

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *SALMONELLA* AOS PRINCIPAIS AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES NA FERMENTAÇÃO DO CACAU

VICTOR B. C. **BIRUEL**¹; MARISTELA DA S. DO **NASCIMENTO**²

Nº 12250

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar a sensibilidade de 5 sorotipos de *Salmonella* frente a antimicrobianos presentes na fermentação do cacau. Os testes foram realizados em caldo BHI, suplementado com os ácidos acético, cítrico e láctico e com etanol. A determinação do crescimento microbiano foi realizada por leitura da densidade ótica (OD) do meio de cultivo em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm por 168 h. O ácido acético a 1mg/g não teve efeito significativo sobre *Salmonella*, com OD₆₀₀ finais semelhantes ou maiores que as das curvas padrões. A concentração de 2mg/g apresentou ação bacteriostática sobre *Salmonella*, não permitindo seu crescimento por 168h. Concentrações iguais ou superiores a 3mg/g promoveram ação bactericida após 24 a 72h. Para o ácido cítrico, a 2mg/g todos os sorotipos mostraram crescimento maior que no meio controle. Nas concentrações de 4 e 5mg/g foi observado discreto crescimento e a inativação completa foi obtida a partir de 6mg/g. Na presença de 2mg/g de ácido láctico, todos os sorotipos mostraram OD₆₀₀ finais próximas a ou maiores que as das curvas padrões. Após 24h, a 4mg/g foi observada a inibição completa do patógeno. O etanol nas concentrações de 5 e 6% permitiu o crescimento de todos os sorotipos. A inibição do patógeno foi observada nas concentrações de 7 e 10%. Portanto, os resultados demonstram que os compostos antimicrobianos naturais do processo fermentativos do cacau são capazes de inibir o crescimento da *Salmonella*. No entanto, a presença de baixa concentração de ácidos pode estimular o crescimento do patógeno.

¹ Bolsista CNPq: Graduando em Biomedicina, UNIP, Campinas-SP, vborincenturion@yahoo.com.br.

² Orientadora: Pesquisadora, Microbiologia CCQA/ITAL, Campinas-SP.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the sensitivity of five *Salmonella* serotypes to the antimicrobial compounds present in cocoa fermentation. The tests were carried out in BHI broth supplemented with acetic, citric and lactic acid and ethanol. The microbial growth was determined by optical density (OD) of the culture medium in a spectrophotometer at a wavelength of 600nm for 168 h. The acetic acid concentration of 1 mg/g had no significant antimicrobial effect on *Salmonella* serotypes showing similar final OD₆₀₀ or higher than that of the standard curves. The concentration of 2 mg/g had a bacteriostatic action on *Salmonella* and did not allow its growth for 168h. Concentrations equal to or greater than 3 mg/g led to bactericidal action after 24 to 72 h. For citric acid, all serotypes showed higher growth in the presence of 2 mg/g than in the control medium. At 4 and 5 mg/g a slight increase of *Salmonella* was found and complete inactivation was observed from 6 mg/g on. For 2 mg/g of lactic acid, all serotypes showed final OD₆₀₀ close to or higher than that of the standard curves. After 24 h, at 4 mg/g a complete inhibition of the pathogen was observed. At 5 and 6 % of ethanol, all serotypes showed growth. Inhibition of the pathogen was observed at concentrations of 7 and 10 %. Therefore, the results show that the natural antimicrobial compounds of cocoa fermentation are capable of inhibiting *Salmonella* growth. However, a low acid concentration can increase the growth of the pathogen.

INTRODUÇÃO

O pré-processamento do cacau inicia-se com a fermentação da polpa que envolve as sementes. A fermentação é um processo microbiológico espontâneo, nas primeiras 24-36h ocorre a proliferação de leveduras, ocasionando a produção de etanol. Na fase seguinte proliferam as bactérias lácticas, com produção de ácido láctico. Com a degradação da polpa ocorre um aumento na aeração do material, favorecendo a multiplicação das bactérias acéticas, que utilizam o etanol produzido pelas leveduras como substrato para gerar ácido acético (SCHWAN & WHEALS, 2004).

