



MODELAGEM DA SOBREVIVÊNCIA DE *SALMONELLA* DURANTE AS ETAPAS DE CONCHAGEM E ESTOCAGEM DE CHOCOLATES

Palavras-Chave: [CINÉTICA DE INATIVAÇÃO], [SEGURANÇA DE ALIMENTOS], [MICROBIOLOGIA PREDITIVA]

Autores: GABRIELA PEREIRA LEITE [COTUCA/UNICAMP], NATALIA SOARES DOS SANTOS [COTUCA/UNICAMP], SAMARA COLIS DANTAS [COTUCA/UNICAMP], CAROLINE HECKLER [FEA/UNICAMP], LARISSA PEREIRA MARGALHO [FEA/UNICAMP], VERÔNICA ORTIZ ALVARENGA [FAFAR/UFMG]; ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA [FEA/UNICAMP]

Profs. ARTHUR Kael RODRIGUES DA PIA e IZABEL GRESSONI JÚNIOR (orientadores) [COTUCA/UNICAMP]

1. INTRODUÇÃO

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um alerta a respeito da contaminação de *Salmonella* em mais de 150 pessoas após consumirem um chocolate contaminado produzido na Bélgica. Sendo as crianças com menos de 10 anos as mais afetadas, com cerca de 89% dos casos (Buogo, 2022). O patógeno conseguir sobreviver em alimentos de baixa atividade de água (Germano, 2008) é um fator preocupante para a indústria alimentícia, visto que a salmonelose pode levar a óbito.

A RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005, define chocolate como o produto obtido a partir da mistura da massa do cacau (*Theobroma cacao* L.) com outros ingredientes, o qual deve conter, no mínimo, 25% de sólidos totais de cacau. Os três principais tipos de chocolate são: chocolate ao leite, o qual contém açúcar, manteiga de cacau, líquido de cacau e leite em pó; chocolate branco, que não possui líquido de cacau; e chocolate amargo, que não contém leite em pó na formulação (Afoakwa et al., 2007). As etapas de processamento do chocolate consistem na mistura dos ingredientes, refino, conchagem, temperagem, moldagem, embalagem e estocagem (Lannes, 1997). Na conchagem, o chocolate passa por aquecimento e agitação objetivando melhorias sensoriais do produto (como aumento de brilho e viscosidade, evaporação de *off-flavours* e redução de umidade) sendo a temperatura do processo dependente do chocolate, variando de 50 a 80° por 6 a 72 horas (Beckett, 2008). Mesmo que a população microbiana no produto possa ser reduzida no processo pela aplicação de calor, esse não é o propósito da conchagem (Brasil, 2005; do Nascimento et al., 2011).

Salmonella é uma bactéria gram-negativa, com formato de bastonete, mesófila, aeróbia

facultativa, móvel, não formadora de esporos e pertencentes à família das enterobacteriaceae. Encontradas principalmente no trato gastrointestinal de humanos e animais. É um dos principais agentes etiológicos envolvidos em Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA's), podendo causar febre tifóide, febre entérica e salmoneloses, cujos principais sintomas envolvem diarreias, vômitos e febre moderada. Sendo responsável pela contaminação de diferentes matérias primas e alimentos processados através de, por exemplo, uma manipulação inadequada.

Em situações de estresse, algumas cepas de *Salmonella* são capazes de alterar sua morfologia e fisiologia de modo a tornar-se mais resistente nestes ambientes inóspitos (Dias, 2014). Assim, devido a baixa atividade de água e o alto teor lipídico (maior que 20%) característico do chocolate, torna concreta a possibilidade da presença do patógeno no produto final, colocando em risco a saúde do consumidor (Shinohara et al., 2007; do Nascimento et al., 2011; da Silva et al., 2019). Nisso se dá a relevância da avaliação do comportamento da *Salmonella* durante as etapas do chocolate, realizá-la através da microbiologia preditiva.

A microbiologia preditiva é uma área que utiliza instrumentos estatísticos e computacionais para gerar modelos matemáticos que preveem o comportamento de um microrganismo sob estabelecidas condições extrínsecas ou intrínsecas dos alimentos (Dannenhauer, 2010). Os modelos podem ser classificados como primários e secundários. Um primário é aquele que descreve respostas microbianas em função do tempo, podendo ser retratados através de, por exemplo, curvas de inativação ou crescimento (de Oliveira et al., 2013). Já os secundários descrevem como as variáveis independentes (pH, a_w , temperatura etc)

afetam os parâmetros dos modelos primários (de Oliveira et al., 2013).

