

EFEITO DA FOSFINA EM *SALMONELLA ENTERITIDIS* EM PIMENTA-DO-REINO (*PIPER NIGRUM*) EM GRÃOS

FÁBIO REZENDE¹; MARIA FERNANDA P. P. M. CASTRO²

N° 0701023A

RESUMO

Pesquisas realizadas no Brasil e no exterior tem revelado níveis elevados de contaminação da pimenta-do-reino por bactérias enteropatogênicas, em especial *Salmonella* spp. A presença desse patógeno em pimenta brasileira tem levado à freqüente rejeição ou detenção de lotes ou partidas contaminadas por parte das autoridades sanitárias. Estudos realizados com fosfina, fumigante largamente utilizado no controle de insetos de grãos armazenados, indicaram que esse produto tem efeito em bolores, podendo desse modo também ter efeito em outros microrganismos. O objetivo principal desse estudo foi o de avaliar o efeito da fosfina em *S. Enteritidis* em pimenta-preta em grãos. Ensaio com culturas puras também foram realizados. Foram aplicadas concentrações de 0.5mg/L à 3.0mg/L por 24 e 48 horas. Foram também verificados o tempo de sobrevivência do patógeno em pimenta irradiada nas temperaturas de 25°C e 35°C e elaboradas isotermas nessas mesmas temperaturas. *Salmonella* Enteritidis sobreviveu por um período superior a 20 dias em amostras de pimenta do reino com baixa atividade de água. A fosfina, em concentrações de até 3.0mg/L não reduziu a população de *S. Enteritidis* em meio de cultura após 24 horas de exposição, no entanto, a 1,5 mg/L, após 48 horas de exposição, houve redução na dimensão das células bacterianas.

ABSTRACT

Researches carried out in Brazil and in other countries have showed the high contamination levels of black pepper by enteropathogenic bacteria, in special, *Salmonella* spp. The presence of this pathogen in brazilian pepper has been a reason for a frequent rejection and detection of the contaminated lots by sanitary authorities. Studies carried out with phosphine, a fumigant largely applied for insects controle in stored grains, indicated that this product has effects on molds, thus could also have effects on other microorganism. The main objective of this study was to evaluate the effect of phosphine in black pepper. Essays with pure cultures were also carried out. Concentrations of 0.5 to 3.0 mg/L for 24 and 48 hours were applied in contaminated black pepper at incubation temperatures of 25°C and 35°C. It was also

1. BOLSISTA CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas-SP, ✉ rezendebiologia@gmail.com

2. ORIENTADOR: Pesquisador, GEPC/ITAL, Campinas-SP

verified the survival time of this pathogen in irradiated pepper at temperatures of 25 and 35°C and isotherms at 25 and 35°C were elaborated. The results showed that *S. Enteritidis* survived for a period superior to 20 days in pepper samples of low water activity. Phosphine in concentrations up to 3.0 mg/L did not decrease the *S. Enteritidis* population in pure culture after 24 hours at 35°C but at 1.5 mg/L, after 48 hours exposition, a reduction in colony size was verified.

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino, inteira ou moída, é um condimento fundamental em vários pratos, podendo ser adicionada em alimentos crus ou já preparados. Em ambos os casos, o controle microbiológico nessa especiaria é extremamente crítico, pois após a sua adição o alimento pode não sofrer nenhum tratamento que reduza a sua carga microbiana ou ser submetido a algum tratamento térmico numa intensidade insuficiente para destruir microrganismos eventualmente introduzidos pelo condimento (Manual, 2004). Pesquisas realizadas no Brasil e no exterior tem revelado níveis elevados de contaminação da pimenta-do-reino por bactérias enteropatogênicas, em especial *Salmonella* spp. A presença desse patógeno em pimenta brasileira tem levado à freqüente rejeição ou detenção de lotes contaminados por parte das autoridades sanitárias (IMPORT REFUSAL REPORTS FOR OASIS, 2005), principalmente dos E.U.A, o maior importador de pimenta-preta brasileira. Além disso, é uma causa comum de rejeição pelas indústrias de alimentos (principalmente a de produtos cárneos embutidos) que utilizam este condimento como ingrediente no preparo de lingüiças, salsichas e outros produtos (Manual, 2004). Pesquisas realizadas com fosfina, fumigante largamente utilizado no controle de insetos de grãos armazenados, indicaram que esse produto também exerce controle no crescimento de bolores (Castro & Leitão, 2003), podendo desse modo também ter efeito em outros microrganismos. Os objetivos do trabalho foram: (1) Verificar o possível efeito da fosfina no controle de *Salmonella* Enteritidis em pimenta-do-reino em grãos; (2) Verificar o tempo de sobrevivência de *S. Enteritidis* em pimenta-preta seca; (3) Obter isothermas de sorção e desorção do produto à temperaturas de 25 e 35°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em pimenta-do-reino preta em grãos

