



# Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

## Prevalencia y sobrevivencia de *Salmonella enterica* en chocolate

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

IBT. Rebeca Hernández Rojas

**Dirigido por:**

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Centro Universitario, Querétaro, Qro, 2022.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Prevalencia y sobrevivencia de *Salmonella enterica* en chocolate”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

IBT. Rebeca Hernández Rojas

Dirigido por

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. María Guadalupe Flavia Loarca Piña

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Alejandra Lorena San Martín Azocar

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. María Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Diciembre 2021

México

## DEDICATORIA

*A mi familia y esposo por su apoyo, ayuda y amor incondicional*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## AGRADECIMIENTOS

A mis papás Meinardo y Josefina, por ser mi apoyo incondicional siempre, creer en mí y alentarme en cada paso que doy.

A mi esposo Diego, por su apoyo en cada decisión y acompañamiento incondicional. Gracias por tu ayuda en mi proyecto, por escucharme y ayudarme a ensayar mil veces cada presentación, por acompañarme en mi estrés y desvelos. También por entender mi mal humor y darme ánimos para continuar aún en los momentos más complicados.

A mi hermana María José y Hugo, por echarme porras siempre y ser parte de mi calma en los momentos de más estrés. A mi sobrino Nikolas, por hacerme olvidar el estrés con risas y juegos.

A mis amigos Jaqueline, Paola, Abigail y Alexis por acompañarme en todo momento, tanto en los académicos como en los momentos personales más dolorosos, gracias por las risas, aventuras y momentos juntos. A mis amigas siempre presentes, Tere, Juana María y Edith, por alentarme en este proceso y darme ánimos en cada plática.

A la Sra Martha, Lalo y Paula, por su amabilidad en todo momento y por ayudarme y guiarme durante mi estancia en laboratorio. A Alex y Adrián, por compartir conmigo su experiencia y conocimientos siempre con amabilidad y paciencia, además de hacer más agradable el tiempo de laboratorio.

A la Dra Montse, por su confianza depositada en mí, por sus enseñanzas y guía en este proceso y por los consejos profesionales y de vida, agradezco lo mucho que pude aprender de ella. A mis sinodales, por sus aportaciones realizadas durante

cada etapa de este proyecto, con especial cariño al Dr. Peniche por sus comentarios y contribuciones, esperando que se encuentre orgulloso de este proyecto.

Al CONACYT por el apoyo económico para poder realizar esta investigación y a la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades brindadas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Alimentos de baja actividad de agua.....	17
2.1.1 El agua en los alimentos.....	17
2.1.3 Inocuidad de alimentos de baja actividad de agua.....	19
2.2 Botánica del cacao.....	21
2.2.1 Taxonomía.....	21
2.2.2 Morfología.....	22
2.3 Chocolate.....	23
2.3.1 Origen e importancia.....	23
2.3.2 Importancia en México y en el mundo.....	24
2.3.3 Composición y clasificación del chocolate.....	25
2.3.4 Producción, comercialización y consumo de chocolate en México.....	28
2.3.5 Procesamiento del cacao y elaboración del chocolate.....	29
2.4 Microbiología del chocolate.....	33
2.4.1 Generalidades.....	33
2.4.2 Microorganismos patógenos asociados al chocolate.....	34

2.4.3 Brotes de enfermedad asociados a chocolate .....	37
2.5 Salmonella enterica .....	41
2.5.1 Salmonelosis .....	43
2.5.2 Sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en alimentos de baja actividad de agua.....	46
2.5.2.1 Mecanismos de sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en ambientes de baja actividad de agua .....	47
2.5.3 Resistencia cruzada inducida por estrés osmótico .....	53
III. OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo general.....	54
3.2 Objetivos específicos .....	54
IV. METODOLOGÍA.....	55
4.1 Equipos, materiales y reactivos .....	55
4.1.1 Equipos.....	55
4.1.2 Materiales .....	55
4.1.2.1 Alimentos .....	55
4.1.2.2 Material biológico .....	55
4.1.3 Reactivos .....	56
4.1.3.1 Soluciones y reactivos.....	56
4.1.3.2 Medios de cultivo.....	57
4.2 Metodología .....	58
4.2.1 Sitios de muestreo .....	58
4.2.2 Cuantificación de microorganismos indicadores.....	58
4.2.2.1 Preparación de muestras .....	58
4.2.2.2 Cuantificación de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y <i>Escherichia coli</i> .....	59

4.2.2.3 Cuantificación de hongos y levaduras.....	59
4.2.3 Detección y cuantificación de <i>Salmonella enterica</i> .....	59
4.2.3.1 Confirmación de <i>Salmonella enterica</i> mediante PCR.....	60
4.2.4. Efecto del origen de la cepa, el método de preparación del inóculo y la temperatura de almacenamiento en el comportamiento de <i>Salmonella enterica</i> en chocolate. ....	61
4.2.4.1 Cepas.....	61
4.2.4.2. Chocolate .....	61
4.2.4.3 Caracterización física y química del chocolate.....	62
4.2.4.3.5 Análisis de actividad de agua .....	62
4.2.4.3.6 pH.....	62
4.2.4.4 Preparación del inóculo.....	62
4.2.4.4.1 Activación de cepas.....	63
4.2.4.4.2 Inóculo a partir de dos tipos de agar.....	63
4.2.4.5 Inoculación de <i>Salmonella enterica</i> y almacenamiento de chocolate .....	64
4.2.4.6. Cuantificación de <i>Salmonella enterica</i> .....	64
4.2.5 Expresión del gen <i>otsB</i> en células de <i>Salmonella enterica</i> .....	65
4.2.5.1 Preparación de muestras .....	65
4.2.5.2 Extracción de ARN .....	65
4.2.5.3 Síntesis de ADN complementario.....	66
4.2.5.4 Validación de iniciadores por PCR punto final .....	66
4.2.5.5 qPCR.....	67
4.2.6 Análisis estadístico .....	67
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	69



5.1 Calidad sanitaria de chocolate con leche de venta a granel .....	69
5.2 Prevalencia de <i>Salmonella enterica</i> en chocolate con leche de venta a granel .....	72
5.3 Evaluación del efecto del origen de la cepa y del método de preparación del inóculo en el comportamiento de <i>Salmonella enterica</i> en chocolate con leche .....	76
5.3.1 Caracterización bromatológica del chocolate con leche .....	76
5.3.2 Comportamiento de <i>Salmonella enterica</i> en chocolate con leche .....	77
5.4 Determinación de la expresión del gen <i>otsB</i> en <i>Salmonella enterica</i> en chocolate con leche .....	90
VI. CONCLUSIONES.....	101
VII. REFERENCIAS .....	103

Dirección General de Bibliotecas UNAO

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de producción de tabletas de chocolate. ....	31
Figura 2. Casos reportados de salmonelosis en México durante el periodo 2000-2019.....	45
Figura 3. Biosíntesis de trehalosa.....	50
Figura 4. Comportamiento de <i>S. enterica</i> en chocolate con leche durante el almacenamiento a 25 °C.....	85
Figura 5. Validación de T <sub>m</sub> para iniciadores de <i>16S rRNA</i> y <i>otsB</i> .....	93
Figura 6. Curva de validación de qPCR para <i>16S rRNA</i> .....	94
Figura 7. Curva de validación de qPCR para <i>otsB</i> .....	94
Figura 8. Curva de fusión para productos amplificados por qPCR. ....	95
Figura 9. Cuantificación relativa de la expresión de <i>otsB</i> en inóculos de <i>S. enterica</i> . .....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad de agua en algunos alimentos.....	18
Tabla 2. Mínima $a_w$ para el desarrollo de patógenos asociados a alimentos. ....	20
Tabla 3. Composición mínima en base seca (% m/m) para cada tipo de chocolate. .....	27
Tabla 4. Brotes de <i>Salmonella enterica</i> asociados a chocolate.....	39
Tabla 5. Características de la salmonelosis y de la fiebre tifoidea.....	43
Tabla 6. Factores relacionados a la sobrevivencia y desarrollo de microorganismos en alimentos.....	46
Tabla 7. Iniciadores para el análisis transcripcional del gen <i>otsB</i> de <i>Salmonella enterica</i> . ....	67
Tabla 8. Factores y niveles para el estudio de sobrevivencia y expresión del gen <i>otsB</i> en <i>Salmonella enterica</i> presente en chocolate .....	68
Tabla 9. Contenido de microorganismos indicadores en chocolate con leche.....	69
Tabla 10. Especificaciones microbiológicas para cacao tostado, chocolate sus variedades y productos similares, derivados del cacao de acuerdo a la NOM-186- SSA1/SCFI-2013 .....	70
Tabla 11. Prevalencia de <i>Salmonella enterica</i> en muestras de chocolate con leche de venta a granel. ....	72
Tabla 12. Caracterización bromatológica del lote de chocolate con leche empleado en el estudio.....	76
Tabla 13. Contenido de <i>Salmonella enterica</i> en las suspensiones empleadas como inóculos.....	78
Tabla 14. Población de <i>Salmonella enterica</i> antes y después del secado del chocolate durante su inoculación.....	80
Tabla 15. Comportamiento de <i>S. enterica</i> en chocolate con leche almacenado a 25 °C.....	84
Tabla 16. Reducción de la población de <i>S. enterica</i> en chocolate con leche almacenado a 25 °C. ....	88

Tabla 17. Concentración de ARN extraído a partir de las suspensiones celulares de *S. enterica* empleadas como inóculos. ....91

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## RESUMEN

Las características propias del chocolate, como una baja actividad de agua y un alto contenido de grasa y azúcar limitan el desarrollo microbiano; no obstante su consumo ha sido causa de brotes de salmonelosis. La capacidad de sobrevivencia de *Salmonella enterica* en alimentos de baja actividad de agua se ha asociado con la síntesis de trehalosa. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de *S. enterica* en chocolate con leche y evaluar su capacidad de sobrevivencia en el alimento así como la expresión del gen *otsB*, asociado al estrés osmótico. Se recolectaron muestras de chocolate con leche de venta a granel en mercados (44) y tiendas de repostería (56) de Querétaro y se cuantificaron hongos/levaduras, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* y se determinó la presencia de *S. enterica*. Se estudió el efecto del origen de las cepas [cepas de referencia (CR) y cepas aisladas del chocolate (CC)] y del método de preparación del inóculo [células recuperadas de agar soya tripticasa (AST) y AST adicionado de chocolate (10 %) (ASTC)] en el comportamiento de *S. enterica* en chocolate con leche. Se inoculó el chocolate con los cuatro tipos de inóculos, las muestras se almacenaron a 25 °C y periódicamente se cuantificó la población de *S. enterica*. La expresión del gen *otsB* se cuantificó en los inóculos, en una muestra recién inoculada y seca y en una muestra con 26 semanas de almacenamiento. En cuanto a la calidad microbiológica del alimento, la mediana y valor máximo de coliformes totales fue de 0.56 Log NMP g<sup>-1</sup>, y los coliformes fecales y *E. coli* estuvieron por debajo del límite de detección en todas las muestras (< 0.56 Log NMP g<sup>-1</sup>), mientras que el valor máximo y mediana del hongos/levaduras fue de 2.45 Log UFC g<sup>-1</sup> y 1 Log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente. La prevalencia global de *S. enterica* fue 6 % (6/100) y el contenido osciló entre 0.48 y 1.97 Log NMP g<sup>-1</sup>. Independientemente del origen de las cepas y de la forma de preparación del inóculo, *S. enterica* se inactivó lentamente en el chocolate con leche, con un promedio de reducción de aproximadamente 4 Log UFC g<sup>-1</sup> después de 245 días de almacenamiento; las células del inóculo AST CC mostraron mayor capacidad de sobrevivencia. La mayor expresión del gen *otsB* se observó en el inóculo de ASTC-CR y en la muestra de chocolate con leche almacenada por 26 semanas con el inóculo AST-CR. El origen de la cepa y el procedimiento de preparación del inóculo parece no afectar la sobrevivencia de *Salmonella* en chocolate con leche. No se observó una clara correlación entre el aumento de la expresión del gen *otsB* y la mayor sobrevivencia del patógeno. Es de interés continuar con el estudio de los mecanismos de sobrevivencia que tiene *Salmonella* en chocolate incluida la síntesis de trehalosa.

## PALABRAS CLAVE

Chocolate, *Salmonella*, estrés osmótico, baja actividad de agua, mecanismos de resistencia.