Os modelos de inativação microbiana variam a depender do microrganismo, podendo ser de modelos cinético de primeira ordem, o qual a morte microbiana, isso é, a perda irreparável da sua capacidade de reprodução, se dá de forma exponencial, ou seja, de forma log-linear (de Matos, 2013). Como existem modelos log não-lineares, como o de Weibull, bifásico e ombro. Nestes, leva-se em consideração a diferença da resistência na população de células caso a inativação não se dê homoganeamente (de Matos, 2013).

Visando o risco à saúde que a contaminação de *Salmonella* no chocolate pode trazer ao consumidor, o objetivo deste trabalho é avaliar a sobrevivência do patógeno durante a etapa de conchagem dos chocolates. Ademais, selecionar mediante geração de parâmetros cinéticos de inativação, duas cepas com maior resistência térmica dentre 12 diferentes cepas, avaliando também quantitativamente o efeito da temperatura e da matriz (chocolate ao leite, amargo e branco) na sobrevivência de *Salmonella*.

2. METODOLOGIA:

2.1 Obtenção e ajuste das suspensões de *Salmonella*

Para este estudo foram utilizadas 12 diferentes cepas de *Salmonella*: S. Typhimurium 87.09; 4,5.12:i 297; S. Anatum 216.05; S. Anatum 214.05; 5,4,5.12:i 298; S. Agona 81.05; S. Concord 5,7.11/07; S. Infantis IOC2494/99; S. Enteritidis S2888; S. Enteritidis S2784; S. Saint Paul 126.05 e S. Seftemberg S87.

Para realização dos experimentos, inicialmente as cepas eram individualmente ativadas em 10 ml de Caldo Tripton de Soja (TSB) e incubadas a 37 °C/24 h, sendo posteriormente repicadas sob mesmas condições. Em seguida, as culturas eram transferidas para 90 ml de TSB e incubadas a 37°C em shaker a 150 rpm *overnight*. As suspensões obtidas eram centrifugadas separadamente (4 °C/10 min a 3000 x g) e os pellets resultantes eram lavados com o tampão fosfato salina (PBS, pH= 7,40±0,20) por três vezes. Então, os pellets finais eram ressuspensos em PBS e, através do espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm), ajustados até a quantidade de células desejada de modo a obter uma população inicial de 10⁶ UFC/g após a inoculação.

2.2 Formulação e processamento das bases de chocolate

Para a realização dos experimentos, padronizou-se a formulação do chocolate ao leite (CL), chocolate amargo (CA) e chocolate branco (CB) de acordo com a tabela 1. Após pesagem dos ingredientes, a manteiga era fundida (55 °C) e os ingredientes, exceto emulsificantes (lecitina e PGPR), passavam por pré-refino em um mixer culinário. O produto resultante era refinado em laminador de massas, repetindo-se o processo por 10 vezes após a menor distância entre os rolos ser atingida. Para a etapa de conchagem, a massa era adicionada, sob condições assépticas, em um reator de aço inox encamisado acoplado a um banho ultratermostatizado e misturado por agitadores mecânicos durante 15 minutos. Passado o tempo, eram acrescentados os emulsificantes e após 15 minutos, considerava-se o chocolate adequado para início do experimento e para coleta de amostra para as análises físico-químicas.

Tabela 1 – Formulação dos chocolates

Ingrediente	Chocolate ao leite (%)	Chocolate amargo (%)	Chocolate branco (%)
Líquor de cacau	16	55	–
Manteiga de cacau	20,1	10,1	25,1
Açúcar refinado	46	34,2	54,2
Leite em pó integral	13	–	20
Leite em pó desnat.	4,2	–	–
Lecitina de soja	0,4	0,4	0,4
PGPR ¹⁾	0,3	0,3	0,3

