

## **AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA *SALMONELLA* ARTIFICIALMENTE INOCULADA EM DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSAMENTO DE CACAU.**

PÂMELA DE O. **PENA**<sup>1</sup>; PRISCILLA **EFRAIM**<sup>2</sup>; FABIANA T. **IMAZAKI**<sup>2</sup>; DANIELA M. **BRUM**<sup>2</sup>; MARISTELA DA S. **DO NASCIMENTO**<sup>3</sup>.

**Nº11213**

### **RESUMO**

*Salmonella* é um importante enteropatógeno responsável por inúmeros surtos e centenas de morte anualmente no mundo. O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento da *Salmonella* durante a fermentação e torração do cacau. As fermentações foram realizadas durante 7 dias, de modo que, a cada dia uma caixa contendo 2kg de amostra de sementes de cacau fosse inoculada com um pool de 5 cepas de *Salmonella* (4 log NMP/g). No processo de torração, 50g de amêndoas e nibs de cacau artificialmente inoculados com *Salmonella* (6 log NMP/g) foram submetidos a temperaturas de 110 a 140°C por até 50min. A população de *Salmonella* foi determinada pela técnica de Número Mais Provável (NMP). Na fermentação, as caixas inoculadas nos 4 primeiros dias apresentaram contagem de *Salmonella*  $\leq 0,48 \log$  NMP/g, após 24 a 48h da inoculação. Apesar do decréscimo no número de *Salmonella*, no final da fermentação houve retomada de crescimento nas caixas 0, 3, 4 e 5; além disso, na caixa 6, foi observado crescimento do patógeno em mais de 2 log NMP/g em apenas 24h. Na torração, as temperaturas de 130 e 140°C apresentaram as maiores reduções, com contagens abaixo do limite de detecção do método ( $< 0,03$  NMP/g) após 20 e 30min. Portanto, na fermentação o comportamento da *Salmonella* estava estreitamente relacionado ao dia/fase em que ocorreu a contaminação. Na torração a resistência térmica da *Salmonella* variou em função do tipo de amostra avaliada, principalmente nas menores temperaturas utilizadas (110 e 120°C).

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Biomedicina, Veris IBTA Metrocamp, Campinas-SP, op.pamela@gmail.com

<sup>2</sup> Colaborador: Pesquisadora, Unicamp. Funcionária e estagiária CCQA-ITAL. Campinas-SP

<sup>3</sup> Orientadora: Pesquisadora, CCQA-ITAL, Campinas-SP

## ABSTRACT

*Salmonella* is an important enteropathogen responsible for numerous outbreaks and hundreds of deaths annually worldwide. The aim of this study was to verify the behavior of *Salmonella* during fermentation and roasting of cocoa. The fermentation step was carried out for 7 days, so that each day one sample box, containing 2 kg of cocoa beans, was inoculated with a pool of five *Salmonella* strains (4 log MPN / g). In the roasting process, 50g of cocoa beans and cocoa nibs artificially inoculated with *Salmonella* (6 log MPN / g) were heated from 110 to 140° C for 50min. *Salmonella* population was determined by the technique of Most Probable Number (MPN). In the fermentation step, the boxes inoculated in the first 4 days showed *Salmonella* count  $\leq 0.48$  log MPN / g after 24 to 48 h of inoculation. Despite the decrease in the *Salmonella* count, at the end of fermentation was observed growth in the boxes 0, 3, 4 and 5. Besides, in the box 6, in only 24 h the pathogen showed growth of more than 2 log MPN / g. In the roasting process, both of almond and cocoa nib, temperatures at 130 and 140 °C showed the greatest *Salmonella* reductions, with scores below the detection limit ( $<0.03$  MPN / g) after 20 to 30 min. Therefore, in the cocoa fermentation *Salmonella* behavior was closely related to the day/stage at which contamination occurred. In the roasting process, *Salmonella* heat resistance varied depending on the type of sample investigated, especially when used lower temperatures (110 and 120 °C).