Salmonella é considerado um importante patógeno de veiculação alimentar que causa milhares de casos e centenas de mortes anualmente no mundo. O levantamento epidemiológico de surtos de salmonelose envolvendo cacau e chocolate demonstra que estes foram epidêmicos, disseminados geograficamente e atingiram um grande número de pessoas, principalmente crianças (WERBER et al., 2005). Características do chocolate como alto teor de gordura e baixa atividade de água

possibilitam a sobrevivência por longos períodos no produto, além de influenciarem no aumento da resistência térmica do patógeno.

O ambiente ácido e a competição microbiana presentes na fermentação do cacau não deveriam favorecer a multiplicação de *Salmonella*, entretanto, estudos anteriores realizados por nossa equipe evidenciaram que dependendo do momento de contaminação ao longo do processo fermentativo, este patógeno não só sobrevive como também se desenvolve no produto (dados não publicados). Portanto, visando compreender melhor a ação dos antimicrobianos e o comportamento da *Salmonella* durante a fermentação do cacau, este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade de diferentes sorotipos de *Salmonella* aos principais metabólitos presentes na fermentação do cacau.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção e Reativação das cepas padrões

Para a realização do estudo foram utilizadas 5 cepas de *Salmonella*: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Oranienburg* IAL 1203, *S. Senftenberg* IAL 1235, *S. Eastbourne* IAL 1131 cultivadas isoladamente e em *pool*. As culturas foram mantidas a -80°C até o momento do uso, quando foram cultivadas em dois repiques consecutivos em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI).

Determinação da curva padrão de crescimento dos diferentes sorotipos de *Salmonella*

Após reativação, as culturas foram inoculadas separadamente e em *pool* em caldo BHI na concentração inicial de 10^3 UFC/g e incubadas a 37°C. O crescimento microbiano foi determinado através de leitura da densidade ótica do meio de cultivo, realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm (LEYER & JOHNSON, 1993). As leituras foram realizadas após 0, 3 (apenas para curva padrão), 5, 7, 9, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação da curva de crescimento de *Salmonella* durante exposição a diferentes antimicrobianos presentes na fermentação do cacau

As culturas, na concentração inicial de 10^3 UFC/g, foram inoculadas separadamente e em *pool* em caldo BHI suplementado com ácido acético (1, 2, 3, 4, 5 e 7mg/g), ácido láctico (2, 3, 4, 5 e 7mg/g), ácido cítrico (2, 4, 5, 6, 7, e 10mg/g) e

etanol (5, 6, 7 e 10%). Os tubos foram incubados a 37°C e as leituras, realizadas conforme descrito no item anterior.

Todas as soluções inoculadas com *Salmonella* que não apresentaram turvação foram estriadas diariamente em ágar tripticase de soja (TSA) e incubadas a 37°C/24h, para determinar a perda de viabilidade do patógeno. A confirmação da presença de *Salmonella* e da pureza do cultivo ao longo dos 7 dias de experimento foi verificada diariamente por estriamento direto em ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD). Após incubação a 37°C/24h, foi realizada confirmação sorológica das placas que apresentaram crescimento (BAM/FDA, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ácido Acético:

Na presença de 1mg/g de ácido acético, todos os sorotipos avaliados apresentaram fase lag ligeiramente maior que a registrada na curva padrão (sem a adição de ácido), 5h versus 3h. Apesar da menor velocidade de crescimento inicial registrada, 4 dos 5 sorotipos atingiram OD₆₀₀ maiores que às verificadas em suas curvas padrões (**Figura 1**). Na presença de 2mg/g, nenhum sorotipo foi capaz de se desenvolver, contudo permaneceram viáveis durante todo o período de incubação. Nas demais concentrações foi observada inativação do patógeno após 48 a 72h para 3mg/g, 24 a 48h para 4mg/g e 24h para 5 ou 7mg/g. As soluções com concentrações acima de 4mg/g apresentaram valores de pH inferiores ao pKa do ácido acético, ou seja, mais de 50% do ácido estavam na forma não dissociada, propiciando uma maior ação antimicrobiana do mesmo. Considerando apenas a ação do ácido acético, as concentrações atingidas durante o processo fermentativo do cacau, entre 7 e 22,5mg/g (CAMU et al, 2007), seriam suficientes para promover a redução de ao menos 3 ciclos logarítmicos do patógeno.

