

**Evaluación de sobrevivencia de *Salmonella*  
spp. en proceso de elaboración de bebida  
tradicional nicaragüense “Pinolillo”**

**Aquileo Daniel González De León Gómez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Evaluación de sobrevivencia de *Salmonella* spp. en proceso de elaboración de bebida tradicional nicaragüense “Pinolillo”**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Aquileo Daniel González De León Gómez**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2019

## **Evaluación de sobrevivencia de *Salmonella* spp. en proceso de elaboración de bebida tradicional nicaragüense “Pinolillo”.**

**Aquileo Daniel González De León Gómez**

**Resumen.** El pinolillo es una bebida tradicional nicaragüense, elaborada principalmente de maíz blanco tostado con el agregado de semillas de cacao tostadas y especias. Los granos de cacao pueden estar contaminados con *Salmonella*. La investigación se enfocó en estudiar la sobrevivencia de *Salmonella* durante el procesamiento de la bebida desde el tostado del cacao hasta el reconstituido final. Se obtuvieron reducciones de 3.26 y 4.98 log UFC/g en la superficie del grano aplicando tratamientos de tostado a 110 °C/60 min y 140 °C/40 min respectivamente. Se determinó que existe contaminación en el interior del grano por ingreso del inóculo y contaminación del grano en el proceso de descascarillado manual. Durante la molienda, el equipo adquiere niveles de contaminación similares al nivel de contaminación del patógeno en el grano. En la fase de reconstitución de la bebida se presentó una reducción de *Salmonella* al reconstituir el pinolillo con leche a 80 °C, obteniendo reducciones de 2.49 log UFC/250 ml para el pinolillo con cacao tratado a 140 °C/40 min y de 2.61 log UFC/250 ml para el pinolillo con cacao tostado a 110 °C/60 min, con respecto al mismo pinolillo reconstituido con leche a temperatura ambiente. Se concluyó que el tostado del grano es una barrera de control, presentando mayor reducción de *Salmonella* en el grano entero al recibir un tratamiento de tostado de mayor temperatura. En el reconstituido se obtuvo menor sobrevivencia de *Salmonella* al reconstituir el pinolillo con leche a 80 °C en comparación al reconstituido con leche temperatura ambiente.

**Palabras clave:** Barrera de control, bebida reconstituida, cacao molido, patógenos, tostado.

**Abstract.** The pinolillo is a traditional Nicaraguan drink, made mainly of white roasted corn with the addition of roasted cocoa beans and spices. Cocoa beans may contain *Salmonella*. The research focused on studying the survival of *Salmonella* during the processing of the beverage from the roasting of cocoa to the final reconstituted. By applying roasting treatments, reductions of 3.26 and 4.98 log CFU/g on the surface of the grain, and roasting at 110 °C/60 min and 140 °C/40 min respectively were obtain. It was determined that there is contamination inside the grain by entry of the inoculum and contamination of the grain in the process of manual husking. During milling, the equipment acquires contamination levels similar to the level of pathogen contamination in the grain. During the drink reconstitution phase, there was a reduction of *Salmonella* reconstituting the pinolillo with milk at 80 °C. In this phase were obtained reductions of 2.49 log CFU/250 ml for the pinolillo with treated cocoa at 140 °C/40 min and 2.61 log CFU/250 ml to the brush with roasted cocoa at 110 °C/60 min, with respect to the same brush reconstituted with milk at room temperature. It was concluded that the roasting of the grain is a control barrier, presenting greater reduction of *Salmonella* in the whole grain when receiving a roasting treatment of higher temperature. In the reconstituted, a lower survival of *Salmonella* was obtained by reconstituting the pinolillo with milk at 80 °C compared to the reconstituted with milk at room temperature.

**Keywords:** Control barrier, grinded cocoa, pathogens, reconstituted beverage, roasting.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>14</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>17</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>17</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Supervivencia de <i>Salmonella</i> (UFC/g) inoculada en cacao durante el tostado y molido. ....	7
2. Recuento de <i>Salmonella</i> spp. en superficie de molino manual después procesar cacao inoculado. ....	10
3. Recuentos de <i>Salmonella</i> (log UFC/250 ml) en pinolillo reconstituído con leche .....	11
Figuras	Página
1. Tipos de poros en el grano de cacao.....	9
2. Imagen de granos de cacao posterior al tratamiento de tostado. ....	9
Anexos	Página
1. Respuesta clínica de adultos a diferentes dosis de desafío con patógenos entéricos. ....	17
2. Resultados de sas estadístico de la fase i.....	17
3. Resustados de sas estadístico de la fase ii .....	18
4. Resultados de sas estadístico de la fase iii .....	18
5. Valores d y z obtenidos de estudio de tostado de cacao .....	17

# 1. INTRODUCCIÓN

El pinolillo es una bebida tradicional nicaragüense elaborada, principalmente de maíz blanco tostado con el agregado de semillas de cacao también tostadas, con especias como canela, pimienta y clavo de olor. El pinolillo tiene una textura ligeramente espesa y arenosa con un olor agradable. Esta bebida es consumida alrededor de Centro América, es una bebida elaborada con dos de los principales cultivos y productos elaborados por los primeros grupos étnicos centroamericanos (Oliverio Celaya 2016). Hoy día el pinolillo es consumido por gran parte de la sociedad nicaragüense siendo su bebida tradicional. El proceso brindado a dicha bebida es un proceso artesanal, sin el uso de tecnologías de procesamiento, ya que en su mayoría es procesada y consumida por población de escasos recursos. Sin embargo, existen en el mercado nicaragüense productos ya industrializados que son comercializados en supermercados de todo el país, estos procesadores no dejan de brindar al producto un procesamiento tradicional.

