

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Adesão, internalização e sobrevivência de *Salmonella* spp. e
Listeria monocytogenes em mangas (*Mangifera indica*), variedade
'Tommy Atkins'

Carlos Henrique Tersarotto

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco.

São Paulo
2020

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Adesão, internalização e sobrevivência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em mangas (*Mangifera indica*), variedade ‘Tommy Atkins’

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Carlos Henrique Tersarotto

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco.

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T331a Tersarotto, Carlos Henrique
Adesão, internalização e sobrevivência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em mangas (*Mangifera indica*), variedade 'Tommy Atkins' / Carlos Henrique Tersarotto. - São Paulo, 2020.
77 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Manga. 2. Adesão. 3. Internalização. 4. *Listeria monocytogenes*. 5. *Salmonella* spp.. I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

Carlos Henrique Tersarotto

Adesão, internalização e sobrevivência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em mangas (*Mangifera indica*), variedade 'Tommy Atkins'

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof^a. Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Bernadette D.G.M. Franco, pela oportunidade e por todo o apoio para a realização deste trabalho.

Aos Professores Uelinton M. Pinto, Daniele F. Maffei e Cecília G. Martins pela valiosa contribuição em meu exame de qualificação.

À Kátia Leani pela amizade, excelente convívio e generosidade. À Lucia Gomes pela amizade, apoio e carinho.

Aos companheiros de laboratórios de microbiologia da FCF, muito obrigado pela amizade e convívio: Raquel, Ana Paulina, Mariana, Sarah, Jéssica, Dani Faria, Débora, Andressa, Augusto, Karina, Catarina, Emília, Ximena, Loredana, Daniel e Marcela. E um agradecimento especial aos grandes amigos do “grupo do vinho”: Ana Clara, Gabriela e Marcelo.

Aos Professores Carina Ulsen (LCT, POLI-USP), Marcelo Palma Sircili (Instituto Butantã) e Ii-Sey Watanabe (ICB-USP) por todo auxílio e contribuições para a realização dos ensaios microscópicos.

Aos técnicos Sônia (ICB-USP) e Marcos (LCT, POLI-USP) pela atitude sempre colaborativa e gentil para realização das análises em MEV.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Mestrado concedida.

Ao FORC (Food Research Center) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto e para participação em congressos internacionais para apresentação de resultados.

A todos os funcionários da FCF/USP pelo apoio.

Aos meus pais, Ruth e Luiz por todo carinho, educação, incentivo e compreensão.

Ao meu irmão Flávio e meus primos Carla, Larissa, Vivi, Giovanni e Victor pela amizade.

À toda a minha família pelo apoio e torcida.

Aos meus amigos de “toda vida”: Adri, Alê, André, Cris, Bia, Carmen, César, Fabio, Felipe, Jan, João, Matheus, Lu B., Lu C., Lucas, Sheila, Tilu e Wal.

Muito obrigado pela confiança. Meus sinceros agradecimentos e gratidão.

RESUMO

TERSAROTTO, C. H. Adesão, internalização e sobrevivência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em mangas (*Mangifera indica*), variedade 'Tommy Atkins'. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

Surtos de salmonelose e listeriose associados ao consumo de frutas inteiras ou minimamente processadas ocorrem com frequência. O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade de adesão e internalização de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em mangas (*Mangifera indica*) variedade Tommy Atkins, em diferentes condições de contaminação experimental e tratamento hidrotérmico, bem como avaliar a multiplicação dos patógenos internalizados na polpa das frutas durante armazenamento em refrigeração (8°C) e temperatura ambiente (25°C). O estudo foi conduzido com as cepas *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* Scott A. Inicialmente as cepas foram avaliadas segundo o índice de hidrofobicidade e capacidade de formação de biofilme em poliestireno. A adesão à superfície da manga foi avaliada por técnicas microbiológicas e também pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. A internalização foi avaliada a partir de inoculação na cicatriz do pedúnculo (6 log UFC/mL) e após tratamento hidrotérmico e imersão em solução contaminada (6 log UFC/mL), mantidas a 8 °C e a 25 °C por 24h, 5 e 10 dias. A sobrevivência foi avaliada através da inoculação em região demarcada, em cenário de baixo (2 log UFC/mL) e alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), a 8 °C e 25 °C, nos tempos 0, 1, 2, 3, 5 e 10 dias. A adesão foi observada nos dois patógenos, mesmo após sucessivas lavagens, com diferença significativa ($p<0,05$) após 1h de exposição e observou-se presença de estruturas exopolissacarídicas em diferentes tempos e condições de temperatura. A internalização ocorreu em todas as amostras avaliadas e a região do pedúnculo foi a mais afetada pela contaminação, diferindo significativamente na comparação com a região *blossom end* ($p<0,05$) a 8 °C e 25 °C. A sobrevivência foi observada nas duas temperaturas até o décimo dia. A multiplicação a 8°C foi significativamente mais baixa ($p<0,05$). Os resultados demonstraram que a *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* são capazes de aderir à superfície, de internalizar e se alastrar pela polpa e ainda sobreviverem por períodos consideráveis, em 8 °C e 25 °C. Esses dados poderão auxiliar produtores e órgãos de saúde no desenvolvimento de avaliações quantitativas de risco e no estabelecimento de medidas adequadas para evitar surtos.

Palavras-chave: manga, adesão, internalização, sobrevivência, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp

ABSTRACT

TERSAROTTO, C. H. Adhesion, internalization and survival of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in mangoes (*Mangifera indica*), variety 'Tommy Atkins'. Dissertation (MSc). Food Science Graduate Program. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2020.

Outbreaks of salmonellosis and listeriosis associated with the consumption of whole or minimally processed fruits occur frequently. The aim of this study was to investigate the ability of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to adhere and internalize in mangoes (*Mangifera indica*) variety Tommy Atkins, under different conditions of experimental contamination and hydrothermal treatment, as well as evaluate the multiplication of the internalized pathogens in the fruit pulp during storage under refrigeration (8°C) and room temperature (25°C). The study was conducted with the strains *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 7644 and *L. monocytogenes* Scott A. Initially the strains were evaluated according to the hydrophobicity index and capability to form biofilms on polystyrene surface. Adhesion to the mango surface was evaluated by microbiological techniques and also by scanning electron microscopy. Internalization was evaluated by inoculating the peduncle scar (6 log CFU / mL) and immersion of the fruits in contaminated solution (6 log CFU / mL) after hydrothermal treatment, during storage at 8 °C and 25 °C for 24h, 5 and 10 days. Survival was assessed by inoculation in a demarcated region, using low (2 log CFU / mL) and high level of contamination (6 log CFU / mL), and storage at 8 °C and 25 °C during 0, 1, 2, 3, 5 and 10 days. Adhesion was observed for both pathogens, even after successive washes, with a significant difference ($p < 0.05$) after 1 h of exposure. Adhesion was mediated by exopolysaccharide structures, observed at different times and temperature conditions. Internalization occurred in all samples and the peduncle region was the most affected by the contamination, differing significantly in comparison with the blossom end region ($p < 0.05$) at 8 °C and 25 °C. Survival was observed at both temperatures until the tenth day. The multiplication at 8 °C was significantly lower than at 25 °C ($p < 0.05$). The results showed that *Salmonella* spp and *L. monocytogenes* were able to adhere to the surface, to internalize and spread through the pulp and still survive for considerable periods, at 8 °C and 25 °C. This data may help producers and health agencies to develop quantitative risk assessments and to establish appropriate measures to prevent outbreaks.

Keywords: mango, adhesion, internalization, survival, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estádios de maturação de mangas de acordo com a cor da casca _____ 15

Figura 2: Estádios de maturação de mangas de acordo com a cor da polpa _____ 15

Figura 3: Representação gráfica das regiões avaliadas – Pedúnculo (P), Meio (M) e *Blossom end* (BE) _____ 32

Figura 4. Adesão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 25°C por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) _____ 38

Figura 5. Adesão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 8°C por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) _____ 39

Figura 6. Detalhes das estruturas características de biofilme de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em fragmentos da casca de manga após armazenamento à 25°C por 72 h _____ 40

Figura 7. Adesão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 25°C por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) _____ 41

Figura 8. Adesão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 8°C por 24h (A), 48h (B) e 72h (C). _____ 42

Figura 9. Detalhes das estruturas características de biofilme de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em fragmentos da casca de manga após armazenamento à 25°C por 72 h _____ 43

Figura 10. Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de baixo nível de contaminação (2 log UFC/mL), de acordo com o estágio de maturação (M – madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento. _____ 49

Figura 11. Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), de acordo com o estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 °C e 25 °C), por até 10 dias de armazenamento _____ 52

Figura 12. Ajustes das equações aos dados experimentais – cenário baixo nível de contaminação _____ 55

Figura 13. Ajustes das equações aos dados experimentais – cenário alto nível de contaminação _____ 56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Teores de pH e SST nas mangas utilizadas como controle de maturação_____ 35
- Tabela 2.** Índice de hidrofobicidade (IH) e formação de biofilme das cepas empregadas no estudo_____ 36
- Tabela 3.** Adesão após inoculação spot à superfície da manga (fragmentos da casca), de acordo com o tempo de exposição, avaliada pela contagem na suspensão bacteriana final_____ 37
- Tabela 4.** Internalização de *Salmonella* spp. após contaminação direta na região do pedúnculo - *spot inoculation*_____ 44
- Tabela 5.** Internalização de *L. monocytogenes* após contaminação direta na região do pedúnculo - *spot inoculation*_____ 45
- Tabela 6.** Internalização de *Salmonella* spp. após imersão em solução contaminada_____ 45
- Tabela 7.** Internalização de *L. monocytogenes* após imersão em solução contaminada_____ 46
- Tabela 8.** Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 na polpa das mangas, para cenário de baixo nível de contaminação (2 log UFC/mL), nas condições estádio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento_____ 47
- Tabela 9.** Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de baixo nível de contaminação (2 log UFC/mL), nas condições estádio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento_____ 48

Tabela 10. Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 na polpa das mangas, para cenário de alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), nas condições estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento_____ 50

Tabela 11. Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), nas condições estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento_____ 51

Tabela 12. Valor de pH das amostras controle ao longo do estudo_____ 53

Tabela 13. Sólidos solúveis totais (SST) nas amostras controle ao longo do estudo_____ 53

Tabela 14. Equações, r^2 e RMSE – *S. Typhimurium* (baixo nível de contaminação)_____ 57

Tabela 15. Equações, r^2 e RMSE – *L. monocytogenes* (baixo nível de contaminação)_____ 57

Tabela 16. Equações, r^2 e RMSE – *S. Typhimurium* (alto nível de contaminação)_____ 58

Tabela 17. Equações, r^2 e RMSE – *L. monocytogenes* (alto nível de contaminação)_____ 58

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A FRUTICULTURA BRASILEIRA	13
1.2 A MANGA VARIEDADE TOMMY ATKINS	14
1.3 SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA	16
1.3.1 SALMONELLA SPP EM FRUTAS	17
1.3.2 LISTERIA MONOCYTOGENES EM FRUTAS	19
1.4 ADESÃO E INTERNALIZAÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 SELEÇÃO DAS MANGAS	23
3.2 PREPARO DAS CULTURAS MICROBIANAS	23
3.3 DETERMINAÇÃO DO PH E TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (SST) DAS MANGAS	24
3.4 PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> SPP E <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> NAS MANGAS, ANTES DA CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL	24
3.5 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DAS CEPAS	26
3.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS CEPAS FORMAREM BIOFILME EM POLIESTIRENO	27
3.7 AVALIAÇÃO DA ADESÃO DOS PATÓGENOS À SUPERFÍCIE DAS MANGAS	28
3.7.1 AVALIAÇÃO DA ADESÃO POR CONTAGEM DE MICRORGANISMOS	28
3.7.2 AVALIAÇÃO DA ADESÃO IRREVERSÍVEL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	29
3.8 AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DOS PATÓGENOS NAS MANGAS	30
3.8.1 AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO POR SPOT INOCULATION	30
3.8.2 AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO POR IMERSÃO EM SUSPENSÃO BACTERIANA APÓS TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	31
3.9 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DOS PATÓGENOS NO INTERIOR DAS MANGAS	33

3.10 ANÁLISE DOS DADOS.....	34
4 RESULTADOS	35
4.1 ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DAS MANGAS TOMMY ATKINS UTILIZADAS NO ESTUDO	35
4.2 OCORRÊNCIA DOS PATÓGENOS NA SUPERFÍCIE DAS MANGAS.....	35
4.3 HIDROFOBICIDADE E FORMAÇÃO DE BIOFILME	35
4.4 CAPACIDADE DE ADESÃO	36
4.5 CAPACIDADE DE INTERNALIZAÇÃO	44
4.6 SOBREVIVÊNCIA NO INTERIOR DAS MANGAS.....	46
4.7 VALOR DE PH E TEOR DE SST NAS MANGAS EMPREGADAS COMO CONTROLE AO LONGO DOS TESTES DE SOBREVIVENCIA DOS PATÓGENOS	53
4.8 MODELAGEM DA RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS	54
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÃO	64
7 REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 A fruticultura brasileira

A fruticultura é um dos setores mais promissores do agronegócio brasileiro. Com uma grande variedade de culturas produzidas em todas as regiões do país e em diversos climas, conquista resultados expressivos e gera oportunidades para o mercado brasileiro (CNA, 2017). O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de produção de frutas, atrás apenas da China e Índia. Juntos, os três países respondem por 45,9% do total mundial e têm suas produções destinadas principalmente aos seus mercados internos. A presença brasileira no mercado externo, com a oferta de frutas tropicais e de clima temperado durante boa parte do ano, é possível pela extensão territorial do país, posição geográfica e condições de clima e solo privilegiadas (ANDRADE, 2017).

As principais frutas cultivadas no país são bananas, maçãs, uvas, melões e frutas tropicais, particularmente manga, abacate, abacaxi e mamão papaia. O volume exato de produção é difícil de mensurar, devido ao grande número de pequenos produtores destinados ao consumo familiar ou para o mercado local (OECD/FAO, 2015).

Em relação à exportação, a manga possui grande importância para o agronegócio brasileiro. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAOSTAT, 2019) o Brasil está em sétimo lugar no ranking dos grandes produtores de manga do mundo. Por questões sazonais, as exportações de mangas brasileiras tiveram significativo incremento no segundo semestre de 2018. Foram exportadas mais de 65 mil toneladas em 2018, 20% do total das frutas exportadas, o que coloca a manga como líder do ranking (ABRAFRUTAS, 2018). A produção brasileira de manga padrão exportação está quase toda concentrada na região nordeste, em especial na microrregião Juazeiro-Petrolina (CODEVASF, 2016).

Segundo HOJO et al., 2009, a competitividade no mercado de exportação de frutas está relacionada à capacidade de produção em épocas adequadas à comercialização e à adequação aos padrões de qualidade e segurança exigidos pelos importadores. A escolha da variedade a ser cultivada está diretamente relacionada ao mercado consumidor a que será destinada e é um fator econômico de grande

importância, pois a variedade deve apresentar boa produtividade, resistência ao manuseio e às pragas. A variedade Tommy Atkins é a mais produzida e comercializada no Brasil e no mundo, por suas características de aceitabilidade e resistência ao transporte para mercados distantes. Essa variedade responde por 80% das plantações de manga em solo brasileiro (MOUCO, 2010).

Cerca de 10% da manga produzida no Brasil é exportada para os Estados Unidos e Europa (OECD/FAO, 2015). Por outro lado, a manga brasileira representa 6% do volume importado pelos Estados Unidos, ocupando a quarta colocação, atrás do México, Peru e Equador (MANGO.ORG, 2017). Esse segmento do agronegócio brasileiro apresenta uma série de desafios a serem superados, sobretudo para adequação aos padrões de qualidade dos grandes mercados importadores em relação à pragas, distúrbios fisiológicos e contaminantes (SEBRAE, 2015; TREICHEL et al., 2016).

1.2 A manga variedade Tommy Atkins

A manga Tommy Atkins é originária da Flórida (Estados Unidos) e possui frutos com comprimento aproximado de 12 cm e peso entre 400 e 700 gramas. Tem formato oval alongado, casca grossa, lisa, coloração amarela alaranjada contendo manchas nos tons vermelho claro ou escuro. É resistente ao transporte e armazenamento. Quando em processo de maturação sua coloração se torna arroxeadopúrpura e vermelho-amarelo-brilhante, quando madura. Sua polpa é amarela-escura com textura firme e representa 80% do peso da fruta, sendo destes, aproximadamente 15% de sólidos solúveis (SANTOS, 2003).

As mudanças físicas e químicas que ocorrem nos frutos durante o amadurecimento podem afetar sua qualidade e conservação. No entanto, um único padrão de amadurecimento não pode ser aplicado a todos os frutos. Muitos índices de maturação foram testados como o número de dias a partir da floração, tamanho, firmeza, formato, cor da casca, cor da polpa, teor de amido, sólidos totais, sólidos solúveis e acidez titulável. No entanto, devido às diferenças entre cultivares e condições de produção, não há consenso sobre os índices de maturação (MITRA, 1997). É importante o conhecimento dessas alterações, visando estabelecer

tecnologias mais adequadas de manuseio e tratamento pós-colheita. Tais indicadores servem como parâmetro de qualidade da fruta (CRUZ, 2010).

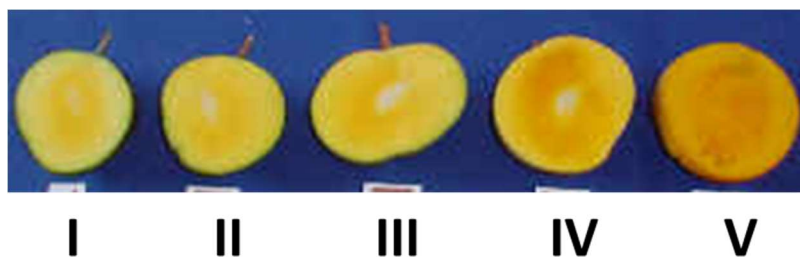
A cor da casca é a principal transformação física associada ao estágio de maturação e a mais perceptível pelo consumidor. A alteração mais comum consiste no desaparecimento da cor verde e o surgimento de coloração que varia do amarelo ao vermelho (AWAD, 1993). Uma escala de cor foi proposta pela Embrapa (MOUCO, 2010) para auxiliar na identificação do estágio de maturação (Figuras 1 e 2):

Figura 1: Estádios de maturação de mangas de acordo com a cor da casca



Fonte: MOUCO, 2010

Figura 2: Estádios de maturação de mangas de acordo com a cor da polpa



Fonte: MOUCO, 2010

O teor de sólidos solúveis totais (SST) expresso em °Brix é uma medida relacionada com a quantidade de açúcares presentes na fruta. Com o amadurecimento, ocorre uma elevação nos valores de SST, em virtude do aumento do teor de açúcares solúveis, sendo, portanto, um bom indicador de maturação (DE LIMA; CHITARRA; CHITARRA, 2001). Quando as mangas são colhidas com 7 a 8°Brix, as frutas podem amadurecer normalmente, porém, é preferível que sejam colhidas com 12 a 15 °Brix, pois assim possuem maior valor comercial. A variedade Tommy Atkins, quando madura, pode apresentar teores entre 15,6 a 16,24% de

sólidos solúveis totais (MANICA et. al, 2001), sendo que no início da maturação o teor médio é de 12% (COCOZZA, 2003). Durante o amadurecimento, ocorre diminuição da acidez e consequentemente aumento do pH. A manga é considerada um fruto ácido na maioria dos cultivares, pois apresenta valores de pH abaixo de 6,0. A variedade Tommy Atkins apresenta valores de pH que podem variar de 3,23 a 4,51 para os estádios I a V (ROCHA et al., 2001) até 4,6 para frutas maduras (MANICA et. al, 2001).

1.3 Segurança microbiológica

Os principais atributos que influenciam a decisão de compra do consumidor estão associados ao grau de frescor e à composição natural do produto. No entanto, aspectos de praticidade de uso são igualmente relevantes (SANTOS et al., 2012). No caso de frutas, o processamento mínimo, que compreende seleção, limpeza, desinfecção, descascamento, corte e embalagem, facilita o uso, mas deve também garantir a manutenção do frescor e propriedades nutricionais da fruta original. No entanto, o processamento mínimo não garante a eliminação de microrganismos presentes (BASTOS, 2006). As frutas apresentam algumas características intrínsecas favoráveis à multiplicação microbiana, como nutrientes e água abundantes, fazendo com que o setor enfrente grandes desafios para minimizar os impactos de uma possível contaminação microbiana indesejada (SILVA et al., 2011).

