações da irradiação de alimentos.

Benefício	Dose (kGy)	Produtos
<b>Dose baixa (até 1kGy)</b>		
(i) inibição do brotamento	0,05 – 0,15	Batatas, cebolas, alho, raiz de gengibre, inhame.
(ii) desinfestação de insetos e desinfecção de parasitas	0,15 - 0,5	Cereais e grãos de leguminosas, frutas frescas e secas, peixe e carne seca, carne de porco fresca.
(iii) Atraso em processos fisiológicos (por exemplo: maturação)	0,25 - 1,0	Frutas e legumes frescos.
<b>Dose média (1 - 10 kGy)</b>		
(i) Extensão do tempo de prateleira	1,0 – 3,0	Peixe fresco, morangos, cogumelos.
(ii) Eliminação de microorganismos da deterioração e patogênicos	1,0 – 7,0	Frutos do mar frescos e congelados, aves e carnes frescas ou congeladas.
(iii) Melhora das propriedades tecnológicas do alimento	2,0 – 7,0	Uvas (aumento do rendimento do suco), legumes desidratados (redução do tempo de cozimento).
<b>Dose alta (10 - 50 kGy)</b>		
(i) Esterilização industrial (em combinação com calor moderado)	30 - 50	Carnes, aves, frutos do mar, alimentos preparados, dietas esterilizadas de hospital.
(ii) Descontaminação de certos aditivos e ingredientes de alimentos	10 - 50	Especiarias, preparações de enzimas, goma natural.

Fonte – ICGFI, 1999.

### 3.7 Radiorresistência de Microrganismos

As bactérias mais sensíveis à radiação ionizante são as gram-negativas, como o gênero *Pseudomonaceae*, enquanto que os gêneros *Deinococcus*, *Deinobacter* e *Acinetobacter* estão entre os mais radiorresistentes. Os cocos gram-positivos são os mais resistentes entre as bactérias não formadoras de esporos, incluindo os micrococcos, estafilococos e enterococos. (JAY, 2001)

A radiosensibilidade de uma cultura de células depende também do seu estado fisiológico e fase de crescimento. As células vegetativas são mais sensíveis à radiação no final da fase logarítmica de crescimento. A resistência maior na fase lag seria devida ao fato do conteúdo enzimático que reduz o nível de oxigênio intracelular (FARKAS, 1998). A injúria causada pela radiação estende a fase lag dos microrganismos sobreviventes (DIEHL, 1990).

A presença de peptoglicano na parede celular e a produção de catalase conferem maior radiorresistência às bactérias gram positivas quando comparadas às gram negativas (FARKAS, 1998). Os esporos bacterianos e culturas desidratadas são mais resistentes do que as células vegetativas (JAY, 2001; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A radiosensibilidade dos microrganismos varia com o meio no qual ocorre a irradiação. Ela depende da atividade de água ( $a_w$ ), pH, temperatura, presença ou ausência de oxigênio e composição química do meio (RADOMYSKY, 1994).

Em soluções quimicamente definidas, como os meios de cultura líquidos, a radiosensibilidade é mais alta do que em meios complexos, como nos alimentos, por exemplo. Isto ocorre por que em meios de cultura, cujo pH normalmente é constante, a interação dos radicais radiolíticos da água com a estrutura do microrganismo é direta, enquanto que no alimento, que possui estrutura molecular complexa, os radicais competem por tais estruturas. Assim,

em alimentos com grupamentos sulfidrilas, ocorre reação destes com radicais livres provocando um efeito protetor sobre os microrganismos (JAY, 2001).

Os alimentos ricos em compostos lipídicos e protéicos também oferecem proteção aos microrganismos por competirem pela interação com os radicais livres (FARKAS, 2006). Por isso, não é recomendável extrapolar a radiosensibilidade de um determinado microrganismo num meio ou num alimento para outros alimentos (JAY, 2001).

Os microrganismos são mais sensíveis quando irradiados na presença de oxigênio devido à formação de peróxidos. A irradiação na presença de oxigênio e a temperaturas altas pode produzir odor e sabor desagradáveis, devido à oxidação lipídica (DIEHL, 1990; MONK et al, 1995, FARKAS, 2006). A irradiação dos alimentos sob vácuo e no estado congelado pode ser uma alternativa para minimizar a formação de produtos radiolíticos e as mudanças que ocorrem nas propriedades sensoriais (MONK et al, 1995).

A temperatura é um dos fatores extrínsecos de maior influência na sobrevivência das células durante o processo de irradiação (MONK et al, 1995).

Os microrganismos em alimentos congelados ou desidratados são significativamente mais resistentes à radiação pela diminuição de atividade de água (DIEHL, 1990; FARKAS, 1998; JAY, 2001).

Embora a resposta de microrganismos à irradiação tenha sido estudada em termos gerais, a influência da composição química do alimento na radiosensibilidade ou sua relação para prever a sobrevivência de um determinado patógeno precisa ser ainda detalhada (JAY, 2001).

O fato de que a exposição múltipla a doses subletais de radiação em um substrato possa produzir microrganismos mutantes radiorresistentes tem sido alvo de algumas especulações. Há evidências de que a radiorresistência do

microrganismo pode ser aumentada com aplicação de doses repetidas (MONK, 1995).

Entretanto, certos estudos mostraram que, para aumentar a radiorresistência de salmonela, foi necessário selecionar sobreviventes e sujeitá-los a, pelo menos 10 ou mais, exposições à radiação (MONK, 1995). Esta situação, porém parece ser muito difícil de ocorrer na prática, onde a probabilidade de aplicação de mais de um tratamento de radiação ionizante é pequena.

De acordo com FAN et al (2008), um dos campos de pesquisas mais recentes em irradiação de alimentos, focaliza na determinação da habilidade dessa tecnologia de inativar patógenos que estão internalizados, associados a biofilmes ou outras formas protetoras (FIG.4). Esses ambientes protetores reduzem consideravelmente a eficácia dos sanitizantes químicos comumente utilizados na indústria de alimentos, como hipoclorito de sódio, dióxido de sódio, hipoclorito de cálcio, entre outros (BURNETT & BEUCHAT, 2001; BEUCHAT, 2002).

### **3.8 Dose de inativação e valor $D_{10}$**

Quando uma população de microrganismos é irradiada com uma dose baixa, somente poucas destas células serão danificadas ou mortas. Porém, com o aumento da dose de radiação, o número de organismos sobreviventes decrescerá exponencialmente (isto ocorre também no tratamento térmico, com o aumento da temperatura). Microrganismos de espécies diferentes requerem diferentes doses para atingir o mesmo grau de inativação. A medida mais usada para medir a radiosensibilidade é o valor de  $D_{10}$  (dose de redução decimal), a qual é definida como a dose requerida para eliminar 90% da população bacteriana inicial, ou diminuir a população em 1 ciclo logarítmico.

Calcula-se através da fórmula:

$$D_{10} = D / (\log N_0 - \log N)$$

onde:

D= dose de radiação ionizante

$N_0$  = número inicial de microrganismos presentes

N = número de microrganismos após a irradiação

O valor  $D_{10}$  depende de vários fatores, incluindo o tipo de alimento a ser irradiado, ou seja, o meio em que se encontra o microrganismo, a temperatura, a presença de oxigênio e o conteúdo de água. Todos estes fatores, incluindo as condições de estocagem de pós-irradiação (para doses não esterilizantes), irão determinar as últimas medidas a serem tomadas para que o alimento seja considerado próprio para o consumo (DIEHL, 1990).

Células de *Escherichia coli* O157:H7, que estão internalizadas, parecem ser mais radioresistentes do que aquelas presentes somente na superfície (FAN *et al*, 2008). Na TAB. 5 estão registrados dados da literatura de valores de  $D_{10}$  para cepa patogênica de *E.coli*.

Tabela 5. Valor  $D_{10}$  para *E. coli* O157:H7, inoculada em vegetais minimamente processados e tratados com radiação gama (FAN *et al*, 2008)

<b>Produto</b>	<b>Valor <math>D_{10}</math> (kGy) (Superfície)</b>	<b>Valor <math>D_{10}</math> (kGy) (Internalizado)</b>
Alface branca	0.14	0.30
Alface roxa	0.12	0.35
Alface romana	0.21	0.39
Espinafre	0.24	0.45
Cebolinha	0.26	0.42

### 3.9 *Salmonella spp* e sua importância em alimentos

A salmonela pertence à família Enterobacteriaceae e o gênero possui duas espécies: *Salmonella* entérica, e *Salmonella bongori*. Há mais de 2400 sorotipos descritos, baseados nos antígenos O e H. A salmonela é um bacilo, não formador de esporos, gram-negativo, móvel, com duas exceções não móveis: *S. gallinarum* e *S. pullorum* (JAY, 2001).

As fontes de contaminação por *Salmonella ssp.* são fundamentalmente os animais domésticos, o homem (trato intestinal), pássaros e alguns répteis (D'AOUST, 1997).

A maioria das espécies é patogênica para humanos, causando febres entéricas, gastroenterites e septicemias, podendo também infectar muitas espécies animais (LE MINOR, 1984).

*S. typhi* e *S. paratyphi* A, B e C geralmente causam bacteremia e produzem febre tifóide e febre entérica em seres humanos, respectivamente. A dose infectante é menor que 15-20 células, mas depende da idade e do estado de saúde do hospedeiro e das diferentes cepas entre as espécies (JAY, 1986). Os sintomas da enfermidade podem ser agudos, como náusea, vômito, cólica abdominal, diarreia, febre e dor de cabeça. Podem durar de um a dois dias ou se prolongar, dependendo dos fatores inerentes ao hospedeiro, da dose ingerida e das características da cepa. As conseqüências crônicas são sintomas de artrite que podem surgir de 3 a 4 semanas após o aparecimento dos sintomas agudos (D'AOUST, 1997).

A dose infectante no alimento para pessoas saudáveis varia de acordo com o sorotipo e o alimento envolvido podendo ser inferior a 100 células viáveis/g ou ml do alimento, como no caso da *S. Eastbourne* em chocolate ou até superior a 10 células viáveis por g ou ml de *Salmonella spp.* (JAY, 1986). Em termos gerais, deve-se considerar também que podem existir casos de

imunidade em populações normais, e que existem populações especialmente suscetíveis (BOLLAERTS, 2008).

Atualmente, a salmonela é um dos microrganismos mais frequentemente envolvidos em surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVA) (JAKABI et al, 1999; HALL et al., 2008; CABEDO et al. 2008).

De acordo com o órgão americano Center for Disease Control e Prevention o número de surtos relacionados com patógenos microbianos aumentou nas últimas décadas, tendo o seu número dobrado no período de 1988-1991 (TAUXE et al, 1997). Em consequência disso, os registros de surtos envolvendo *Salmonella spp* em frutas sofreram um aumento, o que aumentou a preocupação das autoridades de Saúde Pública com esses alimentos (LEITÃO & PENTEADO, 2003; BURNETT & BEUCHAT, 2001 ).

Em 1991, ocorreu um surto interestadual envolvendo o consumo de melão, sendo o identificado *Salmonella poona* como o agente causador (FRANCIS et al, 1991; D' AOUST, 1997). Há descrições recentes de casos de salmoneloses provocadas pelo consumo de tomate e melão cantaloupe (BARAK et. al., 2008).

O consumo de polpas de frutas aumentou significativamente nos últimos anos, sendo muito utilizada como um substituto para o leite, sendo comum essa observação em países como os EUA (HARNACK *et al*, 1999; BORGES *et al*, 2007). Nesse sentido cresce a preocupação com surtos de DVA nesses produtos alimentícios.

### **3.10 *Escherichia coli* e sua importância em alimentos**

Coliformes são bacilos Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos que fermentam lactose em 24/48 horas, produzindo ácido e gás em caldo *Escherichia coli* à 35°C (SILVA *et al*, 1997). Sua presença em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo (principalmente no caso da

pasteurização), evidenciando práticas de higiene e sanitização inadequados para o processamento de alimentos (SILVA *et al*, 1997).

Os coliformes de origem fecal possuem as mesmas características dos coliformes totais, com exceção da temperatura e tempo de produção de gás (44°C/24h). Sabe-se que esse grupo bacteriano é representado por, pelo menos, três gêneros da família *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (Silva *et al*, 1997).

A maioria das cepas de *E. coli* é comensal e existem aquelas que são virulentas podendo causar doença ao homem. As cepas patogênicas são agrupadas de acordo com suas propriedades de virulência, mecanismo de ação, sintomas clínicos e estruturas antigênicas. As categorias incluem as chamadas *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), adesão difusa (DAEC), enteroagregativas (EaggEC) e produtoras de toxinas de Shiga (STEC) (DOYLE *et al*, 2001). A FIG. 6 mostra uma imagem microscópica de *E. coli*.

BEUCHAT (2002), afirma que cepas de *Escherichia coli* não patogênicas podem ser utilizadas em estudos científicos como substitutos da *E.coli* O157:H7. Conceito esse, que motivou a utilização da cepa ATCC 8739 de *E. coli* neste trabalho.

*E. coli* O157:H7 foi identificada pela primeira vez, no Center for Disease Control (CDC) dos EUA em 1975. Contudo, apenas em 1982 foi considerada como um patógeno causador de doença transmitida por alimentos, quando passou a ser relacionada com casos de diarreia sanguinolenta (WELLS *et al.*, 1983). Nesse ano, foi associada a dois surtos nos estados de Oregon e Michigan, envolvendo o consumo de hambúrgueres em uma cadeia americana de *fast food*.

Desde então, *E. coli* O157:H7 passou a ser considerada um problema de Saúde Pública, sendo causadora de surtos não só nos EUA, mas também no Japão, Canadá e Argentina (HINKENS *et al*, 1996; GLYUN *et al*, 1997).

Estudos epidemiológicos mostraram que *E. coli* O157:H7 pode ser transmitida através da água (potável ou de piscina), alimentos e através do contato pessoal. O gado tem sido incriminado como principal reservatório dessas cepas, devido a que a maior incidência estar relacionada a produtos derivados de carne bovina, principalmente, a carne moída e o leite. Contudo, já foi relacionada a surtos causados pela ingestão de cidra de maçã (BESER et al., 1995), molho para saladas (GLYUNN et al., 1997), maionese (RAGHUBEER et al., 1996) e iogurte (MORGAN et al., 1993).

Em agosto de 1994. *E. coli* O157:H7 foi declarada como adulterante de alimentos pelo Food Safety and Inspection Service (FSIS-USDA). Desde então, a carne moída e produtos derivados contaminados devem ser submetidos a algum processo tecnológico para eliminá-lo (DOYLE et al., 2001).