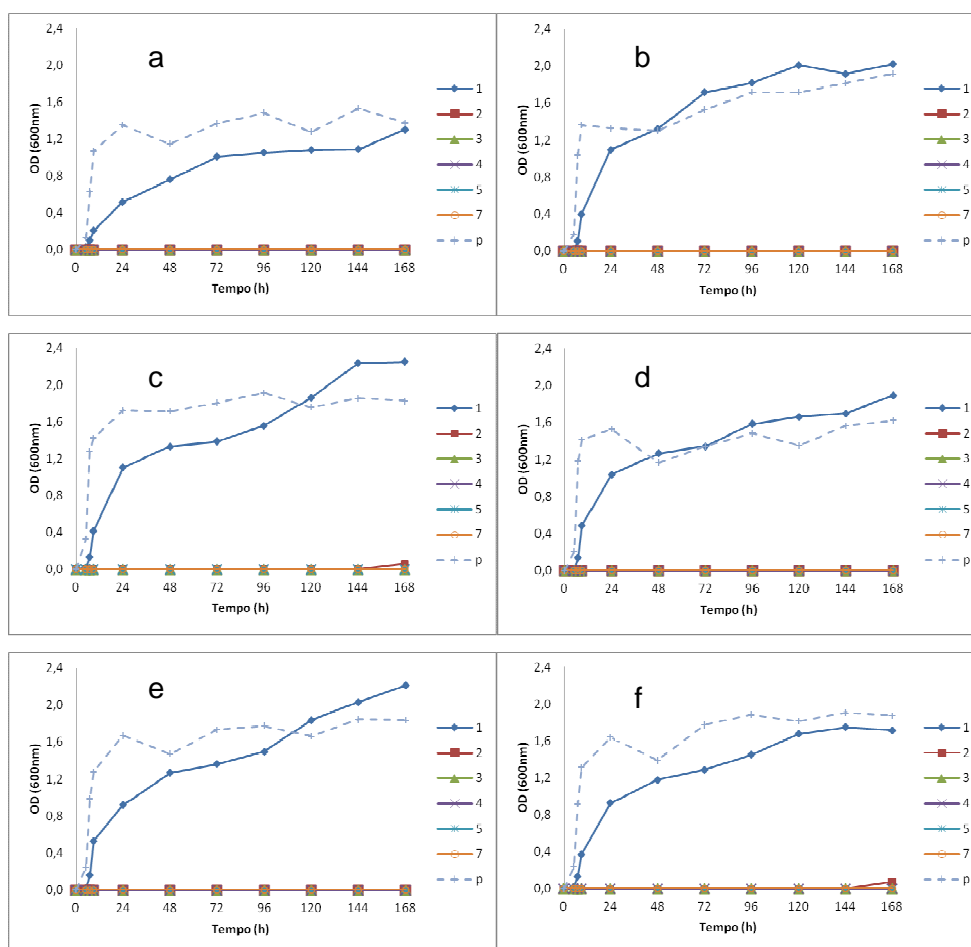


FIGURA 1. Curvas de crescimento de 5 sorotipos de *Salmonella* analisados separadamente e em co-cultivo em caldo BHI suplementado com ácido acético 0mg/g (curva padrão (- - -)), 1mg/g (♦), 2mg/g (■), 3mg/g (▲), 4mg/g (x), 5mg/g (*) e 7mg/g (o). a) S: Senftenberg, b) S: Oranienburg, c) S: Typhimurium, d) S: Enteritidis e) S: Eastbourne, f) Pool (co-cultivo).