## ABSTRACT

The characteristics of chocolate, such as a low water activity and a high content of fat and sugar, limit microbial growth. However, its consumption has been associated to salmonellosis outbreaks. The survival capacity of *Salmonella enterica* in low  $A_w$  foods has been associated with trehalose synthesis. The objective of this work was to determine the prevalence of *S. enterica* in chocolate, and to evaluate the pathogen ability to survive and the expression of *otsB* gene, associated to osmotic stress. Milk-chocolate samples were collected in markets (44) and pastry shops (56) in Queretaro city and mold/yeast, total coliforms, fecal coliforms, *Escherichia coli* were quantified and the presence of *S. enterica* was determined. The effect of the origin of the strains [collection strains (CR) and isolates from chocolate (CC)] and the inoculum preparation method [(TSA and TSA supplemented with chocolate)] on the behavior of the pathogen in milk-chocolate was studied. The chocolate was inoculated with the four types of inocula, the samples were stored at 25 ° C and the population of *S. enterica* was periodically quantified. The expression of the *otsB* gene was quantified in the inoculum suspensions, in a freshly inoculated and dried sample and in a sample with 26 weeks of storage. Regarding the chocolate microbiological quality, the median and maximum value of total coliforms were 0.56 Log NMP g<sup>-1</sup>, fecal coliforms and *Escherichia coli* were in not detectable level in all samples (< 0.56 Log MPN g<sup>-1</sup>), and for yeast and molds, the maximum and median value were 2.45 Log CFU g<sup>-1</sup> and 1 Log CFU g<sup>-1</sup>, respectively. *S. enterica* was detected in six samples (6 %) and its concentration ranged from 0.48 to 1.97 Log MPN g<sup>-1</sup>. *S. enterica* in milk-chocolate showed a slow inactivation, having a reduction average of approximately 4.02 Log CFU g<sup>-1</sup> after 245 days of storage; the cells of the AST-CC inoculum showed greater survival capacity. The highest expression of the *otsB* gene was observed in the ASTC-CR inoculum and in the milk chocolate sample stored for 26 weeks with the AST-CR inoculum. The origin of the strain and the inoculum preparation procedure do not appear to affect the survival of *Salmonella* in milk chocolate. No clear correlation was observed between increased expression of the *otsB* gene and the origin of the strains. It is of interest to continue with the study of the survival mechanisms that *Salmonella* has in chocolate, including the synthesis of trehalose.

## KEY WORDS

Chocolate, *Salmonella*, osmotic stress, low moisture foods, resistance mechanisms.

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L) en México tiene una alta importancia cultural y económica para el país y su fruto es utilizado para preparar golosinas, coberturas, tabletas de chocolate, chocolate de mesa, polvo para preparar bebidas y productos tradicionales como mole, pozol, tascalate, entre otros (González, 1992)

El chocolate se define como un alimento formado por una suspensión semisólida de partículas, principalmente azúcar, cacao y leche, en el que la proporción de estos ingredientes en el producto determina su clasificación (Afoakwa, 2010). Es sólido a temperatura ambiente (25 °C), tiende a fundir a la temperatura corporal (37 °C), presenta un bajo contenido de humedad (< 8 %) y un valor de actividad de agua ( $a_a$ ) de 0.4 a 0.5 (Podolak *et al.*, 2010; Food-Info, 2017). En México el consumo *per cápita* del chocolate es de 0.5 kg, lo que representa 0.6 % del gasto total realizado en el apartado de Alimentos, Bebidas y Tabaco por las familias mexicanas (SAGARPA, 2017). Las preferencias de consumo y de adquisición del producto, como la venta a granel del chocolate, lleva implícito un manejo que puede propiciar la contaminación superficial del producto con microorganismos patógenos (Torres-Vitela *et al.*, 1995).

Los brotes de *Salmonella enterica* asociados al consumo de chocolate han ocurrido desde la década de los 60s; entre las principales causas que propiciaron la contaminación del alimento durante su producción fueron: malas prácticas de saneamiento, instalaciones deficientes y mantenimiento de equipo incorrecto (D'Aoust, 1977; Werber *et al.*, 2005).

*S. enterica* es capaz de colonizar el tracto intestinal de vertebrados, ganado, aves de corral, animales domésticos y humanos (FDA, 2012). Alrededor del mundo existen aproximadamente 550 millones de personas que contraen salmonelosis no tifoidea anualmente, de las cuales, 220 millones son niños menores de cinco años (OMS, 2018). En México, la Dirección General de Epidemiología reportó en el "Anuario de Morbilidad 1984-2018" un total de 689 547 casos de fiebre tifoidea y 1



995 576 casos de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis en el periodo 2000-2018 (DGE, 2018).

Bajo condiciones de baja actividad de agua, los microorganismos no son capaces de crecer; sin embargo, algunos pueden retomar su crecimiento cuando las condiciones son favorables (Badui, 2006). Este patógeno se ha aislado de diversos alimentos con baja actividad de agua ( $a_w$ ) como huevo deshidratado, especias o hierbas deshidratadas, semillas, harina de soya, tahini, cebolla deshidratada, crema de cacahuate, pimienta negra, champiñones deshidratados, cereales de avena, harinas y chocolate (Burgess *et al.*, 2016).

La evidencia epidemiológica del estudio de los brotes asociados a la ingesta de chocolate contaminado con *S. enterica* ha revelado que tienen como característica la ingesta de dosis infectantes muy bajas, de entre 10 y 1000 células (Finn *et al.*, 2013). Por ejemplo, en un brote originado por *S. Napoli* reportado en Inglaterra y Gales en 1982, el registro de casos asociados tuvo una duración de 12 meses (Werber *et al.*, 2005), lo que evidenció que el patógeno fue capaz de sobrevivir en el chocolate por un periodo prolongado.

En alimentos de baja  $a_w$  *S. enterica* activa mecanismos que le ayudan a sobrevivir a las condiciones de estrés (Werber *et al.*, 2005; Finn *et al.*, 2013), como el incremento de la concentración intracelular de solutos compatibles, la modificación de la membrana celular, la formación de filamentos, la degradación de ARN ribosomal y la formación de biopelículas (Mattick *et al.*, 2000; White *et al.*, 2006; Romantsov *et al.*, 2009; Spector y Kenyon, 2012; Burgess *et al.*, 2016).

En México existe poca información respecto a la calidad microbiológica del chocolate con leche de venta a granel incluida la presencia de microorganismos patógenos particularmente *Salmonella*. El presente trabajo tuvo como objetivo conocer la prevalencia de *S. enterica* en chocolate con leche y evaluar la capacidad de sobrevivencia del patógeno en el alimento y su relación con la expresión del gen *otsB* que se asocia con el estrés osmótico.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Alimentos de baja actividad de agua

#### 2.1.1 El agua en los alimentos

El agua es el principal componente de un alimento que puede alterar su composición y estabilidad, lo que ha derivado en el desarrollado del concepto de actividad de agua ( $a_a$ ). Se puede definir a la  $a_a$  como la relación que existe entre la presión de vapor de un alimento y la presión de vapor del agua pura, medidas ambas a la misma temperatura, por lo que la  $a_a$  no tiene unidades (Fernández-Escartín, 2008). Por lo tanto, la actividad de agua es un concepto termodinámico que tiene diferentes requerimientos para su medición, incluyendo que el sistema se encuentre en equilibrio, a temperatura definida y un estado estándar específico. Cuando el agua del alimento y el agua del ambiente se encuentran en equilibrio, la  $a_a$  de un alimento es igual a la humedad relativa del aire alrededor de él. El agua pura es tomada como la referencia o estado estándar de la cual se mide el *estatus* de energía en sistemas alimenticios, como la energía libre de Gibbs del agua libre es cero, la  $a_a$  es 1.0; por lo tanto, el rango de la  $a_a$  va de 0 (completamente seco) a 1.0 (agua pura) (Badui, 2006; Decagon Devices, 2006).

El valor de la  $a_a$  dependerá de la composición, la temperatura y el contenido de agua de un alimento (Badui, 2006). Dentro del contenido de agua de un alimento, se considera que existen dos conceptos, el agua libre y el agua ligada. El agua ligada es aquella porción que no congela a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , por lo que también se le conoce como agua no congelable y es aquella que esta combinada o unida en alguna forma química a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y adsorbida en la superficie de las partículas coloidales. El agua libre, congelable o agua capilar, es aquella que puede ser congelada y es más susceptible a cambios de estado, ya que se volatiliza fácilmente, se pierde en el proceso de calentamiento o secado y de esta fracción depende la actividad de agua del alimento (Badui, 2006; García y Fernández, 2012). El agua libre es parte fundamental de la vida y calidad de los alimentos, ya que ésta

determinará en parte el crecimiento de los microorganismos presentes y la actividad química y enzimática durante su conservación (Cardona, 2019).

De acuerdo a Badui (2006), la actividad de agua está directamente relacionada con la textura de diferentes alimentos. Alimentos con una alta  $a_a$  tendrán una textura jugosa y masticable; sin embargo, cuando el contenido de su humedad disminuye, el alimento tiende a ser seco y endurecido. Los alimentos con una baja  $a_a$  son quebradizos y crujientes, por lo que si existe una exposición del producto a la humedad éste se reblandecerá; algunos de los alimentos de baja  $a_a$  ( $a_a < 0.85$ ) son los cereales, cocoa, frutas y vegetales secos, huevo en polvo, harina, embutidos fermentados y secos, condimentos y especias, miel, proteína vegetal hidrolizada en polvo, carne seca, leche en polvo, pastas, crema de cacahuete, semillas y granos (Sánchez-Maldonado *et al.*, 2018). La determinación de la  $a_a$  en los alimentos es importante debido a que su valor se asociará al método y tiempo de conservación del alimento (Cardona, 2019). En la Tabla 1, se muestran los valores de  $a_a$  para algunos alimentos.

Tabla 1. Actividad de agua en algunos alimentos.

<b>Alimento</b>	<b><math>a_a</math></b>
Frutas frescas y enlatadas	0.97
Verduras	0.97
Jugos	0.97
Huevos	0.97
Carne	0.97
Queso	0.95
Pan	0.94
Mermeladas	0.86
Frutas secas	0.73
Miel	0.70
Huevo en polvo 5% humedad	0.40
Galletas, cereales	0.35
Azúcar	0.10

Fuente: Badui, 2006.

Entre más cercano a 1.0 sea el valor de la  $a_a$  de un alimento, mayor será su inestabilidad. Por dicha razón los alimentos como carnes, frutas y hortalizas frescas requerirán refrigeración para su almacenamiento para evitar su descomposición por microorganismos y reacciones enzimáticas, mientras que los estables a temperatura ambiente comúnmente tienen una baja  $a_a$  y presentan un crecimiento microbiano retardado, derivando en una mayor vida de anaquel (Badui, 2006, Pedro *et al.*, 2010). La disponibilidad de agua que puede ser empleada para llevar a cabo diferentes reacciones biológicas puede ser reducida por diferentes procesos como la deshidratación, congelación, secado por pulverización o por la adición de solutos como sal o azúcar, entre otros (Finn *et al.*, 2013; Sánchez-Maldonado *et al.*, 2018).

### 2.1.3 Inocuidad de alimentos de baja actividad de agua

El potencial de crecimiento microbiano resulta en el deterioro o incremento de la probabilidad de causar una enfermedad transmitida por alimentos. Dicho potencial está determinado por la combinación de los factores intrínsecos del alimento (composición, integridad física, pH,  $a_a$ , potencial oxido-reducción) y de los factores extrínsecos (temperatura, humedad relativa y composición de la atmósfera) a los que son expuestos durante su procesamiento, almacenamiento, comercialización y consumo (Fernández-Escartín, 2008; Scott, 1989). El crecimiento de los microorganismos en los alimentos puede ser controlado a través de la modificación de algunos factores como son la  $a_a$  presente en el mismo, el pH o la temperatura; en consecuencia, suele mejorar la estabilidad de los alimentos (Badui, 2006, Afolabi, 2014).

Por ejemplo, a medida que la  $a_a$  disminuye, el rango de pH para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se estrecha. Mientras que cuando el patógeno se somete a un pH de 4.6 y a un valor de  $a_a$  de 0.93 por la adición de sacarosa al medio, aún presenta crecimiento, bajo las mismas condiciones pero con adición de NaCl se detiene su crecimiento. También se ha reportado el crecimiento de *S. aureus* a pH de 7.0 a una temperatura de 12 °C cuando la  $a_a$  es de 0.93; sin embargo, no se detectó crecimiento a una  $a_a$  de 0.90 (Scott, 1989).

Adicionalmente, en estudios realizados por Olaimat *et al.*, (2017), se evaluó la sobrevivencia de *S. aureus* en tahini ( $a_a$  de 0.33 y 57 % de grasa) almacenado a 10, 21 y 37 °C y el efecto inhibitorio del patógeno con la adición de diferentes concentraciones de ácidos grasos (ácido cítrico y ácido acético) en el alimento original e hidratado. Como resultado, pudieron observar que el efecto inhibitorio de ambos ácidos fue más pronunciado en la forma hidratada de tahini ( $a_a$  de 0.95), sin embargo, con concentraciones de 0.5 y 0.3 % ácido acético era posible reducir al patógeno hasta niveles no detectables después de 7 y 14 días a 21 y 37 °C; por el contrario, en el tahini original se observó una mayor resistencia por parte del patógeno, encontrando que en el tahini sin hidratar la adición de ácido acético era el que producía un mayor efecto, especialmente con una concentración  $\geq 0.3$  % se obtenía efecto inhibitorio notable de *S. aureus* bajo todas las temperaturas evaluadas.