Em 1998, foram relatados ao Center of Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA 42 surtos causados por *E. coli* O157:H7 em contraste com os 31 surtos relatados anualmente entre 1994 e 1997. Os surtos afetaram 777 pessoas sendo que 153 (20%) foram hospitalizadas, 29 (4%) desenvolveram HUS e 3 (0,4%) foram a óbito (CDC, 2002 a).

Em 1993 ocorreu um surto no Estado de Oregon, EUA, provocado pelo consumo de melões e outros itens da mesa de saladas de um restaurante, aparentemente atingidos por contaminação cruzada através de produtos cárneos manipulados na cozinha (FENG, 1995).

Em 1996 ocorreram dois surtos nos EUA provocados pelo consumo de suco de maçã não pasteurizado. O primeiro atingiu pelo menos 70 pessoas, espalhadas por vários estados do oeste, com 3 casos de HUS e nenhuma morte (CDC, 2002 a). O segundo atingiu 45 pessoas dos estados da Califórnia, Colorado, Columbia Britânica e Washington, com 12 casos de HUS e nenhuma morte (CDC. 2002a).

No Brasil não há dados sistemáticos que possam indicar a situação da ocorrência de *E. coli* O157:H7 em alimentos. Um estudo recente analisou-se cerca de 800 amostras de hambúrgueres produzidos por frigoríficos do sul e sudeste, não sendo detectada a presença de *E. coli* em nenhuma delas (SILVEIRA et al., 1999). Apesar disso, é necessário uma análise cuidadosa, em razão de que a qualidade das frutas varia muito de região para região, sendo afetada pelas condições de cultivo, tratamento de água de irrigação e sistemas de distribuição (BEUCHAT, 2002; SILVEIRA, 2003).

### 3.11 – *Alicyclobacillus acidoterrestris* e sua importância em alimentos

As espécies pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus* que eram classificadas dentro do gênero *Bacillus* até 1992, foram inicialmente descritas como bacilos esporulados acidotermófilos isolados de fontes termais e solo (SPLITTSTOESSER et al, 1994; PIRES, 2006).

*Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria termoacidofílica, não-patogênica e esporogênica, que foi identificada e isolada em vários sucos de frutas não pasteurizados, como suco de maçã e laranja (SILVA & GIBBS,2001).

Em 1984 um novo tipo de bactéria deteriorante foi relatado em embalagens assépticas de suco de maçã, sendo conhecida posteriormente por *Bacillus acidoterrestris*. Anos depois um novo gênero, *Alicyclobacillus* caracterizado por ácidos graxos  $\omega$ -alicyclicos como o componente principal de sua membrana celular foi proposto (SPLITTSTOESSER et al, 1994). O organismo possui as seguintes características: bacilos móveis, gram-positivos, aeróbicos e formadores de esporos ovais. Geralmente os meios de cultura utilizados para o seu isolamento são o Bacillus acidocaldarius, também conhecido por BAM e o Agar soro de laranja - OSA (SILVA & GIBBS,2001; SU-SEM & KANG, 2004) (FIG. 8).

SU-SEM & KANG, (2004) afirmam que são grandes as evidências de que a presença dos ácidos graxos  $\omega$ -alicyclicos está associada à excepcional

capacidade de *A. acidoterrestris* de resistir a ambientes ácidos (faixa de pH: 2.2 à 5.8) e tratamentos térmicos (resiste até 98°C).

PETTIPHER *et al* (1997), observaram que *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi capaz de sobreviver a tratamento térmico a 95°C por 30 segundos em suco de laranja e subseqüentemente causar deterioração no sabor.

Em 1982, na Alemanha, pesquisadores conseguiram isolar *A. acidoterrestris* como o agente deteriorante de suco de maçã. Desde então *Alicyclobacillus spp* foi considerado causador em vários incidentes envolvendo deterioração de sucos de frutas na Austrália, Reino Unido, Japão e EUA (MATSUBARA *et al*, 2002; SU-SEM & KANG, 2004).

Análises realizados nos EUA mostraram que 35% da produção de sucos de frutas registravam perdas relacionadas à deterioração de seus produtos causadas por *Alicyclobacillus spp* (SU-SEM & KANG, 2004).

Em sua maioria, os casos de isolamento da bactéria *Alicyclobacillus spp* ocorreram durante o verão, sendo suco de maçã e de tomate os produtos mais afetados. A deterioração foi caracterizada como uma alteração forte no sabor e odor, em alguns casos apresentando sedimentação (SU-SEM & KANG, 2004). Investigações feitas em laboratório, mostraram que suco de maçã e de tomate apresentaram as melhores características para o desenvolvimento de *A. acidoterrestris*.

A concentração de sólidos solúveis é um importante fator de crescimento para *Alicyclobacillus spp*. O crescimento foi inibido quando o conteúdo de açúcar nas amostras de suco ultrapassara 18°Brix (SU-SEM & KANG, 2004).

A alta ocorrência de *Alicyclobacillus spp* em suco de fruta é preocupante, o que implica em perdas comerciais em escalas muito grandes, considerando que muitas indústrias de alimentos sequer contam com sistema de *Recall* implantado (EIROA *et al*, 1999; SILVA & GIBBS, 2001).

*Alicyclobacillus spp* se coloca como um novo desafio para a indústria de sucos. Infelizmente, em grande parte dos casos, a deterioração só é percebida quando o consumidor se utiliza do produto (MURAKAMI *et al*, 1998; SILVA & GIBBS, 2001; OITA, 2002).

Reclamações recebidas pelas indústrias definem a deterioração causada por *Alicyclobacillus spp* como “odor medicinal”, “antisséptico”. A resistência à temperatura de pasteurização a baixo pH e a capacidade de produzir *off-flavors* leva pesquisadores de todo o mundo à buscar alternativas para controlar a contaminação por essa bactéria e é o principal alvo de programas de controle de qualidade nas indústrias processadoras de frutas (SILVA & GIBBS, 2001; VIEIRA *et al*, 2002).

### **3.12 Microbiologia de alimentos**

Embora seja extremamente difícil determinar com precisão, o início da compreensão por parte do homem, da existência e importância dos microrganismos em alimentos, evidências indicam que esse conhecimento precedeu ao estabelecimento da Microbiologia como ciência (JAY, 2001).

Inicialmente, o homem limitava-se exclusivamente a usufruir os recursos naturais abundantes, sem qualquer atividade organizada de criação ou cultivo, predominantemente os de origem animal. Com o gradual avanço cultural, o homem passou a desenvolver técnicas de produção de alimentos, levando necessariamente aos primeiros esforços no sentido de melhor acondicioná-los e preservá-los (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Segundo FRANCO & LANDGRAF, (1996), a evidência do processo de deterioração dos alimentos levou ao desenvolvimento intuitivo de técnicas para melhor preservação, no entanto, o homem não havia relacionado o papel dos alimentos na transmissão de doenças ou como agentes de intoxicação alimentar.

O primeiro pesquisador a apreciar e entender a presença dos microrganismos nos alimentos foi Louis Pasteur. Em 1837 ele demonstrou que a acidificação do leite era causada por microrganismos, e em 1860 empregou calor para destruir microrganismos indesejáveis em vinho e cerveja. Processo este que passou a ser conhecido como Pasteurização (JAY, 2001).

A partir das pesquisas de Pasteur e, particularmente nas últimas décadas, o conhecimento na área de Microbiologia de Alimentos teve um avanço muito acentuado (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Os microrganismos estão intimamente associados com a disponibilidade, abundância e qualidade dos alimentos consumidos pelo homem (FARKAS, 1998; JOHNSON *et al*, 1995).

Alguns microrganismos quando presentes nos alimentos podem representar um risco à saúde. Estes microrganismos, genericamente chamados patogênicos, podem afetar tanto o homem quanto os animais. As características das doenças que esses organismos causam dependem de uma série de fatores inerentes ao alimento, ao microrganismo patogênico em questão e ao indivíduo a ser afetado (FRANCO & LANDGRAF, 1996; DOYLE, *et al*, 2001; CDC, 2002).

As principais fontes de microrganismos que contaminam alimentos são o solo, água, plantas, utensílios, trato intestinal do homem, manipuladores de alimentos, entre outros (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

De acordo com a constituição da parede celular, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram negativas. Gram-negativas se apresentam de cor avermelhada quando coradas pelo método de Gram. Gram-positivas se apresentam de cor roxa quando coradas pelo método de Gram. A parede da célula Gram-negativa é constituída por estruturas de múltiplas camadas bastante complexas, que não retêm o corante quando submetidas a solventes no qual o corante é solúvel, sendo descoloradas e, quando acrescentados outros corantes, adquirem a nova coloração. Já a

parede da célula Gram-positiva consiste de única camada que retém o corante aplicado, não adquirindo a coloração do segundo corante (SILVA *et al*, 1997).

JAY (2001) afirma que, bactérias Gram-positivas apresentam uma parede espessa, homogênea, geralmente não estratificada e predominantemente constituída por peptidoglicano. Deste modo, o precipitado insolúvel que se forma por ação do solvente, fica retido no interior da célula pela camada espessa de peptidoglicano, logo, estas células não são descoradas permanecendo com a coloração conferida pelo corante primário (púrpura).

JAY (2001) afirma que, as bactérias Gram - negativas apresentam uma parede estratificada constituída por uma membrana externa e por uma camada mais interna que contém peptidoglicano e que é mais fina que a das Gram-positivas. Deste modo, o precipitado insolúvel, que se forma por ação do solvente, é removido (camada de peptidoglicano é mais fina que a das Gram-positivo e a membrana externa é parcial ou totalmente solubilizada pelo agente descolorante), pelo que as células ficam descoloradas, corando de vermelho pelo contrastante.

### **3.12.1 Microrganismos indicadores:**

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Contagem de bactérias aeróbias mesófilas: Esta contagem é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Embora não existam na legislação brasileira padrões para bactérias mesófilas totais, de forma geral, é preconizado que alimentos prontos para consumo

contendo contagens microbianas da ordem de  $10^4$  e  $10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC)/g são impróprios para o consumo humano devido a perda do valor nutricional, alterações organolépticas, riscos de deterioração e/ou presença de patógenos (VIEITES *et al*, 2004; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Coliformes totais: este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C, por 48 horas. São bacilos gram negativos e não formadores de esporos. Números altos desse grupo (acima de 1000 NMP/g) pode representar contaminação pós processamento. A presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (DOGAN-HALKMAN *et al*, 2003; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Coliformes fecais: As bactérias pertencentes a este grupo correspondem aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44-45,5°C. Nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *E.coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

*Escherichia coli*: uma vez detectada no alimento, indica contaminação bacteriana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias (WELLS, 1983; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As questões relacionadas à presença de bactérias patogênicas em alimentos têm sido historicamente relacionadas a alimentos de origem animal como carne, leite e ovos (NIEMIRA, 2003; FARKAS, 2006). Entretanto, devido às mudanças das técnicas de produção no campo, processamento, modelos de distribuição e modificação dos padrões de consumo dos produtos de origem vegetal, houve um notável aumento do número de casos de doenças transmitidas também por alimentos de origem vegetal (HEDBERG *et al.*, 1994; TAUXE *et al.*, 1997).

Folhosos, tubérculos e frutas normalmente contêm de 1000 a 100000 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de tecido vegetal (SUMMER & PETERS, 1997; MERCIER & LINDOW, 2000). A maioria desses microrganismos é constituída de bactérias não-patogênicas que interagem com o tecido vegetal e também entre si, normalmente formando um biofilme bacteriano como parte da fito ecologia.

De acordo com BORDINI *et al* (2007), na cadeia de produção, várias etapas podem levar a contaminação de produtos vegetais. Os fatores que podem resultar em uma contaminação pré-colheita, são o manuseio dos fertilizantes, contaminação fecal por animais e colaboradores, uso de água contaminada na irrigação e presença de animais silvestres ou domésticos.

### **3.13 Análise sensorial**

A análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos (IAL, 2006).

De acordo com DUTCOSKY (2007), a análise sensorial se dividiu em quatro fases na metodologia de avaliação da qualidade sensorial:

1º fase (antes de 1940): época artesanal/pré-científica da indústria de alimentos. A qualidade sensorial era determinada pelo proprietário da empresa.

2º fase (1940-1950): época da expansão da indústria de alimentos e incorporação de pessoal técnico, geralmente vindo da área química e farmacêutica. Conceitos de controle de processo e de produto final foram introduzidos, porém, os métodos utilizados eram químicos e instrumentais, não sensoriais.

3º fase (1950-1970): foi nessa fase da indústria alimentícia que se considerou seriamente a utilização do homem como instrumento de medida das características sensoriais dos alimentos.

4º fase (após 1970): definiu-se que a qualidade sensorial de um alimento não é uma característica própria do alimento, mas sim o resultado da interação entre o alimento e o homem. Reconheceu-se que qualidade sensorial é função tanto dos estímulos procedentes dos alimentos como também das condições fisiológicas, psicológicas e sociológicas do indivíduo ou do grupo que avalia o alimento. Na FIG. 04 está esquematizada a rota da percepção do alimento até o cérebro.