Ácido Lático:

Na concentração de 2mg/g de ácido láctico todos os sorotipos apresentaram fase lag menor ou igual a 5h. No final do período de incubação, *S. Enteritidis* e *S. Eastbourne* ultrapassaram o crescimento verificado nas curvas padrões após 96h e 48h de cultivo, respectivamente. Os demais cultivos apresentaram OD próxima a suas respectivas curvas padrões (**Figura 2**). Na solução de ácido láctico 3mg/g, os sorotipos apresentaram comportamento diversificado entre si. Após 5h de fase lag, *S. Senftenberg* e *S. Enteritidis* esboçaram um discreto crescimento entre 0,275 e 0,330nm. Para *S. Oranienburg* após um pequeno crescimento ocorrido durante as primeiras 24h foi observada uma fase estacionária (sem crescimento) até 96h, seguido então pela retomada do crescimento com OD₆₀₀ final de 1629nm. As curvas de *S. Typhimurium*, *S. Eastbourne* e do pool apresentaram o mesmo traçado, com

crescimento linear e praticamente contínuo até 168h. Nas concentrações de 4, 5 e 7mg/g, nenhum sorotipo apresentou crescimento, sendo observada perda de viabilidade das células após 24h. Baseando-se apenas nos resultados obtidos neste estudo, as concentrações de ácido láctico registradas por Camu et al (2007), durante estudos de fermentação de cacau, seriam suficientes para inibir o crescimento de *Salmonella* no material. Contudo, a produção de ácido láctico é muito variável, podendo em alguns casos ser detectado em níveis abaixo de 4mg/g (Papalexandratou et al, 2011), nestas concentrações não há inibição significativa do patógeno.