Otros fenómenos que acontecen por debajo del valor óptimo de  $a_a$  para las bacterias, de acuerdo con Fernández-Escartín (2008), son la disminución de la tasa de crecimiento y la biomasa generada, por mencionar algunas. En la Tabla 2, se presentan algunos de los valores mínimos de la  $a_a$  a los cuales puede darse el desarrollo de algunos patógenos en los alimentos.

Tabla 2. Mínima  $a_a$  para el desarrollo de patógenos asociados a alimentos.

Patógeno	$a_a$	Patógeno	$a_a$
<i>Bacillus cereus</i>	0.93	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.83
<i>Clostridium botulinum</i> A y B	0.95	<i>Vibrio vulnificus</i>	0.94
<i>Clostridium botulinum</i> E	0.97	<i>Vibrio cholerae</i>	0.97
<i>Clostridium perfringens</i>	0.96	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.93
<i>Salmonella enterica</i>	0.95	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.97

Fuente: Modificado de Fernández-Escartín, 2008.

En términos generales, los microorganismos capaces de desarrollarse a bajos niveles de  $a_a$  son conocidos como xerotolerantes. Las bacterias Gram

negativas requieren de mayores niveles de  $a_a$  que las Gram positivas, mientras que las levaduras y los hongos filamentosos crecen a niveles inferiores. Sin embargo, para algunas bacterias la presencia de un elevado valor de  $a_a$  deriva en la limitación de su desarrollo, por la falta de nutrientes. Se considera que para la producción de toxinas, debe haber una cantidad mayor de agua disponible que la requerida para el crecimiento del microorganismo (Badui, 2006; Fernández-Escartín, 2008). Por ejemplo, de acuerdo con Ding *et al.* (2016), *S. aureus* necesita un mínimo de  $a_a$  de 0.85 para la producción de toxinas.

## 2.2 Botánica del cacao

### 2.2.1 Taxonomía

El árbol *Theobroma* pertenece a la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae, que comprende 22 especies divididas en seis secciones; todas las especies requieren de climas preferentemente tropicales lluviosos para su desarrollo. Las especies de este género son árboles ramificados con hojas simples y frutos carnosos (mazorca). Todo el cacao que es cultivado para el mercado mundial de la industria chocolatera se obtiene de la especie *Theobroma cacao* L., sin embargo, otras especies de *Theobroma* son cultivadas solo para explotación local (Dostert *et al.*, 2011).

El nombre designado al árbol que provee al cacao fue acuñado por Carl von Linne, denominándolo *Theobroma cacao* L., que significa “cacao, alimento de los dioses”. Dependiendo de la zona donde es cultivado, el cacao tiende a cambiar de tamaño, sabor, color y composición química, variando su contenido de grasa, polifenoles, alcaloides, entre otros (Valenzuela, 2007; Vega y Kwik-Urbe, 2012).

Los granos de cacao son el fruto proveniente del árbol de cacao que principalmente crece en las regiones de América Central y Sudamérica, de donde es originario (Valenzuela, 2007).

De acuerdo con el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (2010), la clasificación taxonómica del cacao es:

- a. Reino: Vegetal
- b. Subreino: Tracheobionta
- c. División: Magnoliophyta
- d. Clase: Magnoliopsida
- e. Subclase: Dilleniidae
- f. Orden: Malvales
- g. Familia: Esterculiácea
- h. Subfamilia: Byttnerioideae
- i. Tribu: Theobromeae
- j. Género: *Theobroma*
- k. Especia: *Theobroma cacao* L.

Para la caracterización de las formas y cultivares se usan hoy en día, las características morfológicas, agronómicas (resistencia a enfermedades, forma del fruto y tamaño del grano), marcadores genéticos y técnicas moleculares. Las formas de cacao se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario. Se ha determinado que el grupo Forastero presenta una alta variabilidad genética mientras que el Criollo es estrecho genéticamente, el grupo Trinitario comprende híbridos de ambos. La mayoría del cacao que es cultivado en Brasil, África Occidental, América Central y el Caribe pertenece al grupo Forastero; con cerca del 80 % de la producción mundial de cacao, este grupo es el grupo comercialmente más importante (Dostert *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Morfología

*Theobroma cacao* es un árbol o arbusto semicaducifolio de entre 12 y 20 m de altura, generalmente en cultivo se mantiene entre 4 y 8 m. La corteza es oscura en tonos café y grises, las ramas son café y finamente vellosas, mientras que las hojas son coriáceas (o cartáceas) simples, enteras, angostamente ovadas y ligeramente asimétricas. En cuanto al fruto, este es una baya grande también llamada mazorca, polimorfa, de color púrpura o amarillo en su madurez, de entre 200 a 1000 g de peso; las semillas son café-rojizas, ovadas y ligeramente comprimidas (Dostert *et al.*, 2011).

## 2.3 Chocolate

### 2.3.1 Origen e importancia

El chocolate proviene de la palabra azteca “*xocolatl*” la cual significa “agua espumosa”, dicho vocablo fue empleado por la civilización olmeca (1500-400 a.C.), azteca (1400 a.C.) y posteriormente, por los mayas (600 a.C.). La bebida empleada por estas culturas era en un principio de sabor amargo y fuerte, comúnmente mezclado con agua, maíz, chile y/o miel (Hurst *et al.*, 2002; Valenzuela, 2007).

El cacao era un alimento fundamental en la vida económica, social, religiosa y política de la cultura maya. La bebida de cacao era servida en las celebraciones de boda, mientras que las semillas eran ofrecidas a la familia de la novia como señal de respeto por parte de la familia del novio. De acuerdo con algunos registros, se ha encontrado que el cacao no era accesible para la población en general, sino que era un bien destinado para las familias con poder e influencia (Vega y Kwik-Urbe, 2012).

Los primeros registros sobre esta bebida, de acuerdo con Valenzuela (2007) relatan que, en 1520, el emperador azteca Moctezuma ofreció *xocolatl* a Hernán Cortés y sus soldados, lo cual les brindó la suficiente energía para soportar todo un día de marcha forzada, dicha característica de la bebida fue apreciada rápidamente por Hernán Cortés. Moctezuma, al creer que Cortés era la reencarnación del Dios Quetzalcóatl, le regaló la plantación real de Manialtepec, la cual fue aprovechada por los españoles al intercambiar los granos del árbol de cacao por oro.

El consumo se popularizó en España cuando los monjes católicos adaptaron la bebida prehispánica al paladar europeo añadiendo miel y/o azúcar para contrarrestar el sabor amargo original. Dichos cambios tuvieron como consecuencia la rápida popularización de la bebida en toda la población del continente (Valenzuela, 2007).

El descubrimiento de América y el colonialismo facilitó la dispersión de la planta a diferentes partes del mundo, de acuerdo con Vega y Kwik-Urbe (2012), en



1500 los holandeses introdujeron el cacao a Indonesia, en 1600 los españoles en Filipinas e India y en el siglo XIX los españoles, británicos y franceses iniciaron el cultivo del cacao en África Occidental, y es hasta este siglo que el cacao fue consumido como un alimento sólido.

La industrialización del chocolate comenzó a principios de siglo XIX con Henry Nestlé, quien tuvo la idea de mezclar la pasta de cacao con leche evaporada y azúcar para obtener tabletas de chocolate, dicha combinación es el origen del chocolate suizo. Posteriormente, Rudolf Lindt también inicio su comercialización en base al producto creado por Nestlé; en América fue Milton Hershey quien lo industrializó masivamente (Valenzuela, 2007; Manpreet *et al.*, 2017).

El uso de *Theobroma cacao* L. con fines medicinales ha sido reconocido ampliamente en el pasado e investigaciones recientes sugieren que el consumo moderado del chocolate puede aportar beneficios a la salud cardiovascular, en la secreción de insulina y con las funciones endoteliales, debido a su rica proporción en flavonoides y polifenoles (Manpreet *et al.*, 2017).

### 2.3.2 Importancia en México y en el mundo

En el periodo de 2006-2016, la superficie mundial destinada a la producción de cacao tuvo un aumento de millón y medio de hectáreas (ha), con una tasa de crecimiento aproximada del 2 % anual. Dicho crecimiento fue generado principalmente por la inversión de países como Costa de Marfil, Nigeria, Camerún e Indonesia; estos países representan más del 95 % del incremento del área cacaotera mundial. En cuanto a la producción de cacao en América Latina y el Caribe, esta alcanza 1 700 000 ha de cultivo y ha crecido desde el año 2006 en más de 235 000 ha, lo que equivale al 17 % de la superficie destinada al cacao. En cuanto a la distribución de las zonas cacaoteras, en cinco países (Ecuador, Perú, Colombia, Brasil y México) se concentra más del 90 % de la ampliación de la frontera cacaotera en América (Arvelo *et al.*, 2016).

Europa es el mayor consumidor de cacao con 47 % del consumo mundial, seguido por América con el 32 %, Asia y Oceanía con el 17 % y África con el 4 %.

El Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) (2020), reporta que Estados Unidos es el país que registra la mayor demanda de consumo de cacao, tanto en el continente como mundialmente, representando el 62 % del consumo en el continente, seguido por Brasil con 14 %, Canadá con 7 % y México con 5 %. En cuanto a los otros principales consumidores a nivel mundial de cacao se encuentran Alemania, Francia, Reino Unido, Rusia, Japón, España, Italia y Australia, con un consumo *per cápita* de 2.27 kg por persona al año (Arvelo *et al.*, 2016).

El consumo *per cápita* de chocolate es de 0.5 kg, lo cual representa el 0.6 % del gasto total realizado en el apartado de Alimentos, Bebidas y Tabaco por las familias mexicanas. Sin embargo, durante 2016, las 26,863 toneladas producidas en el país únicamente cubrieron el 41.23 % de los requerimientos nacionales, por lo que se importó el cacao de países como Ecuador, Costa de Marfil y Colombia para poder cubrir la demanda de la industria. En cuanto a las estimaciones realizadas para este cultivo, se espera que para el año 2030 exista una producción de 47.54 mil toneladas, mientras que el consumo nacional será de 77.86 mil toneladas. En la producción anual de cacao, participan mayoritariamente los estados de Tabasco, Chiapas y Guerrero con una participación de 68 %, 31 % y 1 %, respectivamente. La producción se encuentra principalmente en manos de 37 mil agricultores y sus familias (González-Lauck, 2005; SAGARPA, 2017; ASCHOCO, 2017).

### 2.3.3 Composición y clasificación del chocolate

El chocolate se define como un alimento formado por una suspensión semisólida de partículas, principalmente azúcar, cacao y leche, y la proporción de estos ingredientes en el producto proporciona su clasificación (Afoakwa, 2010). El chocolate es sólido a temperatura ambiente (25 °C), tiende a fundir a la temperatura corporal (37 °C), presenta un bajo contenido de humedad (< 8%), un pH de 4.4 a

4.5 y un valor de  $a_a$  de 0.3 a 0.5 (Afoakwa, 2010; Podolak *et al.*, 2010; Food-Info, 2017).

Según la NOM-186-SSA1/SCFI-2013, el chocolate puede clasificarse de acuerdo con la proporción y contenido de sus ingredientes en:

- Chocolate amargo u oscuro y semiamargo: Productos homogéneos elaborados a partir de la pasta de cacao, azúcar sin refinar y con la adición de ingredientes opcionales.
- Chocolate blanco: Producto homogéneo elaborado a partir de manteca de cacao, productos lácteos, azúcar, edulcorantes, aromatizantes e ingredientes opcionales.
- Chocolate con leche: Producto homogéneo elaborado a partir de la mezcla de pasta de cacao, manteca de cacao, cocoa, azúcar o edulcorantes, extracto seco de leche (ingredientes lácteos en sus proporciones naturales).
- Chocolate en polvo: Mezcla de cocoa, azúcar e ingredientes opcionales.
- Chocolate para mesa: Producto de la mezcla de pasta de cacao, azúcar sin refinar con un tamaño de partícula mayor a 70 micras con la adición de ingredientes opcionales.
- Chocolate Gianduja: Producto homogéneo obtenido primeramente de sólidos totales de cacao y en segundo lugar, de una sémola fina de avellanas en proporciones que oscilan entre 20 % y 40 %.
- Chocolate para mesa amargo u oscuro y semiamargo: Producto homogéneo elaborado a partir de la pasta de cacao, azúcar sin refinar y con la adición de ingredientes opcionales.
- Chocolate relleno: Producto homogéneo recubierto con uno o más de los chocolates definidos anteriormente. No se incluyen dulces de harina, ni productos de panificación, galletas o helados. La parte de chocolate del revestimiento debe representar al menos 25 % del peso total del producto en cuestión.