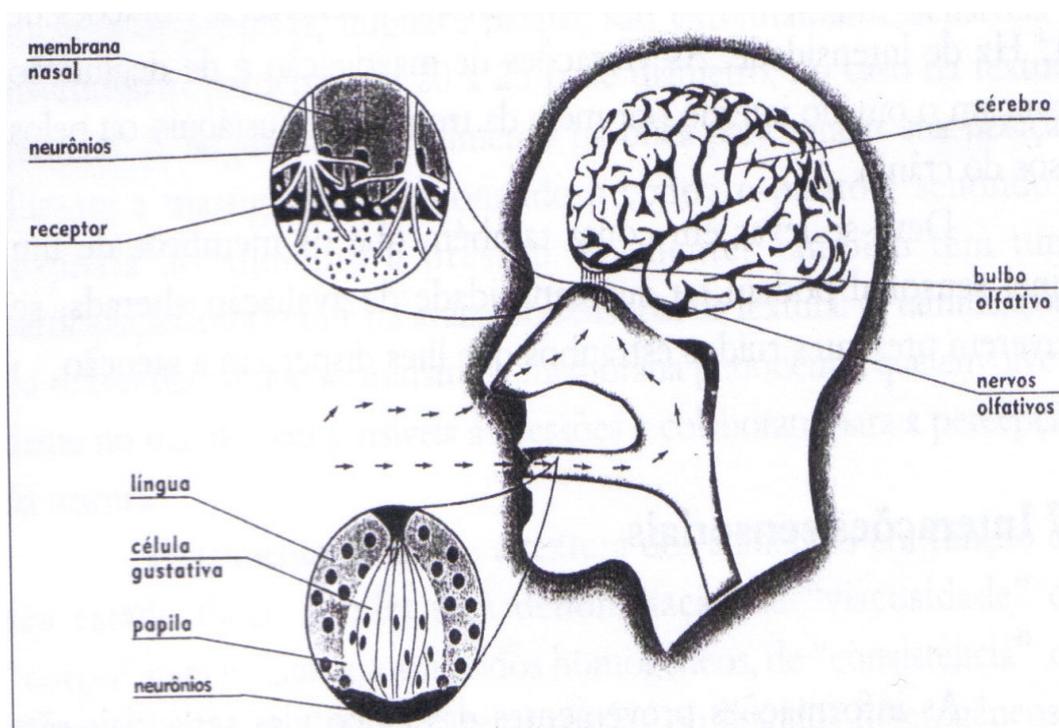


Figura 04. Rota da percepção do alimento até o cérebro (DUTCOSKY, 2007)

De acordo com DUTCOSKY (2007), as aplicações da análise sensorial são inúmeras nas quais se podem destacar:

- a) controle das etapas de desenvolvimento de um novo produto;
- b) avaliação do efeito das alterações nas matérias – primas ou no processamento tecnológico sobre o produto final;
- c) redução de custos: um programa de redução de custos pode se basear em elementos como ingredientes de menor preço, processos menos onerosos ou a produção num local diferente;
- d) seleção de novos fornecedores;
- e) controle de efeito de embalagem sobre os produtos acabados;

O processo de irradiação deve ser aplicado de maneira que não comprometa as características sensoriais quando aplicado em alimentos, como preconiza o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos (ANVISA, 2001). Assim, é imprescindível realizar análise sensorial de produtos irradiados.

### **3.13.1 Testes discriminativos – teste triangular:**

Os testes sensoriais discriminativos ou de diferença são considerados métodos objetivos utilizados em análise sensorial de alimentos, bebidas e água, com os efeitos das opiniões dos indivíduos minimizados (IAL, 2006; DUTCOSKY, 2007). Medem atributos específicos pela discriminação simples, indicando por comparações, se existem ou não diferenças entre amostras (IAL, 2006).

Um dos testes mais empregados em análise sensorial de alimentos é o teste triangular. O objetivo do teste é verificar se existe diferença significativa entre duas amostras que sofreram tratamentos diferentes. Ex.: verificar se o processamento por irradiação causou alterações sensoriais no produto (DUTCOSKY, 2007).

Cada julgador recebe três amostras codificadas e é informado que duas amostras são iguais e uma é diferente. Em seguida, é solicitado ao julgador a provar as amostras da esquerda para a direita e identificar a diferente (DUTCOSKY, 2007).

### **3.13.2 Testes afetivos – Testes de aceitação por escala hedônica**

Nos testes afetivos, o julgador expressa seu estado emocional ou reação afetiva ao escolher um produto. Os julgadores não precisam ser treinados bastando serem consumidores freqüentes do produto em avaliação (IAL, 2006).

Os testes afetivos podem ser aplicados em laboratório ou em ambientes de uso doméstico (IAL, 2006).

Com o teste da escala hedônica, o indivíduo expressa o grau de gostar ou desgostar de um determinado produto, de forma globalizada ou em relação a um atributo específico. As escalas mais utilizadas são as de 7 a 9 pontos, que contem termos definidos situados, por exemplo, entre “gostei muitíssimo” e “desgostei muitíssimo” contendo um ponto intermediário com termo “nem gostei; nem desgostei” (IAL, 2006).

## **4.0 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Microrganismos.**

Foram utilizadas cepas de *Salmonella poona* (isolada de material clínico), *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Alicyclobacillus acidoterrestris* (isolada de suco de laranja), da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz. As cepas foram mantidas em temperatura de 5º C em caldo Infuso cérebro e coração (BHI).

#### **4.1.2 Polpa de manga.**

A polpa de manga na forma congelada foi obtida em 2 lojas de uma rede de hipermercados localizadas na cidade de São Paulo e Itapeverica da Serra.

As amostras foram transportadas em caixa isotérmicas em embalagens de polietileno, contendo 500g de polpa mantidas posteriormente em congelador à -12ºC.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Caracterização microbiológica das polpas provenientes de hipermercados**

Foram coletadas amostras de polpa de manga congelada de diversas marcas, disponíveis no hipermercado no dia anterior à análise. As análises em laboratório foram feitas semanalmente com frequência de 20 amostras por semana entre Junho de 2006 e Junho de 2007. As amostras de polpa de manga foram analisadas para contagem de mesófilos aeróbios, pesquisa de coliformes totais, fecais e detecção de *Escherichia coli* para conhecer a qualidade microbiológica dos produtos comercializados. As polpas foram descongeladas em geladeira por 12 horas antes de serem submetidas a

análises microbiológicas. A técnica do Número Mais Provável (NMP) e o método de contagem padrão em placas foram os procedimentos utilizados de acordo com o descrito por Silva *et al* (1997), partindo de 25g de polpa (FIG. 05):

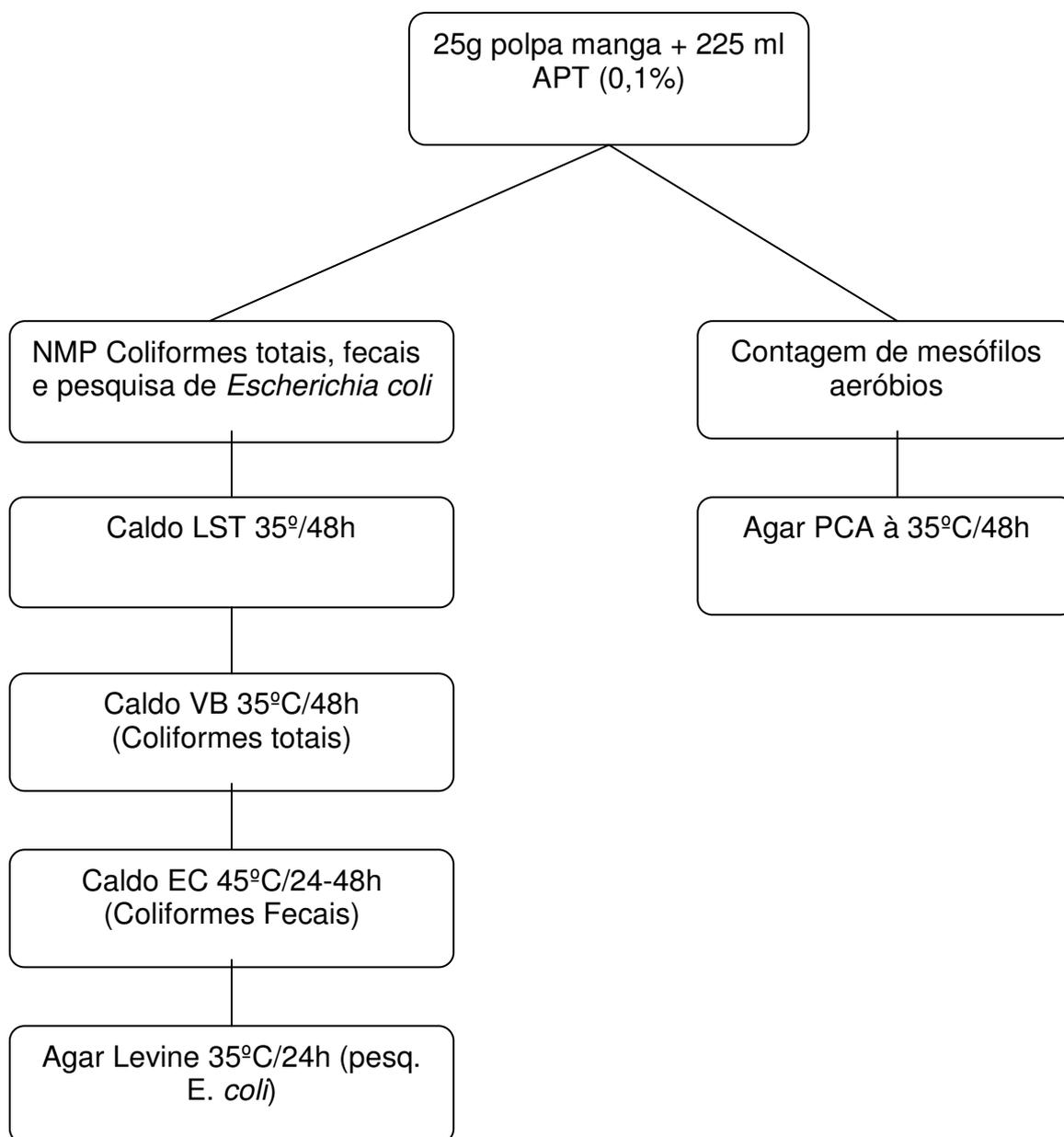


Figura 05. Análise microbiológica de polpa de manga congelada

Para fins de caracterizar a qualidade microbiológica das polpas de manga comercializadas no mercado local foram estabelecidos os seguintes limites:

- Mesófilos aeróbios: até  $10^6$  UFC/g (VIEITES *et al*, 2004)
- Coliformes totais: até  $10^3$  NMP/g (VIEITES *et al*, 2004)
- Coliformes fecais:  $< 10^2$  NMP/g (ANVISA, 2001)
- *Escherichia coli*:  $< 3$  NMP/g, considerado ausência de crescimento (VIEITES *et al*, 2004; PEREIRA, 2006)

#### 4.2.2 Irradiação da polpa de manga contaminada em laboratório

Vinte amostras foram submetidas previamente a controle microbiológico, e selecionadas amostras negativas para uso de contaminação experimental na etapa de determinação da radiorresistência de *Escherichia coli*, *Salmonella poona* e *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

As cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella poona* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* foram reativadas em caldo Infuso cérebro e coração (caldo BHI, Difco) e incubadas à  $35^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{h}$  para *Escherichia coli* ATCC 8739 e, *Salmonella poona* e a  $42^{\circ}\text{C}/24$  para *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

As amostras de polpa de manga foram descongeladas em geladeira por 12 horas antes de serem contaminadas com as bactérias citadas acima.

Para cada bactéria, foram separadas 6 porções de 50g da polpa de manga, denominadas subamostras, assim tratadas: em recipientes estéreis de polietileno de baixa densidade com capacidade de 540ml, foram transferidos 50g de polpa de fruta. Foi adicionado 1ml da cultura de cada cepa, em fase estacionária, que correspondeu a aproximadamente  $10^6$  células viáveis/ml.

Após a adição das culturas, o produto foi homogeneizado em stomacher para se obter uma distribuição uniforme do contaminante pela amostra. Cada teste (5 doses de radiação e um controle para cada microrganismo) teve 4 repetições, sendo 1 teste por semana para cada bactéria, perfazendo um total de 4 semanas.

Depois de acondicionadas nos devidos recipientes, as amostras foram transportadas em caixa isotérmica com gelo, do laboratório de Microbiologia de alimentos da Refricon Mercantil até o irradiador localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares–IPEN, SP.

A FIG. 06 apresenta a fonte de radiação gama, a Gammacell 220 da AECL.



Figura 06. Irradiador Gammacell 220.

As amostras inoculadas com as bactérias foram expostas após 1 hora aproximadamente, às seguintes doses de radiação: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 kGy, em temperatura inicial de  $-12 \pm 1,01$  °C medida com termógrafo marca Testo, modelo 167, em fonte de  $^{60}\text{Co}$  Gammacell 220 (AECL), com taxa de dose de 2,94 kGy/h com utilização de dosímetros Âmbar 3042 para monitoramento da dose.

Após a irradiação, as amostras tratadas e os respectivos controles (não irradiados), foram submetidas ao exame microbiológico após 24h, para fins de quantificação dos sobreviventes de *Escherichia coli*, *Salmonella poona* e *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

#### **4.2.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de *Salmonella poona***

A determinação de *Salmonella poona* foi feita utilizando-se a técnica do número mais provável (NMP), de acordo com Silva et al (1997), e os meios de cultura para isolamento foram os recomendados pelo BAM/FDA, (2001) com modificações.

De cada amostra foram retiradas 25ml sem enriquecimento seletivo e adicionados 225ml de água peptonada tamponada (APT) à 0,1%. A partir deste homogeneizado, que corresponde à diluição  $10^{-1}$ , foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$ , utilizando-se o mesmo diluente. Três alíquotas de 1ml da diluição  $10^{-1}$  foram inoculadas em três tubos de APT 0,1% e alíquotas de 1ml foram inoculadas em 5 séries de três tubos cada de APT 0,1% e incubadas à 35° C /24h. Os tubos que apresentaram turvação, foram semeados em duplicata na superfície dos Agares Salmonella-Shigella (SS) e Agar verde-brilhante e incubadas à 35° C /24h.

#### **4.2.4 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de *Escherichia coli* ATCC 8739**

A determinação de *Escherichia coli* foi feita utilizando-se a técnica do número mais provável (NMP), de acordo com Silva et al (1997), e os meios de cultura para isolamento foram os recomendados por Silva *et al* (1997) com modificações.

De cada amostra foram retiradas 25ml e adicionados 225ml de água peptonada tamponada (APT). A partir deste homogeneizado, que corresponde à diluição  $10^{-1}$ , foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$ , utilizando-se o mesmo diluente. Três alíquotas de 1ml da diluição  $10^{-1}$  foram inoculadas em três tubos de APT 0,1% e alíquotas de 1ml foram inoculadas em 5 séries de três tubos cada de APT 0,1% e incubadas à 35°C/24h. Os tubos que apresentaram turvação, foram semeados em duplicata na superfície do Agar Levine e incubadas à 35° C /24h.

As colônias características de *Escherichia coli* foram confirmadas através de testes bioquímicos específicos conhecidos como IMVC (Teste de Citrato, Teste de Indol, Teste de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer).

#### **4.2.5 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de *Alicyclobacillus acidoterrestris***

A determinação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi feita utilizando-se a técnica do número mais provável (NMP), de acordo com Silva et al (1997), e os meios de cultura para isolamento foram os recomendados por NAKAUMA *et al* (2004), com modificações.

De cada amostra foram retiradas 25ml e adicionados 225ml de água peptonada tamponada (APT). A partir deste homogeneizado, que corresponde à diluição  $10^{-1}$ , foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$ , utilizando-se o mesmo diluente. Três alíquotas de 1ml da diluição  $10^{-1}$  foram inoculadas

em três tubos de APT 0,1% e alíquotas de 1ml foram inoculadas em 5 séries de três tubos cada de APT 0,1% e incubadas à 42° C /24h. Os tubos que apresentaram turvação foram semeados em duplicata na superfície do Agar Soro de laranja e incubadas à 42° C /48h.