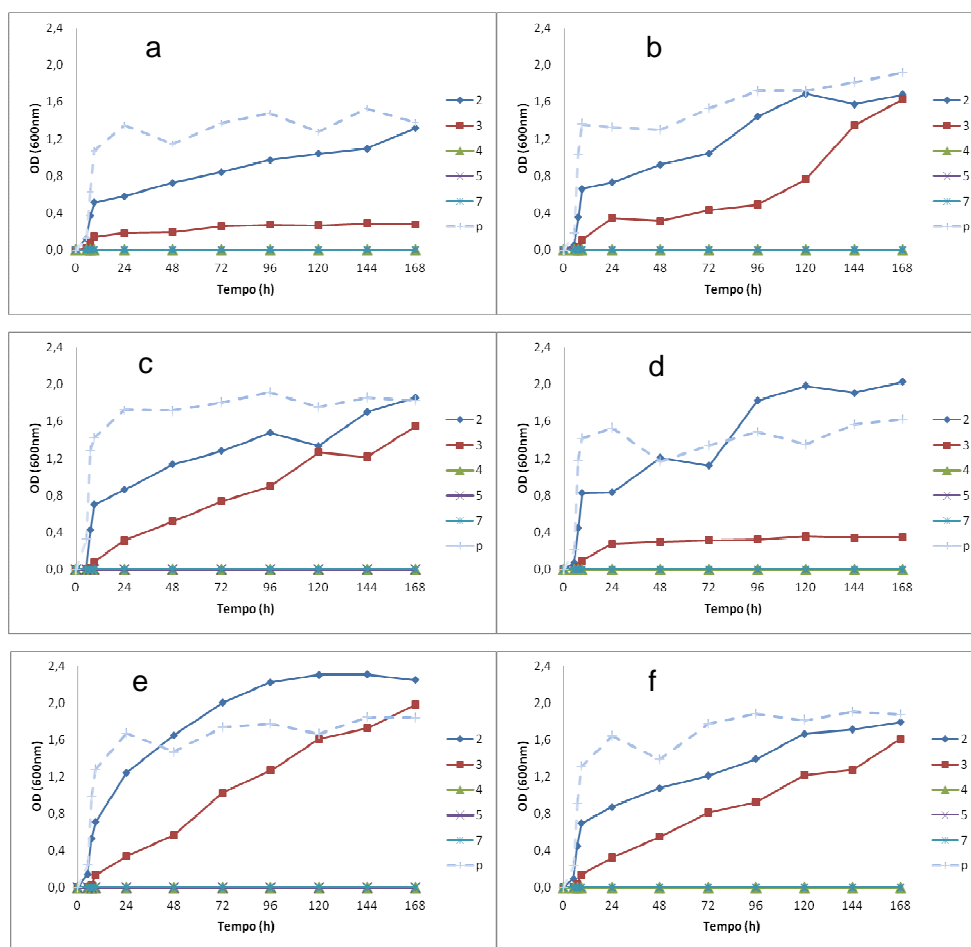


FIGURA 2. Curvas de crescimento de 5 sorotipos de *Salmonella* analisados separadamente e em co-cultivo em caldo BHI suplementado com ácido láctico 0mg/g (curva padrão (- - -)), 2mg/g (♦), 3mg/g (■), 4mg/g (▲), 5mg/g (×) e 7mg/g (*). a) S: Senftenberg, b) S: Oranienburg, c) S: Typhimurium, d) S: Enteritidis e) S: Eastbourne, f) Pool (co-cultivo).

Ácido Cítrico:

Na avaliação da sensibilidade ao ácido cítrico, o sorotipo *S. Senftenberg* foi o que apresentou a maior resistência, enquanto que *S. Eastbourne* foi o sorotipo mais

sensível. A presença de 2mg/g de ácido cítrico no meio de cultivo promoveu um crescimento em nível maior que o observado na ausência do ácido para todos os sorotipos avaliados (**Figura 3**). A 4mg/g todos os sorotipos apresentaram comportamento semelhante, com discreto crescimento observado entre 9 e 24h. Na presença de 5mg/g foram registradas OD₆₀₀ entre 0,160 e 0,318nm após 168h. Na concentração de 6mg/g foi observado crescimento apenas de S. Senftenberg e do pool. Para os demais sorotipos foi verificada perda total de viabilidade após 24 a 48h na presença de 6mg/g. O mesmo foi obtido para todos os sorotipos após 24 a 48h para 7mg/g e após 24h para 10mg/g. De acordo com os resultados obtidos e com os relatos de Camu et al. (2007) e Papalexandratou et al (2011) a concentração inicial de ácido cítrico presente na polpa de cacau seria suficiente para inibir o desenvolvimento de *Salmonella* durante as primeiras 48h de fermentação.