En el chocolate de bajo costo, la manteca de cacao se sustituye por grasa vegetal, la cual no debe exceder el 5 % (m/m) de la composición del producto, ya que el incremento de su presencia produce una sensación grasosa en el paladar y por lo tanto, se deduce que la calidad del producto y su valor nutricional son inferiores respecto a productos en donde se respeta la proporción de manteca (FAO, 2003; Valenzuela, 2007).

Además de la clasificación del chocolate de acuerdo con su composición, la NOM-186-SSA1/SCFI-2013 también define la proporción mínima de los ingredientes principales en cada tipo, dicha composición se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición mínima en base seca (% m/m) para cada tipo de chocolate.

Producto	Manteca de cacao total	Cocoa desgrasada totalmente	Sólidos totales de cacao	Grasa butírica total	Sólidos totales de leche	Sólidos totales de cacao y leche	Grasa vegetal diferente a manteca de cacao
Chocolate	≥ 18.0	≥ 14.0	≥ 35.0	-	-	-	≤ 5.0
Chocolate amargo u oscuro	≥ 22.0	≥ 18.0	≥ 40.0	-	-	-	≤ 5.0
Chocolate semiamargo	≥ 15.6	≥ 14.0	≥ 30.0	-	-	-	≤ 5.0
Chocolate con leche	≥ 20.0	≥ 2.5	≥ 25.0	≥ 2.5	≥ 14.0	≥ 40.0	≤ 5.0
Chocolate con alto contenido de leche	≥ 17.0	≥ 2.5	≥ 20.0	≥ 5.0	≥ 20.0	≥ 40.0	≤ 5.0
Chocolate con leche descremada	≥ 20.0	≥ 2.5	≥ 20.0	≤ 0.5	≥ 14.0	≥ 40.0	≤ 5.0
Chocolate blanco	≥ 20.0	-	≥ 20.0	≥ 3.5	≥ 14.0	≥ 34.0	≤ 5.0
Chocolate para mesa	≥ 11.0	≥ 9.0	≥ 20.0	-	-	-	≤ 5.0
Chocolate para mesa semiamargo	≥ 15.6	≥ 14.0	≥ 30.0	-	-	-	≤ 5.0
Chocolate para mesa	≥ 22.0	≥ 18.0	≥ 40.0	-	-	-	≤ 5.0

amargo u oscuro Chocolate en polvo	≥ 1.8	-	≥ 18.0	-	-	-	≤ 5.0
---	-------	---	--------	---	---	---	-------

Fuente: NOM-186-SSA1/SCFI-2013.

#### 2.3.4 Producción, comercialización y consumo de chocolate en México

El cultivo del cacao en México tiene una alta importancia cultural y económica para el país y es consumido como golosina, cobertura, tabletas de chocolate, chocolate de mesa, polvo para preparar bebidas y productos tradicionales como mole, pozol, tascalate, etc.

En México, la industria de producto final está constituida por alrededor de 213 empresas con un valor de producción superior a los tres mil millones de pesos. Desafortunadamente diez empresas dominan el mercado de venta por volumen y gran mercado, entre las que se incluyen Nestlé, Ricolino (de Grupo Bimbo), Pepsico y La Corona, ya que en conjunto manejan el 59 % de la transformación del cacao en productos de confitería en el país; las empresas procesadoras de productos derivados de chocolate se encuentran asociadas a través de la Asociación Nacional de Fabricantes de Chocolate, Dulces y Similares A.C. (González-Lauck, 2005). En cuanto a los hábitos de consumo, Jacinto y Torres (2015) reportan que existe una preferencia por el chocolate de confitería (41 %), seguido por el chocolate de mesa (31 %) y finalmente en polvo (27 %), mientras que el sitio de consumo con mayor preferencia es el hogar (66 %) seguido de restaurantes y cafeterías (32 %). En cuanto a la predilección por el tipo de fabricación, el chocolate artesanal es el de mayor consumo con un 53 % y el chocolate industrial con un 16 %, mientras que el porcentaje restante no refiere alguna preferencia en específico. En cuanto a los lugares para la adquisición del chocolate se encuentra el supermercado (11 %), directamente en el punto de fabricación (26 %), tienda de conveniencia (9 %) y servicios con entrega a domicilio (39 %).

### 2.3.5 Procesamiento del cacao y elaboración del chocolate

El procesamiento del cacao desde el campo hasta la industria, según Fernández (2018), puede ser clasificado en cuatro etapas:

1. Se inicia con la producción primaria del cacao, que abarca desde la plantación de árboles hasta la cosecha y el preprocesamiento del fruto, semillas y granos. Durante dicho preprocesamiento o fermentación, se desarrollan fracciones volátiles como alcoholes, ésteres y ácidos grasos que son usados como precursores para el desarrollo posterior de olores y sabores característicos del chocolate. De acuerdo con Ortiz *et al.* (2009), algunos de los factores que influyen en esta etapa son: el tipo de cacao, tiempo de almacenamiento del fruto antes de la apertura y desgrane, así como la remoción de las semillas y pulpa (masa fermentante). En cuanto al periodo de almacenamiento de la mazorca y el desgrane, conforme este se alargue, la temperatura durante la fermentación se elevará a una mayor velocidad obteniendo un menor potencial de sabor al tener una menor cantidad de ácido acético sintetizado.

Con respecto a la remoción de la masa fermentativa, se ha encontrado que una remoción moderada favorece la aireación por lo que se regula la acidez y la velocidad de la fermentación, así como la inhibición de crecimiento de hongos debido al apelmazamiento de los granos. Por el contrario, si la masa es removida frecuentemente, se produce un descenso de la temperatura, disminución de la velocidad metabólica y alteración de la secuencia microbiana (Ortiz *et al.*, 2009).

2. La segunda etapa incluye el tostado de los granos y el procesamiento de los granos de cacao. Durante el tostado, los precursores formados en la primera etapa interactúan entre sí para obtener las características deseadas en el cacao. Posteriormente, durante el prensado de los granos se originan tres productos principales: el licor, la manteca y el polvo de cacao. La mezcla de

los tres ingredientes es la base para la pasta de cacao, la cual es empleada para la fabricación de las tabletas de chocolate y otros productos derivados; adicionalmente se pueden agregar productos semiprocesados.

3. Finalmente, la cuarta etapa se refiere a la producción de tabletas de chocolate, dulces de chocolate y demás derivados.

A nivel industrial, las etapas del proceso de producción de tabletas de chocolate (Figura 1), de acuerdo con Medina (2014), tienen las siguientes operaciones unitarias con sus correspondientes características y objetivos:

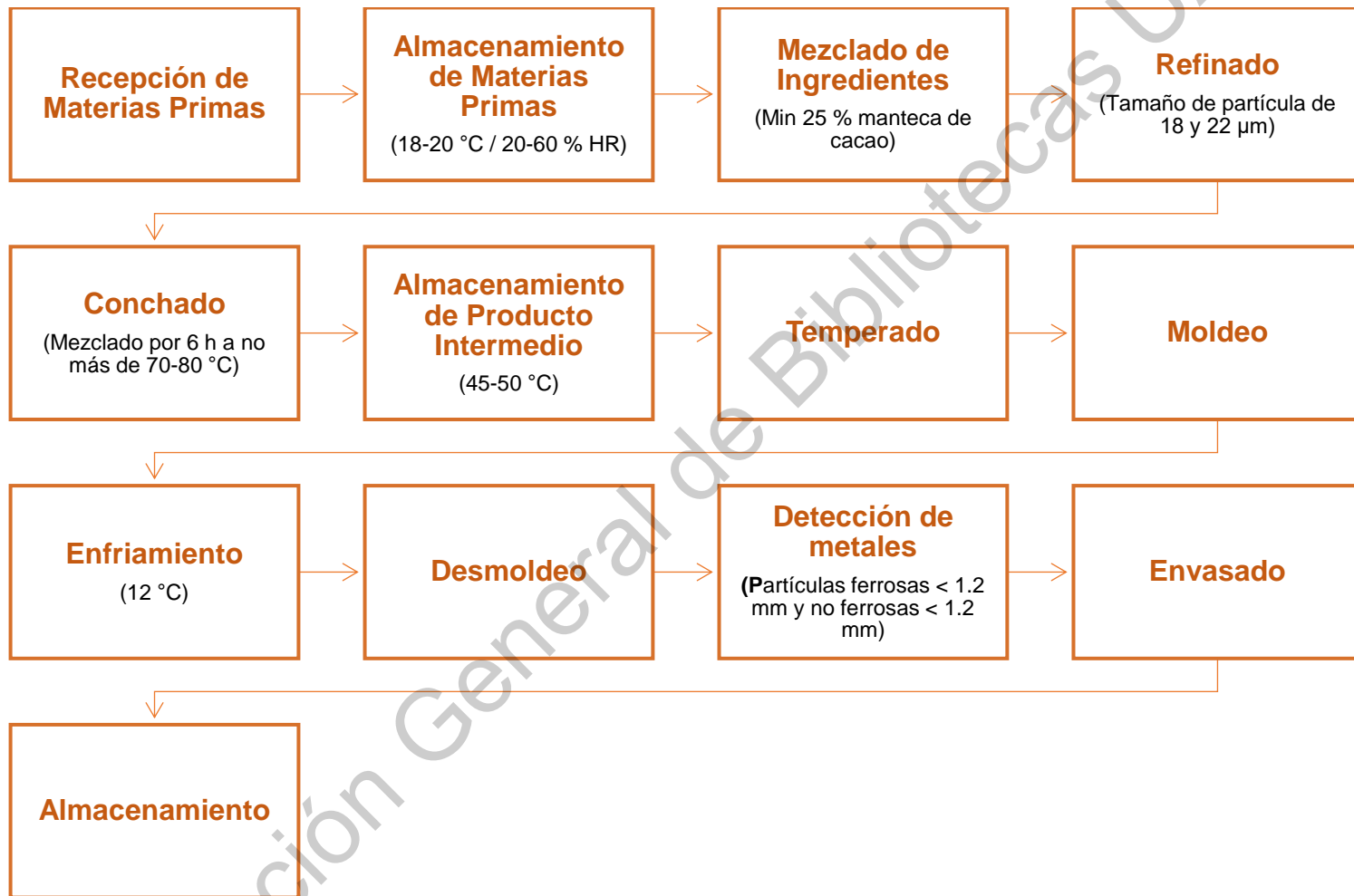


Figura 1. Proceso de producción de tabletas de chocolate.

Fuente: Medina, 2014.



1. Recepción de materias primas: Se reciben las materias primas líquidas y sólidas para la fabricación. Algunos de los ingredientes son: pasta de cacao, manteca de cacao, azúcar, lecitina, vainilla, semillas complementarias, leche, entre otras.
2. Almacenamiento de materias primas: Los ingredientes líquidos son mantenidos en agitación constante y a 40 °C para conservar su estado hasta su uso. Mientras que los ingredientes secos se mantienen en un rango de temperatura de 18-20 °C y bajo condiciones de humedad relativa de 20-60 %.
3. Mezclado de ingredientes: Se realiza la medición de los ingredientes, de acuerdo al producto y a la formulación elegida. Se debe considerar un mínimo de 25 % de manteca de cacao y un tiempo de mezclado de 30 min aproximadamente.
4. Refinado: La mezcla se transporta hasta la máquina refinadora, la cual mediante rodillos que ocasionan fricción van haciendo más fina la mezcla hasta obtener un tamaño de partícula entre 18 y 22  $\mu\text{m}$ . Cuando el refinado no se realiza correctamente y el tamaño de partícula supera los límites especificados, la mezcla tiene una textura arenosa.
5. Conchado: Se produce el amasado de la pasta en seco y se inicia la primera fase que tiene una duración de 6 h y donde se elimina la humedad de la pasta hasta llegar al 1 % y ocurre la reacción de Maillard y una fina capa de manteca de cacao recubre las partículas sólidas presentes; la temperatura no debe superar los 70-80 °C. Cuando esta etapa finaliza, se adiciona a la concha la lecitina, manteca de cacao y vainilla y se inicia el mezclado hasta obtener la fluidez necesaria; generalmente la duración de dicha etapa es entre 4 y 6 horas. Al finalizar el conchado, se filtra la mezcla para eliminar partículas extrañas. Debido a las condiciones de temperatura y a la baja humedad final del producto, se considera que esta es la etapa principal para la reducción de microorganismos presentes en el alimento.