El cacao y los granos secos en general son afectados por microorganismos patógenos, siendo *Salmonella* la que presenta mayor significancia y prevalencia en estos productos (GMA NUT 2010). Salmonelosis es una de las cuatro principales enfermedades diarreicas, si bien la mayoría de los casos de *Salmonella* son leves, ésta puede ser algunas veces letal, va depender de los factores del huésped y del serotipo de *Salmonella*. Esta infección causada por alimentos contaminados por la bacteria ha presentado alto índice de mortalidad tanto en niños y jóvenes el cual es mayor, así como personas adultas que pueden ser más resistentes. Ésta presenta serotipos resistentes a los antimicrobianos los cuales afectan a la cadena alimentaria (OMS 2018).

Las principales medidas de control de *Salmonella* son las prácticas de higiene en los alimentos y su cocción. El método más común para reducir los patógenos en los frutos secos es la aplicación de calor, sin embargo, los procesos térmicos validados previamente en alimentos húmedos no se aplican a nueces. Se ha demostrado que *Salmonella* y *Escherichia coli* entero-hemorrágica son más resistentes al calor cuando están presentes en un entorno alimentario seco en muchos casos muchísimo más resistentes al calor (Empress inocuidad de los alimentos 2012).

No existen antecedentes de investigaciones específicas de productos de pinolillo elaborado artesanalmente, probablemente por la falta de conocimientos y tecnologías por parte de los productores de alimentos de países en desarrollo. Existen antecedentes de investigaciones de sobrevivencia de *Salmonella* post cosecha, pero en su mayoría llegan hasta procesos de fermentación y secado (da Silva 2013). Estas investigaciones se han realizado en granos de cacao que serán utilizados para la elaboración de chocolate.

El estudio asegura que el comportamiento de *Salmonella* es dependiente de la etapa del proceso en que ocurre la contaminación.

Según estudios de da Silva (2013), el pH creado durante la fermentación del grano de cacao reduce la concentración de *Salmonella*; y el secado que existe después de la fermentación reduce la *A<sub>w</sub>*, aumentando la sobrevivencia del patógeno.

Existen publicaciones donde se obtuvo reducción de *Salmonella* en el proceso de tostado de cacao. Nascimento (2012) asegura que sometiendo el grano a temperaturas de 150 °C por 30 min con el uso de hornos convección forzada utilizados para el procesamiento de tostado, no existe presencia de la bacteria. Adicionalmente existe una contaminación de granos que contienen una concentración de bacterias considerables, estas pueden contaminar el molino y posteriormente contaminar otros granos que sean inocuos al pasar por el proceso de molienda en la elaboración de otras tandas de producción (Almond Board of California 2014).

La investigación realizada proveerá información tanto para pequeños productores artesanales, así como para productores de gran escala (a nivel industrial). Es importante añadir que esta investigación puede ser aplicada a otros productos de granos que tienen un proceso similar al de esta bebida; todo esto con el fin de brindar a los consumidores productos seguros. La investigación permitirá evaluar si las barreras de control en el proceso del pinolillo, posterior a procesos como la fermentación en el cacao, en la cual presenta una reducción significativa en la concentración microbiana en dicho alimento.

El motivo que se tomó en cuenta para evaluar el proceso de elaboración de la bebida es la búsqueda de alternativas de control para asegurar la inocuidad de una bebida de suma importancia en la dieta de la población nicaragüense. Cabe destacar que esta bebida es artesanal y elaborada con un mínimo de implementación de equipo especializado, debido a que la bebida es manufacturada por pequeñas microempresas con bajo poder adquisitivo de tecnologías, por lo que se busca desarrollar un método que sea técnica y financieramente accesible a esta industria de procesamiento.

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Evaluar la sobrevivencia que tiene *Salmonella* durante todo el proceso de elaboración de la bebida de pinolillo.
- Determinar las medidas de control para *Salmonella* durante el proceso de elaboración de la bebida.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Localización del estudio.**

El estudio se desarrolló principalmente en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ), en el Departamento de Agroindustria Alimentaria en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La institución se ubica en el km 30 en la carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yeguaré, Francisco Morazán, Honduras.

### **Preparación del inóculo.**

El desarrollo de la investigación se realizó en tres fases, debido a que se evaluó la sobrevivencia del patógeno desde el tostado de grano hasta prácticas antes del consumo final de la bebida. Para iniciar el estudio se necesitó que el grano de cacao tuviese contaminación de *Salmonella*, la cual se inóculo artificialmente en laboratorio. La cepa utilizada fue *Salmonella entérica* subsp. serovar Typhimurium con número de referencia ATCC 14028.

El inóculo se elaboró aislando colonias por el método de estriado en placa y posteriormente se tomó una colonia aislada y se incubó por 24 horas en un tubo de ensayo con caldo soya tripticasa (Harris 2012). Debido a que el grano de cacao ya estaba previamente secado listo para el proceso de tostado se utilizó el inoculado en seco. Se tomó el caldo peptonado con el crecimiento de *Salmonella* y mezcló con talco que no presentara ningún compuesto inhibitorio y de pH neutro. Esta mezcla se dejó secar y se tamizó de forma que quedara el inóculo libre de humedad en forma de polvillo (Mich de León 2017).

Posteriormente, se realizó una cuantificación del talco inoculado. Para la cuantificación del inóculo se tomó 0.1 gr del inóculo y se diluyó en 9 ml de buffer fosfato. Posteriormente se realizaron tres diluciones decimales. Cada una de las diluciones fue sembrada en platos petri usando la técnica de doble capa de agar. Los platos Petri utilizados estaban compuesto de dos capas, agar TSA el cual es un medio de crecimiento no selectivo ahí se realizó siembra de las muestras y posteriormente se aplicó una capa de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) el cual es un medio de crecimiento selectivo utilizado en el aislamiento de especies de *Salmonella* y *Shigella*. Los platos inoculados fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Los recuentos se expresaron en log UFC/g.