Durante as operações de colheita e processamento, as frutas podem sofrer danos mecânicos que potencializam o risco de contaminação cruzada (QADRI; YOUSUF; SRIVASTAVA, 2015). Ferimentos na casca representam um risco à entrada de microrganismos e o elevado teor de água e nutrientes permite sua sobrevivência e multiplicação. Também a água utilizada no processo de lavagem das frutas pode causar a contaminação cruzada da superfície. A posterior internalização dos microrganismos nos espaços intercelulares pode comprometer a segurança microbiológica das frutas. Estudos realizados em diferentes vegetais submetidos a tratamentos hidrotérmicos (imersão em água quente) comprovaram o risco de internalização de microrganismos presentes na superfície das frutas para seu interior (RYSER; HAO; YAN, 2009).

Os mamíferos, aves, répteis e insetos são potenciais fontes de contaminação ambiental e podem ser vetores de uma variedade de patógenos, como *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1998). Entre todos os fatores a serem considerados quando se abordam questões de segurança de vegetais frescos, estes agentes patogênicos recebem grande atenção, devido aos vários casos notificados de salmonelose e listeriose causados pelo consumo de frutas e vegetais contaminados (QADRI; YOUSUF; SRIVASTAVA, 2015). Compreender as circunstâncias que levam à contaminação microbiológica requer atenção cuidadosa sobre como esses alimentos são colhidos, transportados e processados (CHEN et al., 2016; EBLEN et al., 2004).

1.3.1 *Salmonella* spp em frutas

O primeiro registro de surto de salmonelose relacionado ao consumo de mangas *in natura* ocorreu em 1999 nos Estados Unidos, com 78 casos em treze estados americanos e dois óbitos. Investigações epidemiológicas identificaram mangas importadas do Brasil como veículos de *Salmonella* spp. O sorotipo *Salmonella* Newport foi isolado de várias amostras clínicas dos pacientes acometidos pelo surto (SIVAPALASINGAM et al., 2003). Em 2001, mangas importadas do Peru foram identificadas como responsáveis por outro surto de salmonelose, também nos Estados Unidos. O sorotipo *Salmonella* Saint Paul foi identificado nos isolados clínicos. Nos dois casos, as investigações epidemiológicas indicaram que a água utilizada no tratamento hidrotérmico foi a fonte de contaminação. Os inspetores da US Animal and Plant Health Inspection Service – APHIS que visitaram os locais de produção observaram que a água utilizada na última etapa do tratamento térmico não era clorada. Após o surto de 1999, a APHIS recomendou que os produtores utilizassem água tratada com cloro a 50–200 ppm para a imersão das frutas no tratamento hidrotérmico (BEATTY et al., 2004).

Em 2012, ocorreu outro surto relacionado ao consumo de mangas, em quinze estados americanos, no qual 127 pessoas foram infectadas por *Salmonella* Braenderup. As vítimas adoeceram depois de consumirem mangas importadas do México. Trinta e três pessoas foram hospitalizadas, mas nenhuma morte foi reportada (CDC, 2012). No mesmo ano, 16 pessoas foram infectadas por *Salmonella*

Worthington, em três estados americanos. O CDC identificou possível conexão entre os dois surtos. No Canadá, houve registro de surto relacionado às mangas importadas do México do mesmo produtor, investigado pela Canadian Food Inspection Agency. Vinte e três pessoas foram infectadas, em dois estados (CANADA, 2012)

Além das mangas, outras frutas também estiveram envolvidas em surtos de salmonelose, como o ocorrido em 2011, causado por mamão papaia importado do México, contaminado com *Salmonella* Agona. Os casos foram reportados em 25 estados americanos, com 106 indivíduos afetados, nos quais 10 foram hospitalizados, sem mortes (MBA-JONAS et al., 2018). Em 2017, houve quatro surtos multiestaduais de salmonelose, associados à mamão papaya variedade Maradol, provenientes de quatro fazendas do México. O sorotipo identificado nesse caso foi *Salmonella* Anatum (CDC, 2017).

Um surto envolvendo melões processados atingiu nove estados americanos em 2018. Setenta e sete pessoas foram infectadas, 36 foram hospitalizadas e nenhuma morte foi reportada. As investigações epidemiológicas concluíram que as pessoas foram infectadas após consumir saladas de frutas contendo o melão contaminado. O sorotipo *Salmonella* Adelaide foi identificado como agente causador do surto (CDC, 2018a).

Em 2018, dois surtos envolvendo coco ralado foram investigados pelo CDC. Um dos surtos, ocorrido em nove estados americanos, envolveu coco ralado congelado, com 27 pessoas infectadas por *Salmonella* I 4,[5],12:b: e *Salmonella* Newport (CDC, 2018b). Seis pessoas foram hospitalizadas, mas não foram reportadas mortes. O outro surto foi causado por coco ralado seco contaminado com *Salmonella* Typhimurium: 14 pessoas foram infectadas e três foram hospitalizadas, mas não houve mortes (CDC, 2018c).

A preocupação quanto ao risco de surtos de salmonelose associado ao consumo de alimentos ácidos deve-se à capacidade de adaptação da *Salmonella* spp. à acidez, conhecida como ATR (*acid tolerance response*). Muitos estudos foram conduzidos nos últimos anos para compreensão dos mecanismos ATR, concluindo-se que os fatores ambientais têm grande influencia nessa adaptação, com vários mecanismos moleculares envolvidos na complexa resposta adaptativa de *Salmonella* spp. (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012).

1.3.2 *Listeria monocytogenes* em frutas

Os registros de surtos de listeriose causados por frutas contaminadas tem se intensificado nos últimos anos. Estudos mostram que *Listeria monocytogenes* pode contaminar vegetais frescos por contaminação cruzada, se estiver presente no ambiente, solo ou água. Devido à persistência de *L. monocytogenes* no ambiente, associada à capacidade de formação de biofilmes em superfícies, são necessárias medidas eficazes de combate à contaminação em todas as etapas de produção, distribuição e comercialização dos alimentos (ZHU; GOONERATNE; HUSSAIN, 2017).

Nos Estados Unidos, em 2011, um surto ocorreu por consumo de melão cantaloupe contaminado com *L. monocytogenes*, afetando 147 pessoas em 28 estados, com 33 mortes reportadas (MCCOLLUM et al., 2013).

Em 2014 e 2015, nos Estados Unidos, foi registrado um surto envolvendo maçãs caramelizadas contaminadas com *L. monocytogenes*, com a identificação de 35 casos em 12 estados, com 34 hospitalizações e sete mortes. As mesmas cepas isoladas no surto foram detectadas em amostras ambientais obtidas nas instalações de embalagem do produtor e maçãs inteiras da cadeia de distribuição (ANGELO et al., 2017). Um estudo avaliou o efeito do revestimento convencional com cera sobre a sobrevivência de cepas de *L. monocytogenes* e constatou que este procedimento pode favorecer sua sobrevivência por tempos prolongados (MACARISIN et al., 2019).

Em 2014, no estado americano da Califórnia, ocorreu o primeiro surto de listeriose associado a frutas com caroço, conhecidas como “stone fruits”. O surto envolveu pêssegos inteiros, nectarinas e ameixas (CDC, 2015). Foram quatro casos reportados e identificados. Resultados da análise de sequenciamento do genoma completo (WGS) indicaram que estas frutas eram as prováveis responsáveis pelo surto (CHEN et al., 2016b).

A Austrália registrou um surto de listeriose associado ao consumo de melão cantaloupe, de uma fazenda produtora local. As autoridades australianas reportaram esse surto para a OMS (Organização Mundial da Saúde) em março de 2018, após identificar que o produtor exportava seus produtos para vários países. Vinte pessoas foram infectadas e hospitalizadas e sete mortes foram registradas. Análises laboratoriais identificaram presença de *L. monocytogenes* nas amostras de melão e

também nas áreas de produção. As cepas encontradas na fazenda possuíam a mesma sequência genética das amostras clínicas isoladas dos pacientes acometidos pelo surto. As investigações epidemiológicas identificaram como possível causa da contaminação uma combinação de fatores ambientais e climáticos que contaminaram a superfície da fruta, e que persistiram mesmo após o processo de lavagem (WHO, 2018).

A capacidade de adaptação e sobrevivência de *L. monocytogenes* em baixas temperaturas e a possibilidade de formação de biofilmes em diferentes superfícies são grandes preocupações para a indústria de alimentos (BONSAGLIA, 2012; TRAVAGIN, 2010; LEE et al., 2013). Além disso, *L. monocytogenes* apresenta tolerância a valores de pH mais baixos, o que possibilita sua ocorrência em frutas e sucos ácidos (KIM; CHO, 2010).

1.4 Adesão e Internalização

A adesão de microrganismos a uma superfície é um fenômeno resultante de interações físico-químicas entre as bactérias e a superfície. A adesão envolve duas etapas: a primeira, denominada adesão reversível, consiste numa interação fraca entre as bactérias e a superfície, sendo as bactérias aderidas facilmente removíveis. Na segunda etapa, conhecida como adesão irreversível, as células bacterianas unem-se por meio de seus exopolissacarídeos (EPS), formando microcolônias, e adquirem maior resistência à ação de sanitizantes e detergentes. A hidrofobicidade da superfície celular e da superfície de contato tem forte influência na adesão dos microrganismos, que aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas do que às hidrofílicas (STOODLEY et al., 2002; LIU et al., 2004; UKUKU; FETT, 2002; GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; COLLIGNON; KORSTEN, 2010).

Países importadores exigem que mangas sejam submetidas a tratamentos pós-colheita que garantam sua fitossanidade, impedindo a entrada de doenças e pragas em seus territórios. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, as mangas importadas devem ter sido submetidas a um tratamento hidrotérmico, que consiste na sua imersão em água a 46,1 °C por 75 a 90 min, a uma profundidade mínima de 12 cm em relação à superfície da água (USDA, 2017). Esse tratamento não afeta as frutas, que mantém suas características originais por até 20 dias, se mantidas em temperatura de até 11 °C. O custo de implantação e manutenção deste

tratamento é baixo, mas exige rigoroso controle e padronização do estágio de maturação no momento da colheita e do peso das frutas (CEINFO, 2000).

Merker et. al, (1999) avaliaram a internalização de microrganismos em laranjas e toranjas causada pelo diferencial de temperatura durante o tratamento hidrotérmico, empregando soluções com corantes. O estudo mostrou que há uma contração dos gases presentes no interior das frutas quando são aquecidas e posteriormente imersas em água fria, resultando em um diferencial de pressão, que pode resultar na infiltração de bactérias. Buchanan et al., (1999) observaram resultados similares ao realizarem um estudo de internalização em maçãs submetidas ao tratamento hidrotérmico.

A reciclagem da água, prática comum nas etapas de lavagem e resfriamento das frutas, pode resultar em contaminação cruzada devido à penetração da água pelas lenticelas, estômatos e lesões durante e após a colheita. A redução do risco de contaminação cruzada durante o manuseio pós-colheita depende da compreensão dos processos envolvidos na adesão das bactérias nas superfícies (REINA; FLEMING; BREIDT, 2002). Portanto, é de grande importância conhecer o comportamento dos patógenos nas diferentes situações que possam ocorrer durante todas as fases de produção, distribuição e estocagem, essencial para evitar a contaminação, proliferação e consequentemente os surtos alimentares (FDA, 1998).

A identificação dos riscos potenciais de contaminação por patógenos na produção das mangas, bem como a compreensão dos mecanismos de ação dos microrganismos são ferramentas essenciais no combate de possíveis surtos associados ao consumo da fruta. Visto que as mangas são largamente consumidas pela população em sua forma in natura, é necessário avaliar a capacidade de adesão e internalização dos patógenos na manga, a fim de estabelecer procedimentos adequados para reduzir ao máximo os riscos ao consumidor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a capacidade de cepas de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* aderirem à superfície de mangas, internalizarem-se sobreviverem na polpa de mangas (*Mangifera indica*) variedade 'Tommy Atkins' durante armazenamento em refrigeração (8°C) e em temperatura ambiente (25°C) por 10 dias, após terem sido submetidas ao tratamento hidrotérmico recomendado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2017).

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar os índices de hidrofobicidade e capacidade de formação de biofilme das cepas de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* selecionadas para o estudo.
- b) Verificar a existência de alguma relação entre os parâmetros estágio de maturação, valor de pH e teor de sólidos solúveis totais (SST) nas mangas.
- c) Avaliar a capacidade de adesão de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* à superfície de mangas, através da contaminação experimental da superfície das frutas;
- d) Avaliar a capacidade de internalização destes patógenos nas mangas durante armazenamento a 8 °C e 25 °C por até 10 dias após contaminação direta na cicatriz do pedúnculo e após imersão das mangas em solução contaminada, previamente submetidas à tratamento hidrotérmico por imersão em água destilada à 46,1°C por 90 minutos.
- e) Observar a sobrevivência dos patógenos internalizados na polpa das mangas, durante o armazenamento a 8 °C (condição de refrigeração), e a 25 °C (condição ambiental), por até 10 dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das mangas

O estudo foi desenvolvido com mangas (*Mangifera indica*), variedade 'Tommy Atkins', adquiridas em centros de abastecimento localizados em diferentes regiões da cidade de São Paulo, no período de outubro de 2017 a junho de 2019. Foram selecionadas frutas intactas, sem danos físicos ou sinais de deterioração. As mangas foram classificadas quanto à cor da casca segundo o Manual de Cultivo da Mangueira (MOUCO, 2010), que define os seguintes estádios de maturação para mangas: I - fruto verde; II - verde com traços de vermelho; III - mais verde que vermelho; IV - mais vermelho que verde; e V - traços de verde.

3.2 Preparo das culturas microbianas

O estudo foi desenvolvido com as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Listeria monocytogenes* Scott A, pertencentes a biblioteca de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. As cepas foram cultivadas separadamente em 10mL de caldo Brain Heart Infusion – BHI (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) para *Salmonella* spp. e Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado com 0,6% de extrato de levedura - TSB-YE (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para *Listeria* spp, a 37°C por 24 h. As culturas foram centrifugadas a 8°C por 10min, a 2810 x g (6-16K Centrifuge – Sigma, Osterode am Harz, Alemanha). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram lavados três vezes com solução de água peptonada 0,1%. Para os experimentos com *pool* de microrganismos, o inóculo foi preparado a partir da mistura de volumes iguais de cada suspensão bacteriana. A densidade óptica foi medida a 630 nm (Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech, Nova Jersey, EUA), ajustada para atingir o valor correspondente a 10⁸ UFC/mL e em seguida diluída em água peptonada 0,1% conforme o experimento a ser realizado. A concentração do inóculo foi confirmada por semeadura em placas contendo Ágar Trypticase de Soja (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

3.3 Determinação do pH e teor de sólidos solúveis totais (SST) das mangas

As mangas nos estádios de maturação II, III, IV e V (n=5 para cada estágio) foram submetidas à determinação do pH (IAL, 2008) e teor de sólidos solúveis totais (AOAC, 1995), empregando-se um pHmetro de bancada (Modelo PHS3BW – Bel Engineering, Monza, Itália) e um refratômetro analógico (Modelo RHB 32 ATC - AKSO, São Leopoldo-RS, Brasil), respectivamente.

3.4 Pesquisa de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* nas mangas, antes da contaminação experimental

Antes de utilizadas nos testes, as mangas foram avaliadas quanto à presença de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* na superfície, empregando-se a técnica de esfregaço (APHA, 2001) e as metodologias ISO 6579:2002/Corr 1:2004/Amd 1:2007 (ISO, 2007) e ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 (ISO, 2004) respectivamente. Cotonetes esterilizados e umedecidos por imersão em água peptonada 0,1% (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) foram aplicados vigorosamente em toda a superfície das frutas, transferidos para tubos contendo 10mL de água peptonada 0,1% (Kasvi®, Padova, Itália) e agitados em vórtex por um minuto, para liberação das células aderidas. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para dois tubos contendo 10 mL de caldo de enriquecimento primário [Água Peptonada Tamponada - BPW (Kasvi®, Padova, Itália) para *Salmonella* spp. e caldo Half Fraser – HF (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) para *Listeria monocytogenes*]. Os tubos de BPW foram incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}/18\text{h} \pm 2\text{ h}$, e os tubos com caldo HF foram incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}/24\text{h} \pm 2\text{ h}$.

Na etapa de enriquecimento seletivo para *Salmonella* spp., alíquotas de 0,1 mL e 1 mL das amostras pré-enriquecidas em BPW foram transferidas para dois tubos, um contendo 10 mL de Caldo Rappaport-Vassilidis Soja Broth – RVS (Difco®, Detroit, EUA) e outro contendo 10 mL de Caldo Muller Kauffmann Novobiocina MKTTn (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra). Os tubos com caldo RVS foram incubados a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 3\text{ h}$ e os com caldo MKTTn a $37 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 3\text{ h}$. Os caldos foram estriados na superfície de placas contendo meios seletivos Ágar Xilose Lisina Desoxicolato – XLD (Kasvi®, Padova, Itália) e Ágar Hektoen Enterico – HE (Difco®, Detroit, EUA). As placas foram incubadas invertidas a $37 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 3\text{ horas}$. Colônias suspeitas de

Salmonella spp. foram submetidas aos testes de confirmação bioquímica em Ágar Tríplice Açúcar Ferro – TSI (Difco®, Detroit, EUA) e em Ágar Lisina Ferro – LIA (Difco®, Detroit, EUA). Tubos com reação típica foram submetidos à prova de soro-aglutinação em lâmina com soro polivalente para *Salmonella* spp. (Probac, São Paulo, Brasil). Colônias que apresentaram soro-aglutinação foram confirmadas através do kit de confirmação API 20E (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França).

As cepas identificadas como *Salmonella* spp. pelos testes bioquímicos e de soro-aglutinação foram também testadas por PCR convencional. Após a cultura em caldo BHI por 18-24 h, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 13000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspendido em PBS (tampão fosfato alcalino) e submetido ao processo de extração do DNA bacteriano com o kit comercial mericon DNA Bacteria (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo-se as instruções do fabricante. O volume utilizado para o mix da reação (25 µL) foi composto por 12,5 µL de 2x Qiagen Taq PCR Master mix [Tris-HCl, KCl e (NH₄)₂SO₄ buffer, pH 8.7; 3 mM MgCl₂, 400 µL de cada dNTP e 0.05 U/ µL de Taq polimerase], 1 µL do iniciador senso (25 µL de concentração) e 1 µL do iniciador anti-senso (25 µL de concentração), 9,5 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA extraído. A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems, Thermofischer), com uma etapa de desnaturação a 95 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 20 s, anelamento a 55 °C durante 20 seg, extensão a 72 °C durante 2 min e a extensão final do DNA a 72 °C por 4 min. Em todas as amplificações, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi utilizada como controle positivo e água ultra-pura como controle negativo. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *invA*, com os primers senso (F): 5' TAT CGC CAC GTT CGG GCA A-3' e anti-senso (R): 5' TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3', que delimitam um fragmento de 275 pb (NAYAK et al., 2004). Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% a 100V por 45 minutos e corados com Syber Safe (1 µL/10 mL) em tampão TBE 0,5X (pH 8,0). A leitura do resultado foi feita em transiluminador ultravioleta a 320 nm (Bio-rad Laboratories Inc. Hercules, USA) e os resultados das bandas foram comparados com o marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Na etapa de enriquecimento seletivo ou secundário para *L. monocytogenes*, alíquotas de 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas em caldo HF foram transferidas

para tubos contendo 10 mL de caldo Fraser e incubados a 37 ± 1 °C/ 48 ± 2 h. Os caldos HF e Fraser foram transferidos para placas com Ágar Listeria Ottaviani & Agostini – ALOA (Merck, Darmstadt, Alemanha) e Ágar Oxford (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) por estrias de esgotamento e incubadas a 37 ± 1 °C/ 24 ± 3 h. Colônias suspeitas de *Listeria monocytogenes* (típicas e atípicas) foram selecionadas, estriadas em placas com Ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura – TSA-YE (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 37 ± 1 °C/ $18-24$ h. As placas foram observadas sob iluminação oblíqua transmitida (técnica de Henry), e as colônias que apresentaram coloração azulada típica foram submetidas aos testes de produção de catalase, coloração de Gram e motilidade ao microscópio (Axio Observer - Zeiss, Göttingen, Alemanha), verificação de β -hemólise e fermentação de dextrose, xilose, ramnose, maltose e manitol. A cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada como controle positivo.