6. Almacenamiento de producto intermedio: En caso de continuar el procesamiento del chocolate, éste debe almacenarse a 45-50 °C y con agitación para mantenerlo fluido.
7. Temperado: Consiste en someter al chocolate a varios cambios de temperatura con el objetivo de conseguir la cristalización óptima de la manteca de cacao.
8. Moldeo: Mediante una dosificadora se llena cada molde de las tabletas de chocolate.
9. Enfriamiento: Los moldes se dirigen a la cámara de enfriamiento la cual se encuentra a 12 °C. El tiempo que permanece dentro dependerá de la solidificación del chocolate.
10. Desmoldeo: Se saca el producto del molde mediante un pulsador o manualmente, es importante considerar que en esta etapa, puede haber contaminación cruzada hacia el producto por el contacto con equipos mal saneados o por falta de higiene de los trabajadores que intervienen.
11. Detección de metales: Antes de ser envasado, cada tableta debe pasar por un detector de metales; en caso de detectar algún metal, la tableta es retenida y reprocesada. Se pueden detectar partículas ferrosas < 1.2 mm y no ferrosas de < 1.2 mm.
12. Envasado: Las tabletas se envasan individualmente, se codifican con lote y caducidad y por último, son colocadas en cajas.
13. Almacenamiento: El producto final es colocado en el almacén de producto terminado en donde es importante cuidar la temperatura y humedad relativa del ambiente para evitar el deterioro del producto.

## **2.4 Microbiología del chocolate**

### **2.4.1 Generalidades**

La calidad microbiológica del chocolate puede ser influenciada por la variedad del cacao, así como por diversos factores agrícolas y tecnológicos

asociados con la materia prima y su procesamiento. Los granos de cacao suelen estar expuestos a la contaminación con diferentes microorganismos durante su cosecha, incluidos patógenos (Krapf y Gantenbein-Demarchi, 2010; Copetti *et al.*, 2011).

La presencia de microorganismos en un alimento y su distribución dentro de él dependerá del tipo de procesamiento. Algunas etapas de la elaboración del chocolate como el tostado y el conchado, en las cuales se inactivan microorganismos, no logran su eliminación total (Krapf y Gantenbein-Demarchi, 2010; Cordier, 2014).

De acuerdo con Cordier (2014) en el caso del chocolate, el hecho de que se mantenga la mayor parte del tiempo durante su procesamiento en estado líquido, puede contribuir a la distribución homogénea de los microorganismos presentes en el producto final, lo cual ha sido evidenciado en estudios relacionados a brotes con el consumo del alimento.

#### 2.4.2 Microorganismos patógenos asociados al chocolate

La composición del chocolate tiene un efecto importante en la sobrevivencia de los microorganismos, ya que el efecto de la baja  $a_w$  en combinación con el alto contenido de grasa incrementa la tolerancia térmica de algunos patógenos, como *S. enterica*. Estudios realizados con células inoculadas en chocolate, muestran que las células normalmente se agregan dentro o en proximidad a la fase acuosa de la matriz, por lo que la sobrevivencia se ve afectada por el porcentaje de agua disponible y su distribución en el alimento (Finn *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha determinado que los alimentos con baja  $a_w$  que contienen altos niveles de sacarosa presentan una tasa 10 veces mayor de sobrevivencia de patógenos como *S. enterica* y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) que los alimentos con baja  $a_w$  y altos contenidos de NaCl (Hiramatsu *et al.*, 2005).

Para la industria chocolatera es importante considerar que la contaminación de productos derivados del chocolate con microorganismos patógenos puede

deberse principalmente a dos razones: 1) La presencia de patógenos en las materias primas o ingredientes y 2) a la deficiencia en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) durante el proceso (Komitopoulou y Peñaloza, 2009; Carrasco *et al.*, 2012). De acuerdo con Podolak *et al.* (2010), los principales factores reportados por la Organización Mundial de la Salud que contribuyen a la presencia de patógenos en alimentos industrializados incluyen: higiene insuficiente (1.6 %), contaminación cruzada (3.6 %), procesamiento o almacenamiento en condiciones inadecuadas (4.2 %), equipo contaminado (5.7 %) y contaminación por manipulación del personal (9.2 %); mientras que en el Reino Unido los estudios derivados de brotes de enfermedad han sido asociados en un 57 % a la contaminación cruzada.

El tostado del cacao, que comúnmente ocurre a una temperatura de 110 a 140 °C, es considerado el principal paso para la reducción de la carga microbiana, incluyendo patógenos como *S. enterica*. Se ha observado una reducción de la microbiota natural de aproximadamente 1 a 2 logaritmos en granos de cacao tostados a una temperatura de 150 °C. Durante la elaboración del producto final, como tabletas de chocolate, el conchado es la etapa responsable de la eliminación de patógenos (Barrile *et al.*, 1971; Stobinska *et al.*, 2006; Beckett, 2008). Goepfert y Biggie (1968) reportaron que durante el conchado se observaron reducciones de 1 logaritmo en las poblaciones de *S. Senftenberg 775 W* y *S. Typhimurium* bajo condiciones de 71.1 °C por 440 min y 816 min, respectivamente.

En un estudio realizado por Nascimento *et al.* (2015), se analizaron 120 muestras de chocolate provenientes de dos compañías manufactureras de chocolate localizadas en Sao Paulo, Brasil; se evaluaron 32 muestras de chocolate con leche, 30 de chocolate oscuro, 30 de chocolate blanco, 13 de chocolate *light* y 15 muestras con 70 % de contenido de cacao, encontrando Enterobacterias en el 25.8 % del total de las muestras y coliformes totales en un 13.3 %. También se analizó la microbiota presente en 120 muestras de manteca de cacao y 90 muestras de licor de cocoa, reportando un bajo contenido de hongos que osciló entre < 10 y 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup>, detectando la presencia de las especies *Absidia corymbifera*,

*Eurotium amstelodami* y *Aspergillus flavus*, las cuales han sido identificadas en etapas tempranas del procesamiento de los granos de cacao y en el almacenamiento. En contraste, en otro estudio realizado en la región de Ilhéus en el estado de Bahía, Brasil, se analizaron 75 muestras de tabletas de chocolate reportando la ausencia de hongos, lo cual sugiere su inactivación durante el proceso de elaboración (D'Aoust, 1977; Copetti *et al.*, 2011).

La contaminación microbiana de las materias primas es un aspecto que debe ser controlado para reducir riesgos potenciales hacia el consumidor. Después de la fermentación de los granos de cacao, es posible encontrar levaduras, hongos, bacterias del género *Bacillus* y Enterobacterias como *S. enterica* y *E. coli*; sin embargo, se espera que la microbiota presente sea eliminada durante el posterior proceso de tostado. En un estudio para la detección y cuantificación de *Bacillus* en 36 muestras de polvo de cocoa, esta osciló entre  $10^2$ - $10^4$  células por gramo; de estas poblaciones el 20 % se identificó como *B. cereus*, un importante patógeno asociado a alimentos (D'Aoust, 1977).

Productos de chocolate preparados con azúcar, sólidos de leche y cocoa que son secados hasta alcanzar una humedad menor a 1 %, no pueden ser considerados libres de bacterias ya que alguna falla en el proceso o contaminación cruzada después del procesamiento pueden resultar en la presencia de patógenos como *S. enterica* en el producto (D'Aoust, 1977). Estudios epidemiológicos indican que la contaminación cruzada representa uno de los principales mecanismos de contaminación para los alimentos de baja  $a_w$ . Durante la fabricación de chocolate, existen diferentes fuentes de contaminación al producto final como son las materias primas (granos de cacao), o algunos ingredientes (azúcar, sal, leche en polvo añadida en la formulación, vainilla y lecitina); el aditivo rojo carmín se identificó como vehículo de *S. enterica* al ser utilizado en recubrimientos de chocolate (Carrasco *et al.*, 2012).

En estudios realizados por Torres-Vitela *et al.* (1995) en 44 muestras de chocolate empacado provenientes de la ciudad de Guadalajara en el estado de

Jalisco, México, se detectó la presencia de *S. enterica* en 4.5 % de las muestras analizadas, siendo *S. Agona* y *S. Derby* los serotipos presentes en el alimento.

#### 2.4.3 Brotes de enfermedad asociados a chocolate

Como se mencionó previamente, el chocolate es ampliamente consumido y representa una importante actividad comercial en el mundo, siendo los niños el sector de la población con el mayor consumo. En México, es común que el chocolate se venda sin empaque, lo cual favorece su contaminación durante la comercialización y consumo (Torres-Vitela *et al.*, 1995).

La presencia de *Salmonella* en productos derivados del cacao es tema de interés para la industria chocolatera debido a que representa el patógeno más frecuentemente asociado al alimento (Kapperud *et al.*, 1990). En cuanto a brotes de *Listeria monocytogenes* asociados a chocolate, únicamente existen reportes de enfermedad debido a su rápido crecimiento en leche con chocolate a una temperatura de 13 °C (Pearson y Marth, 1990); mientras que para *Escherichia coli* no hay registro de reportes de brotes (Baylis *et al.*, 2004).

Los brotes de *S. enterica* asociados al consumo de chocolate han ocurrido desde la década de los 60s; algunos de los brotes reportados relacionados con el consumo de chocolate se resumen en la Tabla 4. En los brotes debidos al consumo de chocolate, los productos involucrados contenían en promedio 13 UFC g<sup>-1</sup> de *S. enterica*, lo cual sugiere que la dosis infectante fue baja (de 10 a 1000 células). Sin embargo, es importante considerar que la posibilidad de la distribución no homogénea de este patógeno en la matriz alimenticia puede llevar a una mala estimación del número de células presentes (Finn *et al.*, 2013).

Como resultado de las investigaciones de los brotes de *S. enterica* asociados a chocolate se ha concluido que la contaminación cruzada es una de las principales causas de dichos brotes, por lo que la industria debe enfocar sus esfuerzos en la implementación de medidas preventivas basadas en el sistema HACCP (*Hazard*

*Analysis and Critical Control Points*) para asegurar la inocuidad del alimento (Anderson y Lucore, 2012; Ferrigno *et al.*, 2013).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Tabla 4. Brotes de *Salmonella enterica* asociados a chocolate

Año	País	Serovar	Vehículo	Fuente de contaminación	UFC g <sup>-1</sup>	Periodo del brote	Edad de los afectados
1970	Suecia	S. Durham	Productos de chocolate	Polvo de cocoa	-	Diciembre-Mayo	53 % ≤ 15 años
1973-1974	EUA Canadá	S. Eastbourne	Chocolate de Canadá	Granos de cacao	2.5	Diciembre-Febrero	3 años (mediana)
1982	Inglaterra Gales	S. Napoli	Barras de chocolate de Italia	Desconocido	2-23	Mayo-Agosto	58 % ≤ 15 años
1985-1986	Canadá	S. Nima	Monedas de chocolate de Bélgica	Desconocido	-	Diciembre-Enero	-
1987	Noruega Finlandia	S. Typhimurium	Productos de chocolate de Noruega	Contaminación aviar	≤ 1	Marzo-Mayo	6 años (mediana)
2001-2002	Alemania	S. Oranienburg	Chocolate de dos marcas alemanas	Desconocido	1.1-2.8	Octubre-Diciembre	15 años (mediana)

Fuente: Modificado de Werber *et al.*, 2005.



En un brote reportado en octubre de 2001 en Alemania, se detectó la presencia de *S. Oranienburg* en chocolate que afectó a una o dos personas semanalmente durante cinco meses (Werber *et al.*, 2005). Lo anterior refleja que el producto al ser un alimento no perecedero tiene una larga vida de anaquel, y además que el chocolate (debido a su composición) puede conferir un efecto protector a las células de *S. enterica*. En el reporte realizado por Werber *et al.* (2005) de la investigación del brote, se describe que 381 muestras de una compañía alemana producidas durante la misma semana de agosto de 2001, fueron analizadas por la autoridad de Seguridad Alimentaria Nacional, encontrando que en el 5 % de las muestras estaba presente el patógeno. En el brote ocurrido en Inglaterra ocasionado por *S. Napoli* se recibieron reportes de enfermedad durante 12 meses (Gill *et al.*, 1983). Entre 1985 y 1986 a lo largo de 9 meses se confirmaron un total de 29 casos de salmonelosis en Canadá y 4 casos en Estados Unidos, los cuales se asociaron al consumo de monedas de chocolate provenientes de Bélgica. En el estudio realizado como parte del análisis del brote por el Laboratorio de Salud y Bienestar Regional de Vancouver (Canadá), se analizaron 44 muestras de chocolate y en el 31 % se detectó la presencia de *S. Nima*, el agente etiológico identificado en el brote (Greenwood y Hooper, 1983; Hockin *et al.*, 1989; Werber *et al.*, 2005).