### **Inoculación de la muestra.**

Posterior a la cuantificación se determinó la cantidad de talco a inocular para obtener la concentración de aproximadamente 6-7 log UFC/g de muestra. Se pesaron 454 g de cacao utilizando una bolsa estéril a los cuales se les inoculó 4.55 g del inóculo seco.

Se realizaron nueve inoculaciones, las cuales representan los tres tratamientos: control, 140 °C/40 min, 110°C/60 min y las tres repeticiones respectivas por tratamiento. Las repeticiones fueron realizadas en días diferentes para obtener resultados significativos.

Para la cuantificación de la muestra inoculada se tomaron 25 g de cacao por bolsa y se diluyó en 25 ml de buffer fosfato. Se homogenizó la muestra por el método de masajeado durante un minuto. Se realizaron diluciones decimales y se sembraron alícuotas de 1 ml en platos Petri con TSA y XLD como se describió anteriormente. Los platos inoculados fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Los recuentos se expresaron en log UFC/g.

### **Tostado de cacao.**

Los granos de cacao inoculados se sometieron al mismo a tratamiento de tostado. Esta fue primera barrera de control que existió en el proceso que se evaluó. Se utilizaron dos siguientes tratamientos: 110 °C por 60 min y 140 °C por 40 minutos. Se utilizó un tratamiento control, el cual fue inoculado con 4.56 g de inóculo en 450 g de cacao, este para comparar las reducciones entre los tratamientos evaluados durante todo el proceso. Se obtuvo el grano de cacao tostado con los dos tratamientos aplicados. Se tomaron muestras de 25 g de cacao tostado entero de cada tratamiento para evaluar el efecto que tuvo el proceso de tostado en el grano de cacao, comparando la concentración de *Salmonella* en el control (sin tratamiento térmico) y concentración posterior después de los dos tratamientos de tostado. Se tomó la diferencia como la reducción obtenida por el tratamiento aplicado.

Para la cuantificación de la muestra se tomaron los 25 g de la muestra y se diluyeron en 25 ml de buffer de fosfato. Se homogenizó la muestra por el método de masajeado y posteriormente se tomaron 10 ml del buffer y se inocularon en tres platos Petri con doble capa de TSA y agar XLD. Los platos inoculados fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Los recuentos se expresaron en log UFC/g.

### **Descascarillado.**

El cacao posterior a su tostado debe recibir un descascarillado debido a que la cáscara le brinda un sabor amargo al producto final. El proceso de tostado facilita y ayuda al fácil desprendimiento de la cáscara del grano. El descascarillado fue realizado en los dos tratamientos de tostado 140 °C por 40 min y 110 °C por 60 min. El control no fue descascarillado debido a que este no es de fácil desprendimiento ya que no fue sometido al proceso de tostado.

### **Molido del grano de cacao.**

Se realizó el molido del grano de cacao utilizando un molino manual artesanal marca Corona, estos molinos son utilizados para la elaboración de la bebida del pinolillo. Se molió el cacao previamente descascarillado, con excepción del control, ya que a este tratamiento no se le extrajo la cáscara debido a que el tostado facilita el descascarillado, y si este no es previamente tostado, la cáscara está adherida al grano. El molino y las partes del molino fueron lavadas y esterilizadas (121 °C/20 min) entre cada tratamiento.

Para la cuantificación de grano molido se tomó una muestra de 10 g de cacao molido, la cual se diluyó en 90 ml de buffer de fosfatos, se realizó el masajeado durante un minuto para la recuperación y homogenización de la muestra. Para la siembra se realizó vaciado en placa, tomando 10 ml de la muestra diluida y se distribuyó en tres platos Petri. Se utilizó al igual la doble capa (TSA-XLD). Los platos sembrados fueron incubados a 35 °C por 24 horas para su respectiva cuantificación. Los recuentos se expresaron en log UFC/g.

#### **Cuantificación de *Salmonella* en el molino.**

La elaboración de muestreo de superficie interna del equipo se realizó con el uso de esponjas de 21 cm<sup>2</sup> (7×3 cm) de tamaño y buffer de fosfatos para facilitar la recuperación bacteriana. Se utilizó 25 ml de buffer los cuales fueron añadidos a la bolsa con la esponja estéril. El área a muestrear del molino fue toda la superficie interna (tolva y tornillo sin fin) y también se muestreo el área de salida del producto con la misma esponja de muestreo.

Para la siembra del muestreo obtenido en la superficie del molino se utilizó el mismo medio de doble capa utilizando TSA y XLD. El método de siembra utilizado fue el mismo que el de cuantificación de grano entero pos tostado. La siembra al igual se tomaron 10 ml y se distribuyó en tres platos Petri. Los platos Petri inoculados fueron incubados a 35 °C por 24 horas para su respectiva cuantificación. Los resultados obtenidos en la siembra de las muestras se expresaron en log UFC/superficie. Se realizó al igual tres repeticiones respectivamente para los tres tratamientos.

#### **Mezcla de cacao molido e ingredientes.**

Previamente al molido de cacao se realizó el molido de maíz blanco que es utilizado en la elaboración de bebida, este fue molido en molino manual artesanal. El maíz blanco molido (315 gr) se mezcló con 20 gr azúcar, 10 gr de canela y 5 gr de pimienta gorda, estos representan el 5% del polvo final de pinolillo. Se realizó la mezcla de cacao molido y mezcla de maíz y especias, la relación de la mezcla fue 1:1 se mezcló 350 g de cacao molido y 350 g de maíz molido y especias. Esta mezcla se realizó para los tres tratamientos y se realizaron tres repeticiones.