## INTRODUÇÃO

A palavra cacau é o termo empregado de maneira geral, que se refere a frutos da espécie *Theobroma cacao* L, da família *Sterculiaceae*, matéria-prima do chocolate. No processamento do cacau, a fermentação é uma das etapas mais importantes; as sementes, já retiradas do fruto, sofrem a ação de micro-organismos presentes no meio ambiente, iniciando inúmeras reações físico-químicas e bioquímicas responsáveis pelo desenvolvimento de compostos precursores do sabor e aroma do chocolate (SHWAN & WHEALS, 2004). Dentre as etapas do processamento, a torração (110° a 150°C) das amêndoas ou nibs de cacau seria a única fase que poderia reduzir significativamente a contagem de micro-organismos como a *Salmonella*, uma das bactérias que podem afetar adversamente a qualidade do chocolate. Entretanto, devido à resistência térmica que o micro-organismo apresenta neste tipo de produto, pode haver sobrevivência mesmo após o emprego de altas temperaturas. O controle da matéria-prima é, portanto, a maneira mais eficaz na prevenção da *Salmonella* em

chocolate (CORDIER, 1994). Apesar do conhecimento da atuação desse patógeno como agente etiológico de doenças de origem alimentar, pouco se sabe sobre a presença de *Salmonella* em produtos brasileiros derivados do cacau e em chocolate, bem como seu comportamento frente à competição microbiana natural da fermentação do cacau e aos diferentes processamentos térmicos empregados no beneficiamento deste produto, o que justifica este trabalho que, teve como objetivo verificar o comportamento da *Salmonella* durante a fermentação e a torração de cacau.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Cepas de *Salmonella***

Para a realização do estudo foi utilizado um “pool” de 5 cepas de *Salmonella*: S. Typhimurium ATCC 14028, S. Oranienburg IAL 1203, S. Senftenberg IAL 1235, S. Eastbourne IAL 1131 e S. Enteritidis ATCC 13076.

### **Fermentação**

As fermentações foram realizadas por 7 dias em caixas de isopores contendo 2 kg de sementes de cacau. A cada dia uma caixa diferente foi inoculada com um pool de *Salmonella* (4 log NMP/g). Foi coletada, diariamente, uma amostra de 50 g de cada caixa inoculada para determinação da população de *Salmonella*. A temperatura e o pH das amostras também foram monitorados.

### **Torrção**

A torração foi realizada em estufa com circulação de ar e os binômios tempo/temperatura utilizados foram 10, 20, 30, 40 e 50 minutos e, 110, 120, 130 e 140 °C. Cinquenta gramas de amêndoas ou *nibs* de cacau foram previamente inoculadas com um pool de *Salmonella* (6 log NMP/g). A população de *Salmonella* foi determinada antes e após o processo térmico.