#### **4.2.6 Determinação da radiorresistência dos microrganismos**

Para cada dose de radiação, a fração de sobrevivida foi estimada dividindo o número de células viáveis após a irradiação com a dose D (ND) dividido pelo número de células viáveis iniciais (NO). Os valores de D<sub>10</sub> foram calculados de acordo à formula:

$ND = NO \cdot 10^{-D/D_{10}}$  onde D é a dose aplicada e D<sub>10</sub> é a dose de radiação necessária para a destruição de 90% da população microbiana. A formula pode ser expressa como uma equação linear:

$$D_{10} = D / (\log N_0 - \log N)$$

sendo D<sub>10</sub> a tangente estimada por regressão linear da curva de sobrevivida (IAEA. 1982)

#### **4. 3 Análise sensorial**

Para verificar se a aplicação da radiação gama altera as características sensoriais da polpa de manga, foram utilizados o teste triangular e o teste de aceitação (escala hedônica). O teste triangular serve para avaliar pequenas diferenças entre duas amostras que sofreram tratamentos diferentes e o teste de aceitação expressa o julgamento do consumidor sobre a qualidade sensorial do produto (DUTCOSKY, 2007). A dose utilizada foi a de 5 kGy, que foi a dose que atingiu níveis não-detectáveis nas 3 bactérias utilizadas no estudo.

### **4.3.1 Recrutamento de julgadores**

Em uma indústria de alimentos localizada em Itapeçerica da Serra, recrutou-se 32 indivíduos do sexo feminino para participar dos testes sensoriais. Para identificar e qualificar as características destes indivíduos levou-se em conta faixa etária, nível de escolaridade, o hábito e frequência no consumo de manga e/ou derivados e o conhecimento do processo de irradiação de alimentos. Utilizou-se uma ficha-formulário (ANEXO I) para preenchimento de acordo com TAIPINA *et al* (2004) e RIBEIRO (2006).

Também foi utilizada uma escala de intenção de compra de 5 pontos, variando de certamente compraria a certamente não compraria.

### **4.3.2 Teste de diferença - triangular**

Um quilo de polpa de manga foi fracionado em duas porções de 500g, sendo que uma porção foi irradiada com 5 kGy e a outra foi utilizada como controle (0kGy). Os provadores receberam três amostras de polpa de manga, sendo duas iguais e uma diferente, codificadas com três dígitos, uma ficha e um copo de água. Foi orientado que provassem da esquerda para direita ingerindo um pouco de água entre as amostras e, ao final, indicar qual delas era amostra diferente (ANEXO I).

### **4.3.3 Teste de aceitação – Escala hedônica**

O principal uso da polpa de manga é como ingrediente em produtos como sorvetes, biscoitos e sobremesas em geral. Sendo assim, para avaliar a aceitação da polpa de manga irradiada, foi elaborada uma “mousse” tendo a polpa de manga como ingrediente. No preparo da mousse foram utilizados;

- (1) lata de leite condensado;
- 500 gramas de polpa de manga irradiada;
- (2) colheres (sopa) de suco de limão;
- (1) envelope de gelatina em pó sem sabor (12g);

- (3) claras.

O método de preparo seguiu as seguintes etapas: o leite condensado foi batido em liquidificador com a polpa de manga e o suco de limão. Adicionou-se cinco colheres (sopa) de água fria à gelatina e levado ao fogo em banho-maria até dissolver. Foi adicionado a gelatina ao creme de manga e misturado bem. As claras batidas em neve foram incorporadas delicadamente ao creme de manga. A mousse foi distribuída em recipientes apropriados e levada à geladeira por no mínimo 3 horas.

Optou-se pela escala hedônica de sete pontos, conforme DUTCOSKY (2007), dimensionada de (1) desgostei muitíssimo a (7) gostei muitíssimo, em relação aos atributos de sabor, aroma e aparência geral. Também foi utilizada uma escala de intenção de compra de cinco pontos, variando de (1) certamente não compraria a (5) certamente compraria (Anexo II).

Os atributos foram avaliados em copo de vidro incolor de 250 mL, contendo 50g do mousse, tampado com filme plástico.

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização microbiológica das polpas provenientes dos hipermercados

Para fins de caracterizar a qualidade microbiológica das polpas de manga comercializadas no mercado local foram realizadas contagens de coliformes totais que são apresentadas na TAB. 6. Os resultados mostram que 6% das amostras de polpa de manga apresentaram contagens acima de  $10^3$  NMP/g de coliformes totais e 94% estavam dentro dos critérios estabelecidos previamente (vide 4.2.2.2).

Tabela 6. Percentual de amostras que atendem os critérios admitidos para coliformes totais de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeperica da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.

Situação	% das amostras	NMP coliformes totais/g
Conformidade	94	$<10^3$
Não conformidade	6	$>10^3$

SANTOS et al., (2008) também obtiveram resultados positivos (4,3%) para coliformes totais em amostras de polpas de frutas comercializadas em feira livre da cidade de Palmas-TO.

GUEDES (2005), avaliando polpa de açaí, não obteve contagens superiores a 460 NMP/g de coliformes totais, relacionando essas baixas contagens ao fato de que os produtores praticam boas práticas de fabricação em toda a cadeia de processamento do fruto.

BUENO *et al* (2002), avaliando polpa de cupuaçu, acerola, goiaba, cacau, manga, cajá, uva, caju, mamão, melão, abacaxi, siriguela, umbu, morango e açaí, não detectaram coliformes totais em nenhuma das 15 amostras analisadas, apresentando contagens abaixo de 1 NMP/g de produto.

LIMA *et al* (2001), analisando polpa de tamarindo, cajá, pitanga, maracujá, tangerina, melão, abacaxi, seriguela, acerola, manga, ameixa e caju, detectaram que 6,9% das amostras apresentavam elevada contaminação por coliformes totais, relacionando a possibilidade de haver deficiências nas condições higiênico-sanitárias no processo de produção das polpas.

LEITE *et al* (2000), analisando coliformes totais em amostras de polpa de frutas obtiveram contagens de 43 NMP/g em polpa de manga e maracujá, 1100 NMP/g em polpa de goiaba e ausência desse grupo em polpa de abacaxi, associando esses resultados as características intrínsecas de cada produto, principalmente o pH.

As contagens de coliformes fecais e pesquisa de *Escherichia coli* são apresentadas nas TAB. 7 e 8.

Tabela 7. Percentual de amostras que atendem os critérios admitidos para coliformes fecais de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeperica da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.

<b>Situação</b>	<b>% das amostras</b>	<b>NMP coliformes fecais/g</b>
Conformidade	79	$<10^2$
Não conformidade	21	$>10^2$

Tabela 8. Percentual de amostras que atendem os critérios admitidos para *E. coli* de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeceira da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.

Situação	% das amostras	NMP <i>E.coli</i> /g
Conformidade	89	< 3 (ausência)
Não conformidade	11	> 3

Observa-se que 21% das amostras apresentaram contagens acima de 100 NMP/g para coliformes fecais, que é o limite recomendado pela RDC 12, que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos. E 11% das amostras foram positivas para a presença de *Escherichia coli*.

PEREIRA *et al* (2004) analisando amostras de manga minimamente processada, observaram que em relação a coliformes fecais, todas as amostras analisadas enquadraram-se nos padrões da legislação brasileira.

MARTINS *et al* (2004), analisando polpas de morango (15 amostras) e melão (15 amostras) não identificaram a presença de bactérias do grupo coliformes totais e nem de coliformes fecais.

LIMA *et al* (2001); GUEDES (2005); BUENO *et al* (2002) e ABREU (2003) não identificaram coliformes fecais acima do permitido pela RDC 12, em análises de diversas polpas de frutas, o que não foi observado neste trabalho, ressaltando que o número de amostras analisadas para estabelecer o perfil microbiológico foi bem superior aos trabalhos dos autores citados, chegando a ser até 10 vezes maior em alguns casos.

LEITE *et al* (2000), avaliando a presença de coliformes fecais (CF) em polpas de frutas diversas detectou: Abacaxi com 100% de ausência de CF,

Cajá com 75% de ausência de CF , Goiaba com 40% de ausência de CF, Manga com 30% de ausência de CF e Maracujá com 70% de ausência de CF.

Essas porcentagens evidenciam uma qualidade microbiológica insatisfatória, a qual, segundo os autores, estão relacionadas a falhas higiênicas durante o processamento e execução das operações de limpeza e sanificação de utensílios, equipamentos, além das más condições de armazenamento.

NASCIMENTO *et al* (2006), analisando polpa de frutas diversas, observou que 24% das amostras apresentaram contaminação por *Escherichia coli*, associando esse resultado à qualidade da água utilizada no processo, ou com práticas inadequadas de higiene pessoal dos manipuladores.

LEITE *et al* (2000), analisando coliformes fecais em polpa de manga observou que 50% das amostras estavam em desacordo com o estabelecido pela legislação (Portaria 01/87 do MS). Já Bruno *et al.* (2005), analisando frutas minimamente processadas, encontrou 13,3% de contaminação por coliformes fecais ressaltando a falta de procedimentos higiênico-sanitários adequados.

As contagens das bactérias do grupo mesófilos aeróbios estão apresentadas na TAB. 9. Não existem muitos dados disponíveis a respeito da contagem de mesófilos aeróbios em polpa de frutas, mas os dados deste trabalho corroboram em grande parte os trabalhos disponíveis na literatura.

Tabela 9. Percentual de conformidade para mesófilos aeróbios das amostras de polpa de manga comercializada nas cidades de São Paulo e Itapeçerica da Serra no período de Junho/2006 à Julho/2007.

Situação	% das amostras	UFC mesófilos aeróbios/g
Conformidade	97	<10 <sup>5</sup>
Não conformidade	3	>10 <sup>5</sup>

As contagens em placa para o grupo de mesófilos aeróbios somente excederam 10<sup>5</sup> UFC/g em 3% das amostras. KAMAT *et al.* (2000), analisando amostras de sorvete de baunilha, encontraram contagens de mesófilos entre 10<sup>3</sup> e 10<sup>5</sup>UFC/g, relacionando a falta de controle na cadeia do frio como um dos fatores responsáveis por tais contagens. AYCICEK *et al* (2006), encontraram de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> UFC/g analisando frutas e vegetais minimamente processados, enfatizando a necessidade da aplicação de boas práticas agrícolas no manejo de frutas e vegetais minimamente processados.

EL-SAMAHY *et al.* (2000), encontraram em polpa de manga, contagens de mesófilos aeróbios entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> UFC/g, também relacionando a falta de controle da temperatura de armazenamento e de condições adequadas de processamento como os principais responsáveis pela contagem elevada desse grupo bacteriano. FEITOSA *et al* (1999), analisando polpas de acerola, cajá e caju, encontraram contagens entre 10 e 10<sup>5</sup> UFC/g mostrando a necessidade de melhorias no manuseio, transporte e sistema de armazenamento no processamento de polpa de frutas.

DAVEY (1976), afirma que para sucos e polpas de frutas congeladas, as mais importantes fontes de contaminação são originárias do solo, favorecida pela má higiene das mãos dos manipuladores que ocorrem ao longo da linha

de produção. Salienta que os coliformes e as bactérias do grupo mesófilos aeróbios fazem parte da flora microbiana desses produtos e podem ocorrer em grandes números tanto nos equipamentos utilizados como nos manipuladores.

A água utilizada na irrigação de frutas e vegetais pode ser uma fonte de contaminação por microrganismos por estar, as vezes, contaminada com protozoários, bactérias e vírus patogênicos. A contaminação desse tipo de produtos pela água utilizada na irrigação depende da técnica utilizada e da qualidade dessa água (FEITOSA *et al*, 1999; BEUCHAT, 2002; EUROPEAN COMMISSION, 2002; PENTEADO & LEITÃO, 2004).

BASTOS *et al* (1998), em estudo com 15 fábricas de polpa de frutas no Ceará, observaram que 90% delas tinham total desconhecimento dos conceitos de Boas Práticas de Fabricação (BPFs).

CUNHA *et al* (2000), através de análise microbiológica em superfície de equipamentos como despoldadeira e envasadora, em fábricas processadoras de polpas de frutas, observou não conformidades em relação aos procedimentos de limpeza e sanitização, evidenciados pelas altas contagens de mesófilos aeróbios.

BORGES *et al* (2007), avaliando polpas de Acerola, Goiaba, Graviola e Manga não detectou bactérias do grupo coliformes fecais e nem *Salmonella spp*, porém detectou quantidades expressivas (acima de 100 UFC/cm<sup>2</sup>) de mesófilos aeróbios em equipamentos como despoldadeira, envasadora e facas.

No mesmo trabalho, detectou-se a presença de estafilococos coagulase positiva nas mãos de colaboradores da fábrica processadora da polpa de Acerola, evidenciando a necessidade da implantação e monitoramento de procedimentos de controle mais efetivos.

Segundo SOTO *et al* (2007), Os métodos de desinfecção para eliminação de patógenos em frutas e produtos vegetais, devem ser eficazes tanto nas áreas externas quanto nas áreas internas do alimento. A presença de

bactérias patógenas em frutas tratadas por banho térmico, tem sido relacionada à dificuldade no controle da água utilizada nesse processo.

Tomate, Manga, Laranja e Maçãs são exemplos de produtos suscetíveis à internalização por bactérias em função da água contaminada (SOTO *et al*, 2007).

BORDINI *et al* (2007), afirma que se a água contaminada for mais fria do que a fruta, os microrganismos presentes irão migrar para o interior da mesma.

A distribuição não será homogênea na manga e dependendo da temperatura de estocagem, a bactéria irá sobreviver e se multiplicar em todas as porções da fruta

Os dados encontrados neste trabalho reforçam a necessidade da implantação imediata de sistemas de garantia de qualidade como o programa de Boas Práticas de Fabricação, o programa de análise de perigos e ponto críticos de controle (Sistema APPCC), que visam estabelecer normas e procedimentos para a produção de um alimento seguro.

## **5.2 Determinação do D<sub>10</sub> de *Salmonella poona*, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Alicyclobacillus acidoterrestris* em polpa de manga irradiada.**

Nas tabelas 10, 11 e 12 encontram-se o efeito da do de radiação de <sup>60</sup>Co em *Escherichia coli*, *Salmonella poona* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculados experimentalmente em polpa de manga congelada.