#### **Reconstituido.**

La fase del reconstituido fue la última fase del estudio, esta se basó en elaborar la concentración que tiene la bebida antes de ser consumida. Para el reconstituido de la bebida se utilizaron las mezclas de los tres tratamientos para evaluar la presencia final de *Salmonella* en el pinolillo. Se utilizó leche pasteurizada con el cual se elabora la bebida de pinolillo. La mezcla puede ser consumida con leche caliente o a temperatura ambiente Se utilizó leche caliente a 80 °C y a temperatura ambiente (20-25 °C). Para la elaboración del reconstituido se tomaron 20 g de pinolillo y 250 ml de leche, la cual se homogenizó con masajeado y agitación. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Para la cuantificación del fluido se tomó al igual que los otros métodos de cuantificación 10 ml de bebida final los cuales fueron sembrados en tres platos Petri con la capa doble de agar (TSA-XLD). Los platos sembrados fueron incubados a 35 °C por 24 horas para su respectiva cuantificación. Los recuentos se expresaron en log UFC/250 ml bebida. Las muestras que no presentaron colonias visibles en el agar TSA-XLD fueron enriquecidas (incubadas) durante 24 horas y posteriormente sembradas para confirmar presencia o ausencia en los 250 ml de la bebida reconstituida.

### **Diseño experimental.**

Para medir el contenido de *Salmonella* en las diferentes fases se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar, uno por cada fase realizada. En la fase I donde se midió sobrevivencia de *Salmonella*, se utilizó un arreglo factorial 3 × 3, con tres repeticiones. En el arreglo factorial se evaluaron dos tratamientos de tostado y el control, donde se determinó la sobrevivencia de la bacteria en el grano entero, grano molido y cascara para cada uno de los tratamientos.

En la fase II se determinó la contaminación de *Salmonella* del grano en el molino, y se tenía un arreglo de tres tratamientos y un punto de muestreo, con tres repeticiones. En el arreglo factorial se evaluaron los dos tratamientos de tostado y el control, donde se determinó el contenido de *Salmonella* en la superficie interna del molido.

En la fase III se usó un diseño de Bloque Completos al Azar, donde se midió la sobrevivencia de *Salmonella* en la bebida reconstituida con leche (bebida final), con un arreglo factorial 3 × 2, con tres repeticiones. En el arreglo factorial se evaluaron los dos tratamientos de tostado al grano y el control, donde se determinó la sobrevivencia final de *Salmonella* en el pinolillo utilizando leche a 80 °C y leche a temperatura ambiente.

### **Análisis estadístico.**

Se analizaron los resultados de sobrevivencia y contenido de *Salmonella* con el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®). Se realizó un análisis por cada bloque presentado (tres fases). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para identificar significancia del modelo y si existía diferencia estadística entre los tratamientos de tostado, estado de grano, los bloques y la interacción de los mismos (Fase I). En la fase II se identificó si existía diferencia entre la contaminación de los tres tratamientos en el molino y los bloques.

En la Fase III se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar la significancia del modelo y si había diferencia estadística entre los tratamientos de tostado, temperaturas de reconstituido, los bloques y la interacción de los mismos. Después de determinar que existió diferencia estadística en las tres fases, se aplicó el método de cuadrados mínimos (LS MEANS) para determinar las interacciones para la fase I y III; para la fase II se realizó con una prueba Duncan. Todas las pruebas con un grado de significancia del 95% ( $P < 0.05$ ).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros resultados obtenidos en el estudio fueron de la primera fase del estudio la cual consistió en evaluar la reducción que presenta el tratamiento de tostado de los granos, utilizando dos tratamientos: 110 °C/60 min y 140 °C/40 min. Para determinar la reducción del tratamiento térmico se tomó de referencia un control el cual no fue tratado térmicamente.

El cuadro 1 representa el contenido de *Salmonella* tanto en grano entero, cáscara y grano molido para cada uno de los tratamientos. Esta cuantificación esta expresada en log UFC por gramo de muestra. Al comparar el grano entero con los dos tratamientos de tostado se puede observar que el tratamiento de tostado a 110 °C por una hora redujo 3.26 log UFC/g, a diferencia del tratamiento de tostado que obtuvo una mayor reducción de 5 log UFC/g de cacao entero. En un estudio de tostado de cacao para la elaboración de chocolate, en el cual se utilizó un horno de aire forzado (forced air oven), se obtuvieron reducciones de 3.25 y 6.83 log UFC/g respectivamente utilizando tostados a temperaturas de 110 °C y 120 °C por 20 min. Esto se debe a la potencia y poder calórico que presenta el horno industrial (Nascimento 2012). En este estudio se cuantificó en grano entero de cacao *Salmonella* Typhimurium y Senftenberg debido a que esta presenta mayor resistencia al calor.

Cuadro 1. Sobrevivencia de *Salmonella* (UFC/g) inoculada en cacao durante el tostado y molido.

Muestra	Tratamiento térmico		
	Control	110 °C/60 min	140 °C/40 min
Entero	5.37 ± 0.18 <sup>ax</sup>	2.11 ± 0.28 <sup>by</sup>	0.39 ± 0.19 <sup>cz</sup>
Cáscara	nd	3.11 ± 0.13 <sup>ax</sup>	2.20 ± 0.48 <sup>bx</sup>
Molido	3.75 ± 0.19 <sup>ay</sup>	2.05 ± 0.21 <sup>by</sup>	1.39 ± 0.39 <sup>cy</sup>

<sup>abc</sup>: Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia estadística significativa.

