

## Pesquisa de enterobactérias em chocolates

### Detection of enterobacteria in chocolates

RIALA6/1430

Érika Marques REOLON, Aline Regina Barbosa SANTOS, Vanessa Eliane MOREIRA, Maristela da Silva do NASCIMENTO\*

\*Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas/SP, Brasil. E-mail: mnascimento@ital.sp.gov.br. Tel.: (19) 3743-1815; Fax: (19) 3743-1812.

Recebido: 16.11.2010 - Aceito para publicação: 10.01.2012

#### RESUMO

O chocolate é um dos produtos responsáveis pelos maiores surtos de salmonelose em humanos, contudo pouco se sabe sobre a presença de agentes enteropatogênicos em chocolate produzido no Brasil. Neste contexto, este trabalho pesquisou a presença de enterobactérias totais, coliformes, *Escherichia coli* e *Salmonella* em 65 amostras de chocolate (22 ao leite, 22 branco, 17 meio amargo e 4 em pó) comercializadas em Campinas/SP. As amostras apresentaram valores médios de pH entre 5,8 e 7,5 e atividade de água entre 0,31 e 0,59. Não foram isolados coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* nas amostras analisadas. Porém, enterobactérias totais foram detectadas em 22,7% das amostras de chocolate ao leite e branco e em 11,7% das amostras de chocolate meio amargo. Os coliformes totais foram isolados, respectivamente, em 13,6% e 4,5% das amostras de chocolate ao leite e branco. Enterobactérias totais e coliformes não foram detectados nas amostras de chocolate em pó. A contaminação encontrada reforça a necessidade de implementação de rigoroso programa de boas práticas de fabricação pelas indústrias processadoras de chocolate para garantir a segurança microbiológica dos produtos manufaturados.

**Palavras-chaves.** cacau, chocolate, *Salmonella*, *Escherichia coli*.

#### ABSTRACT

Chocolate is one product responsible for causing major outbreaks of salmonellosis in humans, although little is known about the presence of enteropathogens in chocolate produced in Brazil. In this context, the present study investigated the occurrence of total enterobacteria, coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* in 65 samples of chocolate (22 milk chocolate, 22 white chocolate, 17 dark chocolate and 4 chocolate powder) marketed in Campinas/SP. The samples showed mean values of pH from 5.8 to 7.5 and water activity from 0.31 to 0.59. No fecal coliform, *E. coli* and *Salmonella* were isolated from the analyzed samples. Nevertheless, total enterobacteria were detected in 22.7% of milk and white chocolate and in 11.7% of dark chocolate samples. Total coliforms were isolated from 13.6% and 4.5% of milk and white chocolate samples, respectively. Neither total enterobacteria nor total coliforms were detected in chocolate powder samples. These findings reinforce the need for implanting a strict program of good manufacturing practices for chocolate processing to ensure the microbiological safety of these products.

**Keywords.** cocoa, chocolate, *Salmonella*, *Escherichia coli*.

## INTRODUÇÃO

O chocolate é um produto à base de cacau muito apreciado e amplamente consumido em todo o mundo, especialmente por crianças. Em 2007, a produção mundial de chocolate ultrapassou os 4 bilhões de toneladas, sendo os seis maiores produtores Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido, Brasil, França e Itália<sup>1</sup>.

A qualidade do chocolate depende primordialmente da qualidade do cacau, de sua composição físico-química e características sensoriais. Sob o aspecto de saúde pública, os micro-organismos que podem afetar adversamente a qualidade do chocolate são os enteropatógenos, como *Salmonella*.

A União Europeia<sup>2</sup> destaca o chocolate entre os produtos responsáveis pelos maiores surtos de salmonelose em humanos. No Brasil, entre 1999 e 2007, foram reportados 13 surtos de doenças de origem alimentar relacionadas ao consumo de chocolate, totalizando 122 casos, sem registro de óbito. Desses, 2 tiveram seu agente etiológico identificado como *Salmonella* e envolveram 29 pessoas<sup>3</sup>.