3.5 Avaliação da hidrofobicidade das cepas

O teste de hidrofobicidade foi realizado de acordo com Rosenberg et al, 1980. As cepas foram cultivadas separadamente em caldo BHI a 37°C por 24h, centrifugadas a 8°C por 10 min a $2810 \times g$ (6-16K Centrifuge – Sigma, Osterode am Harz, Alemanha) e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* foram lavados três vezes com solução tampão fosfato salino (PBS 0,01M pH 7,2). Cada suspensão bacteriana foi padronizada de forma a apresentar densidade óptica próxima a 1,0, através da leitura por espectrofotometria a 400nm (Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech, Nova Jersey, EUA). Posteriormente, 3,6mL de cada suspensão bacteriana foi misturada com 0,4 mL de hexadecano 99% (Sigma-Aldrich, Burlington-MA, EUA) em vórtex por 5min e deixada em repouso por 1 hora, para separação das fases oleosa e aquosa. Após o equilíbrio das fases, a densidade óptica da camada inferior foi lida a 400 nm (Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech, Nova Jersey, EUA). A mistura de PBS e hexadecano sem microrganismo adicionado foi utilizada como controle negativo.

O índice de hidrofobicidade (IH) foi determinado em porcentagem, de acordo com a fórmula:

$$IH = 100 \times (DO_i - DO_f) / DO_i$$

onde DO_i corresponde à densidade óptica inicial e DO_f à densidade óptica final.

As cepas foram classificadas quanto ao índice de hidrofobicidade de acordo com Rodrigues et al., (2018):

- ✓ $IH > 70\%$: cepa altamente hidrofóbica
- ✓ $IH < 30\%$: cepa altamente hidrofílica
- ✓ $30\% < IH < 70\%$: cepa com hidrofobicidade média

A determinação foi repetida três vezes para cada cepa testada.

3.6 Avaliação da capacidade das cepas formarem biofilme em poliestireno

Para avaliar a formação de biofilme em poliestireno, empregou-se o método descrito por Stepanović et al., (2000), com algumas adaptações. As cepas foram cultivadas em caldo BHI a 37°C por 24 h e 200 µL de cada cultura obtida foram transferidos para poços de placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (MIDSCI, Saint Louis-MI, EUA), que foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após a adição de 200µL de PBS (tampão fosfato salino), as suspensões bacterianas foram removidas dos poços por aspiração, adicionando-se 200 µL de metanol (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) para a fixação do biofilme formado no fundo dos poços. Após 15 min em temperatura ambiente, removeu-se o metanol dos poços, e adicionou-se 200µL de solução de cristal violeta 2% (Labsynth, Diadema-SP, Brasil). Após 5 min, o corante foi removido e as placas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 200µL de ácido acético a 33% v/v (Labsynth, Diadema-SP, Brasil), efetuando-se a leitura da densidade óptica a 570nm após 30 min, em leitor de microplacas (Multiskan FC Thermo Scientific, Waltham-MA, EUA). Poços contendo apenas o caldo BHI foram utilizados como controle negativo. Cada teste foi realizado em quintuplicata para cada cepa e o procedimento repetido três vezes.

A Densidade Óptica medida (DO_a) correspondeu à média aritmética das densidades ópticas obtidas nas três repetições e esse valor foi comparado com a média dos resultados dos controles negativos (DO_{cn}). A capacidade de formação de biofilme foi determinada segundo a classificação de Stepanović et al. (2000), ou seja,

- $DOa \leq DOcn$ = cepa não formadora de biofilme,
- $DOcn \leq DOa \leq 2xDOcn$ = cepa fracamente formadora de biofilme,
- $2xDOcn < DOa \leq 4xDOcn$ = cepa moderadamente formadora de biofilme,
- $DOa > 4xDOcn$ = cepa fortemente formadora de biofilme.

3.7 Avaliação da adesão dos patógenos à superfície das mangas

A capacidade de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* aderirem à superfície das mangas foi avaliada por dois procedimentos: por inoculação *spot* em fragmentos da casca seguida de contagem microbiana e por imersão da frutas seguida de acompanhamento por microscopia eletrônica de varredura. Os testes foram realizados com mangas maduras, previamente sanitizadas por imersão em solução clorada (SUMAVEG, Johnson Diversey, Fort Mill-SC, EUA) a 200 ppm e enxaguadas em água destilada. A eficácia da sanitização foi avaliada através da técnica de esfregaço com cotonetes estéreis umedecidos em água peptonada 0,1% (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) e semeados em Ágar Trypticase de Soja – TSA (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra).

3.7.1 Avaliação da adesão por contagem de microrganismos.

Empregou-se o procedimento de Mathew et al. (2018) e Collignon; Korsten, (2010), com adaptações para avaliação da adesão reversível na superfície da manga. Vinte fragmentos de casca (5x5 cm) de mangas maduras (estádio IV) obtidos com um bisturi estéril foram submetidos a uma leve raspagem para retirada da polpa aderida, sanitizados por imersão em solução clorada (SUMAVEG, Johnson Diversey, Fort Mill-SC, EUA) a 200 ppm e enxaguados com água destilada. Os fragmentos foram transferidos para placas de petri vazias e a superfície dos fragmentos foi inoculada com 50µL da suspensão bacteriana em teste contendo 7 log UFC/mL. Imediatamente após a inoculação (tempo 0), e após 30 seg, 60 seg e 1 h de contato à temperatura ambiente, as suspensões inoculadas foram aspiradas e a região coberta com 100µL de PBS para rinsagem. O PBS foi aspirado com o auxílio de uma pipeta e descartado, repetindo-se o procedimento cinco vezes. Os fragmentos de casca inoculados e lavados com PBS foram transferidos para tubos Falcon contendo 50 mL de água

peptonada 0,1%, agitados em vórtex por 60 seg. Os tubos foram mantidos em banho de ultrassom (USC 700 - Unique, Indaiatuba-SP, Brasil) por 5 minutos, para liberar as células aderidas. A suspensão obtida foi submetida à diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% e semeadas em Ágar XLD (Kasvi®, Padova, Itália) para *Salmonella* spp. e Ágar ALOA para *Listeria monocytogenes* (Merck, Darmstadt, Alemanha). Cada cepa foi testada individualmente, repetindo-se os experimentos três vezes.

3.7.2 Avaliação da adesão irreversível por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliação da adesão irreversível, caracterizada pela formação de estruturas de biofilme, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Para o teste foram selecionadas as duas cepas com melhor performance nos testes de hidrofobicidade, formação de biofilme e adesão. As cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foram testadas individualmente.

Fragmentos da casca (0,5x0,5mm) de mangas maduras (estádio IV) foram imersos na suspensão bacteriana em teste contendo 6 log UFC/mL, por uma hora. Após o período de exposição, a suspensão foi descartada e os fragmentos lavados com PBS por cinco vezes para retirada das células não aderidas à superfície. Os fragmentos foram separados e identificados, de acordo com o patógeno, temperatura (8 °C e 25 °C) e tempo de incubação (24 h, 48 h e 72 h), totalizando assim 12 amostras. Fragmentos não inoculados foram utilizados como controles negativos.

As amostras devidamente identificadas foram imersas em solução de fixação glutaraldeído 5% (Dinâmica Química, Indaiatuba-SP, Brasil) por 2 horas, novamente lavados com PBS para retirada do excesso de glutaraldeído e submetidas ao processo de desidratação em série ascendente de etanol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), através da imersão dos fragmentos em concentrações de 70, 80, 90 e 100%, por quinze minutos em cada etapa. Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao processo de secagem em aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030 Critical Point Dryer, Balzers, Liechtenstein) em CO₂ líquido, e fixadas em suportes metálicos (*stubs*) com fitas condutivas de carbono (Ted Pella Inc, Redding-CA, EUA). Em seguida foram

revestidas com uma camada de platina em equipamento de revestimento (Bal-tec Med 020 Coating System, Balzers, Liechtenstein).

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Caracterização de Materiais da POLI-USP. Utilizou-se microscópio eletrônico de varredura ambiental (ESEM) Quanta 650 FEG (FEI, Hillsboro-OR, EUA), com sistemas de microanálise por EDS Quantax (Bruker Nano GmbH, Berlim, Alemanha).

3.8 Avaliação da internalização dos patógenos nas mangas

A internalização de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* nas mangas foi avaliada por dois procedimentos: por contaminação direta na região do pedúnculo (spot inoculation) e por imersão das frutas em uma suspensão bacteriana. As mangas foram previamente submetidas à tratamento hidrotérmico por imersão em água destilada à 46,1°C por 90 minutos.

Os testes foram realizados com mangas maduras, previamente sanitizadas por imersão em solução clorada a 200 ppm e enxaguadas em água destilada estéril para eliminar possíveis resíduos da solução clorada. A eficácia da sanitização foi avaliada através da técnica de esfregaço com cotonetes estéreis umedecidos em água peptonada 0,1% (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) e semeados em Ágar Trypticase de Soja – TSA (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra).

Para as contaminações experimentais optou-se por utilizar a técnica de *pool* de microrganismos, para simular um cenário de contaminação mista. Foram elaborados dois *pools*:

pool 1: *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* 14028

pool 2: *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* Scott A.

3.8.1 Avaliação da internalização por *spot inoculation*

O procedimento foi baseado na técnica utilizada por Chen et al., (2016a), com algumas modificações. Foram utilizadas 18 mangas maduras (estádios IV e V), organizadas em três grupos: 6 mangas foram desafiadas com o “*pool* 1” de *Salmonella* spp., 6 mangas foram desafiadas com o “*pool* 2” de *Listeria monocytogenes* e 6 mangas foram usadas como controles negativos (amostras não contaminadas). Cada

grupo foi subdividido em amostras representativas de cada tempo (24h, 5 e 10 dias) e temperatura (8 °C e 25 °C). Para a contaminação, a cicatriz do pedúnculo foi inoculada com 100µL de uma suspensão bacteriana contendo 7 log UFC/mL, de forma a atingir a concentração final desejada de 6 log UFC/mL. Após completa absorção do inóculo, as mangas foram transferidas para sacos plásticos estéreis (Nasco, Fort Atkinson, EUA) e armazenadas a 8 °C e 25 °C por 24h, 5 e 10 dias. Em cada tempo de análise, as frutas eram novamente higienizadas e testadas quanto à ausência dos patógenos, empregando-se cotonetes estéreis aplicados à superfície. Com auxílio de bisturi estéril, porções de 25 g da polpa das mangas, obtidas em três diferentes regiões das frutas (Figura 3), foram transferidas separadamente para sacos plásticos (Nasco, Fort Atkinson, EUA). Em seguida adicionou-se 225 mL de Água Peptonada Tamponada – BPW (Kasvi®, Padova, Itália) ou 225 mL de Caldo Half Fraser (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) para os sacos, para posterior contagem de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas em *stomacher* (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), submetidas a diluições decimais em água peptonada 0,1% e semeadas em superfície em meios seletivos Ágar XLD (Kasvi®, Padova, Itália) para *Salmonella* spp. e Ágar ALOA para *Listeria monocytogenes* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

O experimento foi repetido três vezes. Nas amostras em que não foi possível fazer a contagem microbiana (<1 log UFC/g), considerou-se apenas presença/ausência, a partir de semeadura da primeira diluição decimal em água peptonada 0,1% no meio seletivo apropriado.

3.8.2 Avaliação da internalização por imersão em suspensão bacteriana após tratamento hidrotérmico

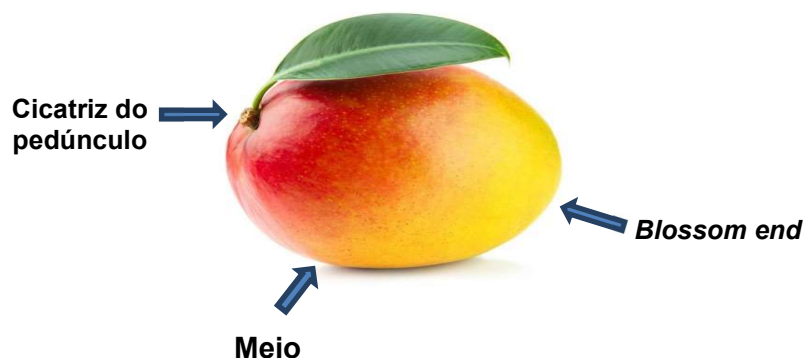
Seguiu-se a metodologia utilizada por Penteado; Eblen; Miller (2004), com adaptações. As suspensões para a imersão das mangas foram preparadas com 5 L de água destilada contendo 6 log UFC/mL a partir dos *pools* 1 de *Salmonella* spp ou 2 de *L. monocytogenes*. Foram utilizadas 18 mangas maduras (estádios IV e V), organizadas em três grupos, conforme descrito no item 3.8.1.

Inicialmente as mangas inteiras foram submetidas ao tratamento hidrotérmico através da imersão em água destilada à 46,1°C por 90 minutos e depois imersas nas

suspensões bacterianas em estudo a 21,1°C, e mantidas a essa temperatura por 10 min. As mangas foram então transferidas para uma solução clorada por 5 min, enxaguadas com água destilada e acondicionadas em sacos plásticos (Nasco, Fort Atkinson, EUA). Em seguida, as mangas foram armazenadas a 8 °C e 25 °C por 24h e 5 e 10 dias. A cada tempo de teste, as frutas eram higienizadas por imersão em uma solução clorada e avaliadas quanto à ausência do patógeno na superfície. Com auxílio de bisturi estéril, porções de 25 g da polpa das mangas, obtidas em três diferentes regiões das frutas (Figura 3), foram transferidas separadamente para sacos plásticos (Nasco, Fort Atkinson, EUA). Para a diluição inicial, adicionou-se 225 mL de Água Peptonada Tamponada – BPW (Kasvi®, Padova, Itália) aos sacos com as amostras a serem testadas para *Salmonella* spp. e 225 mL de Caldo Half Fraser (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) para os sacos com as amostras a serem testadas para *L. monocytogenes*. As amostras foram homogeneizadas em *stomacher* (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), submetidas a diluições decimais em água peptonada 0,1% e semeadas em superfície em meios seletivos Ágar XLD (Kasvi®, Padova, Itália) para *Salmonella* spp. e Ágar ALOA para *Listeria monocytogenes* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

O experimento foi repetido três vezes. Nas amostras em que não foi possível fazer a contagem microbiana (<1 log UFC/g), considerou-se apenas presença/ausência, a partir de semeadura da primeira diluição decimal em água peptonada 0,1% no meio seletivo apropriado. A população microbiana na soluções de imersão foi confirmada através de semeadura nos meios seletivos utilizados nos testes.

Figura 3: Representação gráfica das regiões avaliadas – Pedúnculo (P), Meio (M) e Blossom end (BE)



3.9 Avaliação da sobrevivência dos patógenos no interior das mangas

O experimento foi realizado com 55 mangas maduras (estádios IV e V) e 55 mangas não maduras (estádios II e III), previamente sanitizadas por imersão em solução clorada a 200ppm, seguida de enxágue em água destilada. A eficácia da sanitização foi avaliada através da técnica de esfregação com cotonetes estéreis umedecidos em água peptonada 0,1% (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) e semeados em Ágar Trypticase de Soja – TSA (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra). Para as contaminações experimentais, foram empregadas as cepas padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *L. monocytogenes* ATCC 7644. Cada lote de 55 mangas foi subdividido em três grupos: 22 mangas foram desafiadas com *S. Typhimurium* ATCC 14028, 22 mangas foram desafiadas com *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 11 amostras foram usadas como controles negativos, e para determinação do pH e teor de sólidos solúveis totais, conforme descrito no item 3.2. Cada grupo foi subdividido em amostras representativas para cada tempo (0, 1, 2, 3, 5 e 10 dias), temperatura (8 °C e 25 °C) e nível de inóculo (2 log UFC/mL e 6 log UFC/mL).

Nos testes de desafio, as mangas foram puncionadas com uma ponteira plástica de 200 µL (Labsynth, Diadema-SP, Brasil) no ponto central de uma região delimitada de 5x5 cm, a uma profundidade aproximada de 0,5 cm e diâmetro estimado de 1 mm. Nos orifícios formados, inoculou-se 100 µL da suspensão bacteriana de forma a obter os níveis de inóculo de 2 ou 6 log UFC/mL. As mangas foram mantidas em capela de fluxo laminar até completa absorção do inóculo, e depois transferidas para sacos plásticos estéreis, protegendo-se a região puncionada com um curativo-adesivo (Micropore 3M, EUA) para evitar exsudação do inóculo e oxidação excessiva. As mangas foram armazenadas a 8 °C em geladeira convencional e a 25 °C em estufa. Imediatamente após inoculação (tempo 0) e após 1, 2, 3, 5 e 10 dias, removeu-se 25 g da polpa da região delimitada, adicionando-se 225 mL de Água Peptonada Tamponada – BPW (Kasvi®, Padova, Itália) p/ *Salmonella* spp. ou 225 mL de Caldo Half Fraser (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) para *L. monocytogenes*. As amostras foram homogeneizadas em *stomacher* (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), submetidas a diluições decimais em água peptonada 0,1% e semeadas em superfície em meios seletivos Ágar XLD (Kasvi®, Padova, Itália) para *Salmonella* spp. e Ágar ALOA para *Listeria monocytogenes* (Merck, Darmstadt, Alemanha). O experimento foi

repetido três vezes. Mangas não contaminadas foram utilizadas como controle negativo e para medidas de pH e de teor de SST.

3.10 Análise dos dados

Os valores obtidos nas contagens de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* nos testes de adesão e internalização foram transformados em logaritmos e expressos como média $\pm$ desvio padrão, considerando-se as três repetições realizadas. Os valores de pH e teor de SST para as mangas nos diferentes graus de maturação foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, considerando-se as quintuplicatas realizadas. Os dados foram submetidos a teste estatístico ANOVA - Teste de Tukey para verificar a significância de diferença entre as médias, com intervalo de confiança de 95% e $\alpha = 0,05$ como nível de significância. Os testes foram realizados com o software Minitab™ versão 19 (Pennsylvania, EUA).

Para os testes de sobrevivência dos patógenos no interior das mangas, aplicou-se análise de regressão a fim de estabelecer modelos matemáticos que expressem a relação entre as variáveis, e que possam ser utilizados para estimação e predição. Foram selecionadas equações matemáticas lineares, exponenciais, polinomiais e logarítmicas para ajuste aos dados obtidos experimentalmente. As equações e curvas foram geradas no programa Excel 2013 (Microsoft - Washington, EUA). Para comparação do ajuste das equações aos dados experimentais foram utilizados o coeficiente de determinação (r^2) e o RMSE (raiz do erro quadrático médio).

4 RESULTADOS

4.1 Estádios de maturação das mangas Tommy Atkins utilizadas no estudo

A correlação do estágio de maturação das mangas com pH e teor de SST está apresentada na Tabela 1. Observou-se que os valores de pH diferiram significativamente de acordo com o estágio de maturação ($p < 0,05$), mas para os teores de SST, não houve diferença significativa para os estádios II e III ($p > 0,05$). Os teores de SST foram significativamente mais elevados nas mangas nos estádios de maturação IV e V ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores de pH e de teor de SST nas mangas em diferentes estádios de maturação

Estádio	pH (média $\pm$ DP)*	SST (média $\pm$ DP)*
II	3,6 $\pm$ 0,1 ^a	10,4 $\pm$ 0,4 ^A
III	3,8 $\pm$ 0,1 ^b	11,0 $\pm$ 0,3 ^A
IV	4,5 $\pm$ 0,1 ^c	13,2 $\pm$ 0,9 ^B
V	4,8 $\pm$ 0,1 ^d	14,7 $\pm$ 0,6 ^C

*médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

4.2 Ocorrência dos patógenos na superfície das mangas

Das 450 amostras de superfície avaliadas, apenas duas (0,4%) foram positivas para *Salmonella* spp.; confirmado pelos testes bioquímicos, sorológicos e moleculares utilizados. Oito amostras apresentaram resultado indicativo de *Listeria* spp, porém não houve detecção de *Listeria monocytogenes* conforme os resultados das provas bioquímicas realizadas.

4.3 Hidrofobicidade e formação de biofilme

Os resultados para os índices de hidrofobicidade (IH) e capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno das cepas empregadas no estudo estão descritos na Tabela 2. *Salmonella* ATCC 13076 e 14028 apresentaram

hidrofobicidade média, com diferença significativa entre elas. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 apresentou hidrofobicidade alta, enquanto *L. monocytogenes* Scott A apresentou hidrofobicidade média, porém não houve diferença significativa entre os resultados ($p>0,05$). *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 apresentaram capacidade moderada de formação de biofilmes nas placas de poliestireno, enquanto as duas outras cepas apresentaram capacidade baixa.