El brote relacionado a *S. Eastbourne* culminó en enero de 1974 e involucró una diversa variedad de productos elaborados por la mayor empresa chocolatera de Canadá. Los granos de cacao usados en el proceso se identificaron como la fuente de contaminación; adicionalmente, deficiencias en las buenas prácticas de manufactura y un escaso control de calidad contribuyeron a la diseminación de la contaminación a las diferentes áreas de la planta. Durante la investigación del brote se analizaron 575 muestras de diferentes productos de chocolate provenientes del mismo lote y en el 7.7 % se detectó la presencia de *S. Eastbourne* (D'Aoust *et al.*, 1975). En un estudio realizado por Tamminga *et al.* (1976), *Salmonella* se detectó en el 6 % de 100 muestras de dos variedades de chocolate (con leche y amargo); adicionalmente estudiaron la sobrevivencia de *S. Eastbourne* y *S. Typhimurium* y

observaron que en chocolate con leche el serotipo Eastbourne sobrevivió más tiempo (9 meses) que el serotipo Typhimurium, mientras que, en chocolate amargo ambos serotipos mueren rápidamente.

El estudio epidemiológico del brote de salmonelosis reportado en Finlandia y Noruega en 1987 con 349 y 12 casos reportados, respectivamente, tuvo una duración de 15 semanas; se aislaron cepas de *S. enterica* de pájaros muertos en ambos países que presentaron el mismo perfil de carencia de un plásmido de virulencia de 60 MDa que las cepas de *Salmonella* involucradas en el brote. A pesar de que la fábrica de chocolate involucrada contaba con las medidas de higiene necesarias, se observó que había pájaros cerca de las áreas de producción (Kapperud *et al.*, 1990).

Más recientemente, se registró una alerta asociada a la presencia de *Salmonella* en chocolate ocurrió en 2017 en Reino Unido e Irlanda, cuando la empresa *Mars Incorporated* frenó la distribución de sus productos de chocolate después de que algunos análisis de sus ingredientes resultaron positivos a la presencia de *Salmonella*. La empresa reconoció que alrededor de 3,000 piezas de chocolate ya habían sido distribuidas y probablemente llegaron al consumidor, por lo que ofreció apoyo por medio de un centro de atención al cliente (BBC, 2017).

Por otro lado, en 2018 en Corea del Sur el Ministerio de Seguridad Alimentaria y Farmacéutica y los Centro de Corea para el Control y Prevención de Enfermedades, anunciaron un brote de salmonelosis en 13 escuelas y en la ciudad de Busan asociados al consumo de pastel de chocolate distribuido por un mismo proveedor; se determinó que la cepa involucrada era *S. Thompson* y se registraron un total de 2,207 reportes (Eun *et al.*, 2019).

## **2.5 Salmonella enterica**

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, e incluye a bacterias anaerobias facultativas, Gram negativas, con un tamaño de 2-3 x 0.4-0.6  $\mu\text{m}$ , móviles, no esporuladas, productoras de  $\text{H}_2\text{S}$ , catalasa positivas, oxidasa negativas, ureasa negativas y negativas para la producción de indol. Pueden

fermentar D-glucosa, sin embargo, no tienen la capacidad de fermentar ni lactosa ni sacarosa.

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Sin embargo, *S. enterica*, presente en animales de sangre caliente, es de mayor interés público debido a su incidencia cercana al 99 % en personas enfermas, contrario al 1 % de incidencia de *S. bongori*, cuyos hospederos son animales de sangre fría. *S. enterica* puede dividirse a su vez en seis subespecies que se denotan con números romanos: I. *S. enterica* subsp. *enterica*, II. *S. enterica* subsp. *salamae*, IIIa. *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb. *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV. *S. enterica* subsp. *houtenae* y VI. *S. enterica* subsp. *indica*; las cuales pueden identificarse por sus estructuras flagelares, de carbohidratos y lipopolisacáridos (Coburn *et al.*, 2007; Pui *et al.*, 2011; FDA, 2012).

Las especies del género *Salmonella* adicionalmente se dividen comúnmente en serotipos, dicha nomenclatura epidemiológica se basa en el huésped en el cual se encuentra el patógeno o de acuerdo con el lugar de donde ha sido aislado, de ahí algunos nombres como *Salmonella* Indiana (Brenner *et al.*, 2000; Sabalet, 2010; Pui *et al.*, 2011; FDA, 2012;). De acuerdo con la OMS (2018), se han podido identificar más de 2,500 serotipos o serovares diferentes derivados de *S. bongori* y *S. enterica*.

La primera subespecie (I. *S. enterica* subsp. *enterica*) incluye aquellos serotipos que únicamente infectan al ser humano, como *S. Typhi*. La segunda subespecie incluye aquellos serotipos que están adaptados a un huésped específico, sin embargo, pueden encontrarse en otros, ejemplo *S. Pollurum* de origen aviar. En el tercer tipo se agrupa a los serotipos restantes (Pui *et al.*, 2011).

Entre los serotipos de *S. enterica* más comunes reportados en casos confirmados de salmonelosis en Estados Unidos, se encuentran *S. Enteritidis* (59.0 %), *S. Typhimurium* (13.6 %), *S. Typhimurium* monofásica (4.7 %), *S. Infantis* (2.3 %) y *S. Derby* (0.7 %) (EFSA-ECDC, 2016).

*S. enterica* tiene la capacidad de sobrevivir bajo diversas condiciones ambientales fuera del huésped, no requiere NaCl para su crecimiento, sin embargo, es capaz de crecer en condiciones con presencia de 0.4 a 4 % (m/v) de dicha sal. Puede crecer en el rango de temperaturas de 5 a 47 °C, pero su crecimiento óptimo ocurre de 35-37 °C; se ha reportado que algunas cepas tienen la capacidad de crecer en temperaturas que van desde los 2 a los 4 °C y hasta los 54 °C, pero el género no es capaz de sobrevivir a temperaturas mayores a 70 °C. Tiene un crecimiento en pH de 4 a 9 con un óptimo de crecimiento entre 6.5 y 7.5. En cuanto a su requerimiento de actividad de agua, puede desarrollar entre 0.94 a 0.99; sin embargo, es capaz de sobrevivir en alimentos secos que tienen una  $a_w < 0.2$  (Pui *et al.*, 2011).

Es posible encontrar la presencia de *S. enterica* en diversos alimentos con baja  $a_w$  como huevo deshidratado, especias o hierbas deshidratadas, semillas, harina de soya, tahini, cebolla deshidratada, crema de cacahuete, pimienta negra, champiñones deshidratados cereales de avena, chocolates y harinas (Burgess *et al.*, 2016).

### 2.5.1 Salmonelosis

*S. enterica* es capaz de colonizar el tracto intestinal de vertebrados, ganado, aves de corral, animales domésticos y humanos. *S. enterica* ocasiona dos tipos de enfermedad de acuerdo con el serotipo: salmonelosis no tifoidea (enfermedad gastrointestinal) y fiebre tifoidea (FDA, 2012). Las características de ambas enfermedades se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de la salmonelosis y de la fiebre tifoidea

	Salmonelosis	Fiebre tifoidea
Serotipos asociados	Serotipos distintos a <i>S. Typhi</i> y <i>S. Paratyphi</i> (Typhimurium y Enteritidis los más comunes)	<i>S. Typhi</i> y <i>S. Paratyphi</i> (A, B o C)

Mortalidad	Cercana al 1 %, a excepción de la tasa asociada a S. Enteritidis, la cual asciende a 3.6 %.	10 % de las personas sin tratamiento
Aparición de síntomas	6 a 72 h	1 a 3 semanas
Dosis infectante	Desde una célula	< 1000 células
Síntomas	Náusea, vómitos, diarrea, espasmos y fiebre	Fiebre muy alta, diarrea o constipación, dolor generalizado, dolor de cabeza, letargo y algunas veces, sarpullido
Duración	4 a 7 días	2 a 4 semanas
Fuente de contaminación	Oral (ingestión de comida contaminada, partículas fecales o agua contaminada)	Oral (ingestión de comida contaminada, partículas fecales o agua contaminada)

Fuente: FDA, 2012.

Alrededor del mundo existen aproximadamente 550 millones de personas que contraen salmonelosis no tifoidea anualmente, de las cuales, 220 millones son niños menores de cinco años (Organización Mundial de la Salud, 2018). En cuanto a las estadísticas epidemiológicas en el país, de acuerdo a la revisión realizada por Contreras-Soto *et al.* (2018), en evaluaciones realizadas en México entre 1968 y marzo 2018, se encontró evidencia de la presencia de al menos 216 serotipos presentes en el país, siendo Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Agona, Oranienburg, Derby, Infantis, Ohio, Havana y Meleagridis los más comunes; los alimentos de origen animal fueron la principal fuente de aislamiento.

De igual forma se encontró que aquellos estados en donde predomina un clima cálido-húmedo presentan un mayor registro de enfermedades relacionadas a

*S. enterica*, siendo Sinaloa y Tamaulipas los estados que presentan un mayor número de casos asociados a fiebre tifoidea (Contreras-Soto *et al.*, 2018).

En la Figura 2 se muestran gráficamente los casos de salmonelosis reportados en México durante el periodo 2000 a 2019 en el “Anuario de Morbilidad 1984-2019”. En el periodo mencionado se reportaron un total de 718,362 casos de fiebre tifoidea y 2,083,686 de casos de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis.



Figura 2. Casos reportados de salmonelosis en México durante el periodo 2000-2019.

Fuente: Dirección General de Epidemiología, 2019.

En la Figura 2 se puede observar que la tendencia para fiebre tifoidea es de un crecimiento a través del tiempo, reportando ligeras disminuciones en algunos años, sin embargo, el número de casos se mantiene casi constante, entre 40,000 y 60,000 casos, a partir del año 2007 y hasta 2015. Para fiebre paratifoidea y otras salmonelosis, se reporta mayor variación en el número de casos registrados, sin embargo, el registro se mantiene arriba de los 80,000 casos registrados por año durante todo el periodo 2000-2018.

### 2.5.2 Supervivencia de *Salmonella enterica* en alimentos de baja $a_a$

*S. enterica* es una bacteria que puede sobrevivir por periodos prolongados en condiciones de baja  $a_a$  (Finn *et al.*, 2013). La supervivencia de *S. enterica* en un alimento no depende únicamente de la actividad de agua, sino también de otros factores como la composición de la matriz del alimento en donde se encuentre y la temperatura de almacenamiento. Existen factores que pueden favorecer el crecimiento bacteriano y por lo tanto, incrementar la posibilidad de ocurrencia de una enfermedad transmitida por alimentos. Estos diversos factores pueden estar relacionados con las características del alimento (factores intrínsecos del alimento), con el comportamiento de los microorganismos presentes (factores intrínsecos del microorganismo) o con el ambiente en donde se encuentra el alimento (factores extrínsecos) (Pan American Health Organization, 2015) (Tabla 6).

Tabla 6. Factores relacionados a la supervivencia y desarrollo de microorganismos en alimentos.

Factores	Parámetros
Intrínsecos del alimento	Integridad física
	Nutrientes disponibles
	pH
	Potencial de óxido reducción
	$a_a$
Intrínsecos de los microorganismos	Sustancias antimicrobianas
	Número y tipo
	Adaptación al sustrato
	Estado fisiológico
	Asociaciones microbianas
Extrínsecos	Temperatura
	Composición de la atmósfera
	Humedad relativa

Fuente: Modificado de Fernández-Escartín, 2008.

En particular, en el chocolate existen factores que pueden influir en la tasa de sobrevivencia de las bacterias incluida *S. enterica*. El alto contenido de grasa protege a las células de la desecación y puede conferir resistencia y protección a la bacteria al entrar en contacto con los jugos gástricos del estómago, por lo que, la bacteria tiene mayor oportunidad de entrar al tracto gastrointestinal bajo y colonizarlo (Finn *et al.*, 2013). El bajo nivel de pH y baja  $a_a$  en el chocolate puede desencadenar la expresión génica de algunos mecanismos de sobrevivencia en el patógeno para tolerar el calor la baja  $a_a$  y permanecer viable por más tiempo en el alimento (Podolak *et al.*, 2010). Por otro lado, la temperatura de almacenamiento del alimento y la presencia de compuestos antimicrobianos en el mismo, como la cocoa, influyen en el tiempo de sobrevivencia del patógeno (Busta y Speck, 1968; Finn *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Komitopoulou y Peñaloza (2009) sobre la sobrevivencia de *S. enterica* en alimentos con baja  $a_a$ , mostraron que la viabilidad del patógeno es afectada por el origen de cepa (asociadas a brotes y no asociadas) y la temperatura de almacenamiento. Reportaron que el almacenamiento de alimentos de baja  $a_a$  (aceite de manteca de cacao, cacao triturado, cáscaras de avellana, granos de cacao y granos de almendras) a 5°C favoreció la sobrevivencia de *S. enterica* en comparación con el almacenamiento a 21 °C. Adicionalmente, observaron que las cepas inoculadas asociadas a brotes de enfermedad tenían una mejor sobrevivencia que las cepas inoculadas no asociadas; específicamente se observó una mejor resistencia de los serotipos *S. Oranienburg* y *S. Enteritidis* PT30 bajo las dos condiciones de temperatura mencionadas.