A baixa atividade de água (0,3 a 0,5) e o alto teor de gordura (50%) no chocolate dificultam a multiplicação de enteropatógenos. Contudo, ao mesmo tempo, propiciam o aumento da resistência térmica<sup>4,5</sup> e podem contribuir para a redução da dose infectante do patógeno. No caso de *Salmonella*, a literatura reporta doses de 1,1 a 2,8 UFC/g<sup>6</sup>.

As matérias-primas à base de cacau não são os únicos ingredientes que podem introduzir *Salmonella* no chocolate. Entretanto, de acordo com Cordier<sup>7</sup>, as amêndoas de cacau seriam a principal fonte de contaminação de *Salmonella* para esse tipo de produto. A International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)<sup>8</sup> considera essencial a verificação rotineira da presença deste patógeno nos ingredientes derivados do cacau. Quando esta prática não for possível, análises de *Enterobacteriaceae* totais e coliformes podem fornecer informações sobre as condições higiênico-sanitárias dos produtos e processos. Esses micro-organismos são amplamente utilizados na indústria de alimentos como indicadores de higiene de processo e podem ser monitorados em paralelo para verificar as condições gerais de eficácia.

Apesar do conhecimento da atuação de *Salmonella* como agente etiológico de doenças de origem alimentar transmitidas por chocolate, pouco se sabe

sobre a presença desse patógeno e outras enterobactérias em chocolate produzido no Brasil. Portanto, o objetivo deste estudo foi pesquisar a ocorrência de enterobactérias totais, coliformes, *Escherichia coli* e *Salmonella* em chocolates comercializados em Campinas/SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Foram analisadas 65 amostras de chocolates de 19 marcas comerciais diferentes, sendo 22 amostras de chocolate ao leite, 22 de chocolate branco, 17 de chocolate meio amargo e 4 de chocolate em pó. As amostras foram coletadas no comércio varejista de Campinas/SP entre agosto de 2009 e julho de 2010.

### Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologia da Food and Drug Administration<sup>9</sup>.

Para contagem de enterobactérias, foi utilizado ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), com incubação a 35 °C por 24 horas. Os resultados foram expressos em logaritmo de unidade formadora de colônia por grama (log UFC/g), e o limite de detecção do método foi de 1,0 log UFC/g.

Para coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, o teste presuntivo foi realizado em Lauril Sulfato Triptose. A confirmação de coliformes totais foi feita em caldo Verde Brilhante Bile, com incubação a 35 °C por 48 horas. Para coliformes termotolerantes, foi utilizado caldo EC incubado em banho-maria a 44,5 °C por 24 horas. A confirmação de *Escherichia coli* foi realizada a partir dos tubos de Caldo EC positivos (com produção de gás), utilizando o Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), e posteriormente as provas bioquímicas de indol, Voges-Proskauer, Vermelho de Metila e citrato. Os resultados foram expressos em logaritmo de número mais provável por grama (log NMP/g), e o limite de detecção foi de 0,48 log NMP/g.

Para pesquisa de *Salmonella*, foi realizado pré-enriquecimento em leite em pó desnatado reconstituído a 10%, suplementado com verde brilhante. Para o enriquecimento seletivo, foram empregados os caldos Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetracionato (TT), e para a etapa de plaqueamento os ágar Sulfato de Bismuto (BS), Entérico de Hecktoen (HE) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). A confirmação bioquímica foi realizada utilizando-se primeiramente Ágar Tríplice Açúcar Ferro

inclinado (TSI) e Ágar Lisina Ferro inclinado (LIA). As colônias que apresentaram reações típicas em um ou ambos os testes foram submetidas a confirmação sorológica e provas bioquímicas complementares (Teste de Urease, Vogues-Proskauer, Indol e  $\beta$ -galactosidase). Os resultados foram expressos como presença ou ausência em 25 g de produto.

### Análises físico-químicas

As amostras foram submetidas a análises físico-químicas de determinação de pH e atividade de água. Para a análise de pH, 10 g das amostras foram triturados e adicionados a 100 mL de água deionizada. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 20 minutos em misturador, e a leitura foi feita em pHmetro calibrado<sup>10</sup>.