Tabela 2. Índice de hidrofobicidade (IH) e capacidade de formação de biofilme pelas cepas empregadas no estudo

Cepas avaliadas	IH % (média $\pm$ DP)	Formação de biofilme
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	42,1 $\pm$ 5,4 ^a	Fraca
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	62,6 $\pm$ 8,0 ^b	Moderada
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	70,0 $\pm$ 5,3 ^a	Moderada
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	68,1 $\pm$ 2,1 ^a	Fraca

*médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (valor $p<0,05$)

4.4 Capacidade de adesão

Os resultados de adesão das duas cepas de *Salmonella* spp e de *L. monocytogenes* à superfície das mangas, em função do tempo de exposição, avaliada pela técnica de *spot inoculation*, estão descritos na Tabela 3. É possível observar que a adesão detectada após exposição de 1h diferiu significativamente da observada para os demais períodos avaliados (0, 30 e 60 segundos), para todos os microrganismos testados.

Na comparação entre os resultados para cada par de patógenos (*Salmonella* ATCC 13076 x ATCC 14028 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 x Scott A), não houve diferença na adesão observada, independente do tempo de contato.

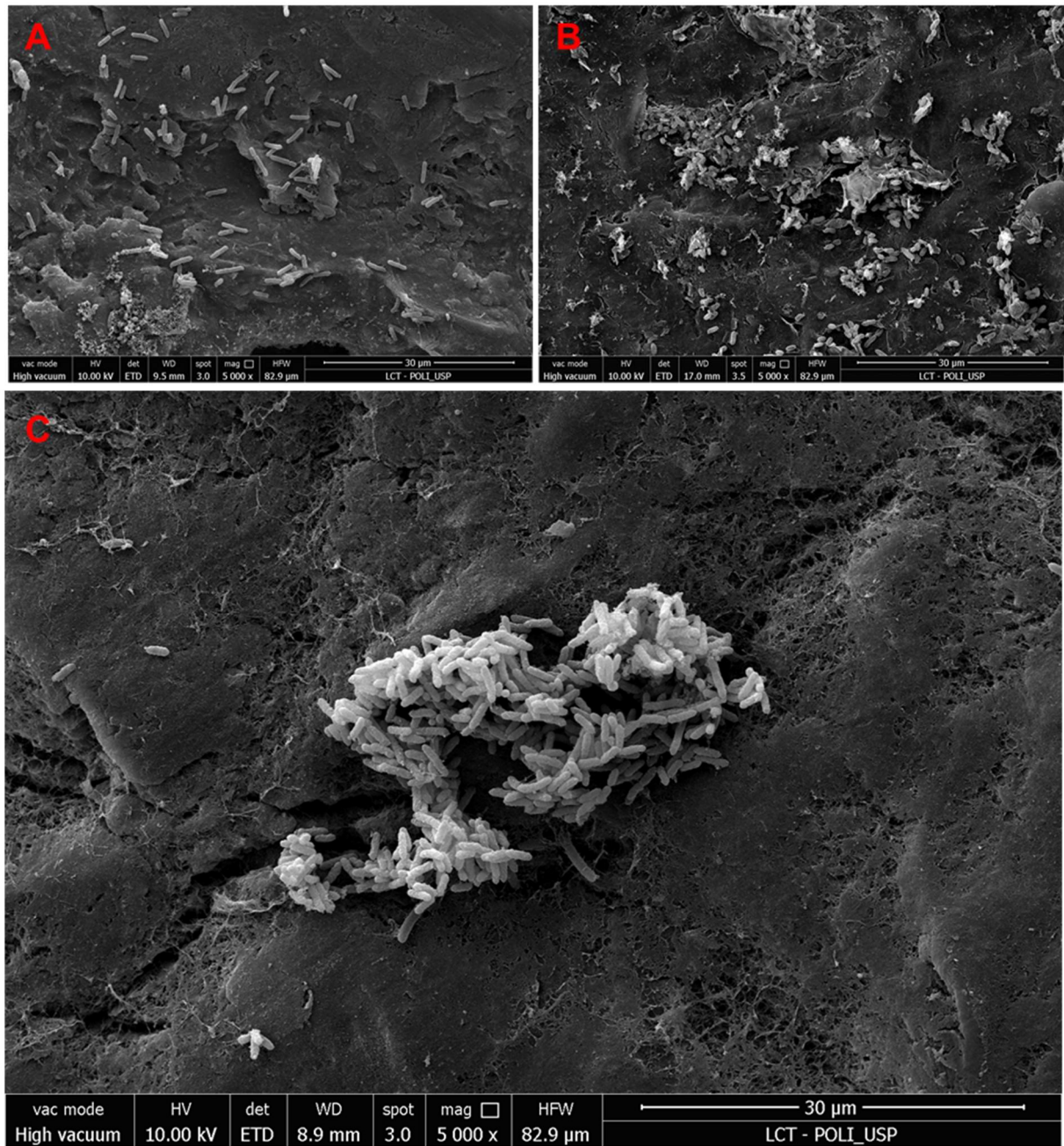
Tabela 3. Adesão das cepas de acordo com o tempo de contato, medida por *spot inoculation* na superfície de fragmentos da casca das mangas

Cepa	Tempo de contato	log UFC/mL (média ± DP)
S. Enteritidis ATCC 13076	0	3,5 ^a
	30 seg	3,6 ^{ab}
	60 seg	3,7 ± 0,1 ^b
	1 h	4,2 ± 0,1 ^c
S. Typhimurium ATCC 14028	0	3,4 ± 0,1 ^a
	30 seg	3,6 ± 0,1 ^{ab}
	60 seg	3,7 ± 0,1 ^b
	1 h	4,3 ± 0,1 ^c
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	0	3,4 ± 0,1 ^a
	30 seg	3,6 ± 0,1 ^{ab}
	60 seg	3,8 ± 0,1 ^{bc}
	1 h	4,3 ± 0,3 ^c
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	0	3,0 ± 0,2 ^a
	30 seg	3,4 ± 0,1 ^b
	60 seg	3,6 ± 0,1 ^b
	1 h	4,0 ± 0,1 ^c

*médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (valor $p < 0,05$)

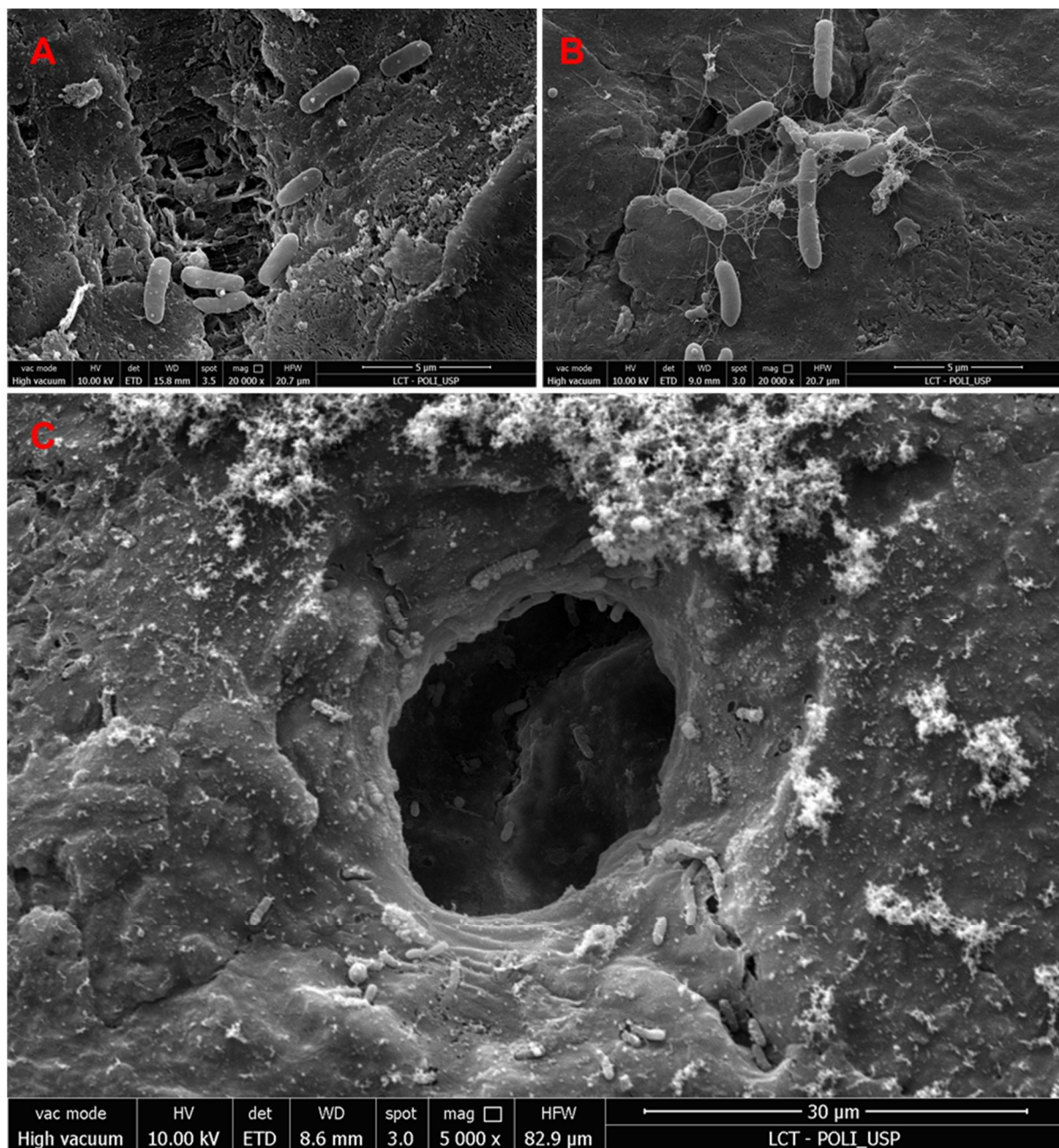
Os resultados de adesão dos dois **pools** de cepas de *Salmonella* spp e de *L. monocytogenes* à superfície das mangas, em função do tempo de contato, avaliada por microscopia eletrônica de varredura, estão apresentados nas Figuras 4 a 9. É possível observar a presença de estruturas características de adesão irreversível nas amostras armazenadas a 25 °C para os dois patógenos (Figuras 4, 6, 7 e 9). Após 72 horas, é possível observar células agrupadas, que indicam colonização da superfície da fruta e formação de biofilme. As Figuras 6 e 9, relativas à *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e à *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, respectivamente, indicam claramente a presença de exopolissacarídeos microbianos. É possível observar que as quantidades de microrganismos aderidos à superfície das mangas armazenadas à 8 °C (Figuras 5 e 8) são consideravelmente menores que as observadas à 25 °C (Figuras 4 e 7).

Figura 4. Adesão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 25°C por 24h (**A**), 48h (**B**) e 72h (**C**).



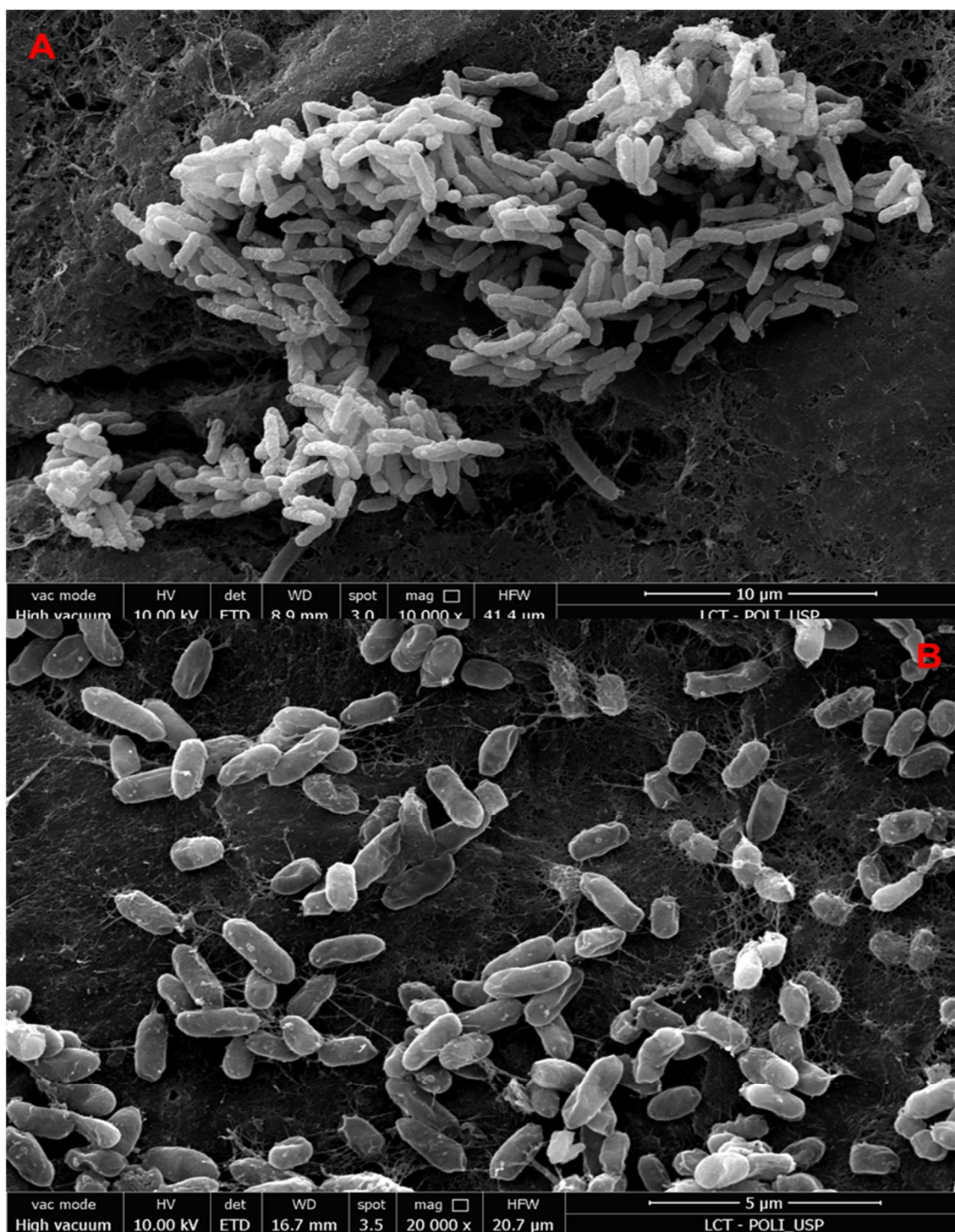
Legenda: adesão de *Salmonella* Typhimurium à superfície da manga a 25°C: **A** – superfície após 24h; **B** – superfície após 48h;; **C** – superfície após 72h

Figura 5. Adesão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 8°C por 24h (A), 48h (B) e 72h (C).



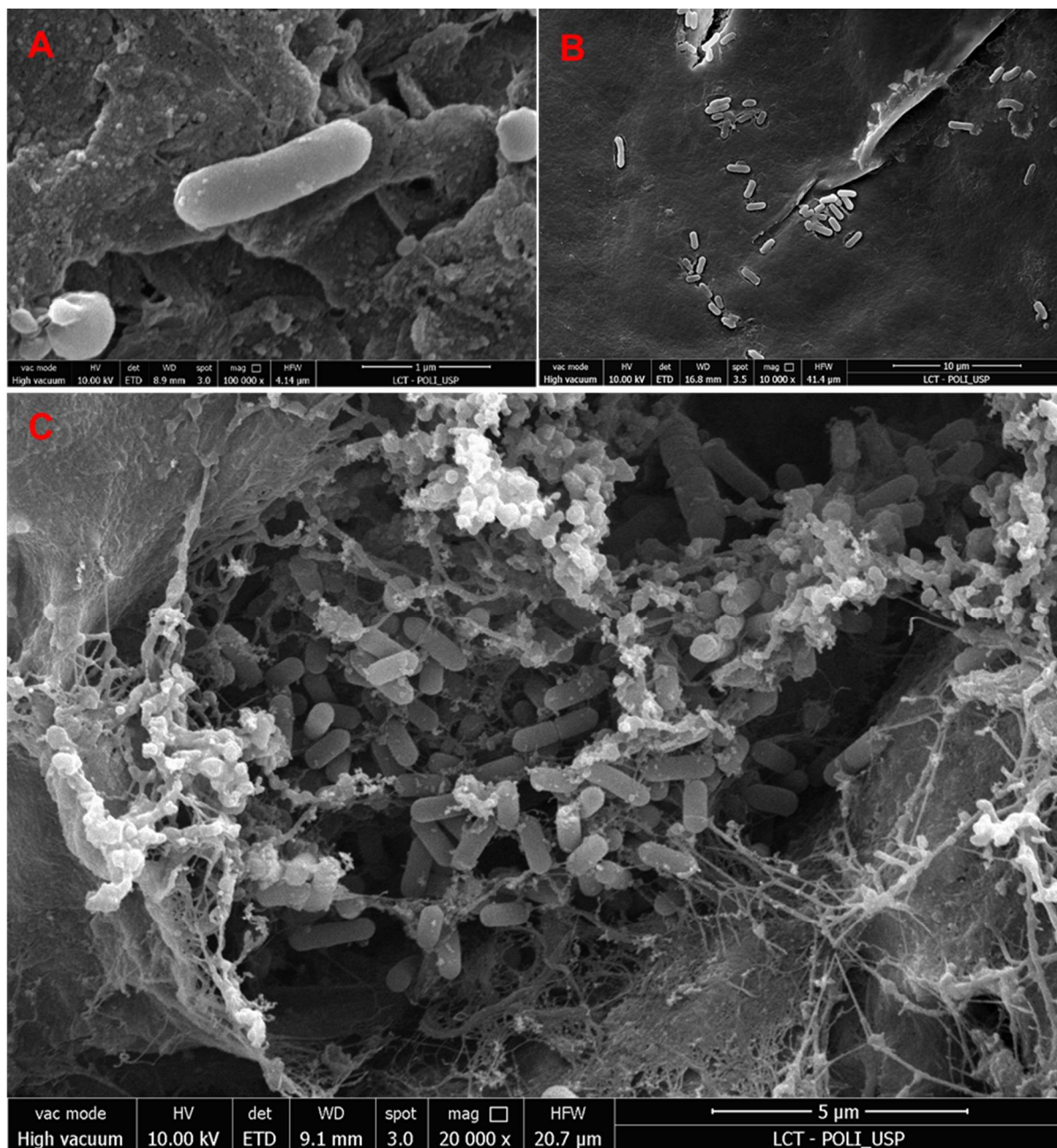
Legenda: adesão de *Salmonella* Typhimurium à superfície da manga a 8°C: **A** – superfície após 24h; **B** – superfície após 48h;; **C** – superfície após 72h

Figura 6. Detalhes das estruturas características de biofilme de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em fragmentos da casca de manga após armazenamento à 25°C por 72 h.