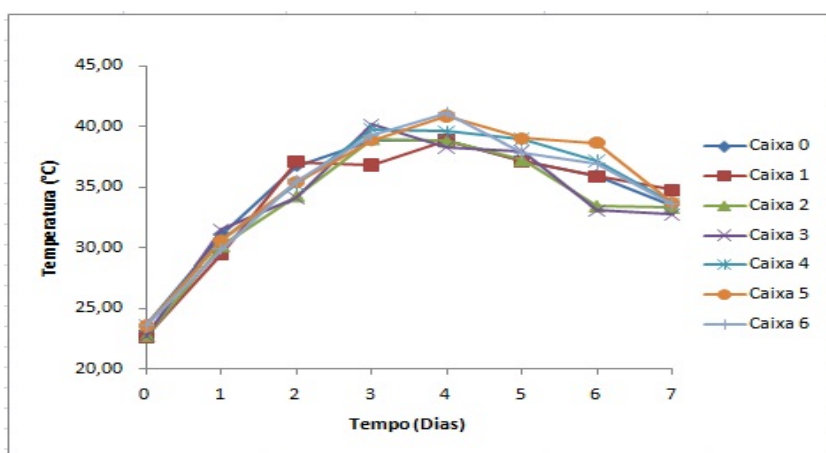
### **Análise Microbiológica**

Para a determinação da população de *Salmonella* foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (N.M.P.), pelo método adaptado da *Food and Drug Administration* (BAM/FDA, 2005). As amostras foram submetidas ao pré-enriquecimento com BPW, com incubação a 37°C/24h. Em seguida, foi realizado o enriquecimento em caldo Rappaport Vassiliadis (RV), incubado a 42°C/24h. O plaqueamento seletivo foi realizado em ágar XLD, com incubação a 35°C/24h. Para a confirmação da presença do patógeno foram realizados testes bioquímicos e sorológicos adicionais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

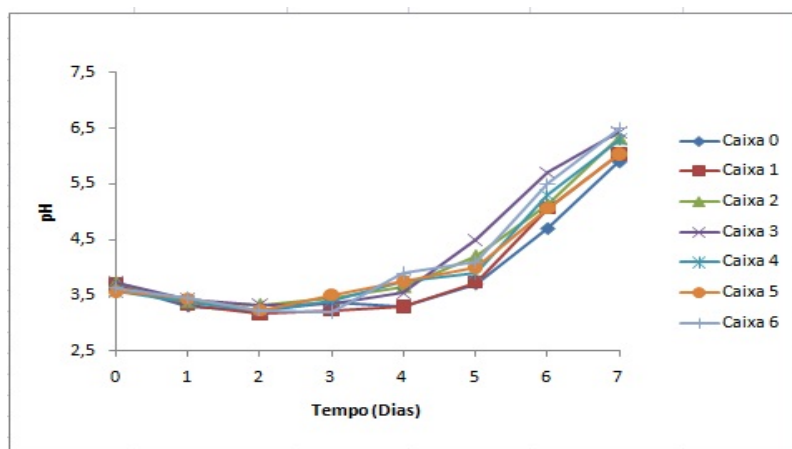
### Fermentação

A temperatura das amostras aumentou significativamente nos primeiros dias do processo fermentativo, atingindo valor máximo de 41 °C, no 4º dia. Após o 5º dia de fermentação, período que coincide com a redução das atividades metabólicas dos principais grupos microbianos, foi verificado um declínio contínuo na temperatura da massa, sendo observada queda de até 8°C no 7º dia quando comparado ao 4º dia.



**FIGURA 1.** Evolução da temperatura durante sete dias de fermentação de cacau artificialmente inoculado com *Salmonella*.

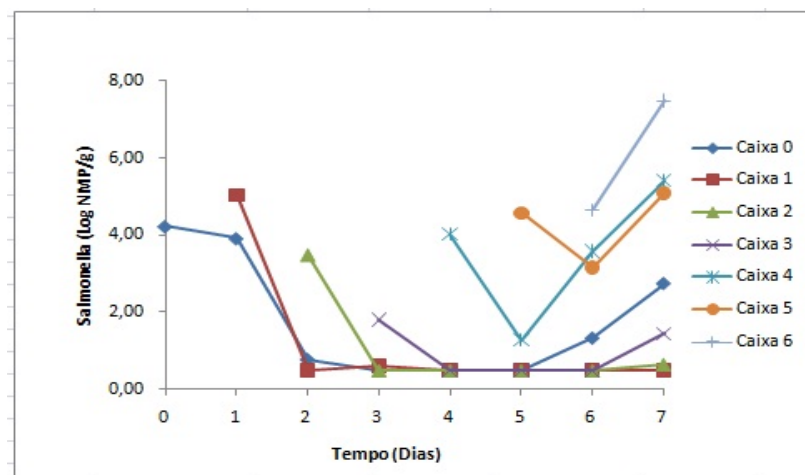
Nos 4 primeiros dias de fermentação foram observados valores de pH abaixo de 4,0 em todas as amostras. A partir do 5º dia houve elevação do pH que ao final do processo fermentativo atingiu valores acima de 6,0 (ARDHANA e FLEET, 2003).