<sup>xyz</sup>: Letras diferentes en la misma columna presentan diferencia estadística significativa entre tipo de muestra.

(P < 0.05)

En otro estudio durante el tostado de almendras se obtuvo 3.8 y 4.8 log UFC/g con el uso de 110 y 130 °C por 30 min respectivamente (Torlak 2013). También afirma que *Salmonella* no es detectada después de 30 minutos de tostado con el uso de 150 °C. Esta inactivación térmica concuerda con las reducciones obtenidas por Nascimento (2012). Cabe resaltar que en el estudio de Torlak (2013) se utilizó un horno de aire forzado al igual que el antes mencionado.

Se observó que gran parte del inóculo seco de *Salmonella* estuvo presente en la superficie de la cascara del grano. Se presentó diferencia estadística entre el contenido de las dos cascara. El tratamiento a 140 °C/40 min presentó una diferencia de 0.91 log menor que el contenido de *Salmonella* tratada a 110 °C/60 min. Esto se debe a que este tratamiento presenta una temperatura mayor. A mayor temperatura de tostado existe una mayor reducción de *Salmonella*.

Se especifica que el contenido de *Salmonella* en cáscara es mayor que los recuentos de grano ya que comparando el contenido de cascara que se utilizó para obtener 10 g de muestra representa mayor superficie de cascara que fue retirada del grano de cacao tratado, en proporción al grano entero muestreado.

Con respecto al grano molido se obtuvo una cuantificación de 2.05 log UFC/g para el tratamiento a 110 °C/60 min y 1.39 logaritmos para el tratamiento a 140 °C/40 min; presentando una diferencia de 1.7 y 2.36 log UFC/g de cacao molido con respecto al grano de cacao molido del control. El cacao que presenta un menor contenido de *Salmonella* en el grano molido entre los tres tratamientos fue el tratamiento a 140 °C/40 min al igual que en el grano entero.

Los recuentos de *Salmonella* en grano entero y grano molido el tratamiento a 110 °C/60 min no presentaron diferencia estadística. Existe una misma concentración de *Salmonella* en la superficie y el grano de cacao molido, esta sobrevivencia es de aproximadamente 2 log UFC/g de cacao. Con respecto al tratamiento a 140 °C/40 min si presentó diferencia significativa, el grano molido presenta recuentos más alto por 1 log de sobrevivencia más que el grano entero. Esto se debe a una migración del inóculo de bacteria al interior del grano de cacao en el momento de inoculación, ya que el grano de cacao presenta porosidad y hendiduras en su superficie que hacen posible el ingreso de inóculo al interior del grano. Según Bart – Plange (2002) y Huamán (2011), mencionan que la porosidad de los granos de cacao depende de la humedad de los mismos, encontrándose una relación inversa, ya que a medida que aumenta la humedad del grano se disminuye la fracción de aire de los mismos. Esto quiere decir que el grano de cacao presenta una mayor porosidad después del secado previo al procesamiento de tostado.

En la figura 1 se puede observar un grano de cacao y los diferentes tipos de poros que presenta la estructura. Tales son los poros cerrados, abiertos y poro ciego. Según Serpil y Servet (2009), mencionan que los poros cerrados poseen un extremo cerrado, a diferencia de los poros abiertos que pueden permitir el libre flujo de aire como entradas y salidas en la partícula (Serpil 2009). El ingreso del inóculo es por el tipo de poro abierto.



Figura 1. Tipos de poros en el grano de cacao. Fuente: Serpil y Servet (2009).

Se debe también añadir al ingreso del inóculo del grano de cacao, después de proceso de tostado, ya que la cáscara del grano de cacao en el proceso de tostado se agrieta debido a la salida de humedad en forma de vapor y compuestos volátiles. Según Nebesny, (1998) El tostado se realiza con tres propósitos: disminuir la humedad de los granos de 7-8 a 2,5%; eliminar compuestos volátiles no deseados (por ejemplo, ácido acético) y generar nuevos compuestos volátiles. Estos compuestos salen en forma de vapor (Nebesny 1998).



Figura 2. Imagen de granos de cacao posterior al tratamiento de tostado. Fuente: Imagen obtenida de empresa Chocolate Gueysh SL. Copyright © 2017

Por otro lado, existe contaminación de *Salmonella* sobreviviente del proceso térmico, esta se presenta en la cáscara. El descascarillado se realizó completamente manual, los operarios utilizaron guantes donde al descascarillar el cacao inoculado con *Salmonella* sobreviviente se pegaba al grano y este contaminaba la superficie del grano sin cascarilla.

Cabe destacar que calor absorbido por el grano en la cáscara es mayor que el calor interno del grano de cacao, esto quiere decir que hubo mayor exposición al calor en la superficie que en el centro del grano. Por otro lado, el contenido interno del grano de cacao presenta un alto porcentaje de grasa y baja actividad de agua, estos parámetros intrínsecos del alimento le brindan una mayor protección a *Salmonella* al proceso térmico.

Según Mattic (2010) la inactivación de *Salmonella* en productos alimenticios puede ser influenciada por muchos factores, entre ellos la composición misma del alimento. En un estudio realizado por Mattic a *Salmonella* Typhimurium donde se evaluó reducción de la bacteria a diferentes temperaturas y Aw refleja diferencia significativa en cuanto a protección a la bacteria cuanto existe una menor Aw en la matriz alimenticia (Mattic 2010).