Inóculo de uma cultura de *S. Enteritidis* foi transferido para tubo de *ágar* nutriente e mantido a 35°C por 24 horas antes do início dos experimentos. Células foram então coletadas desse meio e transferidas para 5mL de solução salina (NaCl 0,85%) de modo a ajustar a concentração da suspensão para 10⁸ UFC/ml de acordo com a escala de turbidez

MacFarland (1,3) e utilizando o equipamento Densimat (bioMerieux). A concentração de células viáveis foi verificada pelo método da diluição em série em XLD. Alíquotas de 100 µl dessa suspensão foram utilizadas na inoculação das amostras de pimenta, previamente irradiadas com uma dose de 15kGy. As amostras inoculadas foram colocadas em dessecadores contendo solução saturada de KI de modo a formar um ambiente com umidade relativa controlada de aproximadamente 70%, após diferentes períodos de incubação à 25 e 35°C amostras foram retiradas para contagens de *S. Enteritidis*. Amostras de pimenta irradiada não inoculadas foram mantidas nas mesmas condições como controle. A atividade de água das amostras foi monitorada durante o experimento.

Elaboração de isotermas

Para a determinação das curvas de equilíbrio higroscópio à temperaturas de 25 e 35°C foi utilizada uma amostra de aproximadamente 1kg obtida após a homogeneização do produto, sendo que 500g foram submetidas ao processo de secagem e 500g ao processo de reumidificação. O teor de umidade inicial das amostras foi determinado.

Anteriormente aos processos de secagem e de reumidificação, aplicou-se uma solução anti-fúngica, conforme a metodologia utilizada por Gustafson & Hall (1974) com o propósito de se evitar o desenvolvimento de fungos durante o experimento.

A secagem foi realizada colocando-se a amostra em estufa à vácuo, à temperatura de 98°C até atingir peso constante (teor de umidade de aproximadamente 1,3%).

A umidificação foi realizada adicionando-se água deionizada ao produto, até atingir um teor de umidade final de aproximadamente 24%. O teor de umidade foi determinado em estufa a vácuo, 98°C a 100°C por 5 horas ou peso constante (AACC, AOAC).

As umidades de equilíbrio foram obtidas utilizando-se dessecadores de 2850 litros de capacidade, contendo soluções salinas saturadas (300mL), de modo a formar ambientes com umidades relativas controladas variando de 7,55% à 96,71% para temperatura de 35°C e de 8,23% à 97,3% para temperatura de 25°C. Os sais utilizados foram KOH, LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NaBr KI, NaNO₃, NaCl, KCl e K₂SO₄ (Winston & Church, 1960).

Ensaio com fosfina

Fosfina

A fosfina foi obtida de tabletes de 3g de fosfeto de alumínio-GastoxinR, em um gerador, de acordo com o método nº16 da FAO (Anon, 1975).

O valor de concentração de fosfina obtido dos tabletes utilizado no cálculo das concentrações requeridas nos ensaios foi de 86%, conforme previamente determinado por Oliveira et al. (2001).

Preparo do inóculo e inoculação

Inóculo da cultura de *S. Enteritidis* foi transferido para tubo de TSA e mantido a 35°C por 24 horas antes do início dos experimentos. Células foram então coletadas desse meio e transferidas para 5mL de solução salina (NaCl 0,85%) de modo a ajustar a concentração da suspensão para 10^8 ufc/ml de acordo com a escala de turbidez MacFarland e utilizando o equipamento Densimat (bioMerieux). A suspensão foi então diluída em série (1:10) em água peptonada 0,1%, e alíquotas de 0,1ml de cada diluição foram plaqueadas em superfície no meio XLD, seguida de incubação a 35°C por 24 h de modo a determinar a concentração de células viáveis. Alíquotas de 10 µl da diluição contendo 10^8 ufc/mL de *Salmonella* Enteritidis foram utilizadas na inoculação de amostras de 11g pimenta-do-reino irradiada, de modo a obtermos uma contaminação inicial de aproximadamente 10^4 ufc/g. Alíquotas de 0.1mL das diluições -2 e -3 foram distribuídas em placas de XLD as quais foram utilizadas nos testes “*in vitro*”. Foi utilizado um planejamento fatorial completo, com três variáveis, concentração de fosfina (0,0 mg/L; 0,5 mg/L; 1,5 mg/L e 3,0mg/L), tempo de exposição (24 e 48 horas) e temperatura (25°C e 35°C). Foram realizadas três (3) repetições por tratamento. Após os ensaios com fosfina contagens de *S. enteritidis* foram realizadas nas amostras de pimenta preta utilizando o método da diluição em série e o meio XLD. Para os testes com culturas puras as colônias que cresceram após o período de exposição ao fumigante foram enumeradas sendo utilizada a média das duas placas como contagem final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação do tempo de sobrevivência de *S. Enteritidis* nas condições do experimento

O monitoramento da atividade de água de amostras controle indicou que os valores de A_w praticamente se mantiveram constantes durante o experimento.