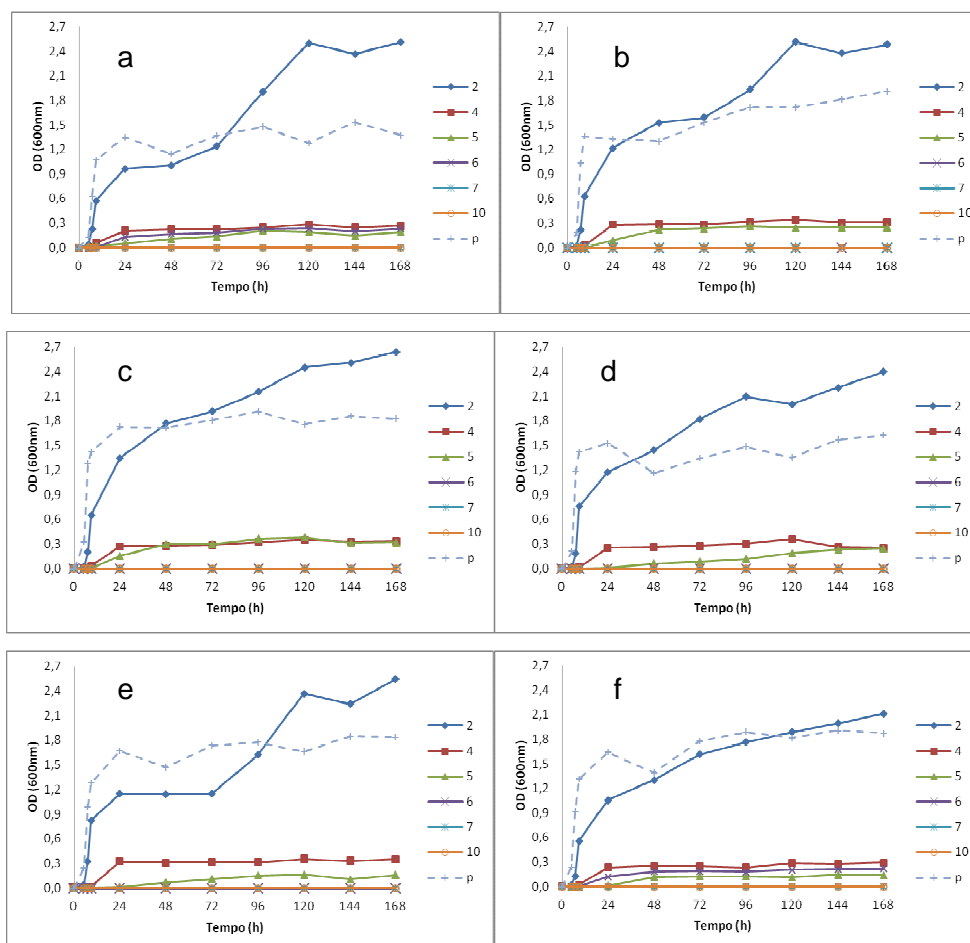


FIGURA 3. Curvas de crescimento de 5 sorotipos de *Salmonella* analisados separadamente e em co-cultivo em caldo BHI suplementado com ácido cítrico 0mg/g (curva padrão (- - -)), 2mg/g (♦), 4mg/g (■), 5mg/g (▲), 6mg/g (×), 7mg/g (*) e 10mg/g (o). a) S: Senftenberg, b) S:Oranienburg, c) S: Typhimurium, d) S: Enteritidis e) S: Eastbourne, f) Pool (co-cultivo).

Etanol:

Na concentração de 5%, foi observado crescimento a partir de 15h para os sorotipos S. Oranienburg S. Eastbourne e para o pool, os demais apresentaram crescimento a partir de 24 e 48h. Na concentração a 6%, foram observados crescimentos após 72 a 120h, para todos os sorotipos (com exceção de S. Eastbourne) foi verificado crescimento inicial seguido de ligeira perda de viabilidade. Nas concentrações de 7 e 10%, todos os sorotipos foram completamente inativados após 24 a 48h (**Figura 4**). De acordo com Camu et al (2007) e Papalexandratou et al (2011) os níveis de etanol encontrados na fermentação de cacau, variam de 0,1 a 2%, nesta concentração o etanol não apresenta ação antimicrobiana significativa sobre a *Salmonella*.