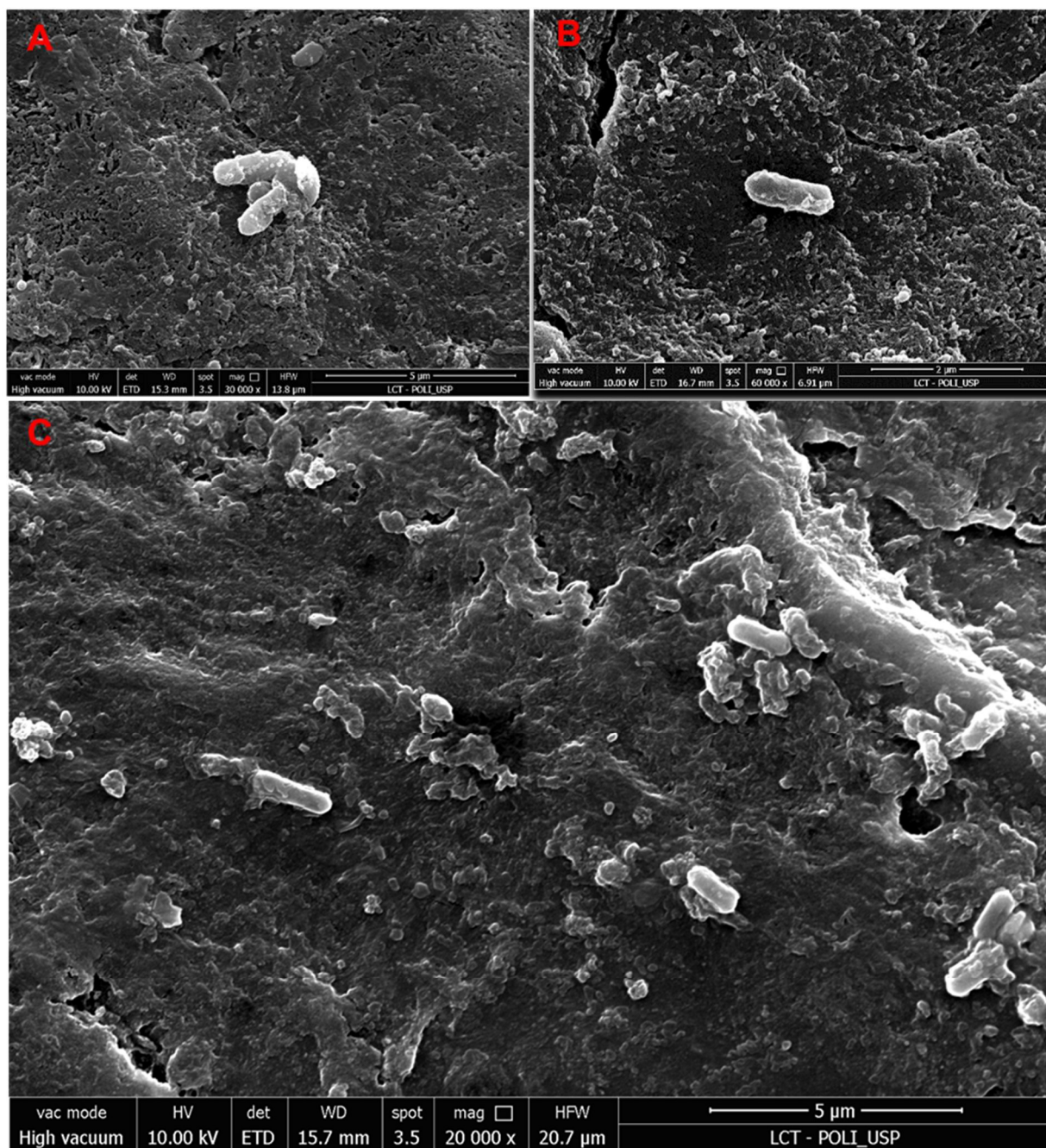
Legenda: adesão de *S. Typhimurium* à superfície da manga a 25 °C por 72 h A – formação de micro-colônias B – vista ampliada da estrutura, com forte presença de exopolissacarídeos.

Figura 7. Adesão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 25°C por 24h (A), 48h (B) e 72h (C).



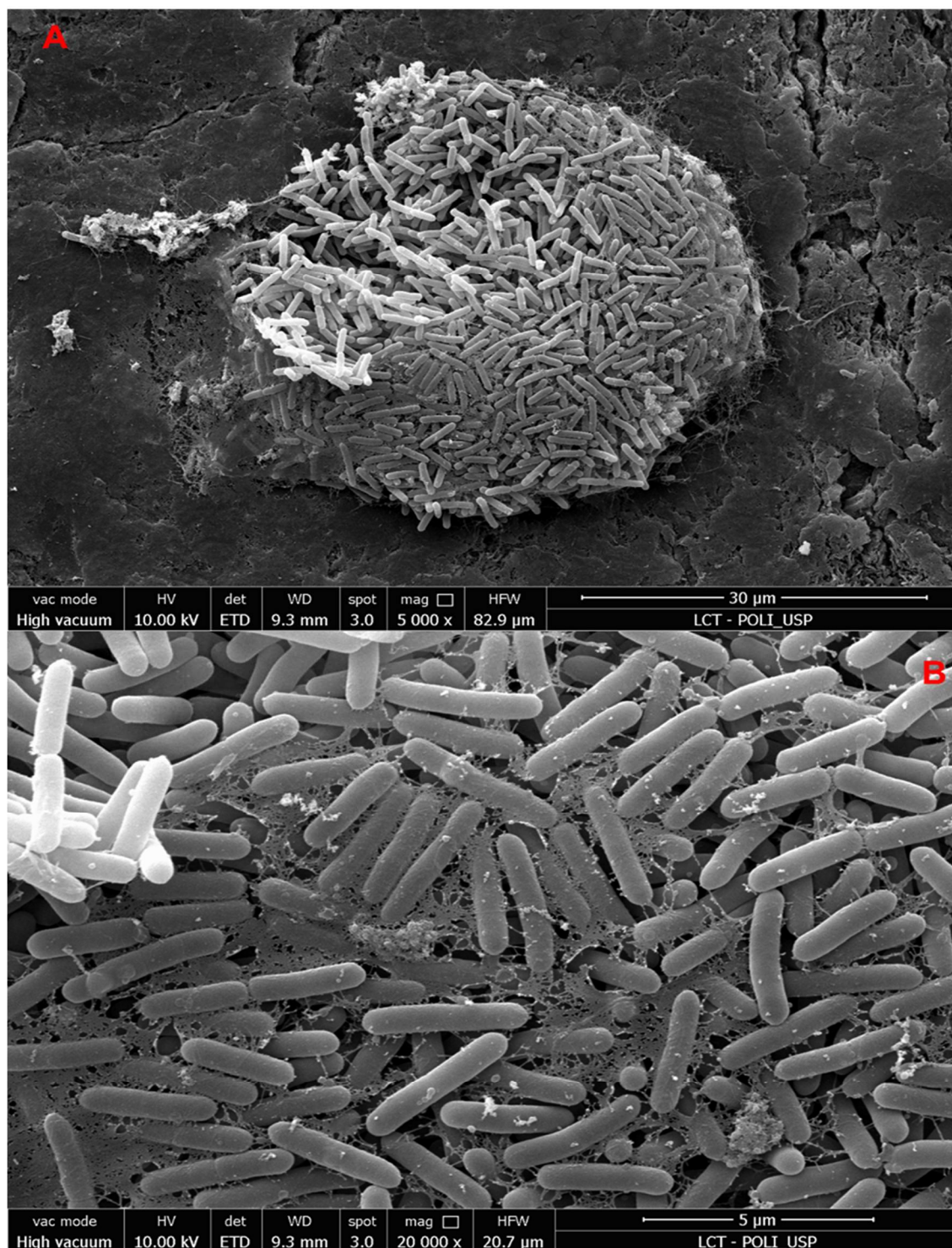
Legenda: adesão de *Listeria monocytogenes* à superfície da manga a 25°C: A – superfície após 24h; B – superfície após 48h;; C – superfície após 72h

Figura 8. Adesão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a fragmentos de casca de manga, após armazenamento à 8°C por 24h (**A**), 48h (**B**) e 72h (**C**).



Legenda: adesão de *Listeria monocytogenes* à superfície da manga a 8°C: **A** – superfície após 24h; **B** – superfície após 48h;; **C** – superfície após 72h

Figura 9. Detalhes das estruturas características de biofilme de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em fragmentos da casca de manga após armazenamento à 25°C por 72 h.



Legenda: adesão de *Listeria monocytogenes* à superfície da manga a 25 °C por 72h A – formação de micro-colônias B –vista ampliada da estrutura, com forte presença de exopolissacarídeos.

4.5 Capacidade de Internalização

Os resultados dos experimentos de internalização de *Salmonella* spp e de *L. monocytogenes* pela cicatriz do pedúnculo estão descritos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Verificou-se que a internalização na região do pedúnculo foi maior quando comparada às demais regiões, com diferença significativa entre a capacidade de internalização na região do pedúnculo e no *blossom end*, para ambos os patógenos estudados.

As Tabelas 6 e 7 descrevem os resultados dos experimentos de internalização por imersão em suspensão contaminada após tratamento hidrotérmico. A internalização foi detectada após 24h na região do pedúnculo para os dois patógenos. No quinto dia, foi possível quantificar os microrganismos presentes em todas as regiões e nas duas temperaturas (8°C e 25°C) para *Salmonella* spp. Para *L. monocytogenes* não foi possível quantificar todas as regiões após o quinto dia, mas a presença da bactéria foi detectada. Houve diferenças significativas entre os resultados obtidos na região do pedúnculo e na região *blossom end*.

Tabela 4. Internalização de *Salmonella* spp. nas mangas após contaminação direta na região do pedúnculo - *spot inoculation*, de acordo com o tempo de armazenamento

Tempo de armazenamento	Região analisada*	Contagens** (média log UFC/g $\pm$ DP)	
		8°C*	25°C*
24 h	P	3,2 $\pm$ 0,2 ^a	3,7 $\pm$ 0,1 ^a
	M	2,3 ^b	2,9 $\pm$ 0,2 ^b
	BE	D***	2,5 $\pm$ 0,2 ^c
5 d	P	3,3 $\pm$ 0,2 ^a	5,8 $\pm$ 0,1 ^a
	M	2,3 $\pm$ 0,4 ^b	5,2 $\pm$ 0,1 ^b
	BE	2,0 $\pm$ 0,2 ^b	4,2 $\pm$ 0,3 ^c
10 d	P	3,9 $\pm$ 0,2 ^a	6,2 $\pm$ 0,2 ^a
	M	2,8 $\pm$ 0,1 ^b	5,8 $\pm$ 0,1 ^b
	BE	2,1 $\pm$ 0,1 ^c	4,1 $\pm$ 0,2 ^c

* P = cicatriz do pedúnculo, M = meio, BE = *blossom end*

** médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

*** não quantificado mas presença detectada em 25g.

Tabela 5. Internalização de *L. monocytogenes* nas mangas após contaminação direta na região do pedúnculo - *spot inoculation*, de acordo com o tempo de armazenamento

Tempo de armazenamento	Região analisada*	Contagens** (média log UFC/g $\pm$ DP)	
		8°C*	25°C*
24 h	P	3,0 $\pm$ 0,1 ^a	3,3 $\pm$ 0,2 ^a
	M	2,6 $\pm$ 0,2 ^a	2,8 $\pm$ 0,3 ^a
	BE	D***	2,0 $\pm$ 0,3 ^b
5 d	P	3,4 $\pm$ 0,2 ^a	4,9 $\pm$ 0,1 ^a
	M	3,0 $\pm$ 0,1 ^a	3,2 $\pm$ 0,2 ^b
	BE	2,4 $\pm$ 0,3 ^b	2,5 $\pm$ 0,2 ^c
10 d	P	4,1 $\pm$ 0,2 ^a	5,6 $\pm$ 0,1 ^a
	M	3,7 $\pm$ 0,2 ^b	5,2 $\pm$ 0,2 ^b
	BE	3,0 $\pm$ 0,1 ^c	3,6 $\pm$ 0,1 ^c

* P = cicatriz do pedúnculo, M = meio, BE = *blossom end*

** médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

*** não quantificado mas presença detectada em 25g.

Tabela 6. Internalização de *Salmonella* spp. nas mangas após imersão na suspensão bacteriana, de acordo com o tempo de armazenamento

Tempo de armazenamento	Região analisada*	Contagens** (média log UFC/g $\pm$ DP)	
		8°C*	25°C*
24 h	P	D***	D***
	M	<1	<1
	BE	<1	<1
5 d	P	3,2 $\pm$ 0,2 ^a	3,6 $\pm$ 0,1 ^a
	M	2,3 $\pm$ 0,3 ^b	2,8 $\pm$ 0,1 ^b
	BE	2,1 $\pm$ 0,2 ^b	2,5 $\pm$ 0,2 ^b
10 d	P	4,2 $\pm$ 0,3 ^a	4,5 $\pm$ 0,1 ^a
	M	3,5 $\pm$ 0,3 ^b	4,0 $\pm$ 0,1 ^b
	BE	3,1 $\pm$ 0,1 ^b	3,5 $\pm$ 0,2 ^c

* P = cicatriz do pedúnculo, M = meio, BE = *blossom end*

** médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

*** não quantificado mas presença detectada em 25g.

Tabela 7. Internalização de *L. monocytogenes* nas mangas após imersão na suspensão bacteriana, de acordo com o tempo de armazenamento

Tempo de armazenamento	Região analisada*	Contagens** (média log UFC/g $\pm$ DP)	
		8°C*	25°C*
24h	P	D***	D***
	M	<1	<1
	BE	<1	<1
5 d	P	3,1 $\pm$ 0,2 ^a	3,2 $\pm$ 0,2 ^a
	M	2,2 $\pm$ 0,2 ^b	2,7 $\pm$ 0,2 ^b
	BE	D***	D***
10d	P	4,5 $\pm$ 0,2 ^a	4,5 $\pm$ 0,4 ^a
	M	2,9 $\pm$ 0,1 ^b	2,9 $\pm$ 0,3 ^b
	BE	D***	2,2 $\pm$ 0,3 ^b

* P = cicatriz do pedúnculo, M = meio, BE = *blossom end*

** médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (p<0,05)

*** não quantificado mas presença detectada em 25g.

4.6 Sobrevivência no interior das mangas

As Tabelas 8 e 9 descrevem os resultados dos testes de sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, de acordo com a temperatura, estágio de maturação e tempo de armazenamento, num cenário de baixo nível de contaminação (2 log UFC/mL). A análise estatística foi aplicada a fim de comparar as contagens de cada condição (estádio de maturação e temperatura) em cada tempo observado.

Foi possível observar que a contagem nas mangas não maduras mantidas a 8°C apresentaram diferenças significativas a partir do segundo até o décimo dia de estudo para *Salmonella* Typhimurium, na comparação com as demais condições, para cada tempo avaliado. Para *Listeria monocytogenes*, mangas não maduras mantidas a 8°C apresentaram diferenças significativas nas contagens a partir do terceiro até o décimo dia, para cada tempo avaliado.

Com relação ao estágio de maturação é possível observar que a diferença significativa foi mais acentuada a partir do quinto dia para *Salmonella* Typhimurium e no décimo dia para *Listeria monocytogenes*. Todos os cenários comparativos apresentaram diferenças significativas no décimo dia de incubação, na comparação entre temperaturas e estágio de maturação.

Tabela 8. Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 na polpa das mangas, para cenário de baixo nível de contaminação (2 log UFC/mL), nas condições estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento (tempo em dias e resultados expressos em média log UFC/g $\pm$ DP)

Tempo	Condição	Contagens*
0	M – 25 °C	2,1 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 25 °C	1,8 $\pm$ 0,3 ^a
1	M – 8 °C	2,4 $\pm$ 0,2 ^{ab}
	M – 25 °C	2,5 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 8 °C	2,0 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 25 °C	2,1 $\pm$ 0,2 ^{ab}
2	M – 8 °C	3,1 $\pm$ 0,3 ^a
	M – 25 °C	3,0 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 8 °C	2,2 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 25 °C	3,0 $\pm$ 0,2 ^a
3	M – 8 °C	3,2 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25 °C	3,5 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 8 °C	2,5 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 25 °C	3,5 $\pm$ 0,1 ^a
5	M – 8 °C	3,5 $\pm$ 0,2 ^a
	M – 25 °C	4,5 $\pm$ 0,2 ^b
	NM – 8 °C	2,8 $\pm$ 0,1 ^c
	NM – 25 °C	4,2 $\pm$ 0,2 ^b
10	M – 8 °C	3,7 $\pm$ 0,2 ^a
	M – 25 °C	5,0 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8 °C	2,9 $\pm$ 0,1 ^c
	NM – 25 °C	4,5 $\pm$ 0,1 ^d

*Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (p<0,05)

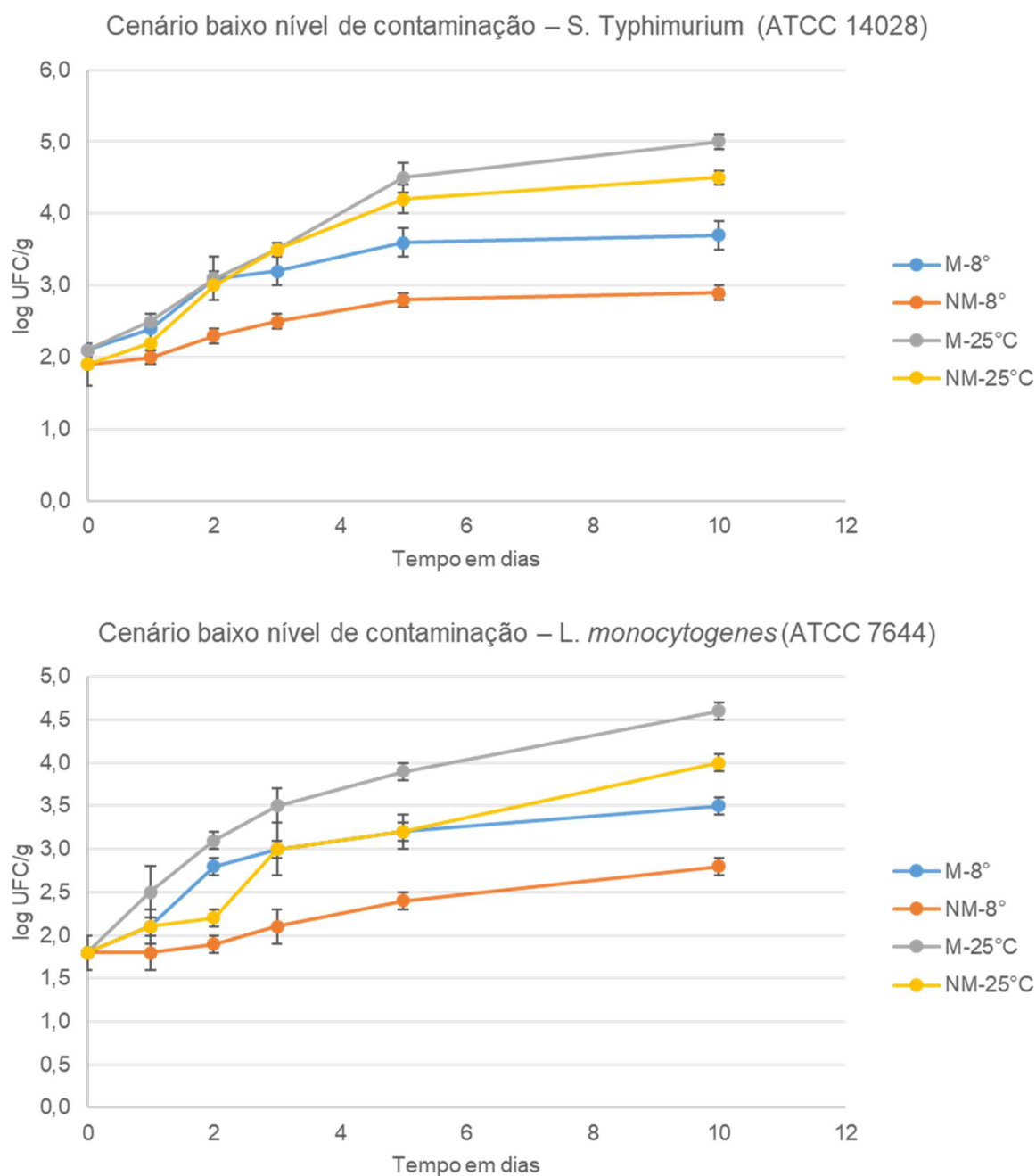
Tabela 9. Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de baixo nível de contaminação (2 log UFC/mL), nas condições estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento (tempo em dias e resultados expressos em média log UFC/g $\pm$ DP)

Tempo	Condição	Contagens
0	M – 25 °C	1,8 $\pm$ 0,2 ^a
	NM – 25 °C	1,8 $\pm$ 0,2 ^a
1	M – 8 °C	2,1 $\pm$ 0,2 ^{ab}
	M – 25 °C	2,4 $\pm$ 0,3 ^a
	NM – 8 °C	1,8 $\pm$ 0,2 ^b
	NM – 25 °C	2,1 $\pm$ 0,1 ^{ab}
2	M – 8 °C	2,8 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25 °C	3,1 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8 °C	1,9 $\pm$ 0,1 ^c
	NM – 25 °C	2,2 $\pm$ 0,1 ^c
3	M – 8 °C	2,9 $\pm$ 0,3 ^a
	M – 25 °C	3,4 $\pm$ 0,2 ^a
	NM – 8 °C	2,1 $\pm$ 0,2 ^b
	NM – 25 °C	3,0 $\pm$ 0,1 ^a
5	M – 8 °C	3,2 $\pm$ 0,2 ^a
	M – 25 °C	3,9 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8 °C	2,4 $\pm$ 0,1 ^c
	NM – 25 °C	3,2 $\pm$ 0,1 ^a
10	M – 8 °C	3,5 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25 °C	4,6 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8 °C	2,8 $\pm$ 0,1 ^c
	NM – 25 °C	4,0 $\pm$ 0,1 ^d

*Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (p<0,05)

A Figura 10 representa graficamente o comportamento dos patógenos no cenário de baixo nível de contaminação, onde é possível observar que a multiplicação foi maior nas mangas maduras (M) a 25°C, seguida pelas mangas não maduras a 25°C, para os dois patógenos. A menor multiplicação ocorreu nas mangas não maduras (NM) armazenadas a 8°C. A multiplicação dos dois patógenos foi maior nas mangas maduras do que não maduras, armazenadas à mesma temperatura.