A Tabela 1 apresenta as contagens de *S. Enteritidis* inoculado experimentalmente em pimenta-preta em grãos irradiada com atividade de água de 0,67 após 21 de estocagem a temperaturas de 35°C e 25°C. Verificou-se a sobrevivência da *Salmonella* por um período superior a 20 dias em amostras de pimenta do reino com baixa atividade de água nas duas temperaturas estudadas.

Tabela 1. Contagem de *Salmonella* Enteritidis¹ (log UFC/g) após diferentes períodos de incubação a 25 e 35°C.

| Tempo (dias) | Temperatura (°C) | |
|--------------|------------------|---------|
| | 25°C | 35°C |
| 0 | 4,6±0,2 | 5,1±0,2 |
| 3 | 3,8±0,2 | 3,0±0,2 |
| 7 | 4,2±0,1 | 2,3±0,3 |
| 14 | 3,7±0,2 | 1,6±0,4 |
| 21 | 2,5±0,1 | 2,0±0,3 |

¹Resultados expressos como a média de três repetições e o desvio padrão para cada método utilizado.

Elaboração de isotermas.

A Figura 1 apresenta as isotermas para pimenta-preta em grãos obtidas nas temperaturas de 25 e 35°C.

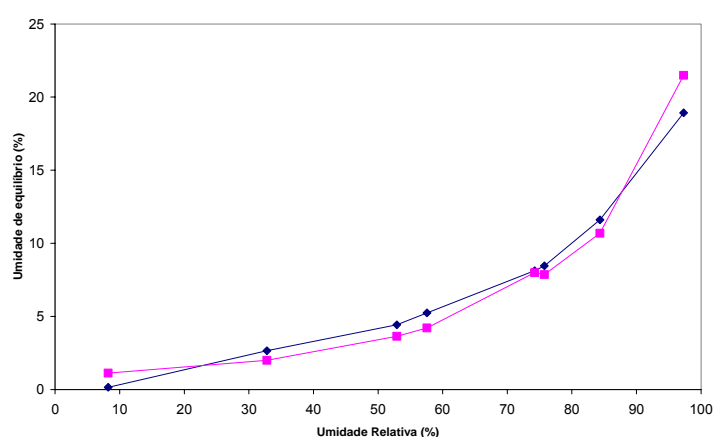


Figura 1. Curvas de adsorção de pimenta-preta em grãos à temperaturas de 25°C (♦) e 35°C (■).

Ensaio com fosfina

Os resultados dos testes realizados com cultura pura e na pimenta-do-reino com fosfina realizados até a presente data indicaram que não houve reduções na população do patógeno testado tanto em cultura pura quanto na pimenta-do-reino, quando concentrações de até 1,5mg/L foram aplicadas, independentemente do tempo de exposição e temperatura estudados (24 ou 48 horas). Observamos, no entanto, que em culturas puras, após 48 horas de exposição à uma concentração de 1,5 mg/L à 35°C as colônias expostas ao fumigante apresentaram dimensões menores que as do controle, conforme pode ser observado na Figura 2.



Figura 2. Colônias de *S. enteritidis* expostas ao fumigante

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association of Cereal Chemists. Approved Method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Min., USA, 1976.

Anon. Recommended methods for the detection and measurement of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major beetle pests of stored cereals with methyl bromide and phosphine. FAO method n°16. FAO *Plant Protection Bulletin*, 23,12-24, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1975.

Castro, M.F.P.P.M. & Leitão, M. F.F. Efeitos da fosfina no crescimento de *Aspegillus flavus* Link e na produção de aflatoxinas em milho (*Zea mays*, L.) armazenado com elevados teores de umidade. Tese (Doutorado). Unicamp. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2003.

Gustafon, R.J. & Hall, G.E. Equilibrium moisture content of shelled corn from 50 to 155f. Transactions of the ASAE, St. Joseph, Michigan, 17(1):120-4, 1974.

Import Refusal Reports for OASIS. Disponível em: <http://www.fda.gov/ora/oasis>>. Acesso em 28 setembro 2005.

MANUAL de segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino.-Brasília, DF: CampoPAS, 2004. 65 p. – (Série qualidade e segurança dos alimentos).

Oliveira, J.do V., Castro, M. F.P. M. de, Athié, I., Dias, I.S. Determinação da porcentagem de fosfina obtida de produtos comerciais utilizados para fumigação na agricultura e em grãos armazenados. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 14 (2), 13-16, 2001.

Winston, P.W. & Bates, D.H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, Tempe, USA, 41(1): 232-5, 1960.