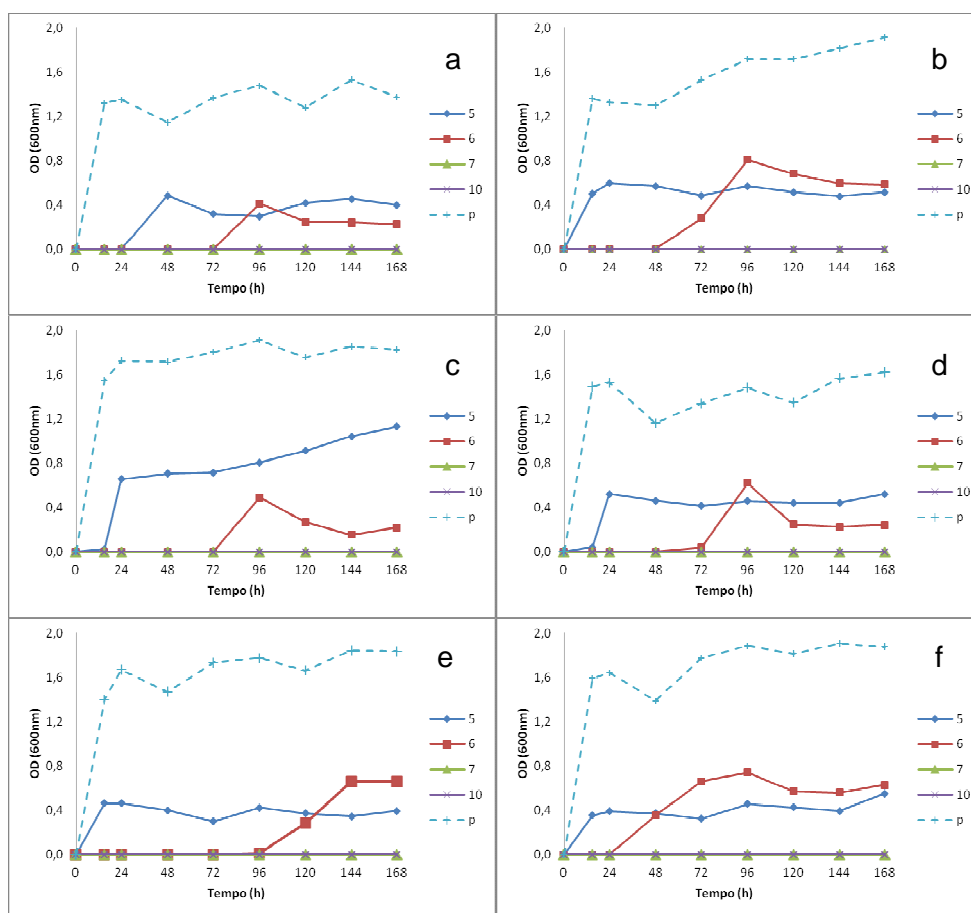


FIGURA 4. Curvas de crescimento de 5 sorotipos de *Salmonella* analisados separadamente e em co-cultivo em caldo BHI suplementado com etanol 0% (curva padrão (- - -)), 5% (♦), 6% (■), 7% (▲) e 10% (×). a) S: Senftenberg, b) S: Oranienburg, c) S: Typhimurium, d) S: Enteritidis e) S: Eastbourne, f) Pool (co-cultivo).

CONCLUSÃO

As máximas concentração de ácidos orgânicos encontradas durante a fermentação do cacau seriam capazes de promover a inibição de *Salmonella*, caso o pH do meio não sofresse alteração ao longo do processo. Contudo, quando presentes em baixa concentração, os ácidos orgânicos poderiam favorecer o crescimento do patógeno. O etanol, por sua vez, nas concentrações presentes na fermentação do cacau não apresenta ação antimicrobiana efetiva sobre a *Salmonella*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA Microbiologia – ITAL, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, W.H.; HAMMACK, T.S. **BAM: Bacteriological Analytical Manual Online 2005**. Chapter 5: *Salmonella*, november 2011 version. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm>>, acesso em 20 jan. 2012.
- CAMU, N.; WINTER, T.; VERBRUGGHE K.; CLEENWERCK I.; VANDAMME P.; TAKRAMA, J.S.; VANCANNEYT e M., VUYST, L. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.6, p.1809-1824, 2007.
- LEYER, G.J; JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.6, p.1842-1847, 1993.
- PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N.; FALONY, G.; DEVUYST, L. . Comparison of the Bacterial Species Diversity of Spontaneous Cocoa Bean Fermentations Carried out at Slected Farms in Ivory Coast and Brazil. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.964-973, 2011.
- 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, n.4, p. 205-221, 2004.
- WERBER, D.; DREESMAN, J.; FEIL, F.; VAN TREECK, U.; FELL, G.; ETHELBERG, S.; HAURI, A.M.; ROGGENTIN, P.; PRAGER, R.; FISHER, I.S.T.; BEHNKE, S.C.; BARTELT, E.; WEISE, E.; ELLIS, A.; SIITONEN, A.; ANDERSSON, Y.; TSCHÄPE, H.;



KRAMER, M.H.; AMMON, A. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n.7, p.7-17, 2005.