**FIGURA 2.** Evolução do pH durante sete dias de fermentação de cacau artificialmente inoculado com *Salmonella*.

Na caixa 0, as primeiras 24 horas podem ter sido determinantes para a presença da *Salmonella* no final da fermentação, o que possibilitou a adaptação do patógeno ao meio. Em relação às caixas 1 e 2, pôde-se observar que praticamente não houve crescimento significativo de *Salmonella* até o término da fermentação. O motivo para o ocorrido, provavelmente, foi o grau de injúria sofrido pelo micro-organismo no período subsequente à inoculação (SHWAN & WHEALS, 2004; GALVEZ et al., 2007). Na caixa 3, apesar de ter sido injuriada inicialmente, a *Salmonella* foi capaz de retomar crescimento.

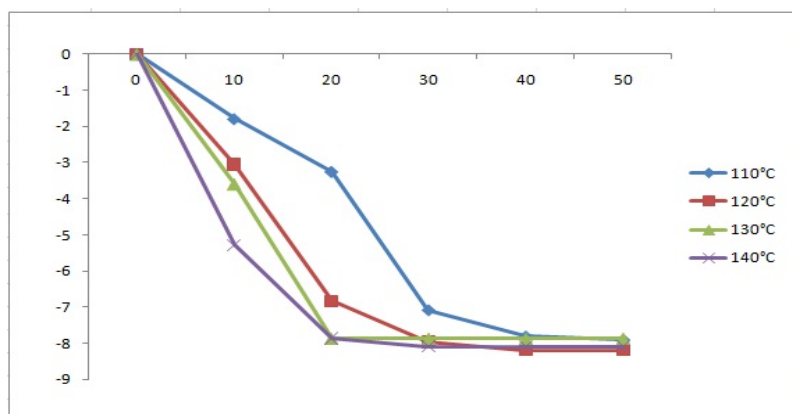
O micro-clima presente no final da fermentação, especialmente o pH, favoreceu o desenvolvimento da *Salmonella*. Isto foi comprovado pela retomada de crescimento do patógeno nas caixas 0, 3, 4 e 5 e também pelo comportamento diferenciado na caixa 6, que ao invés de queda apresentou crescimento de mais de 2 log NMP/g em apenas 24 horas.



**FIGURA 3.** Contagem de *Salmonella* artificialmente inoculada durante fermentação de cacau.

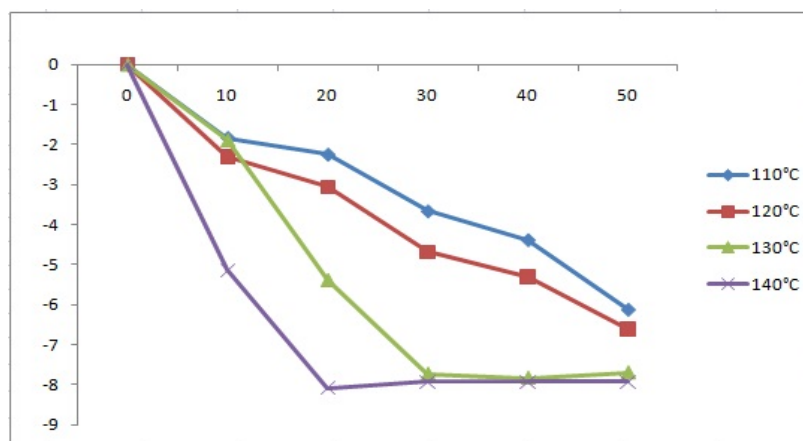
### Torração

Na torração de amêndoa de cacau, após os 10 primeiros minutos a redução de *Salmonella* estava em torno de 1,79 log UFC/g a 110°C, enquanto que a 120 e 130°C a redução foi de cerca de 3,05 e 3,59 log UFC/g, respectivamente. A maior redução observada foi a 140°C, com declínio de 5,28 log UFC/g na contagem de *Salmonella*. A população de *Salmonella* foi reduzida abaixo do limite de detecção do método, ou seja redução maior que 8 log NMP/g, após 40 minutos a 110°C, 30 minutos a 120°C e 20 minutos a 130 e 140°C.