Figura 10. Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de baixo nível de contaminação (2 log UFC/mL), de acordo com o estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento.



Os resultados do teste de sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, de acordo com a temperatura, estágio de maturação e tempo de armazenamento, num cenário de alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. A análise estatística foi aplicada a fim de comparar as contagens de cada condição (estádio de maturação e temperatura) em cada tempo observado.

Tabela 10. Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 na polpa das mangas, para cenário de alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), nas condições estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 e 25°C), por até 10 dias de armazenamento (tempo em dias e resultados expressos em média log UFC/g $\pm$ DP)

Tempo	Condição	Contagens
0	M – 25°C	5,4 $\pm$ 0,2 ^a
	NM – 25°C	5,1 $\pm$ 0,1 ^b
1	M – 8°C	5,6 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25°C	5,7 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 8°C	5,1 $\pm$ 0,2 ^b
	NM – 25°C	5,7 $\pm$ 0,1 ^a
2	M – 8°C	5,7 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25°C	6,0 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8°C	5,2 $\pm$ 0,1 ^c
	NM – 25°C	5,7 $\pm$ 0,1 ^a
3	M – 8°C	5,7 $\pm$ 0,2 ^{ab}
	M – 25°C	6,4 $\pm$ 0,1 ^c
	NM – 8°C	5,5 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 25°C	6,0 $\pm$ 0,1 ^b
5	M – 8°C	5,8 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25°C	7,6 $\pm$ 0,2 ^b
	NM – 8°C	5,8 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 25°C	6,3 $\pm$ 0,1 ^c
10	M – 8°C	6,0 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25°C	8,3 $\pm$ 0,2 ^b
	NM – 8°C	6,0 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 25°C	6,4 $\pm$ 0,2 ^c

*Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (p<0,05)

Tabela 11. Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), nas condições estágio de maturação (M – madura e NM - não madura) e temperatura (8°C e 25°C), por até 10 dias de armazenamento (tempo em dias e resultados expressos em média log UFC/g $\pm$ DP)

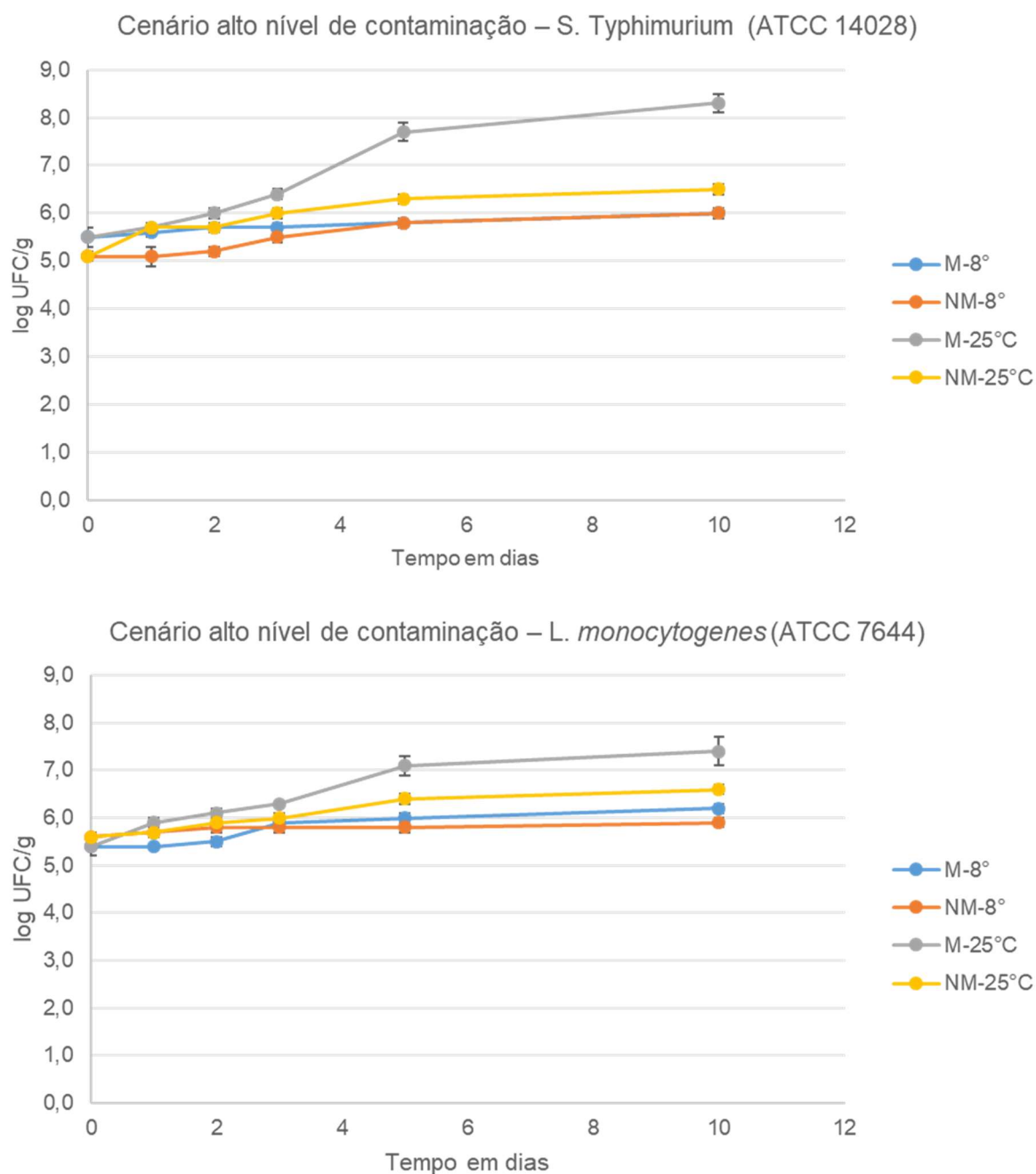
Tempo	Condição	Contagens
0	M – 25°C	5,3 $\pm$ 0,2 ^a
	NM – 25°C	5,6 $\pm$ 0,1 ^b
1	M – 8°C	5,3 ^a
	M – 25°C	5,9 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8°C	5,7 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 25°C	5,7 $\pm$ 0,1 ^b
2	M – 8°C	5,6 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25°C	6,1 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8°C	5,8 $\pm$ 0,1 ^{ab}
	NM – 25°C	5,8 $\pm$ 0,2 ^{ab}
3	M – 8°C	5,8 $\pm$ 0,2 ^a
	M – 25°C	6,3 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 8°C	5,8 ^a
	NM – 25°C	6,0 $\pm$ 0,1 ^a
5	M – 8°C	6,0 $\pm$ 0,1 ^a
	M – 25°C	7,1 $\pm$ 0,2 ^b
	NM – 8°C	5,8 $\pm$ 0,1 ^a
	NM – 25°C	6,4 $\pm$ 0,1 ^c
10	M – 8°C	6,2 $\pm$ 0,1 ^{ab}
	M – 25°C	7,4 $\pm$ 0,4 ^c
	NM – 8°C	5,9 $\pm$ 0,1 ^b
	NM – 25°C	6,6 $\pm$ 0,1 ^a

*Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (p<0,05).

Foi possível observar diferenças significativas nas contagens a partir do terceiro dia para as mangas maduras mantidas a 25°C para *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*, na comparação com as demais condições.

A Figura 11 representa graficamente o comportamento dos patógenos no cenário de alto nível de contaminação. Avaliando-se as informações representadas na Figura 11, é possível observar maior multiplicação nas mangas maduras (M) armazenadas a 25°C, seguida das mangas não maduras (NM) também armazenadas a 25°C. Mangas maduras e não maduras armazenadas a 8°C apresentaram comportamento similar e menor multiplicação para os dois patógenos.

Figura 11. Sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na polpa das mangas, para cenário de alto nível de contaminação (6 log UFC/mL), de acordo com o estágio de maturação (M - madura e NM – não madura) e temperatura (8 °C e 25 °C), por até 10 dias de armazenamento



4.7 Valor de pH e teor de SST nas mangas empregadas como controle ao longo dos testes de sobrevivência dos patógenos

As Tabelas 12 e 13 descrevem os valores de pH e do teor de sólidos solúveis totais (SST) das mangas utilizadas como controles nos testes de sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Foi possível observar que nas amostras maduras o pH no 10º dia foi significativamente superior ao mensurado no dia 0, para as duas temperaturas observadas. Para as amostras não maduras, não houve variação significativa do pH ao longo do estudo. Não foram observadas diferenças significativas no teor de SST ao longo do estudo em nenhuma das condições de temperatura e estágio de maturação.

Tabela 12. Valores do pH das mangas maduras (M) e não maduras (NM) empregadas como controles nos testes de sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (tempo em dias, resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão)

Tempo	M - 8°C	M - 25°C	NM - 8°C	NM - 25°C
0	-	4,3 $\pm$ 0,1 ^a	-	3,6 $\pm$ 0,1 ^a
1	4,6 $\pm$ 0,2 ^{ab}	4,5 $\pm$ 0,1 ^{abc}	3,7 $\pm$ 0,2 ^a	3,7 $\pm$ 0,1 ^a
2	4,5 $\pm$ 0,1 ^{ab}	4,7 $\pm$ 0,2 ^{abc}	3,6 $\pm$ 0,2 ^a	3,9 $\pm$ 0,3 ^a
3	4,7 $\pm$ 0,3 ^{ab}	4,5 $\pm$ 0,1 ^{ab}	3,7 $\pm$ 0,3 ^a	3,9 $\pm$ 0,1 ^a
5	4,8 $\pm$ 0,2 ^{ab}	4,8 $\pm$ 0,3 ^{bc}	3,8 $\pm$ 0,2 ^a	4,0 $\pm$ 0,2 ^a
10	4,9 $\pm$ 0,1 ^b	5,0 $\pm$ 0,2 ^c	3,9 $\pm$ 0,2 ^a	3,9 $\pm$ 0,1 ^a

*médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabela 13. Teores de sólidos solúveis totais (SST) nas mangas maduras (M) e não maduras (NM) empregadas como controles nos testes de sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (tempo em dias, resultados expressos em média °Brix $\pm$ desvio padrão)

Tempo	M - 8°C	M - 25°C	NM - 8°C	NM - 25°C
0	-	13,2 $\pm$ 0,3 ^a	-	10,7 $\pm$ 0,4 ^a
1	13,6 $\pm$ 0,7 ^a	14,2 $\pm$ 0,5 ^a	10,9 $\pm$ 0,8 ^a	10,9 $\pm$ 0,1 ^a
2	13,6 $\pm$ 0,1 ^a	14,5 $\pm$ 0,9 ^a	10,8 $\pm$ 0,3 ^a	11,0 $\pm$ 0,3 ^a
3	13,6 $\pm$ 0,6 ^a	13,8 $\pm$ 0,2 ^a	10,8 $\pm$ 0,3 ^a	10,8 $\pm$ 0,2 ^a
5	13,8 $\pm$ 0,3 ^a	14,7 $\pm$ 0,8 ^a	10,8 $\pm$ 0,2 ^a	11,1 $\pm$ 0,1 ^a
10	14,2 $\pm$ 0,4 ^a	14,9 $\pm$ 0,9 ^a	11,1 $\pm$ 0,2 ^a	11,2 $\pm$ 0,4 ^a

* Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

4.8 MODELAGEM DA RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS

As Figuras 12 e 13 representam os ajustes das curvas lineares, exponenciais, polinomiais e logarítmicas aos dados observados nos experimentos de sobrevivência, para os diferentes cenários avaliados (nível de contaminação, estágio de maturação, temperatura e tempo de armazenamento).

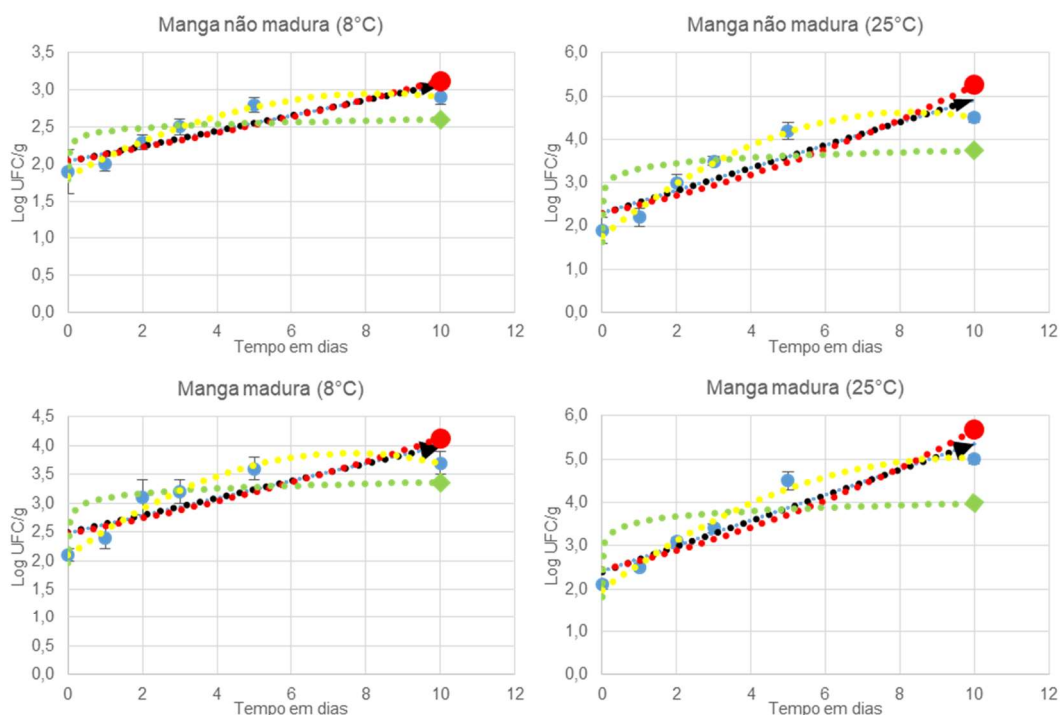
As Tabelas 14 e 15 descrevem as equações, o coeficiente de determinação (r^2) e o RMSE para o cenário de baixo nível de contaminação das mangas com *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*, respectivamente. Foi possível verificar que as equações polinomiais apresentaram maior r^2 e menor RMSE quando comparadas às demais equações avaliadas, indicando melhor ajuste aos pontos observados.

A equação logarítmica apresentou resultados mais dispersos e pior ajuste aos dados observados em todos os cenários na comparação com as demais equações avaliadas.

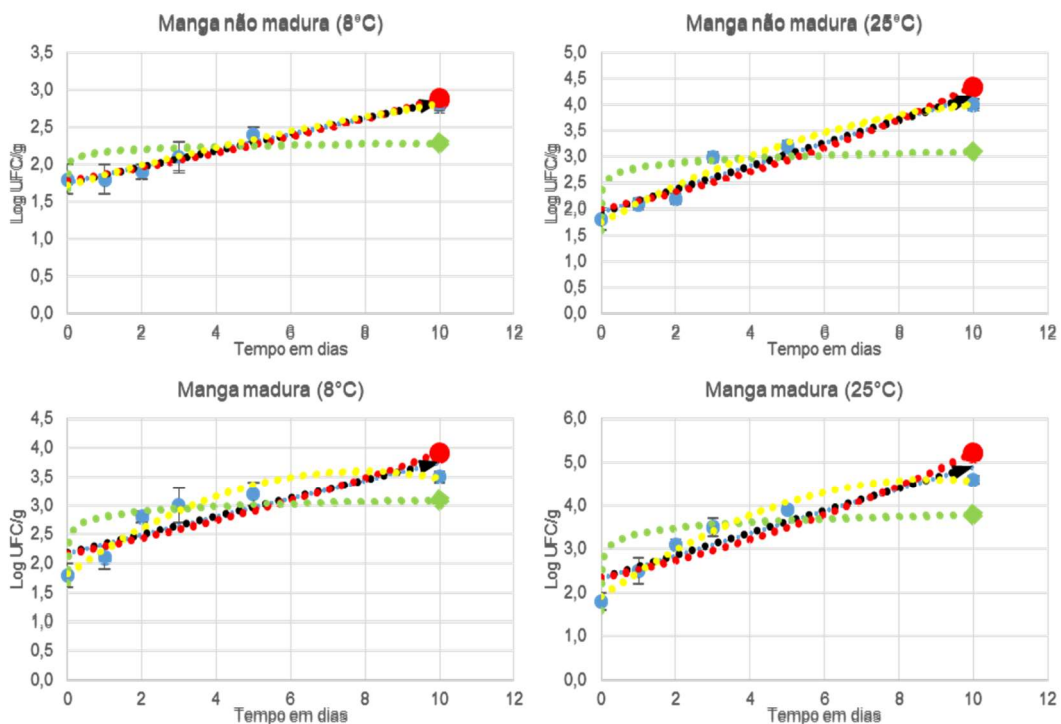
As Tabelas 16 e 17 descrevem as equações, o coeficiente de determinação (r^2) e o RMSE para o cenário de baixo nível de contaminação das mangas com *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*, respectivamente. As equações polinomiais apresentaram maior r^2 e menor RMSE, indicando melhor ajuste aos pontos observados quando comparadas às demais equações avaliadas. A equação logarítmica apresentou resultados mais dispersos e pior ajuste aos dados observados em todos os cenários na comparação com as demais equações avaliadas.