Los resultados expresados en el cuadro 2 representan la cuantificación de *Salmonella* en el equipo de molienda. Esta parte del estudio representa a la fase II del estudio, donde los dos tratamientos de tostado (140 °C/40min y 110 °C/60 min) y el control fueron sometidos al proceso de molienda posterior al tostado y descascarillado del grano, a omisión del control el cual no fue sometido al tratamiento térmico y no fue descascarillado. En esta fase se evaluó la contaminación que tuvo el molino posterior al molido de los dos tratamientos de grano tostado y pelado y el control. Los resultados obtenidos en el muestreo están expresados en log UFC/superficie completa del molino manual.

En el cuadro 2 se puede observar la contaminación que obtuvo el molino manual al procesar los granos de cacao tostado y pelado de los dos tratamientos de tostado y el control. Esta cuantificación esta expresada en UFC por toda la superficie del molino. El tratamiento que tuvo una mayor contaminación en el equipo fue el grano de cacao control, esto se debe a que el grano control no fue tratado térmicamente previo a su molienda. Seguido tenemos el tratamiento de menor temperatura 110 °C/60 min el cual se cuantifico  $2.71 \pm 0.19$  log UFC/sup.

Cuadro 2 . Recuento de *Salmonella* spp. en superficie de molino manual después procesar cacao inoculado.

<b>Log UFC/ Superficie del molino después de procesar cacao inoculado.</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Tratamiento térmico</b>		
	<b>Control</b>	<b>110°C/60 min</b>	<b>140°C/40 min</b>
Sup. Molino	$5.14 \pm 0.17^a$	$2.71 \pm 0.19^b$	$1.22 \pm 0.25^c$

<sup>abc</sup>: Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia estadística significativa. (P < 0.05)

Por último, el tratamiento con menor cuantificación fue el de mayor temperatura 140 °C/40 min que presento una cuantificación de  $1.21 \pm 0.25$  log UFC/sup. Se puede determinar que el tratamiento de tostado a 140 °C/40 min presento 3.9 logaritmos menos de contaminación al equipo que el control y el tratamiento de tostado a 110 °C/60 min presentó 2.43 logaritmos menos de contaminación en comparación al control. Cabe destacar que debido al contenido de la cascara en grano del control, esta presenta una capa del talco inoculado con *Salmonella*, el grano dejo gran parte de ese talco en la tolva del molino.

Es de suma importancia el estudio de la contaminación que existe en el equipo de procesamiento, ya que en procesos continuos el grano que presenta presencia de *Salmonella* contamina el equipo. Esta contaminación queda presente en la superficie del equipo y contamina la siguiente tanda de procesamiento la cual puede estar libre del patógeno.

Los productos de nueces y semillas pueden estar naturalmente contaminados con *Salmonella* debido a la naturaleza de los procesos de cultivo y / o cosecha. Se ha retirado un gran número de productos de nueces y semillas debido a la contaminación por *Salmonella* (Podolak 2010). Contaminación cruzada y la re contaminación debido al procesamiento de productos contaminados con el patógeno y malas prácticas de saneamiento de la maquinaria en los productos pueden contribuir a la contaminación por *Salmonella*.

Por otro lado, también puede existir formación de biopelículas, el cual es un modo de protección de la bacteria para sobrevivir a condiciones ambientales estresantes tales como los procedimientos de secado y limpieza de las superficies de alimentos y el medio ambiente (Reuter y Van Vliet 2010). *Salmonella* spp. ha sido recuperado de una amplia gama de superficies en contacto con alimentos; *Salmonella* presenta la capacidad de unirse a superficies inertes en el entorno de procesamiento de alimentos (Hood y Zottola 1997; Joseph *et al.* 2001) y consecuentemente forman biopelículas (Stepanovic y Svabic-Vlahovic 2004). Es de suma importancia tener un control en procesamiento de materia prima contaminada, ya que una vez que se forma una biopelícula, se convierte en una fuente de contaminación alimentaria en el procesamiento.

Los resultados del cuadro 3 corresponden a la última fase del estudio. El siguiente cuadro representa el contenido de *Salmonella* en la bebida final. La bebida fue reconstituida en leche semidescremada. Para el reconstituido se utilizó dos temperaturas de leche: la primera a temperatura ambiente y leche calentada previamente a 80 °C. Esta cuantificación representa la carga final de 20 gramos de pinolillo reconstituídos en 250 ml de leche semidescremada a las dos temperaturas. Los resultados fueron expresados en log UFC/250 ml de la bebida reconstituidas.

Cuadro 3. Recuentos de *Salmonella* (log UFC/250 ml) en pinolillo reconstituido con leche

Temperatura de reconstitución	Control	Tratamiento térmico	
		110 °C/60 min	140 °C/40 min
Ambiente	4.33 ± 0.12 <sup>ax</sup>	3.71 ± 0.14 <sup>abx</sup>	3.32 ± 0.05 <sup>bx</sup>
80 °C	1.72 ± 0.55 <sup>ay</sup>	0.83 ± 0.73 <sup>by</sup>	0.83 ± 0.73 <sup>by</sup>

<sup>abc</sup>: Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia estadística significativa

<sup>xyz</sup>: Letras diferentes en la misma columna presentan diferencia estadística significativa entre tipo de muestra.

(P < 0.05)

Los resultados del cuadro 3 determinaron que los tratamientos con menor contenido de *Salmonella* fueron los pinolillos cuyos granos de cacao fueron tratados a 140 °C/40 min y 110 °C/60 min los cuales fueron reconstituidos en leche a 80 °C. Ambos presentaron una carga de 0.83 Log UFC/250 ml de la bebida. El Reconstituido con leche a 80 °C que tuvo una mayor carga fue el control con 1.72 Log UFC/250 ml de la bebida.