**FIGURA 4.** Destruição térmica de *Salmonella* durante a torração de amêndoas de cacau artificialmente inoculadas.

Na torração dos *nibs* de cacau, após 10 minutos do início do processo, a redução de *Salmonella* nas temperaturas de 110, 120 e 130°C estava bastante próxima, por volta de 1, 83, 2,30 e 1,89 log UFC/g, respectivamente. Nesse mesmo período de tempo a 140°C houve declínio de 5,14 log UFC/g na contagem de *Salmonella*. A população do microorganismo foi reduzida abaixo do limite de detecção do método (redução >8 log NMP/g) apenas nos processos que empregaram as temperaturas de 130 e 140 °C após 30 e 20 min, respectivamente.



**FIGURA 5.** Destruição térmica de *Salmonella* durante a torração de nibs de cacau artificialmente inoculados.

Na torração das amêndoas, o tempo necessário para reduzir a população do patógeno a níveis abaixo do limite de detecção do método foi menor em quase todas as temperaturas avaliadas quando comparado às amostras de *nibs*.

Em relação à resistência térmica da *Salmonella*, alguns estudos realizados com amêndoas demonstraram menor tempo de inativação. Almond Board of California's Technical Expert Review Panel (ABC TERP, 2008) e Harris (2008) avaliaram a resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis PT 30 em amêndoas e obtiveram reduções superiores em menor tempo de processo que as obtidas no presente estudo. Contudo, Akinleye (1994) ao estudar a resistência de *Salmonella* Typhimurium em solução modelo com  $A_w$  de 0,42, verificou redução de 1 ciclo logarítmico após 18,2 minutos a 110°C e 8,9 minutos a 120°C; valores estes superiores ao observado nesse estudo.

## CONCLUSÃO

A sobrevivência e/ou multiplicação da *Salmonella* está relacionada ao momento de contaminação da amostra, sendo influenciada pelo micro-clima da fermentação. Dependendo da fase em que ocorre a contaminação o risco à saúde pública pode ser potencializado.

Na torração, a resistência térmica da *Salmonella* variou em função do tipo de amostra avaliada, especialmente nas menores temperaturas utilizadas (110 e 120°C). Para garantir segurança microbiológica ao produto, devem ser empregados os processos 120 °C/20 min para amêndoas inteiras e 130°C/30 min ou 140 °C/20 min para *nibs* de cacau.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

## REFERÊNCIAS

- ABC (Almond Board of California). 2007. Processing authority kit. Disponível em: <http://www.almondboard.com/about/content.cfm?ItemNumber=25135&token=58482&userID>. Acesso em 10 de junho de 2011.
- AKINLEYE, I.O. *The effect of water activity on the heat resistance of Salmonella Typhimurium*. A thesis submitted to the University of reading. Reading, UK, 1994.



ARDHANA, M.; FLEET, G.H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*. v.86, p.87-99, 2003.

BAM: Bacteriological Analytical Manual Online 2005. Chapter 5: *Salmonella*. ANDREWS, W.H., HAMMACK, T.S. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html>>, acesso em 15/11/10.

CORDIER, J. L. HACCP in the chocolate industry. *Food Control*. v.5, p.171-175, 1994.

GALVEZ, S.L.; LOISEAU, G.; PAREDES, J.L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J-P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*. v.114, p. 124-130, 2007.

HARRIS, L.J. *Salmonella – factors affecting resistance to heat*. In: IAFP Symposium S8 Validating process for reducing *Salmonella* in low water activity foods. IAFP annual meeting, August 3-6, Columbus, Ohio, 2008.

SCHWAN, R.F. & WHEALS, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* v.44, p.1-17, 2004.