Figura 12. Ajustes das equações aos dados experimentais para cenário de baixo nível de contaminação

Cenário baixo nível de contaminação – *S. Typhimurium* (ATCC 14028)

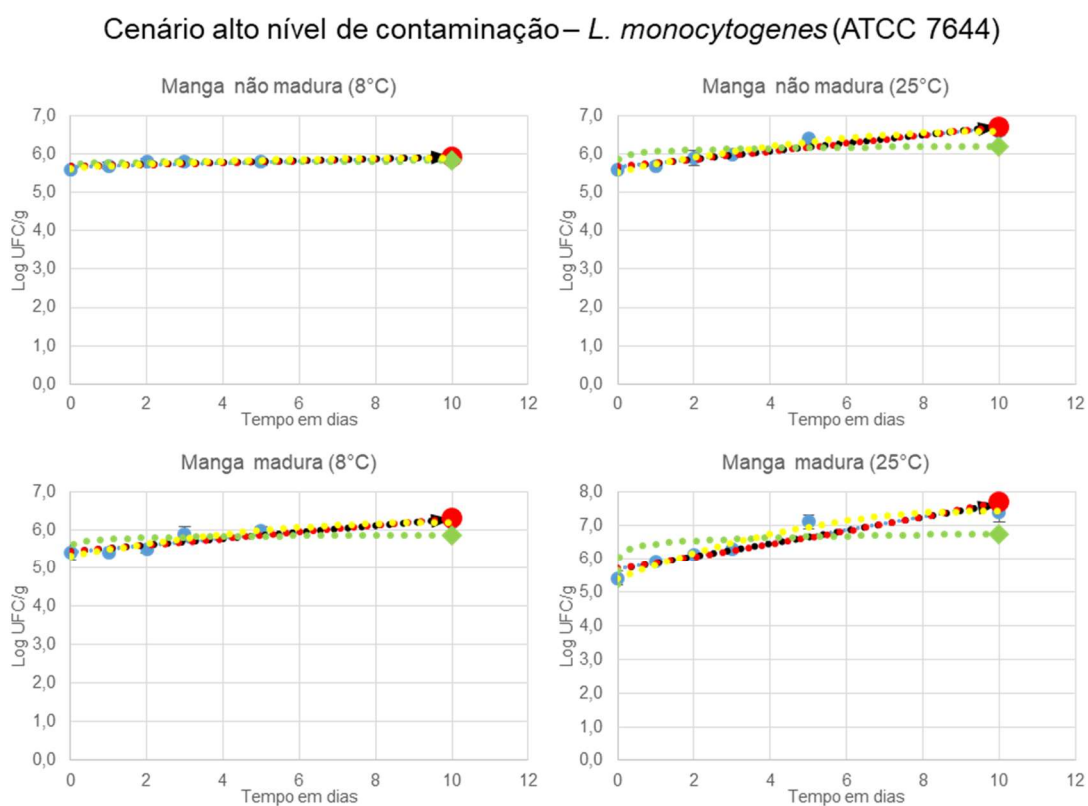
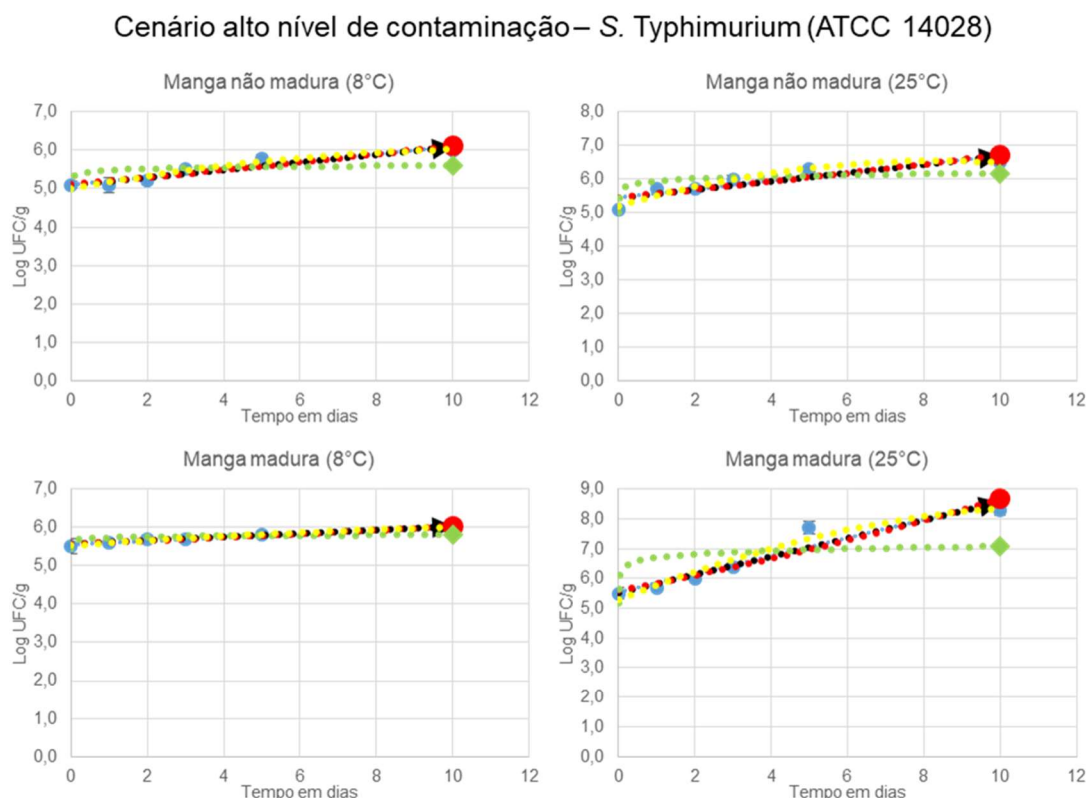


Cenário baixo nível de contaminação – *L. monocytogenes* (ATCC 7644)



Legenda: ajuste da equação linear (triângulo preto), exponencial (círculo vermelho), logarítmica (losango verde) e polinomial (linha amarela).

Figura 13. Ajustes das equações aos dados experimentais – cenário alto nível de contaminação



Legenda: ajuste da equação linear (triângulo preto), exponencial (círculo vermelho), logarítmica (losango verde) e polinomial (linha amarela).

Tabela 14. Equações e valores de r^2 e RMSE para os experimentos com *S. Typhimurium*, com baixo nível de contaminação

Condições	Ajuste	Equação*	r^2	RMSE
Não Madura a 8 °C	Linear	$y = 0,1023x + 2,042$	0,816	0,161
	Exponencial	$y = 2,0434e^{0,0424x}$	0,786	0,183
	Polinomial	$y = -0,016x^2 + 0,2667x + 1,8364$	0,985	0,046
	Logarítmica	$y = 0,0697\ln(x) + 2,4408$	0,535	0,255
Não Madura a 25 °C	Linear	$y = 0,2618x + 2,3002$	0,815	0,161
	Exponencial	$y = 2,2924e^{0,083x}$	0,748	0,183
	Polinomial	$y = -0,0413x^2 + 0,6875x + 1,7681$	0,988	0,046
	Logarítmica	$y = 0,1822\ln(x) + 3,3231$	0,557	0,255
Matura a 8 °C	Linear	$y = 0,1504x + 2,4903$	0,716	0,313
	Exponencial	$y = 2,4693e^{0,0513x}$	0,668	0,355
	Polinomial	$y = -0,0308x^2 + 0,4674x + 2,0939$	0,971	0,099
	Logarítmica	$y = 0,1214\ln(x) + 3,0876$	0,658	0,463
Matura a 25 °C	Linear	$y = 0,2947x + 2,402$	0,895	0,341
	Exponencial	$y = 2,442e^{0,0843x}$	0,839	0,478
	Polinomial	$y = -0,0323x^2 + 0,6271x + 1,9864$	0,986	0,101
	Logarítmica	$y = 0,1877\ln(x) + 3,543$	0,512	0,712

Tabela 15. Equações, e valores de r^2 e RMSE para os experimentos com *L. monocytogenes*, com baixo nível de contaminação

Condições	Ajuste	Equação	r^2	RMSE
Não Madura a 8 °C	Linear	$y = 0,1084x + 1,7539$	0,970	0,063
	Exponencial	$y = 1,7789e^{0,048x}$	0,955	0,076
	Polinomial	$y = -0,0024x^2 + 0,1333x + 1,7228$	0,974	0,058
	Logarítmica	$y = 0,0524\ln(x) + 2,1639$	0,319	0,300
Não Madura a 25 °C	Linear	$y = 0,2206x + 1,9445$	0,925	0,208
	Exponencial	$y = 1,9895e^{0,078x}$	0,872	0,281
	Polinomial	$y = -0,0153x^2 + 0,3781x + 1,7476$	0,962	0,147
	Logarítmica	$y = 0,1313\ln(x) + 2,7934$	0,462	0,556
Matura a 8 °C	Linear	$y = 0,1573x + 2,183$	0,752	0,298
	Exponencial	$y = 2,1631e^{0,0593x}$	0,687	0,349
	Polinomial	$y = -0,0282x^2 + 0,4475x + 1,8201$	0,958	0,123
	Logarítmica	$y = 0,124\ln(x) + 2,8058$	0,659	0,350
Matura a 25 °C	Linear	$y = 0,2565x + 2,3356$	0,863	0,338
	Exponencial	$y = 2,3316e^{0,0808x}$	0,756	0,458
	Polinomial	$y = -0,0333x^2 + 0,5991x + 1,9072$	0,987	0,106
	Logarítmica	$y = 0,1908\ln(x) + 3,3448$	0,673	0,521

Tabela 16. Equações e valores de r^2 e RMSE para os experimentos com *S. Typhimurium*, com alto nível de contaminação

Condições	Ajuste	Equação	r^2	RMSE
Não Madura a 8 °C	Linear	$y = 0,1x + 5,1$	0,891	0,115
	Exponencial	$y = 5,1059e^{0,0181x}$	0,882	0,122
	Polinomial	$y = -0,0083x^2 + 0,185x + 4,9937$	0,943	0,084
	Logarítmica	$y = 0,0534\ln(x) + 5,4812$	0,359	0,280
Não Madura a 25 °C	Linear	$y = 0,1229x + 5,4532$	0,793	0,208
	Exponencial	$y = 5,452e^{0,0209x}$	0,764	0,220
	Polinomial	$y = -0,0192x^2 + 0,3203x + 5,2063$	0,957	0,095
	Logarítmica	$y = 0,1008\ln(x) + 5,9422$	0,751	0,228
Madura a 8 °C	Linear	$y = 0,0466x + 5,5537$	0,958	0,032
	Exponencial	$y = 5,5553e^{0,0081x}$	0,952	0,034
	Polinomial	$y = -0,0024x^2 + 0,0711x + 5,5231$	0,979	0,023
	Logarítmica	$y = 0,0298\ln(x) + 5,7341$	0,553	0,105
Madura a 25°C	Linear	$y = 0,3023x + 5,542$	0,918	0,299
	Exponencial	$y = 5,5902e^{0,044x}$	0,906	0,347
	Polinomial	$y = -0,0206x^2 + 0,5148x + 5,2763$	0,954	0,223
	Logarítmica	$y = 0,1644\ln(x) + 6,6961$	0,383	0,819

Tabela 17. Equações e valores de r^2 e RMSE para os experimentos com *L. monocytogenes*, com alto nível de contaminação

Condições	Ajuste	Equação	r^2	RMSE
Não Madura a 8°C	Linear	$y = 0,0244x + 5,6812$	0,733	0,049
	Exponencial	$y = 5,6811e^{0,0042x}$	0,726	0,049
	Polinomial	$y = -0,0035x^2 + 0,0603x + 5,6363$	0,860	0,035
	Logarítmica	$y = 0,0212\ln(x) + 5,779$	0,776	0,045
Não Madura a 25°C	Linear	$y = 0,1038x + 5,67$	0,913	0,106
	Exponencial	$y = 5,6756e^{0,017x}$	0,905	0,114
	Polinomial	$y = -0,0096x^2 + 0,2029x + 5,5461$	0,980	0,051
	Logarítmica	$y = 0,0623\ln(x) + 6,0698$	0,464	0,410
Madura a 8°C	Linear	$y = 0,087x + 5,4288$	0,836	0,127
	Exponencial	$y = 5,4315e^{0,015x}$	0,826	0,132
	Polinomial	$y = -0,0092x^2 + 0,1819x + 5,3102$	0,916	0,091
	Logarítmica	$y = 0,0498\ln(x) + 5,7624$	0,385	0,247
Madura a 25 °C	Linear	$y = 0,1954x + 5,6827$	0,883	0,235
	Exponencial	$y = 5,6953e^{0,0302x}$	0,863	0,263
	Polinomial	$y = -0,022x^2 + 0,4224x + 5,3989$	0,978	0,101
	Logarítmica	$y = 0,1321\ln(x) + 6,4439$	0,569	0,451

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam haver uma relação entre a coloração da casca, o valor de pH, o teor de sólidos solúveis totais (SST) e o estágio de maturação. A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que o estágio de maturação mais elevado apresenta valores de pH e SST mais elevados quando comparados aos estádios mais baixos de maturação. Os valores obtidos para pH e SST foram próximos aos relatados em outros trabalhos para mangas variedade Tommy Atkins. Coccozza (2003) observou que esta variedade de manga apresenta aproximadamente 12,0% de SST no início da maturação. Martim (2006) obteve valores de $14,13^{\circ}\text{B} \pm 0,61$ para SST e $4,41 \pm 0,10$ para pH enquanto Santos (2003) encontrou valores de 15°B para SST e 4,11 para pH, em mangas maduras (estádio 4). Rocha et. al (2001) avaliaram o pH de mangas Tommy Atkins nos estádios ‘verde’ a ‘traços de verde’, obtendo valores entre 3,23 a 4,51.

Santos et. al (2008) avaliaram as características físico-químicas de mangas variedade Tommy Atkins dos estádios I a V e encontraram valores de pH entre 2,84 e 4,59 e teor de SST entre 7,4 a $15,7^{\circ}\text{B}$. Importante observar que durante o amadurecimento da manga há diminuição da acidez e conseqüentemente aumento do pH, pois os ácidos orgânicos voláteis e não voláteis são constituintes celulares metabolizados durante o processo de amadurecimento (COCOZZA, 2003). A elevação do teor de SST está associada à hidrólise dos açúcares complexos, como amido, que são transformados em açúcares simples durante o processo de maturação (SANTOS et. al, 2008).

A presença de *Salmonella* spp. na superfície de duas mangas empregadas no estudo evidencia falhas de higiene. Como as frutas foram adquiridas em centros de abastecimento, é importante destacar a possibilidade de ocorrência de contaminação cruzada. A contaminação de uma única fruta pode se espalhar para outras frutas e superfícies, o que é agravado pelo hábito de muitos consumidores no Brasil selecionarem manualmente as frutas que pretendem comprar. Bordini et al. (2007) avaliaram a incidência de *Salmonella* spp em 100 mangas variedade Tommy Atkins (33 destinadas à exportação e 67 ao mercado interno) detectando o patógeno em duas mangas destinadas ao mercado interno. Bairos (2018) avaliou 100 amostras de manga variedade Tommy Atkins adquiridas no município de Viçosa/MG, mas não

observou presença de *Salmonella* spp. Embora nenhuma das mangas utilizadas no presente estudo tenham sido positivas para *Listeria monocytogenes*, é importante destacar que outras espécies de *Listeria* sp. poderiam estar presentes, indicativos do risco potencial de contaminação do ambiente, além de refletir procedimentos de sanitização inadequados (NALÉRIO et al., 2009).

O índice de hidrofobicidade encontrado para *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi próximo aos relatado por Reina et. al (2002), $63,2\% \pm 3,2$. Para *Listeria monocytogenes*, o mesmo estudo encontrou o valor de $23\% \pm 5,4$ para a cepa identificada como NCK 157. Importante ressaltar que o tipo de hidrocarboneto utilizado nos testes e as condições de cultivo das cepas podem influenciar a comparação dos resultados obtidos em outros estudos (ROSENBERG; GUTNICK; ROSENBERG, 1980). Vasquez-Armenta et al., (2018) associaram as características de hidrofobicidade de *Listeria monocytogenes* à energia superficial da célula, observando que quanto menor a energia superficial maior a hidrofobicidade. Briandet et al., (1999) demonstraram que a temperatura de cultivo influencia a hidrofobicidade da *Listeria monocytogenes* Scott A. Em temperaturas próximas a 37°C a bactéria pode assumir um perfil mais hidrofílico, enquanto que em temperaturas mais baixas (8 , 15 e 20°C), pode assumir um caráter hidrofóbico. Segundo o estudo, a mudança no comportamento pode estar associada à síntese de flagelos, que sofre uma inibição a 37°C . Takahashi et al., (2010) reportaram que a *Listeria monocytogenes* apresentou um caráter hidrofóbico à temperatura de 20°C .

Quanto à capacidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 de formarem biofilme em poliestireno, ambas foram classificadas como “moderadas” segundo o critério utilizado nesse estudo. Stepanović et al., (2004) observaram que todos os 170 isolados de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* estudados foram capazes de produzir biofilme em superfície plástica, em maior ou menor quantidade, dependendo das condições de cultivo observadas. De modo geral, mais cepas de *Salmonella* spp. foram capazes de produzir biofilme quando comparadas às cepas de *Listeria monocytogenes*. Borges et al., (2018) avaliaram a capacidade de formação de biofilme de 243 isolados de *Salmonella enterica* de 11 diferentes sorotipos, em quatro condições de temperaturas, concluindo que $92,2\%$ das cepas avaliadas foram capazes de produzir biofilme em pelo menos uma das condições de temperatura avaliadas: $71,6\%$ produziram biofilme a 37°C , 63%

a 28°C, 52,3% a 12°C e 39,5% a 3°C. Blackman e Frank (1996) já haviam reportado que *Listeria monocytogenes* era capaz de produzir biofilmes em diferentes materiais, incluindo poliestireno. Di Bonaventura et al., (2008) testaram 44 cepas de *Listeria monocytogenes* quanto à produção de biolmes em vidro, lâminas de aço e poliestireno, em diferentes condições de cultivo e temperatura, observando que todas deram resultados positivos nas condições experimentais avaliadas.

A adesão das cepas utilizadas no estudo à superfície das mangas foi observada em todos os tempos avaliados, após inoculação *spot*. O tempo de contato teve papel importante na adesão, sendo que adesão após uma hora de contato foi significativamente ($p < 0,05$) mais alta que a observada para os demais tempos de contato (0, 30 e 60 segundos). A medida em que o tempo de exposição aumentava ocorreu um aumento gradativo nas contagens. A microscopia eletrônica de varredura identificou estruturas características de adesão irreversível em todas as temperaturas e tempos avaliados. A presença de estruturas exopolissacarídicas a 25 °C em maior quantidade que a observada a 8 °C demonstra que a temperatura e o tempo de incubação influenciaram a capacidade de adesão dos patógenos e produção de biofilme na superfície das mangas. Collignon e Korsten (2010), ao avaliar a capacidade de adesão de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* à superfície de “stone fruits” (pêssegos e ameixas), observaram que *Salmonella* Typhimurium foi capaz de aderir imediatamente à superfície das duas frutas e que *Listeria monocytogenes* apresentou adesão imediata em ameixas, mas em pêssegos ela ocorreu somente após 60 segundos de exposição. Esses autores relataram que a adesão não reversível foi caracterizada pela produção de estruturas exopolissacarídicas (EPS), detectadas por microscopia eletrônica de varredura, observadas após 30 segundos para ameixas e após uma hora para pêssegos, para *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*. Mathew et al., (2018) também avaliaram a capacidade de adesão de *Salmonella* Newport à superfície de mangas, empregando microscopia eletrônica de varredura, observando que *Salmonella* Newport foi capaz de aderir imediatamente e que, após dois minutos de exposição, formaram-se estruturas características de adesão irreversível, que ficaram mais evidentes após uma hora de exposição. Fernandes et al., (2014) avaliaram a influência da hidrofobicidade e rugosidade na adesão de *Salmonella* Typhimurium à superfície de mangas e tomates e na eficiência

da higienização com surfactantes. Por ser a superfície da manga hidrofílica, esperava-se baixa ou mesmo ausência de adesão mas os resultados obtidos por técnicas microbiológicas e por microscopia eletrônica de varredura comprovaram a ocorrência de adesão. Segundo o estudo, a alta rugosidade da superfície da manga pode ter contribuído para o processo de adesão.

Os resultados obtidos nos experimentos de internalização identificaram a região do pedúnculo como a mais afetada pela contaminação, com contagens mais elevadas na comparação com as outras regiões avaliadas (meio e *blossom end*). Segundo os resultados, a entrada do patógeno no interior das frutas pode ter ocorrido pelo orifício resultante do corte do pedúnculo, espalhando-se pela polpa durante o armazenamento, atingindo toda a fruta, conforme evidenciado pela detecção dos dois patógenos na região oposta ao pedúnculo (*blossom end*). Foi possível comprovar que a região da cicatriz do pedúnculo (*stem scar*) é a mais susceptível à entrada de patógenos, conforme já havia sido demonstrado em outros estudos (Chen et al., (2016a), Eblen et al. (2004) e Penteado; Eblen; Miller, (2004).

As diferenças entre as contagens observadas a 8 °C e a 25 °C indicam haver influência direta da temperatura na velocidade com que os patógenos se alastram por toda a polpa das mangas e se multiplicam. Para o teste realizado por inoculação “spot”, as diferenças entre as duas temperaturas foram significativas para a maior parte dos tempos de armazenamento estudados. No caso do teste por imersão, foram observadas diferenças nas contagens, mas as diferenças para alguns dos tempos de armazenamento não apresentaram significância. É possível que a concentração de microrganismos internalizados pelo processo de imersão tenha influenciado as contagens observadas, dificultando a comparação entre as temperaturas estudadas. É importante ressaltar que houve internalização e multiplicação dos microrganismos em toda a polpa das frutas nas duas temperaturas estudadas. No estudo de Penteado; Eblen; Miller (2004), a internalização de *Salmonella* Enteritidis em mangas maduras e não maduras após tratamento hidrotérmico, durante armazenamento a 10, 20 e 30 °C), ocorreu em 80% das mangas não maduras e 87% das mangas maduras. A ocorrência do patógeno na região do meio da fruta foi observada em 19% das mangas, enquanto em 8% ela foi detectada na região *blossom end*. Bordini et al., (2007), em estudo semelhante com uma cepa de *Salmonella* isolada de manga brasileira, também identificou internalização após tratamento hidrotérmico. Chen et al., (2016a)

investigaram a internalização de *Listeria monocytogenes* em avocados, através de inoculação *spot* na região da cicatriz do caule (*stem scar*) e de imersão em solução experimentalmente contaminada, reportando a internalização nas duas situações avaliadas.

Os experimentos de sobrevivência dos patógenos no interior das frutas mostraram que ambos foram capazes de sobreviver nas condições de temperatura avaliadas, tanto em mangas maduras como nas não maduras. Penteado; de Castro; Rezende (2014) também relataram a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes* em polpas de manga armazenadas a -20, 4, 10 e 25 °C, relatando ótimo crescimento de ambos à 25°C e sobrevivência por 8 dias a 4 °C. A 10 °C, apenas *Listeria monocytogenes* foi capaz de se multiplicar nas polpas.