TABELA 10 – Efeito da dose de radiação em *Escherichia coli* inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada

Teste	Dose (kGy)	Log
1	0	6,13
	1	5,18
	2	4,65
	3	2,11
	4	1,09
2	5	0
	0	5,22
	1	4,34
	2	2,74
	3	2,11
3	4	1,16
	5	0
	0	6,32
	1	5,50
	2	3,45
4	3	2,15
	4	1,85
	5	0
	0	6,17
	1	5,21
4	2	3,85
	3	2,35
	4	1,25
	5	0

TABELA 11 – Efeito da dose de radiação em *Salmonella poona* inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada

Teste	Dose (kGy)	Log
1	0	6,25
	1	5,41
	2	3,14
	3	2,24
	4	1,23
2	5	0
	0	5,22
	1	3,65
	2	2,31
	3	1,26
3	4	0
	5	0
	0	5,89
	1	4,21
	2	3,25
4	3	2,56
	4	1,11
	5	0
	0	5,47
	1	3,74
4	2	2,65
	3	1,45
	4	0
	5	0

TABELA 12 – Efeito da dose de radiação em *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada

Teste	Dose (kGy)	Log
1	0	5,24
	1	4,04
	2	2,35
	3	1,23
	4	0
	5	0
2	0	6,21
	1	5,32
	2	3,65
	3	1,78
	4	0
	5	0
3	0	5,64
	1	4,21
	2	3,08
	3	1,15
	4	0
	5	0
4	0	5,08
	1	4,26
	2	2,65
	3	1,07
	4	0
	5	0

Nas FIG. 07, 08 e 09, mostra-se respectivamente as curvas de sobrevivência após irradiação das amostras de polpa de manga contendo *Salmonella poona*, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculadas em laboratório.

Observa-se que após a aplicação de 1kGy a redução da população de *E.coli* ficou em torno de 1 ciclo logarítmico, o mesmo observado para *Salmonella poona* e para *A. acidoterrestris*, que também obteve um declínio na sua população com essa dose de ao redor de 1 log. A dose necessária para reduzir às populações a níveis não detectáveis para as três bactérias foi 5 kGy, dose essa que foi usada para avaliação da qualidade sensorial da polpa de manga irradiada.

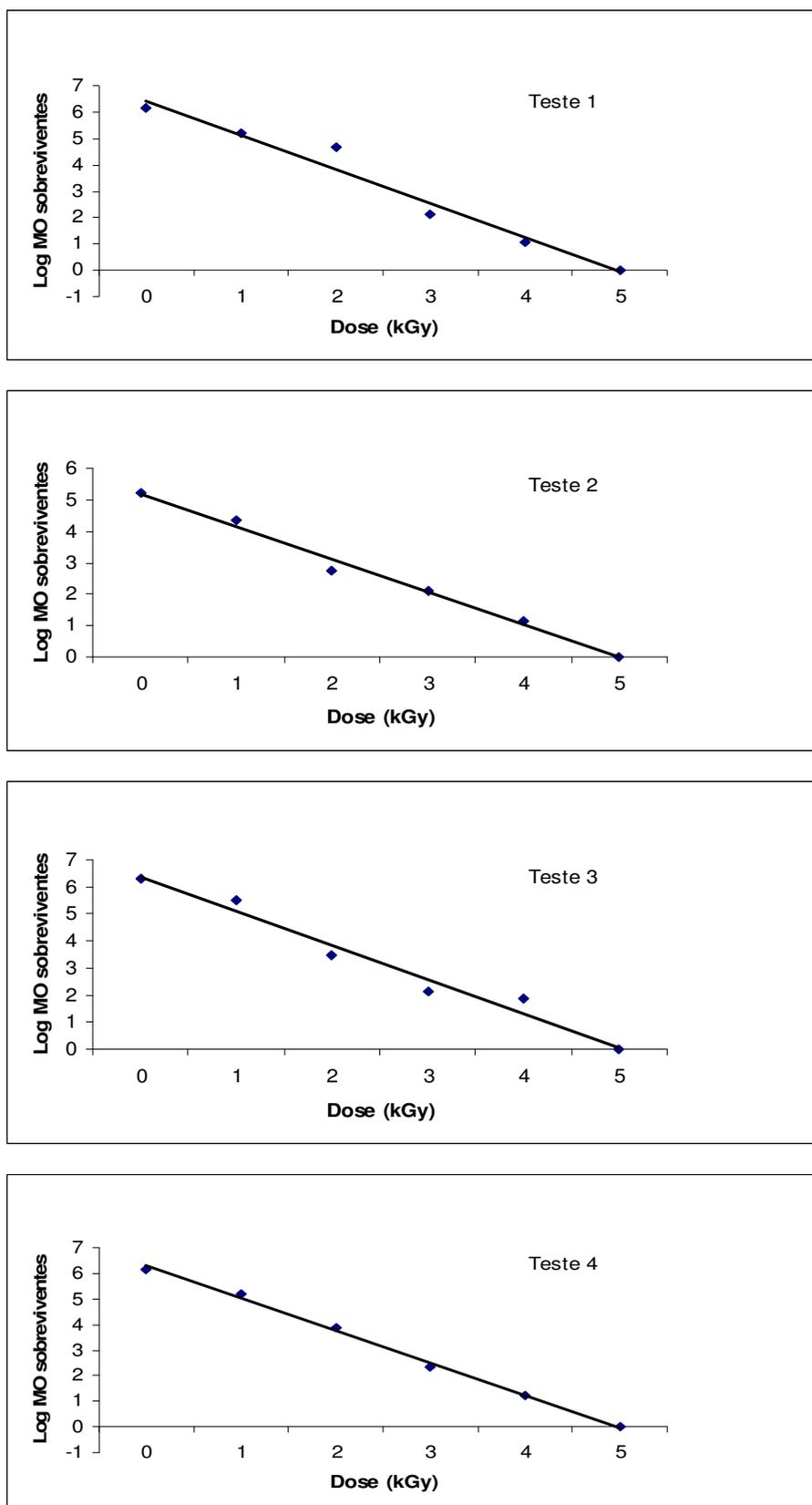


Figura 07. Curvas de inativação de *Escherichia coli* em polpa de manga inoculada em laboratório em função da dose de irradiação.

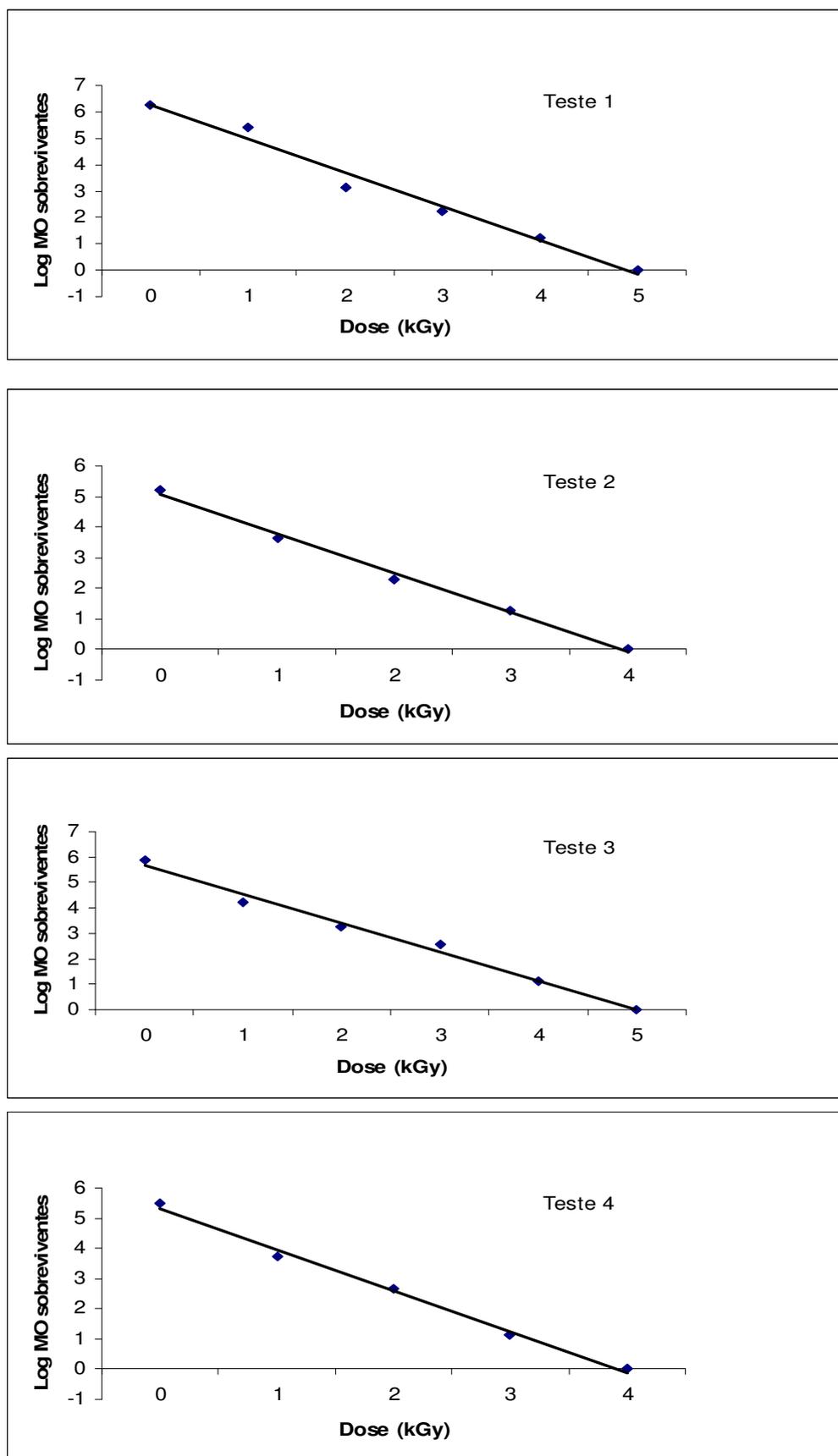


Figura 08. Curvas de inativação de *Salmonella poona* em polpa de manga inoculada em laboratório em função da dose de irradiação.

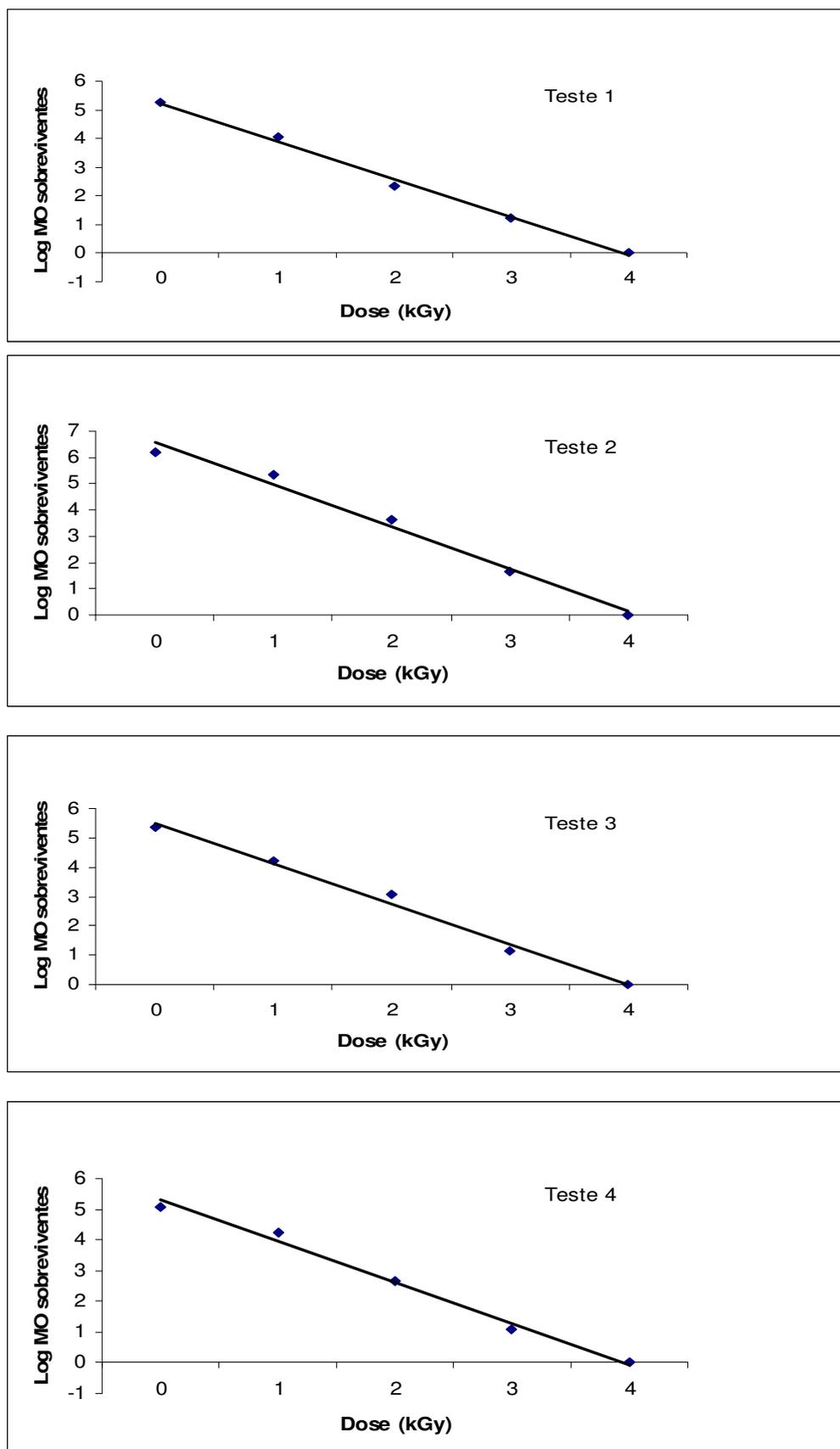


Figura 09. Curvas de inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em polpa de manga inoculada em laboratório em função da dose de irradiação.

Os valores de  $D_{10}$  para os microrganismos objeto do presente trabalho estão nas TAB. 13, 14 e 15. A dose necessária para inativar 90% das populações de *Escherichia coli* ATCC 8739 ficou entre 1,01 e 1,09 kGy, para *Salmonella poona* ficou entre 0,60 e 0,98 e para *Alicyclobacillus acidoterrestris* entre 0,72 e 0,88 kGy.