#### 2.5.2.1 Mecanismos de sobrevivencia de *Salmonella enterica* en ambientes de baja actividad de agua

La exposición a factores estresantes como la escasez de nutrientes, acidez, calor, oxidación y desecación son causantes de propiciar la activación de algunos



mecanismos de sobrevivencia en *S. enterica* para tolerar las condiciones del ambiente, los cuales derivan en la capacidad de adaptarse rápidamente, por ejemplo a un ambiente con estrés hiperosmótico, generado por la concentración elevada de solutos en comparación con los presentes intracelularmente (Spector y Kenyon, 2012).

La baja disponibilidad de agua dificulta que las bacterias tengan la mínima cantidad de agua disponible para llevar a cabo sus funciones de mantenimiento o desarrollo celular (Potts, 1994). Los mecanismos que se activan para inducir la sobrevivencia de *S. enterica* están asociados a reguladores como el factor sigma  $\sigma^s$ , el cual incrementa o disminuye la expresión de genes vinculados a la respuesta de estrés (Villa, 2015). El factor sigma tiene cerca de 100 promotores que regulan la sobrevivencia de *S. enterica* en condiciones de estrés por diversas causas (Spector y Kenyon, 2012; Villa, 2015).

Al estar en alimentos de baja  $a_w$ , *S. enterica* tiende a mantener su presión de turgencia mediante el incremento de la concentración intracelular de solutos compatibles (Spector y Kenyon, 2012; Finn *et al.*, 2013). La respuesta inmediata de la bacteria al encontrarse en alimentos, como el chocolate, es mantener rápidamente un balance en la presión osmótica mediante el movimiento de moléculas de agua a través de la membrana interna y la pérdida de agua del citoplasma. Estas moléculas de agua pasan directamente a través de la bicapa de fosfolípidos o mediante proteínas específicas de canal denominadas acuaporinas o AqpZ (Calamita *et al.*, 1995; Delamarche *et al.*, 1999). Posteriormente, inicia la expresión de dos porinas de membrana, denominadas OmpF y OmpC, las cuales están involucradas en la difusión pasiva de los solutos. El incremento de la transcripción de *ompC* está relacionado con la exposición de *S. enterica* a la desecación por NaCl después de 12 min (Finn *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se ha observado que los organismos tienden a responder a los cambios en la osmolaridad externa, mediante la acumulación o salida de solutos de bajo peso molecular con el propósito de mantener un balance en su osmolaridad, para lo cual se han propuesto dos modelos. El primero es el “Modelo de control de

turgencia” el cual menciona que inicialmente hay una acumulación en la célula de  $K^+$ , el cual posteriormente actúa como segundo mensajero para desencadenar los otros mecanismos asociados a la respuesta osmótica. El segundo modelo o “Modelo de fuerza iónica” propone que el factor condicionante para la activación de la respuesta celular hacia las condiciones de osmolaridad es el aumento de la fuerza iónica en el citoplasma (Balaji *et al.*, 2005).

Por ende, a los pocos minutos después de la exposición, la bacteria tiende a iniciar la transcripción del operón *kdpABC*, el cual está involucrado con un sistema de alta afinidad de transporte de  $K^+$  (gen *kdp*). Este proceso deriva en la rápida acumulación de  $K^+$  intracelular, sin embargo, esta respuesta celular es rápidamente reemplazada por la acumulación de compuestos orgánicos conocidos como solutos compatibles. En este mecanismo, participan los sistemas de transporte de membrana ProP y ProU, los cuales transportan los solutos hacia adentro de la célula incluyendo glicina, betaína y prolina; si estos solutos no se encuentran disponibles en el ambiente externo, entonces la célula inicia la síntesis del disacárido trehalosa, el cual actúa como su principal osmoprotector (Spector y Kenyon, 2012). Cuando un organismo ha perdido agua, se le conoce como estado de anhidrobiosis, en el cual puede sobrevivir por un largo periodo de tiempo sin agua; cuando el microorganismo es rehidratado, rápidamente se reactivan las funciones celulares.

En microorganismos que han sufrido desecación se ha encontrado altas cantidades de azúcares y alcoholes, representando aproximadamente el 20 % de su peso seco, por lo que se ha propuesto la posible relación de disacáridos, como la trehalosa, en la sobrevivencia de bacterias ante condiciones de estrés osmótico (Potts, 1994).

Las moléculas de trehalosa forman una capa protectora alrededor de las proteínas, con lo cual previene la desnaturalización y en consecuencia, la pérdida de su función (Potts, 1994; Crowe *et al.*, 1998; Kaushik y Bhat, 2003). Para este proceso de protección, se ha sugerido que las moléculas de trehalosa reemplazan a las moléculas de agua presentes en la célula, las cuales, en condiciones normales están unidas a moléculas de la membrana y a las cadenas laterales de aminoácidos

(Crowe *et al.*, 1998). Se ha visto que la expresión de genes para la síntesis de trehalosa se activa en condiciones de desecación, evaluada en discos de papel y acero inoxidable, además de algunos alimentos como leche en polvo, pimienta negra, alimento seco para mascotas y chocolate, lo cual sugiere la posible importancia de la biosíntesis de la trehalosa para la tolerancia de *S. enterica* a la desecación sobre superficies abióticas y en alimentos con baja  $a_a$  (Li *et al.*, 2012; Finn *et al.*, 2013; Crucello *et al.*, 2019). Las moléculas de trehalosa pueden ser sintetizadas a partir de glucosa, maltosa y maltodextrinas a través de cinco diferentes rutas biosintéticas (Avonce *et al.*, 2006). En la biosíntesis de trehalosa, participan enzimas que son codificadas por los genes *otsB* y *otsA*, dentro del operón *otsBA* (Spector y Kenyon, 2012; Aviles *et al.*, 2013). Las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa (OtsA) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (OtsB) catalizan la conversión de UDP glucosa y glucosa 6-fosfato a trehalosa (Howells *et al.*, 2002), siguiendo la ruta de la Figura 3.

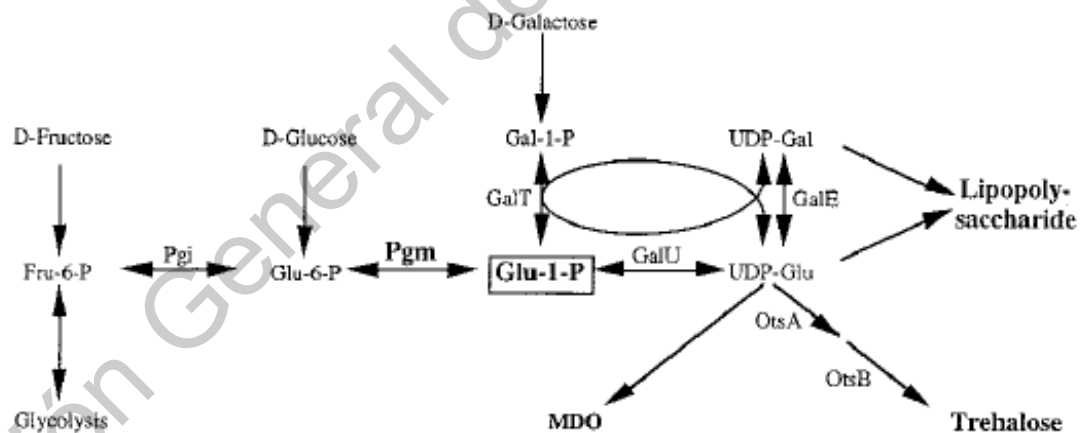


Figura 3. Biosíntesis de trehalosa  
Fuente: Cánovas *et al.*, 2001.

Tournu *et al.* (2013) reportaron que en estudios realizados con cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, que la supresión del gen *otsA* derivó en algunos defectos de crecimiento en la bacteria, mientras que la ausencia de expresión del gen *otsB* fue esencial para mantener la viabilidad celular.

Por otro lado, se ha reportado que la composición y estructura de la membrana celular, que consiste en una bicapa de fosfolípidos con proteínas embebidas, se modifica por la exposición al estrés osmótico con el propósito de mantener la fluidez de la membrana (Romantsov *et al.*, 2009). En el caso de las bacterias Gram negativas, la membrana externa tiene una estructura asimétrica, debido a que su membrana interna está constituida predominantemente de fosfolípidos mientras que la externa está constituida de lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos se forman a partir de la unión de tres regiones, el lípido A, polisacárido central y polisacárido O, la ausencia del polisacárido O está relacionado a cepas con una menor sobrevivencia a la desecación (Garmiri *et al.*, 2008). Estudios realizados por Garmiri *et al.* (2008), con cepas de *S. Typhimurium* tratadas con aire caliente para provocar desecación, mostraron que después de 24 h las cepas con el polisacárido central completo, pero con ausencia del polisacárido O, tuvieron una reducción en su resistencia al tratamiento.

Otro mecanismo de sobrevivencia de las bacterias a una baja  $a_w$  es la formación de filamentos. Jones *et al.* (2013) reportaron que el transporte activo y la acumulación o biosíntesis de solutos compatibles podrían generar un agotamiento de la energía disponible en la célula, lo cual conduce a la formación de filamentos; dicho mecanismo ha sido observado en patógenos como *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *B. cereus* expuestos a la presencia de elevadas concentraciones de NaCl, glicerol y azúcar. Se considera que la filamentación es causada por problemas en la división celular, cuando las proteínas asociadas a la división celular son inestables o cuando no se encuentran en la tasa requerida, así como en cambios en la expresión génica y por lo tanto, en la síntesis de proteínas.

Se ha reportado que las células filamentosas son más largas que las células simples pero tienen aproximadamente el mismo grosor, cuando las células filamentosas son expuestas a condiciones de menor estrés, los filamentos pueden dividirse en células individuales. Estudios realizados por Mattick *et al.* (2000) con *S. enterica* serovar Enteriditis PT4 y *S. enterica* serovar Typhimurium DT104, demostraron que la aparición de filamentos de al menos 200  $\mu\text{m}$  de longitud bajo

estrés osmótico, no depende de la expresión del gen *rpoS* (asociado a la sobrevivencia por estrés), ya que las células deficientes de dicho gen son capaces de formar filamentos, aunque su tolerancia a ambientes con baja  $a_a$  no sea la misma que las células con expresión normal del gen *rpoS*; adicionalmente, el estudio mostró que los niveles de sobrevivencia a bajos niveles de  $a_a$  fueron mejores a 21 °C que a 37 °C.

Burgess *et al.* (2016) reportaron que otro mecanismo de sobrevivencia observado en células de *S. Enteritidis*, es la degradación de moléculas de ARN ribosomal, lo cual puede funcionar como una fuente de nutrientes para la célula durante el periodo de adaptación ante la exposición a condiciones de baja  $a_a$ . Por lo tanto, este mecanismo de degradación está en concordancia con la necesidad de la célula por una mayor biosíntesis de osmoprotectores y un aumento del catabolismo de ácidos grasos en la célula. Se ha reportado que en chocolate con leche, después de 24 h de inoculación de *S. enterica* en el alimento, se ha observado que las primeras células en morir durante este periodo liberan nutrientes que son aprovechados por las demás células (Finn *et al.*, 2013).

Se ha reportado que *S. enterica* es capaz de formar fimbrias tipo curli y sintetizar celulosa como mecanismos de sobrevivencia ante condiciones de estrés por desecación. De igual forma, también tiene la capacidad de formar capas de glicocálix (compuesto principalmente por exopolisacáridos y proteínas) que forman una matriz extracelular tipo gel, que tienen efectos protectores hacia la bacteria en condiciones de estrés por baja  $a_a$  (Finn *et al.*, 2013). La proteína reguladora CsgD controla la biosíntesis de la celulosa extracelular y fimbrias necesarias para la formación de biofilms, el cual se ha demostrado que confiere resistencia a las células bacterianas en su paso por el ambiente gástrico (Spector y Kenyon, 2012; Aviles *et al.*, 2013). En estudios realizados por White *et al.* (2006) se realizaron modificaciones a cepas de *S. Typhimurium* en genes relacionados con la secreción de fimbrias curli y celulosa, para demostrar que las cepas expuestas a condiciones no controladas tienen mayor probabilidad de sobrevivir al almacenamiento y bajo estrés por exposición a hipoclorito de sodio. En el estudio se observó que el efecto

de la deshidratación en células de *S. Typhimurium* ATCC 14028, hubo una mejor sobrevivencia a lo largo del tiempo incluso hasta los 9 meses, en comparación con aquellas cepas modificadas para inducir la supresión de los genes para la expresión de fimbrias y celulosa.

### 2.5.3 Resistencia cruzada inducida por estrés osmótico

La exposición de *S. enterica* a ambientes de baja  $a_a$  puede provocar que la bacteria desarrolle una resistencia cruzada ante otros factores de estrés ambientales. Los mecanismos de sobrevivencia expresados por *S. enterica* durante el estrés osmótico también proveen protección contra radiación UV, agentes químicos desinfectantes, calor seco y sales biliares. Esta característica, aunada a la composición del alimento y la temperatura de almacenamiento, puede influir en la sobrevivencia del patógeno por largos periodos en algunas matrices alimenticias (Finn *et al.*, 2013).