Fonte: Lucas et al, 2019. [1] polirricinoleato de poliglicerol

2.3 Seleção das cepas de maior resistência térmica

Para este experimento, foi utilizado somente CL. Após a preparação da base do chocolate, deixava-se o reator a 60 °C até adicioná-lo na conchagem. Depois de 15 minutos da adição, o alimento era transferido do reator para sacos estéreis, onde eram individualmente inoculados (10⁶ UFC/g) com as suspensões de *Salmonella* e homogeneizados em stomacher por 1 minuto no modo *fast*. Depois, eram fracionadas amostras de 25 g em novos sacos estéreis e os mesmos eram submetidos ao tratamento térmico em banho-maria (50, 55 ou 60 °C) por 6 horas. Para a quantificação da população inicial (N₀) e final (N_f) do patógeno, eram adicionados 225 ml de PBS pré-aquecido (42 °C) na amostra. Após 25 minutos de descanso e nova homogeneização em stomacher, nas mesmas condições, a amostra era submetida à diluição seriada em PBS. A quantificação foi realizada por filtração de 10 mL de amostra em membrana (0,45 µm), seguida de plaqueamento em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e incubação a 37 °C/48 h.

2.4 Determinação da cinética de inativação

Foi realizado o experimento de determinação da cinética de inativação com as cepas que apresentaram maior resistência térmica (*Salmonella* Agona 81.05 e *S. Typhimurium* 87.09).

Após preparo da base de chocolate (tabela 1), eram retirados 50 g de amostra do reator (este já com a temperatura que seria trabalhada) para inoculação da suspensão de *Salmonella* (10^6 UFC/g). Após a reintrodução da amostra ao sistema de conchagem, dava-se início a contagem de tempo do processo. A cinética de inativação microbiana era monitorada através de coletas, em intervalos de tempo pré-definidos, de 10 g de amostra em sacos estéreis. Os experimentos foram conduzidos para cada cepa (n=2), em cada chocolate (CL, CB ou CA), sob diferentes temperaturas de conchagem (50, 60 ou 70 °C), considerando-se a realização de duplicatas independentes. Deste modo, totalizaram-se 36 ensaios distintos.

Para a quantificação da população microbiana em CL, cada amostra coletada era adicionada de 90 mL de PBS pré-aquecido (42 °C), aguardavam-se 25 minutos e, em seguida, homogeneizava-se em stomacher por 1 minuto (modo *fast*). Posteriormente, a amostra era submetida a diluição seriada em PBS e filtração em membrana (0,45µm), com plaqueamento em ágar XLD. As placas eram incubadas a 37 °C/48 h.

Já para a quantificação de *Salmonella* em CB e CA, adotou-se como diluente leite desnatado com 1% de verde brilhante (Salfinger, 2015), sendo a diluição seriada feita em água peptonada 0,1% e o plaqueamento por *pour plate* em Tryptic Soy Agar (TSA). Destaca-se que a escolha de diferentes métodos de quantificação foi baseada em testes preliminares.

2.5 Análises físico-químicas

Para medição de pH, era utilizado pHmetro digital de bancada sendo a amostra previamente dissolvida em água destilada (1:10). O diâmetro de partícula era determinado com auxílio de micrômetro após dispersão de uma pequena quantidade de chocolate em óleo vegetal. E, por fim, a determinação da a_w era realizada em AquaLab®. Todas as aferições foram conduzidas em triplicatas.

2.6 Tratamento de dados e análise estatística

Para os experimentos de seleção das cepas, foi calculado, em cada temperatura, o número de reduções decimais dos microrganismos através da relação: $\gamma = \log N_0 - \log N_t$, onde N_0 é a população inicial (UFC/g) e N_t , população final

(UFC/g). Posteriormente, para verificação da diferença significativa da inativação entre as cepas, submeteu-se os resultados a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para descrição das curvas de inativação de *Salmonella* foi adotado o modelo de Weibull (equação 2), descrito por Mafart et. all (2002), adequado para cinéticas do tipo não log-lineares. Os ajustes foram realizados pelo add-in GInaFit para Microsoft Excel®.

$$\log N(t) = \log N_0 + (t/\delta)^p \text{ (Eq.2)}$$

onde: $N(t)$: quantidade de microrganismo no tempo t ; $N(0)$: quantidade da população inicial de microrganismo; t : tempo; δ : tempo para redução microbiana em 1 ciclo-log; p : parâmetro de curvatura (adi. Fonte: Mafart; Gaillard; Leguerinel (2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 apresenta os resultados do número de reduções decimais após a realização do experimento de seleção de cepas em três diferentes temperaturas.