O mecanismo de ação básico da radiação ionizante é a criação de espécies reativas de oxigênio, em particular radicais hidroxilas a partir de moléculas de água (FRANCO & LANDGRAF, 1996; IAEA, 2006). Em condições onde a quantidade de água livre disponível é restrita, ou a baixas temperaturas como em produtos congelados, por exemplo, doses maiores de radiação são necessárias para reduzir as populações microbianas (NIEMIRA, 2002; FARKAS, 2006).

Tabela 13: Valores de  $D_{10}$  para *Escherichia coli* inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada

Teste	Valor $D_{10}$ (kGy)	Equação linear
1	1,09 $\pm$ 0,01	$y = -1,29x + 7,67$
2	1,01 $\pm$ 0,07	$y = -1,51x + 6,92$
3	1,01 $\pm$ 0,07	$y = -1,52x + 7,15$
4	1,05 $\pm$ 0,03	$y = -1,55x + 6,95$

A composição da polpa de manga também pode ter influenciado na radiorresistência dos microrganismos. A manga é rica em vitamina A e contém quantidades razoáveis de vitaminas do complexo B e vitamina C, além de alguns sais minerais, principalmente ferro. Apresenta também quantidades

consideráveis de compostos fenólicos, que podem amenizar os efeitos da radiação ionizante já que são considerados radioprotetores (RIBEIRO, 2007; SHIEBER, 2000).

Os valores de  $D_{10}$  encontrados para *Escherichia coli* (TAB.10) foram bem maiores do que aqueles encontrados em outros trabalhos envolvendo irradiação de produtos vegetais, sendo inclusive, maior que o  $D_{10}$  observado para *Alicyclobacillus acidoterrestris*, que é uma bactéria Gram positiva.

A radioresistência bacteriana pode variar entre cepas da mesma espécie, o que poderia explicar o comportamento incomum da *E. coli* utilizada neste trabalho.

Tabela 14: Valores de  $D_{10}$  para *Salmonella poona* inoculada experimentalmente em polpa de manga congelada

Teste	Valor $D_{10}$ (kGy)	Equação linear
1	0,80 $\pm$ 0,07	$y = -1,02x + 6,26$
2	0,60 $\pm$ 0,03	$y = -0,94x + 5,13$
3	0,82 $\pm$ 0,05	$y = -1,52x + 7,11$
4	0,98 $\pm$ 0,06	$y = -1,37x + 6,74$

Tabela 15: Valores de  $D_{10}$  para *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculado experimentalmente em polpa de manga congelada

Teste	Valor $D_{10}$ (kGy)	Equação linear
1	0,75 $\pm$ 0,02	$y = -0,97x + 6,73$
2	0,86 $\pm$ 0,04	$y = -1,11x + 7,41$
3	0,88 $\pm$ 0,02	$y = -1,08x + 6,87$
4	0,72 $\pm$ 0,08	$y = -0,94x + 6,85$

Não era esperado que os valores de  $D_{10}$  de *A. acidoterrestris* observados neste trabalho (TAB. 15) fossem menores que as outras duas bactérias, que são Gram-negativas. Geralmente, bactérias Gram-positivas costumam possuir uma radiorresistência maior do que o referido grupo (FRANCO & LANDGRAF, 1996). YOUSSEF *et al* (2002), obteve valores de  $D_{10}$  entre 1,18 e 2,23 kGy, em polpa de manga estocada à 3°C, para leveduras (que são Gram-positivas) isoladas da própria amostra.

SOUTO (2001), observou que polpa de açaí irradiada com 2,5 kGy, apresentou presença somente de bactérias Gram-positivas, enquanto que amostras do produto irradiadas com 0,70 kGy, apresentaram tanto bactérias Gram -positivas quanto Gram-negativas.

Na literatura há referências que descrevem a existência de diferenças na radiosensibilidade dependendo da forma em que manga é irradiada. Frutas inteiras suportam de maneira geral 1 a 2 kGy sem grandes alterações nas características sensoriais e nutricionais. EL-SAMAHY *et al.* (2000), conseguiu reduções de 3 ciclos logarítmicos em bactérias do grupo mesófilos utilizando dose de 1,5 kGy em mangas *in natura* estocadas a 12°C.

Na literatura é possível encontrar diversos valores de  $D_{10}$  para os microrganismos, dependendo do meio em que se encontram. SONG *et al* (2006) encontraram valores de  $0,44 \pm 0,004 \text{ kGy}$  e  $0,30 \pm 0,005 \text{ kGy}$  para *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* em suco de cenoura, respectivamente.

NIEMIRA *et al* (2002), irradiando diversos vegetais congelados contaminados com *Listeria monocytogenes*, encontraram valores de  $D_{10}$  entre 0,50 e 0,92 kGy.

GUEDES (2005), encontrou valores de  $D_{10}$  para *Salmonella enteritidis* entre 0,78 e 0,87 kGy e 0,71 e 0,92 kGy para *Escherichia coli* ATCC 25922, irradiando polpa de açaí a temperatura de  $-18\text{C}^{\circ}$ , resultados esses similares aos encontrados neste trabalho (TAB. 11. A autora relaciona os números encontrados à presença de antocianinas e ao estado físico da polpa.

Poucos trabalhos relatam o efeito da irradiação sobre os esporos, células vegetativas ou ainda métodos de conservação de produtos à base de frutas contaminados com *A. acidoterrestris*. Segundo NAKAUMA *et al* (2004), a dose necessária para reduzir 5 ciclos logarítmicos de esporos de *A. acidoterrestris* ficou entre 5 e 5,5 kGy em suco de laranja refrigerado. No presente trabalho pesquisou-se o efeito da radiação em bactérias vegetativas e não sobre os esporos bacterianos.

PIRES (2006), conseguiu redução de 3 logs de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja com uma dose de 8 kGy, sendo a população inicial de aproximadamente  $10^9$  UFC/ml, demonstrando a formidável radioresistência dos esporos desse microrganismo.

As bactérias podem se multiplicar depois do processamento por irradiação, e podem atingir o mesmo número de microrganismos da população inicial se forem estocados a altas temperaturas ou sem observância das boas práticas de fabricação de alimentos (IAEA, 2006). Além disso, microrganismos

patogênicos pareceriam desenvolver melhor em alimentos irradiados por falta da competição entre espécies (FARKAS, 2006; KAMAT *et al*, 2000).

A capacidade de adaptação das bactérias ao meio em que se encontram e a influência da presença de substâncias radioprotetoras podem ser fatores capazes de explicar os resultados não usuais da radiorresistência dos microrganismos testados neste trabalho.

Em tecnologia de alimentos é considerado que tratamentos combinados são a melhor alternativa para o processamento de produtos perecíveis tais como a polpa de manga e de frutas como um todo.

### 5.3 Análise sensorial da polpa de manga irradiada

Com base nas respostas fornecidas na ficha de avaliação, todas as julgadoras selecionadas neste estudo são consumidoras de manga, e apreciam muito produtos a base de manga.

Nas TAB. 16 e 17 estão os resultados do levantamento das características individuais referentes à faixa etária e ao grau de escolaridade da equipe de avaliadoras.

Tabela 16. Distribuição % de consumidores segundo a faixa etária

<b>Faixa etária</b>	<b>%</b>
20 a 30	81
31 a 40	12
41 a 50	7

Das 32 consumidoras de manga, a maior parte está na faixa entre 20 a 30 anos;

Tabela 17. Distribuição percentual de consumidores segundo o grau de escolaridade.

<b>Grau de escolaridade</b>	<b>%</b>
Ensino fundamental	28
Ensino médio	62
Graduado	6
Pós-graduado	4

Das 32 consumidoras de manga, a maior parte possui ensino médio completo.

Sobre o conhecimento da tecnologia de irradiação de alimentos, 16% tinham conhecimento do processo, justificado pela divulgação do tema em reportagens nos canais de comunicação.

ORNELLAS *et al* (2006), entrevistando 218 consumidores da cidade de Belo Horizonte/MG, observou que 40,6% dos entrevistados tinham conhecimento que a irradiação é um método de conservação de alimentos, associando esse número ao nível de instrução e renda elevados (acima de cinco salários mínimos).

RESURRECCION *et al* (1995), estabelece que a falta de uma difusão maior sobre a tecnologia de irradiação é um agravante que ainda permite que a população permaneça com a idéia de que alimento irradiado é radioativo.

Neste trabalho, 62% dos entrevistados responderam não saber se a irradiação de alimentos pode trazer danos à saúde do consumidor e/ou meio ambiente.

As polpas de manga irradiadas com 5 kGy e não irradiadas foram submetidas ao teste triangular por essa equipe de avaliadoras. Das 32 julgadoras que participaram do teste, foram computadas 29 respostas afirmativas ao considerar que as amostras são diferentes. Através de consulta

à tabela do qui-quadrado (Anexo III) para o teste triangular, pode ser verificado que são necessárias 18 respostas afirmativas a 0,1% de significância. Assim, as polpas de manga irradiadas e controle foram consideradas diferentes entre si do ponto de vista sensorial.

No Tabela 18, estão os resultados do teste de aceitação dos consumidores e da intenção de compra do mousse preparado com polpa de manga irradiada a 5 kGy.

Tabela 18. Médias das respostas em escala hedônica aos atributos sabor, aroma e aparência geral dos julgadores e intenção de compra do mousse de manga.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Sabor	5,8 ± 1,16
Aroma	6,4 ± 0,55
Aparência geral	6,5 ± 0,51
Intenção de compra	4,8 ± 0,31

Abaixo, seguem os valores da escala hedônica utilizada:

- (7) gostei muitíssimo
- (6) gostei muito
- (5) gostei
- (4) nem gostei / nem desgostei
- (3) desgostei
- (2) desgostei muito
- (1) desgostei muitíssimo

Observa-se que para todos os atributos avaliados, os valores médios de aceitação situaram-se entre 5,8 a 6,5, representando na escala hedônica a faixa de “gostei” e “gostei muito”.

A utilização da polpa de manga em um produto elaborado como “mousse”, por exemplo, em que há interação com outros alimentos,

notadamente ricos em carboidratos, certamente minimizou os efeitos do tratamento por irradiação, ainda que em uma dose que pode ser considerada alta para este tipo de produto (5 kGy).

As FIG. 10, 11, e 12 representam as distribuições das freqüências do teste de aceitação de consumidor, segundo a escala hedônica de sete pontos, quanto aos atributos de sabor, aroma e aparência geral do mousse de manga.

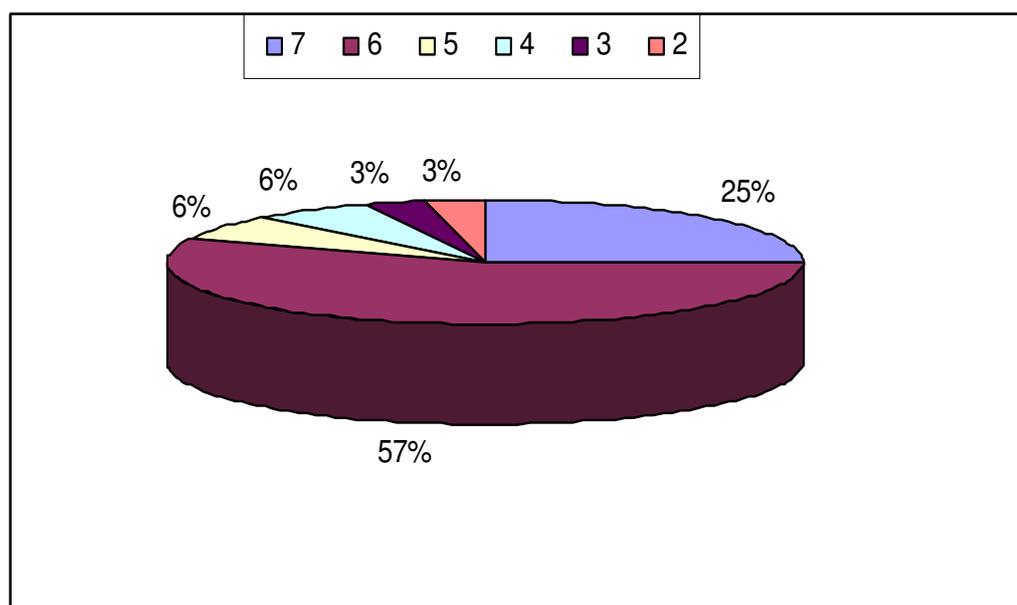


Figura 10. Freqüência dos valores de aceitação de sabor do mousse de manga.

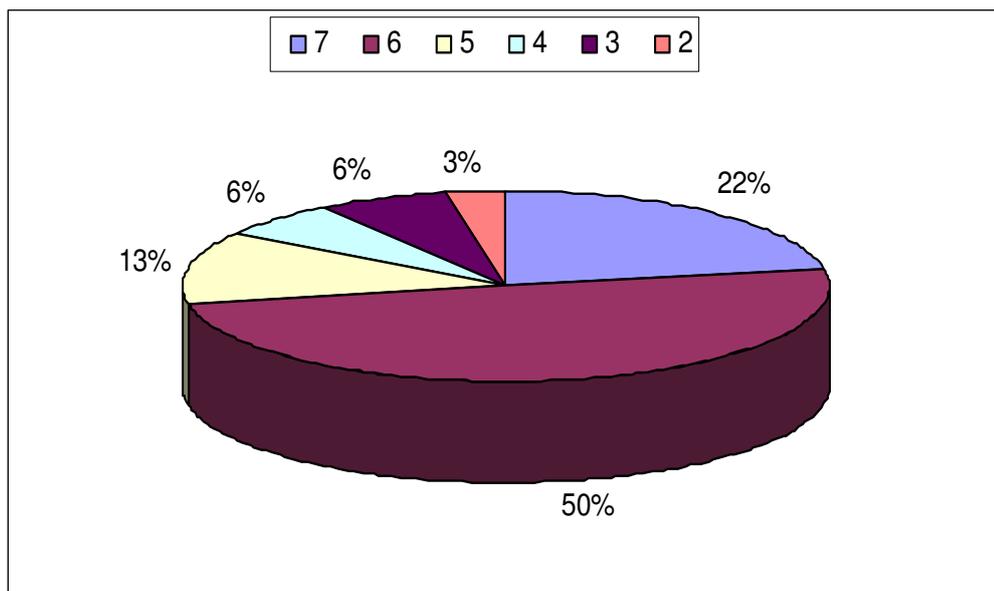


Figura 11. Frequência dos valores de aceitação de aroma do mousse de manga.