A atividade de água de cada amostra foi determinada em duplicata, com o auxílio de um higrômetro (Aqua Lab 3TE, Braseq, Brasil). As amostras foram maceradas, levadas a estufa de 25 °C para estabilização da temperatura e, então, submetidas a leitura.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados médios referentes à determinação do pH e da atividade de água de 65 amostras de chocolate de 19 diferentes marcas coletadas no varejo de Campinas/SP. As amostras de chocolate ao leite apresentaram atividade de água média de 0,44 e pH de 6,5. No chocolate branco, foram verificados atividade de água de 0,44 e pH de 6,7. Para o chocolate meio amargo, foram obtidos atividade de água de 0,42 e pH de 6,1. A atividade de água das amostras de chocolate em pó foi de 0,49, com pH de 7,1, valores ligeiramente superiores aos observados para as amostras em barra.

**Tabela 1.** Determinação de pH e atividade de água em chocolates comercializados em Campinas/SP

Produto	pH*	Atividade de água*
Chocolate ao leite	6,5 ± 0,2	0,44 ± 0,07
Chocolate meio amargo	6,1 ± 0,4	0,42 ± 0,07
Chocolate branco	6,7 ± 0,1	0,44 ± 0,06
Chocolate em pó	7,1 ± 0,2	0,49 ± 0,04

\* Média ± desvio padrão.

A baixa atividade de água (< 0,60) induz consumidores e indústrias a considerarem o chocolate um produto de baixo risco microbiológico. Contudo, apesar de limitar o desenvolvimento microbiano, esta

condição não impede a sobrevivência de bactérias no produto<sup>11</sup>.

Existem escassos relatos na literatura sobre a contaminação de chocolate por membros da família *Enterobacteriaceae*, como coliformes e *Salmonella*. Torres-Vitela et al.<sup>12</sup> realizaram no México um estudo no qual foram analisadas 44 amostras de chocolates embalados e 56 de chocolates não embalados quanto à presença de *Salmonella* e coliformes. O estudo revelou a presença de coliformes em 30% das amostras, e *Salmonella* em duas amostras de chocolate embalado. Barrera et al.<sup>13</sup> analisaram 30 amostras de chocolate comercializado na Espanha. Não detectaram *Salmonella*, porém duas amostras (6,7%) apresentaram *E. coli*.

Neste estudo, nenhuma das 65 amostras analisadas apresentou contaminação por coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella*, estando, portanto, de acordo com a legislação vigente<sup>14</sup>. Porém, apesar da ausência de *Salmonella*, as amostras apresentaram contaminação por enterobactérias totais e coliformes totais. Cinco (22,7%) das 22 amostras de chocolate ao leite apresentaram enterobactérias totais, com contagem média de 1,7 log UFC/g e máxima de 3,6 log UFC/g, e 13,6% (3/22) das amostras continham coliformes totais (1,1 log NMP/g). As amostras de chocolate branco apresentaram o mesmo percentual de contaminação que o chocolate ao leite por enterobactérias (22,7%), com contagem média de 1,2 log UFC/g; com relação aos coliformes totais, apenas 1 amostra (4,5%) apresentou contagem acima do limite de detecção do método (0,6 log NMP/g). Dentre as 17 amostras de chocolate meio amargo analisadas, 2 (11,7%) apresentaram contaminação por enterobactérias (1,4 log UFC/g), e em nenhuma foram detectados coliformes totais. Já nas amostras de chocolate em pó, não foi observada contaminação por nenhum grupo microbiano avaliado (Tabela 2).

A detecção de membros da família *Enterobacteriaceae* em 20% das amostras com contagem superior à recomendada pelo ICMSF<sup>8</sup>, ou seja,  $\geq 1$  log UFC/g, indica a ocorrência de alguma falha nos programas de qualidade, no processo térmico ou na sanitização. Condições que permitam a contaminação e a permanência de enterobactérias totais e coliformes no produto acabado também possibilitam uma eventual contaminação por patógenos como *Salmonella*. Este fato preocupa do ponto de vista de saúde pública, visto que falhas de limpeza e de Boas Práticas de Fabricação já foram identificadas como causa de surtos de salmonelose