Se toma de referencia el estudio realizado por Harris, (2012) el cual se basó en el uso de agua caliente para reducir el contenido de *Salmonella* en superficies de Almendras. Según Harris la exposición de las almendras con agua caliente por 30 segundos a 80 °C presentó una reducción de 2.9 log UFC/g de almendra (Harris 2012). Para realizar la comparación objetiva, la diferencia que hubo en reducción de *Salmonella* comparando el pinolillo tratado con leche caliente y pinolillo reconstituido a temperatura ambiente es de 2.88 Log UFC/250 ml para el pinolillo elaborado granos de cacao tostados a 110 °C/60 min, con respecto al pinolillo elaborado a partir de cacao tostado a 140 °C/40 min existe una diferencia de 2.49 Log UFC/250 ml y el pinolillo control obtuvo diferencia de 2.61 Log UFC/250 ml. La leche a 80 °C presenta una reducción de 2.61 Log UFC por vaso de bebida.

Se observó diferencia significativa en sobrevivencia de *Salmonella* entre el tratamiento tratado con leche a temperatura ambiente y los tratamientos con leche a 80 °C, esto se debe a que la *Salmonella* presente en el pinolillo final fue expuesta a calor. Se debe tomar en cuenta que el pinolillo está en forma de polvo que conlleva a una mejor reducción con la aplicación de calor, ya que el calor suministrado con la leche presenta homogeneidad de acción reductiva por su disolución en el pinolillo, añadir que las partículas tratadas tienen un menor tamaño existe una mejor exposición.

La FAO junto a la OMS en 2012 llevaron a cabo una evaluación del riesgo de microorganismos patógenos, en donde se revisó el conjunto de patógenos transmitidos en alimentos que provocan enfermedades de diversa gravedad. De los siete microorganismos patógenos incluidos en la Declaración conjunta de 2007, el que presentó mayor riesgo de prevalencia en alimentos con bajo contenido de humedad fue *Salmonella*, la cual fue tomada como el objetivo principal de los programas de inocuidad de alimentos para alimentos de bajo contenido de humedad (FAO/OMS 2012).

Es necesario comparar la dosis infectante que causa la enfermedad de salmonelosis. Esta se refiere al número de bacterias para causar la enfermedad, y no puede determinarse para la población en general, ya que existen grupos especiales con mayor riesgo como son los infantes, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeficientes. La dosis infectiva en adultos para *Salmonella* Typhimurium según la OPS va de  $10^4$  a  $10^9$  Log de células viables/g.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se concluyó que el tostado del grano de cacao reduce 3-4.98 log UFC/gr en la superficie del grano para los tratamientos 110 °C/60 min y 140 °C/40 min respectivamente.
- Existe una contaminación en el descascarillado manual donde existe presencia de *Salmonella* que no fue eliminada, y una posterior manipulación del grano pelado; esto conlleva a posterior contaminación del molino.
- Se determinó barreras múltiples de control de *Salmonella* spp. las cuales son el proceso de tostado del grano (3-4.98 log) y el proceso de reconstituido de la bebida con leche a 80 °C (3log), obteniendo reducción de 3 hasta 8 log de *Salmonella* entre las dos barreras.

## 5. RECOMENDACIONES

- Simular un procesamiento de tostado de manera artesanal el cual se realiza tradicionalmente en ollas de cerámica que son expuestas a calor y comparar las reducciones con el uso de hornos convectivos.
- Estudiar la migración que existe de *Salmonella* posterior al inoculado superficial.
- Realizar un análisis sensorial de atributos finales del pinolillo que le brindan las temperaturas de tostado utilizadas al producto final.
- Evaluar el efecto en reducción microbiana con el uso de especies como canela y pimienta gorda.

## 6. LITERATURA CITADA

- Da Silva M. 2013. Behavior of *Salmonella* during fermentation, drying and storage of cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*. 167(3):363–368. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.003.
- EMPRES Inocuidad de los Alimentos (2012): Prevención y control de *Salmonella* y la *E. coli* entero hemorrágica en los frutos secos. UC Food Safety; [consultado, septiembre 2018]. Available online at <http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/163175.pdf>
- Harris L, Uesugi A, Abd S. 2012. Survival of *Salmonella Enteritidis* PT 30 on inoculated almond kernels in hot water treatments. *Food Research International*; [consulted November 2018]. 45(2):1093–1098. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.048>.
- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 145–153.
- GMA Nut Safety Task Force. 2010. Industry handbook for safe processing of nuts. Asociación de Fabricantes de Comestibles, Washington, D.C; [consultado, septiembre 2018]. Disponible en: [http://www.gmaonline.org/downloads/wygwam/Industry\\_Handbook\\_for\\_Safe\\_Processing\\_of\\_Nuts\\_1st\\_Edition\\_22Feb10.pdf](http://www.gmaonline.org/downloads/wygwam/Industry_Handbook_for_Safe_Processing_of_Nuts_1st_Edition_22Feb10.pdf)
- Mattick, K. L., Jorgensen, F., Wang, P., Pound, J., Vandeven, M. H., Ward, L. R., ... Humphrey, T. J. (2001). Effect of Challenge Temperature and Solute Type on Heat Tolerance of *Salmonella* Serovars at Low Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4128–4136. doi:10.1128/aem.67.9.4128-4136.2001
- Nascimento, M. da S. do, Brum, D. M., Pena, P. O., Berto, M. I., & Efraim, P. (2012). Inactivation of *Salmonella* during cocoa roasting and chocolate conching. *International Journal of Food Microbiology*, 159(3), 225–229. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.017
- Nebesny, E.; Rutkowski, J. (1998). Effect of cocoa bean enrichment and chocolate mass conching on the composition and properties of chocolates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 7 (4), 673-681.