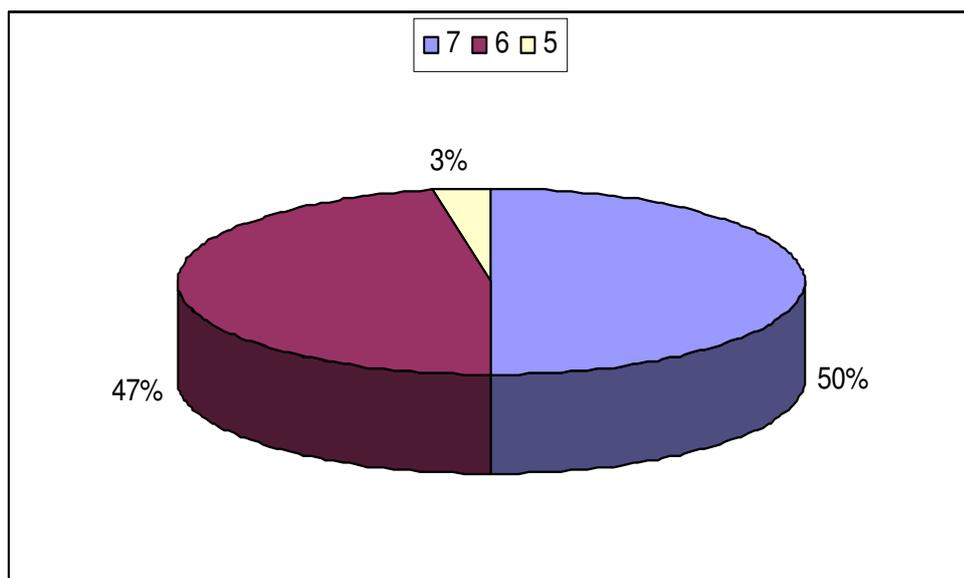


Figura 12. Frequência dos valores de aceitação de aparência geral do mousse de manga.

GUEDES (2005), avaliando polpa de açaí, comprovou que a dose de 1 kGy não alterou as características sensoriais do produto, com um período de armazenamento de oito dias após a irradiação. A presença de antioxidantes naturais pode ser um fator relevante para a radioproteção da grande

quantidade de lipídeos presentes na polpa de açaí e que podem alterar sensorialmente o produto.

EL-SAMAHY *et al.* (2000), observou que mangas frescas irradiadas com 1,5 kGy, apresentaram alteração sensorial após 30 dias de armazenamento.

Os efeitos indiretos da radiação gama correspondem à maior parte dos efeitos causados pelo processamento por irradiação em frutas e vegetais, já que a proporção de água disponível nesses alimentos chega até 95% em alguns casos. Sendo assim, as espécies oxidativas produzidas pela radiólise da água estão na origem do processo de alteração sensorial nos alimentos GUEDES (2005).

KAMAT *et al.* (2000), observaram que sorvete de baunilha irradiado com 2 kGy apresentou mudança no “flavor” do produto, porém o mesmo não ocorreu ao irradiar sorvete de morango ou chocolate a 3 kGy. Os autores justificam que é possível que o forte sabor de sorvete de morango ou chocolate tenha mascarado as alterações sensoriais radioinduzidas.

VALDIVIA *et al.* (2002), ao avaliarem polpa de abacate congelada e irradiada (0,5, 1,0, 1,5, e 2,5 kGy) comprovaram que o tipo de lipídio encontrado no produto influenciou positivamente na aceitação, mesmo quando aplicada a dose máxima de 2,5 kGy, pela baixa formação de malondialdeído que não foi suficiente para causar “off-flavor”.

A presença de grande quantidade de carboidratos na polpa de manga talvez seja o principal fator de diferenciação nos testes realizados, devido às diferentes sensibilidades que açúcares complexos e simples possuem perante o processo de irradiação (FARKAS, 2006).

A aceitação de um produto elaborado com polpa de manga irradiada, pode ter sido favorecida por alguns fatores como: grande quantidade de antioxidantes, grande quantidade de açúcares e a interação entre esses alimentos, podem ter influenciado positivamente no julgamento dos provadores.

## CONCLUSÕES

- ◆ Parte da polpa de manga comercializada em mercados locais da cidade de São Paulo encontra-se em condições insatisfatórias para o consumo, baseado na RDC nº. 12 da ANVISA e em dados da literatura.
  
- ◆ A dose necessária para reduzir a níveis não detectáveis as bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella poona* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* em polpa de manga foi de 5 kGy com valores  $D_{10}$  entre 1,01 e 1,09 kGy para *Escherichia coli* ATCC 8739, 0,60 e 0,98 kGy para *Salmonella poona* e 0,72 e 0,88 kGy para *Alicyclobacillus acidoterrestris* respectivamente.
  
- ◆ A polpa irradiada com 5 kGy apresentou diferenças significativas com a amostra não irradiada na avaliação sensorial. Entretanto, a “mousse” elaborada com esse ingrediente teve uma boa aceitação em relação aos atributos sensoriais de sabor, aroma e aparência geral, revelando também intenção de compra satisfatória.

## ANEXOS

## Análise Sensorial – Teste triangular – Anexo I

Você está participando de teste sensorial de polpa de manga. Sua colaboração é importante. Após o teste, preencha o formulário.

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F

Você está recebendo três amostras de polpa de manga (irradiada e não irradiada). Duas são iguais e uma é diferente. Experimente as amostras da esquerda para a direita sem retornar a amostra anterior, tomando um gole de água entre elas. Depois circule o número correspondente à amostra que difere das outras duas.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO I

É consumidora de manga? ( ) Sim ( ) Não

Conhece a tecnologia de irradiação de alimentos? ( ) Sim ( ) Não

Nível de escolaridade:

- ( ) Ensino fundamental  
 ( ) Ensino médio  
 ( ) Graduado  
 ( ) Pós-graduado

Aprecia produtos que contenham manga como ingrediente?

- ( ) Muito  
 ( ) Moderadamente  
 ( ) Regularmente  
 ( ) Muito pouco

Faixa etária (anos):

- ( ) 20 a 30  
 ( ) 31 a 40  
 ( ) 41 a 50

## Análise Sensorial – Teste de Aceitação - Anexo II

Nome: \_\_\_\_\_

Amostra: Mousse de manga

Prove a amostra e indique sua opinião em relação à aparência geral, aroma e sabor, de acordo com a escala abaixo:

- (7) gostei muitíssimo
- (6) gostei muito
- (5) gostei
- (4) nem gostei / nem desgostei
- (3) desgostei
- (2) desgostei muito
- (1) desgostei muitíssimo

Aroma: \_\_\_\_\_

Sabor: \_\_\_\_\_

Aparência geral: \_\_\_\_\_

Assinale, para esta amostra, qual seria sua atitude quanto à compra do produto:

- (5) certamente compraria este produto
- (4) provavelmente compraria este produto
- (3) tenho dúvidas se compraria ou não este produto
- (2) provavelmente não compraria este produto
- (1) certamente não compraria este produto

## ANEXO III

## Anexo III

TABELA 30 - Significância no teste triangular ( $P = 1/3$ )

Nº de Julgamentos	Nº de respostas corretas necessárias para estabelecer diferença significativa			Nº de Julgamentos	Nº de respostas corretas necessárias para estabelecer diferença significativa		
	P = 0.05	P = 0.01	P = 0.001		P = 0.05	P = 0.01	P = 0.001
	+	++	+++		+	++	+++
7	5	6	7	57	27	29	31
8	6	7	8	58	27	29	32
9	6	7	8	59	27	30	32
10	7	8	9	60	28	30	33
11	7	8	9	61	28	30	33
12	8	9	10	62	28	31	34
13	8	9	10	63	29	31	34
14	9	10	11	64	29	32	35
15	9	10	12	65	30	32	35
16	10	11	12	66	30	32	36
17	10	11	13	67	30	33	36
18	10	12	13	68	31	33	36
19	11	12	14	69	31	34	37
20	11	13	14	70	32	34	37
21	12	13	15	71	32	34	37
22	12	14	15	72	32	35	38
23	13	14	16	73	33	35	38
24	13	14	16	74	33	36	39
25	13	15	17	75	34	36	39
26	14	15	17	76	34	36	39
27	14	16	18	77	34	37	40
28	15	16	18	78	35	37	40
29	15	17	19	79	35	38	41
30	16	17	19	80	35	38	41
31	16	18	20	81	36	38	42
32	16	18	20	82	35	39	42
33	17	19	20	83	37	39	42
34	17	19	21	84	37	40	43
35	18	19	21	85	37	40	43
36	18	19	21	86	38	40	44
37	18	20	22	87	38	41	44
38	19	21	23	88	39	41	45
39	19	21	23	89	39	42	45
40	20	22	24	90	39	42	46
41	20	22	24	91	40	42	46
42	21	22	25	92	40	43	46
43	21	23	25	93	40	43	47
44	21	13	25	94	41	44	47
45	22	24	26	95	41	44	48
46	22	24	26	96	42	44	48
47	23	25	27	97	42	45	49
48	23	25	27	98	42	45	49
49	23	25	28	99	43	46	49
50	24	26	28	100	43	46	49
51	24	26	29	200	80	84	89
52	25	27	29	300	117	122	127
53	25	27	29	400	152	158	165
54	25	27	30	500	185	194	201
55	26	28	30	1000	363	372	381
56	26	28	31	2000	709	722	737

FONTE: DUTCOSKY (2007)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.C.; NUNES, I.F.S; OLIVEIRA, M.M.A. Perfil microbiológico de polpas de frutas comercializadas em Tererezina, PI. **Higiene Alimentar**. V. 17, n. 112, p. 78- 81, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Resolução – RDC n. 12, de Janeiro de 2002. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01\\_rde.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rde.htm). Acesso em: 01 de Dezembro de 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Resolução – RDC n. 21, 26 de Janeiro de 2001. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/21\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/21_01rdc.htm). Acesso em: 22 de Julho de 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12806: análise sensorial dos alimentos e bebidas – terminologia. Rio de Janeiro, 1993.

BARAK, J.D.; LIANG, A.; NARM, K. Differential attachment to and subsequent contamination of agricultural crops by *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5568-5570, 2008.

BENEVIDES, S. D.; RAMOS, A.M.; STRINGHETA, P.C.; CASTRO, V.C. Qualidade da Manga e da polpa de manga Ubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28, v.3, p. 571-578, jul.-set. 2008.

BESSER, R.R., LETT, S.M., WEBER, J.T., DOYLE, M.P., BARRET, T.J., WELL, J.G., GRIFFIN, P.M. Na outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **Journal American Medicine Association**, Chicago, v.267, n. 17, p.2217-2220. 1993.

BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infection** v. 4, p. 413–423, 2002.

BOLLAERTS, K.; AERTS, M.; FAES, C.; GRIJSPEERDT, K.; DEWULF, J.; MINTIENS, K. Human salmonellosis: Estimation of dose-illness from outbreak data. **Risk Analysis**, v. 28, n. 2, p. 427-440, 2008.

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**, v. 18, p. 1002–1007, 2007.

BORGES, M. F; OLIVEIRA, M. E. B; LEMOS, E.H; MUNIZ, C. R; ASSUNÇÃO, C. B; OLIVEIRA, A. M. M. Condições higiênico-sanitárias durante o processamento e a vida de prateleira de polpas de frutas tropicais. Disponível em: [www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/artigo\\_1918.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/artigo_1918.pdf). Acesso em : 20 Dez. 2007.

BRACKETT, R.E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biology and technology*, v.15, p. 305-311, 1999.

BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C.C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P. H. M. Análise físico química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico solar. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v.25.n.1. Jaboticabal. Dez.2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa Nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas. Diário Oficial da União, Nº 6, Brasília, 10 de janeiro de 2000. Seção 1, p. 54-58.

BUENO, S. M.; LOPES, M.R.V.; GRACIANO, R.A.S.; FERNANDES, E.C.B.; GARCIA-CRUZ, C.H. Avaliação da qualidade de Polpas de Frutas Congeladas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 62, n. 2, p.121-126, 2002.

BURNETT, S.L & BEUCHAT, L.R. Food-borne pathogens: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 27, p. 104–110, 2001.

CABEDO, L., BARROT, L., PICART, I.; CANELLES, A.; TEIXIDO, I. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection*, v. 71, n. 4, p. 855-859, 2008.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Department of Health & Human Services. Outbreak response and surveillance unit. E. Coli O157 outbreak summaries. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/outbreak/ecoli-sum.htm>

CHOE, E.; MIN, D.B. Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. *J. Food Sc.*, v. 70, n. 9, p. R 142- R 159, 2005.

CUNHA, V. A; BASTOS, M. S. R. B; FEITOSA, T; OLIVEIRA, M. E. B; MUNIZ, C. R. Diagnóstico das condições higiênico sanitárias dos equipamentos utilizados em três fábricas de polpa de fruta congelada da região metropolitana de Fortaleza. *Boletim Centro de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 171176, jul./dez. 2000.

D'AOUST, J.V. **Salmonella species**. In DOYLE, M.P., BEAUCHAT, L.R., MONTEVILLE, T.J. Food Microbiology: Fundamental and Frontiers. Washington: ASM Press, 1ed., p. 129-158. 1997.

DELINCÉE, H. Detection of food treated with ionizing radiation . **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 37, p.73-82, 1998.

DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods**. New York, N.Y: Marcel Dekker, p. 95-239. 1990.

DOGAN-HALKMAN, H.B; ÇAKIR, I; KEVEN, F; WOROBO, R.W; HALKMAN, A.K. Relationship among fecal coliforms and Escherichia coli in various foods. **European Food Research Technology**, v. 216: p.331-334, 2003.

DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG,J.; ZHAO,S. Escherichia coli O157:H7. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTEVILLE, T.J. Food Microbiology: Fundamental and Frontiers. Washington, ASM Press, 2ed. P. 193-213. 2001.

DUNCAN, S.E. & HACKNEY, C.R. Relevance of Escherichia coli O157:H7 to the Dairy industry. **Dairy Food Environment Sanitation**. v.14, p. 656-660. 1994.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. 2 ed. Edit. Champagnat, Curitiba, 2007.

EIROA, M. N. U.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SCHMIDT F. L. Alicyclobacillus in Orange juice: Occurrence and heat Resistance of Spores. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 883-886, 1999.

EMPRESA MATO-GROSSENSE DE PESQUISA ASSISTÊNCIA E EXTENSÃO RURAL, EMPAER. **Receitas com Manga**. Departamento de comunicação rural. 1996.

EUROPEAN COMMISSION – Health & Consumer Protection Directorate-General. Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. Bruxelas, 45 p., 29/04/2002.

FAN, X; NIEMIRA, B.A; PRAKASH, A. Irradiation of Fresh Fruits and Vegetables. **Food Technology**, v. 62, n. 3, p. 36 – 43, 2008.