Tabela 2 - Número de Reduções (logUFC/g) por cepa de *Salmonella* em chocolate após 6 h sob diferentes temperaturas.

Microrganismo	50 °C	55 °C	60 °C
4.5.12:i 297	2,22±0,26 ^{Ab}	2,93±0,15 ^{ABab}	4,38±0,16 ^{Aa}
S. Agona 81.05	1,99±0,73 ^{Aa}	2,42±0,42 ^{Aa}	3,00±0,46 ^{Aa}
S.Typhimurim 87.09	1,69±0,40 ^{Ab}	2,31±0,20 ^{Ab}	3,74±0,49 ^{Aa}
S. Concord 5,7.11-07	2,13±0,14 ^{Ab}	2,73±0,11 ^{ABa}	3,17±0,08 ^{Aa}
S. Infantis IOC 2494/99	2,27±0,05 ^{Ab}	3,15±0,53 ^{ABab}	4,24±0,08 ^{Aa}
S. Enteritidis S2888	2,37±0,73 ^{Aa}	3,45±0,34 ^{Ba}	4,32±0,04 ^{Aa}
S. Seftenberg S87	3,39±0,70 ^{Aa}	3,43±0,19 ^{ABa}	3,84±0,78 ^{Aa}
S. Enteritidis 52784	2,27±0,74 ^{Aa}	3,43±0,40 ^{ABa}	3,34±1,53 ^{Aa}
S. Anatum 216.05	2,80±0,32 ^{Aa}	3,33±0,89 ^{ABa}	4,01±1,31 ^{Aa}
5.4.5.12:i 298	2,76±0,13 ^{Aa}	3,12±0,06 ^{ABa}	4,53±1,04 ^{Aa}
S. Saint Paul 126.05	2,51±0,25 ^{Ab}	3,38±0,10 ^{ABa}	4,44±0,72 ^{Aa}
S. Anatum 214.05	2,27±0,40 ^{Aa}	3,20±0,03 ^{ABa}	4,02±0,01 ^{Aa}

Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as cepas ($p < 0,05$). Letras minúsculas iguais em uma mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as temperaturas ($p < 0,05$).

Ao observarmos a tabela 2, em relação a diferença entre as cepas podemos destacar que a 50 °C e a 60 °C não houve diferença entre as reduções decimais de nenhuma das doze cepas analisadas, a 55°C, de outro modo, as cepas S. Agona 81.05 e S. Typhimurium 87.09 obtiveram diferença em relação às outras cepas, apresentando menores valores de reduções decimais, ou seja, foram as mais resistentes a essa temperatura. E a

Salmonella Enteritidis (S2888) também apresentou diferença significativa em relação às outras cepas, apresentando essa a maior redução decimal a 55°C.