- Oliverio Celaya. Agosto, 2016. Pinolillo: ¡la peculiar bebida que despierta su paladar! [Nicaragua es rica en recetas tanto de la mesa como del beber.]. Managua, Nicaragua: [sin editorial]; [consultado agosto,2018]. <http://www.lavozdelsandinismo.com/cultura/2016-08-03/pinolillo-la-peculiar-bebida-despierta-paladar/>.
- OMS (Organización mundial de la Salud). Febrero de 2018. *Salmonella* (no tifoidea). [sin lugar]: Organización mundial de la Salud; [consultado octubre de 2018]. [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
- Mich de León, Oscar; Márquez, Mayra; Espinal, Raul (2017): Desarrollo de un procedimiento para elaborar un control interno de calidad para la enumeración de grupos indicadores en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. EAP Zamorano, Francisco Morazán, Honduras. Available online at <http://hdl.handle.net/11036/5973>.
- Podolak, R., E. Enache, W. Stone, D. G. Black y P. H. Elliott. 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *J. Food Prot.* 73:1919-1936.
- Reuter, M., Mallet, A., Bruce, M. P., & van Vliet, A. H. M. (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2122–2128.
- Scott, V. N., Y. U. H. Chen, T. A. Freier, J. Kuehm, M. Moorman, J. Meyer, T. Morille-Hinds, L. Post, L. Smoot, S. Hood, J. Shebuski y J. Banks. 2009. Control of *Salmonella* in low-moisture foods I: Minimizing entry of *Salmonella* into a processing facility. *Food Prot. Trends* 29:342-353.
- Serpil, S; Servet G. 2009. Propiedades físicas de los alimentos. Zaragoza, España, Acribia.
- Stepanovic, S., Circovik, I. C., Ranin, L., & Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 428–432.
- Torlak, E., Sert, D., & Serin, P. (2013). Fate of *Salmonella* during sesame seeds roasting and storage of tahini. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 214–217. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.010.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla Respuesta clínica de adultos a diferentes dosis de desafío con patógenos entéricos.

<b>ORGANISMO</b>	<b>DOSISI DE DESAFÍO (log10 de células viable/g)</b>
<i>Shigella dysenteriae</i>	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>4</sup>
<i>Shigella flexneri</i>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>9</sup>
<i>Vibrio cholerae</i>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>9</sup>
<i>Salmonella typhi</i>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>9</sup>
Especies de <i>Salmonella</i> (no Typhi)	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>9</sup>
<i>Escherichia coli</i> (tipos patógenos)	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>10</sup>
<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>10</sup>
<i>Yersinia enterocolítica</i>	10 <sup>9</sup>

Fuente: Pan American Health Organization.

**Anexo 2.** Resultados de SAS estadístico de la Fase I.

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Model</b>	9	48.63268379	5.40363153	76.16	<.0001
<b>Error</b>	13	0.92237708	0.07095208		
<b>Corrected Total</b>	22	49.55506087			

<b>R-Square</b>	<b>Coeff Var</b>	<b>Root MSE</b>	<b>UFC Mean</b>
0.981387	10.56470	0.266368	2.521304

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Type I SS</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>TRT</b>	2	37.83442754	18.91721377	266.62	<.0001
<b>GRANO</b>	2	5.25694603	2.62847302	37.05	<.0001
<b>REP</b>	2	0.32558344	0.16279172	2.29	0.1402
<b>TRT*GRANO</b>	3	5.21572678	1.73857559	24.50	<.0001

**Anexo 3.** Resustados de SAS estadístico de la Fase II.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	4	23.60897778	5.90224444	131.62	0.0002
<b>Error</b>	4	0.17937778	0.04484444		
<b>Corrected Total</b>	8	23.78835556			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC Mean
0.992459	7.006932	0.211765	3.022222

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>TRT</b>	2	23.52748889	11.76374444	262.32	<.0001
<b>REP</b>	2	0.08148889	0.04074444	0.91	0.4728

**Anexo 4.** Resultados de SAS estadístico de la Fase III.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	7	35.92655000	5.13236429	26.23	<.0001
<b>Error</b>	10	1.95650000	0.19565000		
<b>Corrected Total</b>	17	37.88305000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC Mean
0.948354	18.01725	0.442323	2.455000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>TRT</b>	2	3.00213333	1.50106667	7.67	0.0096
<b>Leche</b>	1	31.92005000	31.92005000	163.15	<.0001
<b>REP</b>	2	0.88583333	0.44291667	2.26	0.1545
<b>TRT*Leche</b>	2	0.11853333	0.05926667	0.30	0.7452

**Anexo 5.** Valores D y Z obtenidos de estudio de tostado de cacao.

**Table 1**  
D and Z values determined for *Salmonella* during roasting of cocoa beans and nibs.

Matrix	Temperature (°C)	Means D-value ± SD (min) <sup>a</sup>	r <sup>2</sup> <sup>b</sup>	Z-value (°C)	r <sup>2</sup> <sup>b</sup>
Cocoa beans	110	4.79 ± 0.22a	0.948	102.60	0.898
	120	3.62 ± 0.07b	0.962		
	130	2.55 ± 0.11c	0.998		
	140	2.55 ± 0.11c	0.962		
Nibs	110	8.86 ± 0.69a	0.977	50.30	0.932
	120	8.02 ± 0.23b	0.972		
	130	3.75 ± 0.19c	0.988		
	140	2.47 ± 0.06d	0.976		

<sup>a</sup> Values obtained from three independent trials with standard deviation. Means with different letters in the same sample are significantly different (p<0.05).

<sup>b</sup> r<sup>2</sup>: correlation coefficient.

Fuente: Nascimento (2012).