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. **International Journal of Food Microbiology**., Oxford, v.44, p. 189-204. 1998.

FARKAS, J. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 148-152, 2006.

FDA/CFSAN. *Escherichia coli O157:H7*. In: Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook (“the bag bug book”), chap 15, 2000. Disponível em internet: <http://vm.cfsan.fda.gov/~now/badbug.zip>

FDA/CFSAN. Food and Drug administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition – Potencial for infiltration, survival and growth og human pathogens within fruits and vegetables. 2002. Disponível em internet: <http://vm.cfsan.fda.gov/~com/juicback.html>. Acesso em: 18/06/2003.

FEITOSA, T.; BASTOS, M.S.R.; OLIVEIRA, M.E.B.; MUNIZ, C.R.; BRINGEL, H.F.; ABREU, S.C.A. Qualidade microbiológica de polpas de frutas produzidas e comercializadas nos Estados da Paraíba e Pernambuco. *Higiene Alimentar*, v. 13, n. 66/67, p. 111-114, 1999.

FENG, P. Escherichia coli serotype O157:H7 Novel vehicles of infections and emergence of phenotypic variants. *Emerging Infections Diseases*, v.1, n.2. p. 1-9,1995. Disponível em: <http://cfsan.fda.gov/~now/feng.htm>

FRANCIS, B.; ALTAMIRANO, J.V.; STOBIEFSKI, M.G.; HALL, W.; ROBINSON, B.; DIETRICH, S.; MARTIN, R.; DOWNES, F.; WILCOK, K.R.; HEDBERG, C.; WOOD, R.; OSTERHOLM, M.; GANESE, C.; HUNG, M.J.; PAUL, S.; SPITALNY, K. C.; WHOLEN,C.; SPIKA, J. Epidemiologic notes and reports multistate outbreak of Salmonella Poona infections – United and Canada. *CDC Morbidity and Mortality Weekly Report*, 40(32), p. 549-552. 1991.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. Atheneu p. 165, 1ed. 1996.

GERMANO, M.I.S. & GERMANO, P. M. L. *Irradiação de Alimentos*. In: Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. Cap. 27. p. 444-466, Varella, 2ed. 2003.

GLYUNN, K., CODY, S., CAIRS, L., ALEXANDRE, R., FYPE, M., SAMADPOUR, M., LEWIS, J., SWAMINATHAN, B., ABBOTT, S., HOFFMAN, R., KOBAYASHI, J., VUGIA, D., GRIFFIN, P. International outbreak of Escherichia coli O157:h7 infections associated with unpasteurized commercial apple juice. In: Internacional Symposium and Workshop on Shiga Tosin (verocytotoxin) – producing Escherichia coli (STEC) infections, Baltimore. Abstracts, n. V147/1, p. 18. 1997.

GUEDES, R. L. **Análise microbiológica e de propriedades organolépticas de açaí (*Euterpe olerácea*) irradiado com radiação gama**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. 2005.

HALL, G.; YOHANNES, K.; RAUPACH, J.; BECKER, N.; KIRK, M. Estimating community incidence of Salmonella, Campylobacter, and Shiga toxin-producing Escherichia coli infections, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1601-1609, 2008.

HARNACK, L.; STANG, J & M. STORY. Soft drink consumption among U.S. children and adolescents: nutritional consequences. **Journal American Dietetic Association**, v.99, p. 4436-4441. 1999.

HINKENS, J.C., FAITH, N.G., LORANG, T.D., BAILEY, P., BUEGE, D., KASPAR, C.W., LUCHANSKY, J.B. Validation of pepperoni process for control of Escherichia coli O157:H7. **Journal Food Protection**, Des Moines, v9, n. 12, p. 1260-1266. 1996.

IAEA – International Atomic Energy Agency. **Training Manual on Food Irradiation Technology and Techniques**. Vienna. Technical reports series No. 114, 2nd Ed, 1982.

ICGFI. International Consultative Group on Food Irradiation. **Facts about food irradiation**., IAEA, Vienna, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 4 ed., p. 281-320, 2006.

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de salmonella spp, ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 à 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 58, n. 1, p. 47-51. 1999.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. New York. Avi, 5 ed., p. 185-248. 2001.

JEYAMKONDAM, S., JAYAS,D.S., HOLLEY, R.A. Pulsed electric field processing in foods: a review. **Journal Food Protection**, v.62, p. 1088-1096, 1999.

JOHNSON, J.L.; ROSE, B.E.; SHARAR, A.K.; RANSON, G.M.; LATTUADA, C.P.; MCNAMARA, A.M. Method used for detection and recovery of Escherichia coli O157:H7 associated with a foodborne disease outbreak. **Journal Food Protection**, v. 58, n. 26, p. 587-603. 1995.

LADO, B. H & YOUSEF, A.E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v.4, p. 433-440, 2002.

Le MINOR, L. **Salmonella**. In: BERGEY, DH.; BUCHANAN, R.E., GIBBONS, N.E. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, London. Willians & Wilkins, v.1, p. 427-458. 1984.

LEITE, C. C; SANTANA, L. R. R; SILVA, M. D; SANT'ANNA, M. E. B; ASSIS, P. N. Avaliação microbiológica de polpas congeladas de frutas produzidas no estado da Bahia. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 78/79, p. 69-73, 2000.

MARTINS, T. M; Pizza, S. C; EVANGELISTA, R. M.; VIEITES, R. L; RALL, V. L. M. Avaliação da qualidade físico-química, química e microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 126/127, p. 82-87, 2004.

MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T.; MOCHIDA, K.; IWAKI, M.; NIWA, M.; YAMASATO, K. Alicyclobacillus acidiphilus SP. Nov.. a novel thermo-acidophilic,  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1681-1685, 2002.

MAULE, A. The survival of Escherichia coli O157:H7 in model ecosystems and surfaces. In International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing Escherichia coli (STEC) Infections, Baltimore. Abstracts, v182/II, p. 38. 1997.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, L. McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S., SHAPITO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious. Disease**, Atlanta, v.5, n.5; p. 607-625. 1999.

MERCIER, J & LINDOW, S. E. Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of MONK, D.J., BEUCHAT, L.R., DOYLE, M.P. Irradiation inactivation of foodborne microorganisms. **Journal Food Protection**., Des Maines, v.58, n.2, p. 197-208, 1995.

MONTEIRO, S. **Vencendo o tempo**. Revista Frutas e derivados, n. 1, p. 32-36, 2006.

MORGAN, D.; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N.; WALKER, A.M.; ROWE, B., MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection associated with the consumption of yoghurt. ***Epidemiology Infectious***, Cambridge, v.111, p. 181-187. 1993.

MOTARJEMI, Y., & KÄFERSTEIN, F.K. Global estimation of foodborne diseases. ***World Health Statistics Quartely***, n. 50, p. 5-11.1997.

MURAKAMI, M.; TEDZUKA, H.; YAMAZAKI, K. Thermal Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. ***Food Microbiology***, v. 15, p. 577-582, 1998.

NAKAUMA, M.; SAITO, K.; KATAYAMA, T.; TADA, M.; TOFORIKI, I. Radiation-heat synergism for inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in citrus juice. ***Journal of Food Protection***, Des Moines, v. 67, n. 11, p. 2538-2543, 2004.

OITA, S. Control of Thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidoterrestris* by Barley and Wheat  $\alpha$  - and  $\beta$  - Thionins. ***Bulletin National of Agriculture Reseach Center***, n. 49, p. 49-59, 2002.

ORNELLAS, C.B.D.; GONÇALVES, M.P.J.; SILVA, P.R.; MARTINS, R.T. Atitude do consumidor frente à irradiação de alimentos. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v.26, n.1, p. 211-213, Jan-Mar, 2006.

PENTEADO, A.L & LEITÃO, M.F.F.. Growth of *Salmonella enteritidis* in mellow, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. ***Food Control***, v.15, issue 5, p. 369 - 373. 2004.

PENTEADO, A.L. as condições adversas na contaminação de frutas. Disponível em Internet: <http://agricultura.gov.br/sarc/profuta/html/analises7.htm>

PEREIRA, J.E. Centro Universitário da Fundação de ensino Octávio Bastos. Análise da presença de *Escherichia coli* em alfaces consumidas em Poços de Caldas - MG. Disponível em: [http://portal.unifeob.edu.br/novoportal/index\\_biblioteca\\_lista.php?expressao=alface&categoria=T&total=1&pagina=0](http://portal.unifeob.edu.br/novoportal/index_biblioteca_lista.php?expressao=alface&categoria=T&total=1&pagina=0). Acesso em 01 Jun. 2006.

PETTIPHER, G. L.; OSMUNDSON, M. E.; MURPHY, J. M. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and juice-containing drinks. ***Letters of Applied Microbiology***, n. 24, p. 185-189, 1997.

PIRES, C.C. ***Efeito das radiações gama e ultra-sônica em suco de laranja contaminado por Alicyclobacillus acidoterrestris***. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, 2006.

RADOMYSKY, T.; MURANO, E.A.; OLSON, D.G.; MURANO, P.S. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: ***Journal of Food Protection***, Des Moines, v.57, n.1, p. 73-86. 1994.

RAGHUBEER, E.V., KE, J.S.; CAMPBELL, M.L.; MEYER, R.S. Fate of Escherichia coli O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. ***Journal of Food Protection***, Des Moines, v.58, n.1, p. 13-18. 1995.

RESURRECCION, A.V.A.; GALVEZ, F.C.F. FLETCHER, S.M. MISRA, S.K. Consumer attitudes towards irradiated food: results of a new study. ***Journal of Food Protection***, v.58, n.2, p. 193-196, 1995.

ROSS, A.I.V., GRIFFITHS, M.W., MITTAL, G.S., DEETH, H.C. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 89, p. 125-138, 2003.

RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of Escherichia coli O157:H7 in acidified media and fruit juices. ***International Journal of Food Microbiology***, Oxford, v.45, p.185-193. 1998.

SANTOS, C. de N. P. dos. ***Elaboração de um estruturado de polpa de manga (Mangifera indica L. cv Tommy Atkins) parcialmente desidratada por osmose***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Campinas, 2003.

SANTOS, C.A.A.; COELHO, A.F.S.; CARREIRO, S.C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 28, n. 4, p. 913-915, 2008.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICROS E PEQUENAS EMPRESAS, SEBRAE/PE. Polpa de frutas: perfil industrial. 1997. Disponível em: [http://www.pe.sebrae.com.br:8080/notitia/download/PN\\_polpa.pdf](http://www.pe.sebrae.com.br:8080/notitia/download/PN_polpa.pdf). Acesso em: 15 Jan. 2009.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. Alicyclobacillus acidoterrestris spores in fruit products and design of pasteurization processes. ***Trends in Food Science and Technology***, London, v. 12, n. 2, p. 68-74, Feb, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. ***Manual de métodos de análises Microbiológicas de alimentos***. Ed. Varela, (1997).

SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.; CONTRERAS SILVEIRA, N.F.; SILVA, N.; CONTRERAS C. Ocorrência de Escherichia coli O157:H7 em produtos cárneos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p. 223-227. 2001.

SILVEIRA, N.F.; SILVA, N.; CONTRERAS, C. Occurrence of Escherichia coli O157:H7 in hamburguers produced in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.11, p. 1333-1335. 1999.

SIVAPALASINGAM, S; BARRETT, E; KIMURA, A; DUYNE, S. V.; De WITT, W; YING, M; FRISCH, A; PHAN, Q; GOULD, E; SHILLAM, P; REDDY, V; COOPER, T; HOEKSTRA, M; HIGGINS, C; SANDERS, J. P; TAUXE, R. V; SLUSTKER, L. A multistate outbreak of Salmonella enterica serotype Newport infection linked to Mango consumption: impact of water-dip disinfestation technology. **Clinical Infectious Disease**, volume 37, p. 1585-1590, 2003.

SOTO, M; CHAVEZ, G; BAEZ, M; MARTINEZ, C; CHAIDEZ, C. Internalization of Salmonella typhimurium into mango pulp and prevention of fruit pulp contamination by chlorine and copper ions. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 17, n. 6, p. 453–459, 2007.

SPLITTSTOESSER, D.F., CHUREY, J.J. & LEE, C.Y. GROWTH CHARACTERISTICS OF ACIDURIC SPOREFORMING BACILI ISOLATED FROM FRUIT JUICES. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 1080-1083, 1994.

SU-SEM, C. & KANG, D. H. Alicyclobacillus spp. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current isolation/Detection Procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p. 55-74, 2004.

TAIPINA, M.S.; COHEN, V.H.; DEL MASTRO, N.L.; RODAS, M.A.B.; DELLA TORRE, J.C.M. Aceitabilidade sensorial de suco de manga adicionado de polpa de banana (*Musa* sp) verde. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.1, p. 49-55, 2004.

TASSARA, H.; SILVA, S. GOMES, P. Manga. Frutas no Brasil. Disponível em <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br>>consultado em 10/01/2007.

TAUXE, R.V. Emerging Foodborne Diseases: an evolving public health challenge. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.3, n.4, p. 425-434. 1997.

THARANATHAN, R. N., YASHODA, H. M. and PRABHA, T. N. Mango (*Mangifera indica* L.), "The King of Fruits"—An Overview', **Food Reviews International**, v. 22, v.2, p. 95 — 123, 2006.

TODA FRUTA - Site. Variedades de Manga – Matéria Frutas de A à Z Data Edição: 14/03/03 Disponível em Disponível em: <www.todafruta.com.br> Acesso em: 15 Ago. 2008.

TOFANELLI, M. B. S.; FERNANDES, M. S.; CARRIJO, N. S.; MARTINS F. Mercado de frutas frescas no município de Mineiros-GO. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, 2007.

VIEIRA, M. C.; TEIXEIRA, A. A.; SILVA, F. M.; GASPAR, N.; SILVA, C. L. M. Alicyclobacillus acidoterrestris spores as a target for Cupuaçu (Theobroma grandiflorum) néctar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 71-81, 2002.

VIEITES, R.L.; EVANGELISTA, R.M.; CAMPOS, A.J.; MOREIRA, G.C. Efeito da embalagem e da irradiação gama no controle da contaminação microbiana da manga minimamente processada. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 197-206, jul./set. 2004.

WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, K.I.; RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare Escherichia coli serotype. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v.18, n.3, p. 512-520. 1983.

YOUSSEF, B.M.; ASKER, A.A.; EL-SAMAHY, S.K.; SWAILAN, H.M. Combined effect of steaming and gamma irradiation on the quality of mango pulp stored at refrigerated temperature. **Food Research International**, v. 35, p. 1–13, 2002.