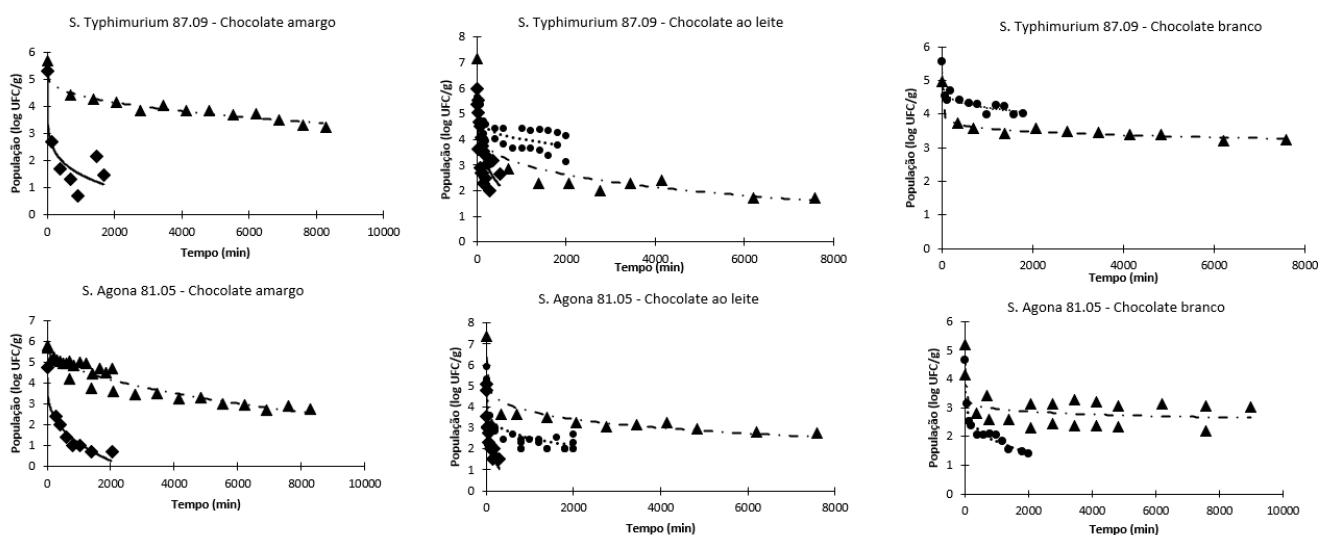
Comparando os resultados obtidos entre temperaturas para cada cepa individualmente, temos que a *S. Agona* (81.05), *S. Enteritidis* (S2888), *S. Seftemberg* (S87), *S. Enteritidis* (52784), *S. Anatum* (216.05), 5.4,5.12:i (298) e *S. Anatum* (214.05) não apresentaram diferença em nenhuma das temperaturas analisadas. As cepas de código *S. Typhimurium* (87.09) e *S. Infantis* IOC (2494/99) apresentaram diferença significativa ao compararmos o número de reduções decimais entre as temperaturas de 50°C e 60°C. A diferença significativa entre 60°C e as duas temperaturas remanescentes ocorre com *S. Typhimurium* (87.09),

e a temperatura de 50°C diferencia das demais temperaturas para *S. Concord* (5,7.11-07).

Analisando o número de reduções decimais das doze cepas utilizadas neste primeiro experimento, *S. Agona* (81.05) e a *S. Typhimurium* (87.09) foram as cepas que obtiveram os menores números de reduções decimais em todas as três temperaturas escolhidas para o experimento. Isso significa que foram as mais resistentes das doze, sendo então, selecionadas para a de cinética de inativação durante o processo de conchagem.

Para o tratamento de dados da cinética de inativação, foi escolhido um modelo de ativação não-linear. Dentre os disponíveis, o modelo de Weibull apresentou bom ajuste em todas as curvas de inativação obtidas nas matrizes do chocolate ao leite e do chocolate branco (ambos com R² acima de 0,90), que podem ser observados na Figura 1.

Figura 1 - Cinética de inativação de *S. Typhimurium* (87.09) e *S. Agona* (81.05) durante conchagem de diferentes tipos de chocolate sob diferentes temperaturas



Símbolos indicam a população de salmonella sobrevivente em função do tempo de conchagem a 50°C (▲) 60°C (●) e 70°C (◆). Curvas indicam os modelos de Weibull ajustados.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos do modelo primário

Matriz	Temperatura (°C)	<i>Salmonella Typhimurium</i> 87.09			<i>Salmonella Agona</i> 81.05		
		δ	p	R ²	δ	p	R ²
Chocolate amargo	50	1809,57	0,39	0,9176	1561,71	0,32	0,8335
	60	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	70	1,12	0,19	0,8404	33,2	0,34	0,9527
Chocolate ao leite	50	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	60	44,07±25,02	0,18±0,01	0,9212±0,0193	2,46±1,73	0,17±0,04	0,9549±0,0273
	70	26,82±17,64	0,44±0,10	0,9072±0,0644	6,73±4,41	0,35±0,01	0,9674±0,0440
Chocolate branco	50	33,05	0,10	0,983	20,98±4,62	0,11±0,01	0,9711±0,0209
	60	129,65	0,15	0,9246	6,07	0,19	0,9689
	70	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)

(1) Experimentos ainda em fase de realização.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químico dos chocolates

Matriz	Diâm. de partícula (µm)	Aw	pH
Chocolate ao leite *	126±19	0,473±0,057	6,74±0,12
Chocolate ao leite	89±12	0,534±0,189	6,49±0,43
Chocolate amargo	91±20	0,396±0,066	5,93±0,35
Chocolate branco	98±17	0,479±0,176	6,92±0,16

*seleção das cepas de maior resistência térmica. **Determinação da cinética de inativação.