**Tabela 2.** Pesquisa de enterobactérias em chocolates comercializados em Campinas/SP

Tipo de Chocolate	Contaminação microbiológica									
	Enterobactérias totais		Coliformes totais		Coliformes termotolerantes		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i>	
	Amostras positivas (%)	Contagem (log UFC/g)*	Amostras positivas (%)	Contagem (log NMP/g)**	Amostras positivas (%)	Contagem (log NMP/g)**	Amostras positivas (%)	Contagem (log NMP/g)**	Amostras positivas (%)	Presença em 25 g
Ao leite	22,7	1,7 ± 1,1	13,6	1,1 ± 0,8	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente
Meio amargo	11,7	1,4 ± 0,1	0	< 0,5	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente
Branco	22,7	1,2 ± 0,3	4,5	0,6	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente
Em pó	0	< 1,0	0	< 0,5	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente

\* Unidade formadora de colônia. \*\* Número mais provável.

veiculados por chocolate<sup>6,15</sup>. Além disso, outro agravante a ser considerado pelas indústrias processadoras na implantação e na manutenção de programas de qualidade são as características apresentadas pela *Salmonella* neste tipo de produto, como baixa dose infectante (1 UFC/g)<sup>6</sup>, alta resistência térmica<sup>5</sup> e longa permanência no ambiente e no produto<sup>16</sup>.

## CONCLUSÃO

O controle tanto da matéria-prima quanto do processo é considerado essencial na prevenção de patógenos em chocolate. Apesar da ausência de *Salmonella*, 20% das amostras apresentaram contaminação por enterobactérias. Baseado neste contexto, fica claro que as indústrias processadoras de chocolate devem manter um rigoroso programa de boas práticas de fabricação para garantir a segurança microbiológica dos produtos.

## REFERÊNCIAS

1. ICCO (International Cocoa Organization) Annual Report 2007/2008. [acesso 2012 jul 12]. Disponível em: [http://www.icco.org].
2. EC (European Commission). *Salmonella* in Foodstuffs. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health, 2003. [acesso 2006 nov 22]. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66\_en.pdf].
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidação de surtos e emergências em saúde pública. COVEHMS. Sistema de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. [acesso 2009 jun 20]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
4. Podolak R, Enache H, Stone W, Black DG, Elliot P. Sources and Risk Factors for Contamination, Survival, Persistence, and Heat Resistance of *Salmonella* in Low – Moisture Foods. *J Food Prot*. 2010;73(10):1919-36.
5. Izurieta WP, Komitopoulou E. Effect of moisture on *Salmonella* spp. heat resistance in cocoa and hazelnut shells. *Food Res Int*. 2011; doi:10.1016/j.food.res.2011.09.024.
6. Werber D, Dreesman J, Feil F, Treeck UV, Fell G, Ethelber GS. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infect Diseases*. 2005;5:7-17.
7. Cordier JL. HACCP in the chocolate industry. *Food Control*. 1994;5:171-5.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSE, Microorganisms in Foods 8 – Use of data for assessing process control and product acceptance. Nova York: Springer; 2011.
9. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online, 2005. [acesso 2008 jan 15]. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html].
10. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília: Anvisa; 2005. p. 104-5.
11. Hiramatsu R, Matsumoto M, Sakae K, Miyazaki Y. Ability of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:6657-63.
12. Torres-Vitela R, Escartin EF, Castillo A. Risk of Salmonellosis Associated with Consumption of Chocolate in Mexico. *J Food Prot*. 1995;58(5):478-81.
13. Barrera MC, Blanco MJ, Agut M. Análisis microbiológico de tabletas de chocolate y cacao en polvo. *Alimentaria*. 2001;38(326):71-4.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 10 jan 2001. Seção 1, n. 7-E, p. 45-53.
15. HPA (Health Protection Agency). National increase in human *Salmonella* infections in England and Wales: March to June 2006. *CDR Weekly*. 2006;16(26):1-2.
16. Komitopoulou E, Peñaloza W. Fate of *Salmonella* in dry confectionery raw materials. *J Appl Microbiol*. 2009;106:1892-900.