As equações matemáticas foram utilizadas para descrever o fenômeno de multiplicação bacteriana e a influência dos fatores temperatura e estágio de maturação. Os dados experimentais apresentaram bom ajuste na comparação com os dados obtidos nas equações lineares, exponenciais e polinomiais, indicando a existência de relação funcional entre as variáveis. O r^2 é uma medida estatística que representa a proporção da variância para uma variável dependente que é explicada por uma ou mais variáveis independentes em um modelo de regressão. Um valor alto calculado para o r^2 é uma indicação de que o modelo se ajusta muito bem aos dados. O RMSE calcula o quão próximo os pontos de dados reais estão dos valores previstos pelo modelo e é usado para medir o desvio padrão dos resíduos. O RMSE serve para agregar esses resíduos em uma única medida de capacidade preditiva. Quanto menor o RMSE, melhor ajuste do modelo. (ZOU et. al, 2003). Valores de r^2 mais próximos de 1 indicaram que o modelo polinomial proposto é o mais adequado para descrever o fenômeno estudado, ou seja, a influência da temperatura e do estágio de maturação sobre o crescimento da *Salmonella* spp. e da *Listeria monocytogenes* em condições experimentais. Valores de RMSE mais baixos evidenciaram o quão próximo os dados reais estão próximos aos valores previstos para o modelo polinomial. Esse critério é muito importante quando o principal objetivo é usar o modelo para fins de previsão. É importante ressaltar que a análise de regressão linear apresenta limitações para determinar previsões. É necessário avaliar todas as variáveis aleatórias que exercem influência sobre a variável resposta devem ser estudadas a fim de estabelecer um modelo matemático preditivo do comportamento dos microrganismos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que cepas de *Samonella* spp e *Listeria monocytogenes* utilizadas no estudo foram capazes de aderir à superfície das mangas, através da formação de estruturas características de adesão irreversível (exopolissacarídeos), detectadas por microscopia eletrônica de varredura. Além de aderirem, os dois patógenos apresentaram internalização nas mangas, observada tanto após inoculação na região do pedúnculo como após imersão em solução contaminada, em intensidade dependente do grau de maturação das frutas e do tempo e temperatura de armazenamento. A internalização pela cicatriz do pedúnculo foi mais evidente que a ocorrida por outras partes da fruta. Também foi possível observar que os patógenos, uma vez internalizados, se espalharam por toda a polpa, atingindo até a extremidade oposta das mangas (*blossom end*). Importante destacar que as amostras submetidas a tratamento hidrotérmico e imersas em solução contaminada apresentaram contaminação na polpa, indicando que este procedimento representa um risco potencial para internalização dos patógenos. A sobrevivência e multiplicação dos patógenos ao longo do armazenamento foram afetadas pela temperatura e estágio de maturação das frutas. Os dados gerados por este estudo poderão auxiliar produtores de mangas e órgãos de saúde no desenvolvimento de avaliações quantitativas de risco e no estabelecimento de medidas preventivas adequadas para evitar surtos causados por mangas contaminadas por *Samonella* spp e *Listeria monocytogenes*.

7 REFERÊNCIAS

ABRAFRUTAS. **ABRAFRUTAS comemora abertura de mais um mercado para exportação de frutas.** Disponível em: <https://abrafrutas.org/2018/09/24/abrafrutas-comemora-abertura-de-mais-um-mercado-para-exportacao-de-frutas/>. Acesso em 3 set. 2019.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; PRIETO, M.; BERNARDO, A.; HILL, C.; LOPEZ, M. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, Volume 45, Issue 2, Pages 482-492, ISSN 0963-9969, 2012.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA - **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th Edition, Washington DC, 2001.

ANDRADE, P. F. S. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná -SEAB. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/17: fruticultura.** 2017. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf. Acesso em 3 set. 2019.

ANGELO, K.; CONRAD, A.; SAUPE, A.; DRAGOO, H.; WEST, N.; SORENSON, A. & JACKSON, B. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. **Epidemiology and Infection**, 145(5), 848-856, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - **Official Methods of Analysis.** 16th ed. Washington: AOAC. 1141 p. method 932.12 – Solids soluble in fruit and fruit products, 1995.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos.** São Paulo: Editora Nobel, 1993.

BAIRROS, J. V. Ocorrência, cinética de crescimento e transferência de *Salmonella*

em manga durante o banho hidrotérmico. 64f. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/24283?show=full>. Acesso em 5 set. 2019.

BASTOS, M. D. S. R. Frutas Minimamente Processada: Aspectos de Qualidade e Segurança. p. 59, 2006. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/frutasminimamenteprocessadas_000fdejd97n02wx5eo0a2ndxyb8wg7w1.pdf. Acesso em 5 set. 2019

BEATTY, M.; LAPORTE, T.; PHAN, Q.; VAN DUYNE, M. & BRADEN, C. A Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Saintpaul Infections Linked to Mango Consumption: A Recurrent Theme, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 38, Issue 9, 1 May 2004, Pages 1337–1338, 2004.

BEGLEY, M.; HILL, C. Stress Adaptation in Foodborne Pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, Volume 6, pages 191–210, 2015.

BLACKMAN, I. C.; FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food- processing surfaces. **Journal of Food Protection**, 59 (8): 827–831, 1996.

BONSAGLIA, E. Produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos. 2012. 47 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87783/bonsaglia_ecr_me_bot_ib.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em 05 set. 2019

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**, Volume 18, Issue 8, Pages 1002-1007, 2007.

BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q.; SOUZA, S. N.; MENEZES, R.; TONDO, E. C.; SALLE,

C. T. P.; MORAES, H. L. S. & NASCIMENTO, V. P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 71-76, 2018.

BRIANDET, R.; MEYLHEUC, T.; MAHER, C.; BELLON-FONTAINE, M. N. *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5328–5333, 1999.

BUCHANAN, R. L.; EDELSON, S. G.; MILLER, R. L.; SAPERS, G. M. Contamination of intact apples after immersion in an aqueous environment containing *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 444–450, 1999.

CANADA, PUBLIC HEALTH AGENCY OF. **Outbreak of Salmonella illness related to mangoes**. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/food-safety/public-health-notice/public-health-notice-outbreak-salmonella-illness-related-mangoes.html>. Acesso em 3 set. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Braenderup Infections Associated with Mangoes (Final Update) Reports of Selected Salmonella Outbreak Investigations**, Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-12/index.html>. Acesso em 9 set. 2019.

CDC. **Notes from the Field: Listeriosis Associated with Stone Fruit**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6410a6.htm>. Acesso em 4 set. 2019.

CDC. **Multistate outbreak of *Salmonella* Anatum infections linked to imported Maradol Papayas**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/anatum-9-17/index.html>. Acesso em 9 set. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Adelaide Infections Linked to Pre-Cut Melon (Final Update)**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/adelaide-06->

18/index.html. Acesso em 9 set. 2019.

CDC. **Brote multiestatal de infecciones por *Salmonella* asociado a coco rallado congelado de la marca Coconut Tree.** Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/coconut-01-18/index_esp.html. Acesso em 9 set. 2019.

CDC. **Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections linked to dried coconut.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-03-18/index.html>. Acesso em 9 set. 2019.

CEINFO. **Fitossanidade na exportação de manga.** Disponível em: http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2312.pdf. Acesso em 3 set. 2019.

CHEN, Y.; EVANS, P.; HAMMACK, T. S.; BROWN, E. W.; MACARISIN, D. Internalization of *Listeria monocytogenes* in whole avocado. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 8, p. 1440–1445, 2016a.

CHEN, Y.; BURALL, L.S.; TIMME, R.; MELKA, D.; MURUVANDA, T.; PAYNE, J.; WANG, C.; KASTANIS, G.; DE JESUS, A. J., CURRY, P. E., LIU, E.; HAMMACK, T. S.; DATTA, A.; STRAIN, E. A.; BROWN, E. W. *Listeria monocytogenes* in stone fruits linked to a multistate outbreak: Enumeration of cells and whole-genome sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7030–7040, 2016b.

CNA - CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Fruticultura: Balanço 2016, Perspectivas 2017. **CNA Brasil**, p. 93–97, 2017. Disponível em: https://www.cnabrasil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/10_fruticultura.pdf. Acesso em 9 set. 2019.

COCOZZA, F. D. M. Maturação e conservação de manga Tommy Atkins à aplicação pós-colheita de 1-metilciclopropeno. 198 f. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Pós-Colheita)** – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003, Disponível em:

http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/257590/1/Cocozza_FabioDelMonte_D.pdf. Acesso em 9 set. 2019.

CODEVASF. **Safra e exportação da manga em projetos da CODEVASF devem crescer 20% neste ano.** Disponível em: <https://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/safra-e-exportacao-de-manga-em-projetos-da-codevasf-devem-crescer-20-neste-ano>. Acesso em 9 set. 2019.

COLE, M. B.; JONES, M. V.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, 69: 63-72, 1990.

COLLIGNON, S.; KORSTEN, L. Attachment and colonization by *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. Enterica serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stone fruit surfaces and survival through a simulated commercial export chain. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 7, p. 1247–1256, 2010.

CONNER, D. E.; SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T. Growth, inhibition, and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 8, p. 652–655, 1990.

CRUZ, J. N. da. Estudo de tratamentos fitossanitários na manga (*Mangifera indica* L.) para exportação. 88f. (**Dissertação - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN**) - Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-12082011-092015/publico/2010CruzEstudo.pdf>. Acesso em 5 set. 2019.

DAVIS, M. J.; COOTE, P. J.; O'BYRNE, C. P. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. **Microbiology**, v. 142, n. 10, p. 2975–2982, 1996.

DE LIMA, L. C. O.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. Changes in amylase activity

starch and sugars contents in mango fruits pulp Cv. Tommy atkins with spongy tissue. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba , v. 44, n. 1, p. 59-62, 2001.

DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, 104: 1552-1561, 2008.

EBLEN, B. S.; WALDERHAUG, M. O.; EDELSON-MAMMEL, S.; CHIRLTEL, S. J.; DE JESUS, A.; MERKEL, R. L.; BUCHANAN, R. L.; MILLER, A. J. Potential for internalization, growth, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in oranges. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 8, p. 1578–1584, 2004.

FAOSTAT. **Statistics about mangoes**. Disponível em: [http://www.fao.org/faostat/en/#search/Mangoes%2C mangosteens%2C guavas](http://www.fao.org/faostat/en/#search/Mangoes%2C+mangosteens%2C+guavas). Acesso em 3 set. 2019.

FDA. Guidance for industry: Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. **Federal Register**, October, 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/117408/download>. Acesso em 5 set 2019.

FERNANDES, P. E.; SÃO JOSÉ, J. F.B; ZERDAS, E. R. M. A.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, C. M.; SILVA, L. D. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin. **Food Control**, v. 41, n. 1, p. 21–26, 2014.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

HOJO, R. H.; SÃO JOSÉ, A. R.; HOJO, E. T. D.; ALVES, J. F. T.; REBOUÇAS, T. N. H.; DIAS, N. O. Qualidade De Manga “Tommy Atkins” Pós-Colheita Com Uso De

Cloreto De Cálcio Na Pré-Colheita 1 Quality of “Tommy Atkins” Mangoes in Post-Harvest With Calcium Chloride Spray Use in the Pre-Harvest Period. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 62–70, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL - **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4^a ed. (1^a Edição digital), 2008. 1020 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 6579:2002: microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4.ed. Geneva, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004(E): microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Geneva, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 11290-2:1996/Amd.1:2004(E): microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. Geneva, 2004.

KIM, H. J.; CHO, J. C. Simple and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in fruit juice by real-time PCR without enrichment culture. **Food Control**, Volume 21, Issue 10, Pages 1419-1423, ISSN 0956-7135, 2010.

LEE, H. Y.; CHAI, L.C.; MUSTAFA, S.; CHEAH, Y.K.; NISHIBUCHI, M. and RADU, S. Formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 at different incubation temperatures and concentrations of sodium chloride. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 51–55, 2013.

LIU, Y.; YANG, S.; Li, Y.; XU, H.; QIN, L. and TAY, J. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. **Journal of**

Biotechnology, v. 110, n. 3, p. 251–256, 2004.

MACARISIN, D.; SHETH, I.; HUR, M.; WOOTEN, A.; KWON, H.; GAO, Z.; DE JESÚS, A.; JURICK, W. & CHEN, Yi. Survival of outbreak , food , and environmental strains of *Listeria monocytogenes* on whole apples as affected by cultivar and wax coating. **Scientific Reports**, vol. 9, p. 1–11, 2019.

MANGO.ORG. Three Year Trends For U . S . Mango Imports. 2017. Disponível em: https://www.mango.org/wp-content/uploads/2018/03/3_Year_Trend_15_17_Eng.pdf. Acesso em 05 set. 2019.

MANICA, I (Ed.). **Manga: tecnologia, produção, agroindústria e exportação**. 1. ed. [s.l.], 617 p., Cinco Continentes Editora, 2001.

MARTIM, N. S. P. P. Estudo das características de processamento da manga (Mangifera Indica L.) variedade Tommy Atkins desidratada. 76 f. (**Dissertação - Setor de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos**) Universidade Federal do Paraná, 2006. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/5884/MARTIM%2c%20NELISA%20S.P.P.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 05 set. 2019.

MATHEW, E. N.; MUYYARIKKANDY, M. S.; KUTTAPPAN, D. & AMALARADJOU, M. A. Attachment of *Salmonella* enterica on mangoes and survival under conditions simulating commercial mango packing house and importer facility. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–10, 2018.

MBA-JONAS, A.; CULPEPPER, W.; HILL, T.; CANTU, V.; LOERA, J.; BORDERS, J.; SAATHOFF-HUBER, L.; NSUBUGA, J.; ZAMBRANA, I.; DALTON, S.; WILLIAMS, I & NEIL, K. (2018). A Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Agona Infections Associated With Consumption of Fresh, Whole Papayas Imported From Mexico-United States, 2011. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**. 66 (3), 2018.

MCCOLLUM, J.; CRONQUIST, A.; SILK, B.; JACKSON, K.; O'CONNOR, K.;

COSGROVE, S.; GOSSACK, J.; PARACHINI, S. & JAIN, N.; ETTESTAD, P.; IBRAHEEM, M.; CANTU, V.; JOSHI, M.; DUVERNOY, T.; FOGG, N.; GORNY, J.; MOGEN, K.; SPIRES, C.; TEITELL, P. & MAHON, B. Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Cantaloupe. **The New England journal of medicine**. 369. 944-53, 2013.

MERKER, R.; EDELSON-MAMMEL, S.; DAVIS, V. and BUCHANAN, R.L. Preliminary Experiments on the Effect of Temperature Differences on Dye Uptake by Oranges and Grapefruit, **U.S. Food & Drug Administration: Hazard analysis critical control points**, 1999. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/hazard-analysis-critical-control-point-haccp/preliminary-experiments-effect-temperature-differences-dye-uptake-oranges-and-grapefruit>>. Acesso em 3 set. 2019.

MITRA, S. K. Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits. **Wallingford, UK: Cab International**, 423 p., 1997.

MOUCO, M. A. C. (Ed.). Cultivo da mangueira. Embrapa Semi-Árido, Sistemas de Produção 2, Petrolina - 2ª edição, 2010. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/884451/1/CultivodaMangueira.pdf>. Acesso em 05 set. 2019.

NALÉRIO, E.S.; ARAÚJO, M.R.; MENDONÇA, K.S.; BASSANI, M.T. & SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: Monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 626–630, 2009.

NAYAK, R.; STEWART, T.; WANG, R.F.; LIN, J.; CERNIGLIA, C.E.; KENNEY, P.B. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. **International Journal of Food Microbiology**, volume 91, issue 1, pages 51-62, 2004.

OECD/FAO. Brazilian agriculture: prospects and challenges. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**, p. 61–108, 2015. Disponível em: <https://www.oecd->

ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015_agr_outlook-2015-en. Acesso em 05 set. 2019.

PENTEADO, A. L.; DE CASTRO, M. F. P. M.; REZENDE, A. C. B. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Listeria monocytogenes* in mango (*Mangifera indica* L.) pulp: Growth, survival and cross-contamination. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94 (13) : 2746-2751, 2014.

PENTEADO, A. L.; EBLEN, B. S.; MILLER, A. J. Evidence of *Salmonella* Internalization into Fresh Mangos during Simulated Postharvest Insect Disinfestation Procedures. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 1, p. 181–184, 2004.

QADRI, O. S.; YOUSUF, B.; SRIVASTAVA, A. K. Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2015.

REINA, L. D.; FLEMING, H. P.; BREIDT, F. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1881–1887, 2002.

ROCHA, R. H. C., MENEZES, J. B., MORAIS, E. A., SILVA, G. G., AMBRÓSIO, M. M. Q. & ALVEZ, M. Z. Uso Do Índice De Degradação De Amido Na Determinação Da Maturidade Da Manga “Tommy Atkins”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 302–305, 2001.

RODRIGUES, L.; SANTOS, L.; RIZZO, N.; TAGLIARI, V.; OLIVEIRA, A.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S.; TAGLIETI, R.; DICKEL, E. & NASCIMENTO, V. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 225, 2018.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, Volume 9, Issue 1, September 1980, Pages 29–33, 1980.

RYSER, E. T.; HAO, J.; YAN, Z. Internalization of Pathogens in Produce. In Fan X. et

al. Microbial Safety of Fresh Produce, **IFT Press/Wiley Blackwell**. pp.55-80, 2009.

SANTOS, D. B.; PEREIRA, M. E. C.; VIEIRA, E. L.; LIMA, M. A. C.. Caracterização físico-química dos estádios de maturação da manga “Tommy Atkins” produzida no município de Iacu-BA. **Embrapa Semiárido**, 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/162107/caracterizacao-fisico-quimica-dos-estadios-de-maturacao-da-manga-tommy-atkins-produzida-no-municipio-de-iacu-ba>. Acesso em 5 set. 2019.

SANTOS, C. de N. P. dos. Elaboração de um estruturado de polpa de manga (*Mangifera indica*, Tommy Atkins) parcialmente desidratada por osmose. **Dissertação de Mestrado**. 80 f. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255223>. Acesso em 5 set. 2019.

SANTOS, J. S. e OLIVEIRA, M. B. P. P. Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.15 n.1, p. 1–14, 2012.

SEBRAE. Boletim De Inteligência - Mercado De Fruticultura. p. 5, 2015. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf). Acesso em 03 set. 2019.

SILVA, E.O.; PINTO, P.M.; JACOMINO, A.P.; SILVA, L.T. Processamento Mínimo de Produtos Hortifrutícolas. **Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 71, 2011. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Doc139.pdf>. Acesso em 03 set. 2019.

SIVAPALASINGAM, S.; BARRETT, E.; KIMURA, A.; VAN DUYNE, S.; 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.; SLUTSKER, L. A Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport Infection Linked to Mango Consumption: Impact of Water-Dip Disinfestation Technology. **Clinical**

Infectious Diseases, v. 37, n. 12, p. 1585–1590, 2003.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B. and ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEPANOVIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RANIN, L. and SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M.. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G. and COSTERTON, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, 2002.

TAKAHASHI, H.; SUDA, T.; TANAKA, Y. and KIMURA, B. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 618-625, 2010.

TRAVAGIN, B. N. F. S.. Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios. 2010. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-20102010-104203/publico/Bruna_Travagin.pdf. Acesso em 03 set. 2019.

TREICHEL, M. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2016**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 88 p., 2016.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. **Federal Register**, **October**, v. 20204, p. 49, 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/117408/download> . Acesso em: 3 set. 2019.

UKUKU, D. O.; FETT, W. F. Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 7, p. 1093–1099, 2002.

USDA. Treatment Manual. p. 932, 2017. Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/ports/downloads/treatment.pdf. Acesso em: 3 set. 2019.

VAZQUEZ-ARMENTA, F.J.; BERNAL-MERCADO, A.T.; LIZARDI-MENDOZA, J.; SILVA-ESPINOZA, B.A.; CRUZ-VALENZUELA, M.R.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; NAZZARO, F.; FRATIANNI, F. & AYALA-ZAVALA, J.F. Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 889–907, 2018.

WESCHE A.M.; GURTNER J.B.; MARKS B.P. and RYSER, E.T. Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**; 72 (5): 1121–1138, 2009.

WHO. **Listeriosis - Australia**. Disponível em: <https://www.who.int/csr/don/09-april-2018-listeriosis-australia/en/>. Acesso em: 3 set. 2019.

ZHU, Q.; GOONERATNE, R.; HUSSAIN, M. *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. **Foods**, 6, 21, 2017.

ZOU, K.H.; TUNCALI, K.; & SILVERMAN, S.G. Correlation and simple linear regression. **Radiology**, 227 3, 617-22, 2003.