Analisando a figura 1 para a *S. Typhimurium* (87.09), podemos observar que a matriz, interfere no comportamento da cepa, dependendo da temperatura. A 50°C no chocolate amargo a população de *salmonella* resiste mais, assim como no chocolate branco, se compararmos com a terceira matriz, o chocolate ao leite, em que a população chega abaixo de 2 log UFC/g no mesmo período de tempo, 8000 minutos. *S. Agona* também se mantém com a população constante na matriz chocolate branco, chegando em valores mais baixos de população nos outros dois tipos de chocolate, amargo e ao leite.

Ao compararmos a temperatura em uma mesma cepa e matriz, observamos que esta interfere muito na população total de *salmonella*. A 60°C e 70°C o tempo para atingir LMQ é bem curto, ou seja, a população reduz mais drasticamente que a 50 °C. Com isso conseguimos perceber que uma conchagem em maiores temperaturas, como a feita em 70°C tem um efeito bem maior ao reduzir a população de *salmonella* presente no chocolate.

Em relação às cepas, *S. Typhimurium* (87.09) e *S. Agona* (81.05) para o chocolate amargo as curvas apresentam praticamente as mesmas características cinéticas, embora a 70°C *S. Agona* apresente a população bem próxima do LMQ. Para o chocolate ao leite, em ambas temperaturas de 60°C e 70°C a *S. Typhimurium* apresenta caráter mais resistente.

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados foi possível a visualização de que, mesmo entre as cepas mais resistentes (*Salmonella Agona* 81.05 e *S. Typhimurium* 87.09) dentre as 12, há diferença na velocidade de suas inativações, sendo a *S. Typhimurium* 87.09 mais resistente. E, como esperado, a temperatura afetou diretamente a morte do patógeno, de modo que, quanto maior a temperatura aplicada, mais rápido é sua inativação. Bem como a matriz, uma vez que nos resultados obtidos até o momento, a bactéria tem sua inativação mais rápida no chocolate ao leite. Alguns

experimentos ainda estão sendo conduzidos, os dados provenientes deles serão usados para a obtenção de um modelo secundário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOAKWA, E. O. et al. **Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry.** Food Chemistry, Glasgow, v. 113, n. 1, p. 208-215, 2009a
- BECKETT, S.T. 2.ed., **RSC Publishing**, p.103-124, 2008.
- BENICIO, C. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* enterica de origem avícola e atividade antimicrobiana de extratos de própolis.** 2019
- BRASIL. **Regulamento técnico para chocolate e produtos de cacau.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Ministério da Saúde/Diário Oficial da União, Brasília: 23 set. de 2005. Seção 1.
- BUOGO, L. **OMS alerta para presença de *Salmonella* em chocolate.** 2022
- CALATAYUD, M. et al. **Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications.** Food Chemistry, v. 139, n. 1-4, p. 51-58, 2013.
- DANNENHAUER, C.E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva.** 2010. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimento) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DIAS, J. **“Por que a *Salmonella* se torna uma superbactéria quando a Aw é baixa?”.** 2014.
- GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos.** Barueri, SP: Manole, 200, 229- 230; 317p.
- KUMAZAWA, S. H. **“Modelagem da variabilidade da resistência térmica e sobrevivência de *Salmonella* no processo de conchagem e estocagem de chocolate”.** 2017.
- LANNES, S. **“Estudo das propriedades físico-químicas e de textura de chocolates”.** 1997
- MATOS; K. **Inativação microbiana em ostras empregando dióxido de carbono supercrítico.** 2013.
- NASCIMENTO, M. de S. et al. **Enterobactérias em produtos processados de cacau.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 70, n. 1, p. 81-85, 2011.
- SHINOHARA, N. K. S. et al. ***Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos.** Ciência & saúde coletiva, v. 13, p. 1675-1683, 2008.
- OLIVEIRA, A. et al. **Microbiologia preditiva.** 2013
- Salfinger, Y et al. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 2015
- SILVA, I. F. **Enterobactérias na cadeia produtiva do cacau ao chocolate.** 2011.
- WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. **A classification of models for predictive microbiology.** Food Microbiology [online], v. 10, p. 175-177, 1993.