Estudios previos han asociado las condiciones de estrés por desecación en *S. enterica* a la adquisición de una alta tolerancia térmica y a ambientes con etanol, en cuanto a esto, Gruzdev *et al.* (2011) estudió la viabilidad de células de *S. Typhimurium* estresadas por desecación (tratadas a 40 % de humedad relativa y 25 °C por 22 h) y su respuesta ante otros factores de estrés. Las células estresadas de *S. Typhimurium* fueron más resistentes a los tratamientos de ambientes con etanol (10 a 30 %, por 5 min), hipoclorito de sodio (10 a 100 ppm, 10 min), cloruro de didecildimetilamonio (0.05 a 0.25 %, 5 min), peróxido de hidrógeno (0.5 a 2.0 %, 30 min), NaCl (0.1 a 1 M, 2 h), sales biliares (1 a 10 %, 2h), calor seco (100 °C, 1h) y radiación por luz UV (125  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , 25 min); los serotipos *S. Enteritidis*, *S. Newport* y *S. Infantis* tuvieron respuestas similares hacia la exposición a los factores mencionados.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de *S. enterica* en chocolate con leche y evaluar la capacidad de sobrevivencia del patógeno en el alimento y la expresión del gen *otsB*.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la prevalencia de *S. enterica* en chocolate con leche de venta a granel en la ciudad de Querétaro y cuantificar los microorganismos indicadores de calidad sanitaria de mayor importancia en el alimento.
2. Evaluar el efecto del origen de la cepa y el método de preparación del inóculo en el comportamiento de *S. enterica* en chocolate con leche almacenado a 25 °C.
3. Determinar la expresión del gen *otsB*, asociado la síntesis de trehalosa, durante el almacenamiento de chocolate con leche inoculado con *S. enterica*.

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Equipos, materiales y reactivos

#### 4.1.1 Equipos

AquaLab LITE (Decagon Devises Inc.)

Cámara de electroforesis (BIO-RAD)

Campana de bioseguridad tipo II tipo A/B3 (LABCONCO)

Centrífuga 5702 (Eppendorf)

Espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000)

Fotodocumentador de luz UV (Kodak DC290)

Fuente de voltaje PowerPac 200 (BIO-RAD)

Homogenizador mecánico Stomacher (Seward, London, England)

Incubadora CO2 HERAcCell 150i (Thermo Scientific)

Potenciómetro, Orion 410A

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Qiagen®)

Sistema de documentación de geles Gel Doc XR (BIO-RAD)

Termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf)

#### 4.1.2 Materiales

##### 4.1.2.1 Alimentos

Lote de chocolate con leche (Callebaut®) de venta a granel obtenido en una tienda de repostería en la ciudad de Querétaro, México.

##### 4.1.2.2 Material biológico

*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076

*Salmonella* Montevideo ATCC 8387

*Salmonella* Thompson ATCC 8391



*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

*Salmonella* Typhimurium ATCC 23595

Cepas de *Salmonella* sp. aisladas de chocolate

#### 4.1.3 Reactivos

##### 4.1.3.1 Soluciones y reactivos

10X DNase I Reaction Buffer

2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen®)

5X First-strand buffer

Ácido bórico

Ácido clorhídrico 0.1 N

Ácido sulfúrico

Ácido tartárico al 10 %

Agarosa al 2, 3 y 5 % (Bioline)

Agua estéril libre de DNasas-RNasas (Invitrogen)

AllPrep® PowerViral® DNA/RNA Kit (Qiagen®)

Bromuro de etidio (BIO-RAD)

Buffer fosfato-salino (PBS)

Buffer TAE 1X

DNase I (1 U/μL)

dNTP mix (10 mM)

DTT (0.1 M)

Etanol 75 % (preparado con agua DEPC)

Éter etílico anhidro

Gránulos de zinc

Hidróxido de sodio

Isopropanol (Sigma-Aldrich)

Leche descremada en polvo  
Marcador de peso molecular 10 bp (0.1 µg/µL) (Thermo Scientific)  
Marcador de peso molecular DNA 100 bp (Promega)  
Marcador de peso molecular DNA 100 bp (Promega)  
Parafina  
Reactivo de Kovac  
Reactivo Shiro Tahiro  
Retrotranscriptasa M-MLVRT (200 U)  
Rifampicina  
RnaseOUT  
Solución amortiguadora de fosfatos  
Solución salina isotónica estéril  
Solución verde brillante al 1%  
Sulfato de cobre  
Sulfato de sodio anhidro  
Sybr safe (Invitrogen)  
Tinta de carga azul/naranja 6X (Promega)  
β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.3.2 Medios de cultivo

Agar De Dextrosa y Papa (DIBICO)  
Agar Hierro y Lisina (DIBICO)  
Agar Hierro y Triple Azúcar (BD Bioxon)  
Agar Soya Trypticase (DIBICO)  
Agar Sulfito de Bismuto (DIBICO)  
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (BD Difco)  
Caldo Lauril Sulfato De Sodio con MUG (DIBICO)

Caldo Lauril Triptosa  
Caldo Muller-Kauffmann Tetratonate Novobiocina (Sigma)  
Caldo Rappaport Vassiliadis (BD Difco)  
Caldo Soya Tripticasa (DIBICO)  
Caldo Urea (DIBICO)  
Caldo Verde Brillante Bilis (DIBICO)  
Diluyente de Peptona (DIBICO)

## **4.2 Metodología**

### **4.2.1 Sitios de muestreo**

Se realizó la recolección 100 muestras de chocolate con leche de venta a granel en mercados y tiendas de repostería del estado de Querétaro. Las muestras se recolectaron de manera aséptica, se almacenaron en bolsas Ziploc®, y se transportaron en hieleras al Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA) para su análisis. Se realizaron cinco muestreos distribuidos en los periodos de octubre-noviembre de 2020 y abril-mayo de 2021.

### **4.2.2 Cuantificación de microorganismos indicadores**

#### **4.2.2.1 Preparación de muestras**

Se pesaron 25 g de la muestra a analizar y se le adicionaron 225 mL de solución amortiguadora de fosfatos, se verificó que el pH se mantuviera a  $6.8 \pm 0.2$ . Se homogenizó mecánicamente por 2 min hasta lograr una suspensión completa y homogénea; a partir de esta suspensión se prepararon dos diluciones decimales consecutivas en solución amortiguadora de fosfatos.

#### 4.2.2.2 Cuantificación de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli*.

La cuantificación de microorganismos coliformes totales, fecales y *E. coli* se realizó mediante la técnica de Número Más Probable (NMP) siguiendo el procedimiento de la NOM-210-SSA1-2014 para alimentos. Se pesaron 25 g del alimento y se le adicionaron 225 mL de solución amortiguadora de fosfatos, posteriormente se homogenizó mecánicamente por 2 min. Para la cuantificación se empleó una batería de seis tubos, para esto se transfirió 1 mL de cada una de las diluciones a tres tubos conteniendo caldo lauril triptosa (9 mL) los cuales se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 h. De cada tubo positivo (los que presentaron turbidez y formación de gas dentro del tiempo de incubación), se tomaron alícuotas (100  $\mu\text{L}$ ) y se transfirieron tres tubos con caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB) (3 mL) y tres tubos con caldo lauril sulfato (CLS) con MUG (3 mL). El tubo con CLBVB se incubó a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 h mientras que el tubo de CLS + MUG se incubó a  $44.5^\circ\text{C}$  en un baño de precisión durante 48 h. Para el CLBVB la presencia de gas evidenció que la prueba fue positiva para CT en el tubo incubado a  $35^\circ\text{C}$  y CF en los incubados a  $44.5^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.2.3 Cuantificación de hongos y levaduras

De acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994, el recuento de hongos y levaduras (H&L) se realizó mediante la técnica de vaciado en placa, usando agar papa dextrosa adicionado con ácido tartárico al 10 % para lograr un pH de  $3.5 \pm 0.1$ . Las cajas se incubaron a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5 días.

#### 4.2.3 Detección y cuantificación de *Salmonella enterica*

La detección de *S. enterica* se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por la FDA en el *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 2014). Inicialmente se pesaron asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril y se le agregaron 225 mL de leche descremada en polvo reconstituida y estéril y se mezclaron mecánicamente por 2 min. Se transfirió asépticamente a un nuevo

recipiente con capacidad de 500 mL con tapón de rosca y se dejó en reposo por aproximadamente  $60 \pm 5$  min a temperatura ambiente. Se mezcló por agitación y se midió el pH, siendo ajustado en caso de ser necesario a  $6.8 \pm 0.2$ , finalmente se agregaron 0.45 mL de solución verde brillante al 1 % y se aflojó la tapa  $\frac{1}{4}$  de vuelta, por último se dejaron en incubación por  $24 \pm 2$  h a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Después de la incubación se agitó suavemente la muestra y se transfirió 0.1 mL de la suspensión de preenriquecimiento a 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (RVS) y se incubó por  $24 \pm 2$  h a  $42 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$  (en baño de agua, controlando la temperatura con termostato). De la misma suspensión de preenriquecimiento se transfirió 1 mL de la mezcla a 10 mL de Caldo Tetrionato (TT) el cual fue incubado por  $24 \pm 2$  h a  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Posterior a la incubación, se tomó un alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de caldo TT para sembrar placas de agar XLD, AVB y SB y se repitió el proceso para el caldo RVS; las placas de los 3 tipos de agar fueron incubadas a  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  h. La confirmación bioquímica se realizó inoculando agar TSI (triple azúcar hierro) y agar LIA (agar lisina-hierro), ambos agares fueron incubados a  $24 \text{ h} \pm 2$  a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Finalmente se hizo la confirmación a las colonias con el perfil bioquímico esperado mediante una prueba basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) previamente validada, que se describe a continuación.

Para la cuantificación de *S. enterica* en las muestras positivas anteriormente identificadas, se utilizó la técnica de NMP con una batería de 9 tubos por muestra y el mismo procedimiento de detección del patógeno establecido en el BAM (FDA, 2014) para cada uno de ellos.

#### 4.2.3.1 Confirmación de *Salmonella enterica* mediante PCR

Las cepas de *S. enterica* aisladas de las muestras de chocolate se activaron en CST fresco a  $36^\circ\text{C}$  por 24 h. Se tomó una alícuota de 1 mL de cultivo y se centrifugó 10 000 rpm durante 3 min, después se resuspendió en SSI para y se colocó en termobloque durante 10 min a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente se llevó a cabo una

PCR empleando 10  $\mu$ L de GoTaq Colorless Master Mix, 1  $\mu$ L del iniciador *InvA* F (CGCGCGTTGATGAGCTTTACC) (1.25 mM; Sigma Aldrich), 1  $\mu$ L del iniciador *InvA* R (CTCGTAATTCGCCGCCATTG) (1.25 mM; Sigma Aldrich), 7  $\mu$ L de agua y 1  $\mu$ L de ADN en un volumen final de 20  $\mu$ L.

Las condiciones de PCR fueron las propuestas por Liu *et al.* (2002) que consistieron en 30 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, posteriormente una desnaturalización (95°C por 30 s), alineación (60°C por 90 s) y extensión (72°C por 90 s); además de una extensión final a 72°C por 5 min. El tamaño del amplicón esperado fue de 437 pb. El producto amplificado se reveló mediante electroforesis en un gel de agarosa (2 %) con Sybr Safe a 100 V durante 15 min; y se observó en un fotodocumentador de luz UV (Kodak DC290). Las cepas confirmadas como *S. enterica* se aislaron y se conservaron en CST fresco con glicerol (20 %) a -70 °C.

4.2.4. Efecto del origen de la cepa, el método de preparación del inóculo y la temperatura de almacenamiento en el comportamiento de *Salmonella enterica* en chocolate.

#### 4.2.4.1 Cepas

Se emplearon cinco cepas de *S. enterica* (*S. Eastbourne* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 23595, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Thompson* ATCC 8391 y *S. Montevideo* ATCC 8387) provenientes del cepario del LECRIMA y cinco cepas aisladas de chocolate, cuatro aisladas previamente por el grupo de trabajo y una en este estudio. A todas las cepas se les indujo la resistencia a rifampicina.

#### 4.2.4.2. Chocolate

Se compraron 10 kg de chocolate con leche Callebaut® de venta a granel a un solo proveedor establecido en la ciudad de Querétaro, el chocolate se almacenó en bolsas Ziploc® y se transportó a temperatura ambiente en hieleras al LECRIMA para su uso.

#### 4.2.4.3 Caracterización física y química del chocolate

Se tomaron muestras completamente al azar de chocolate y se sometieron a análisis físicos y químicos. Se determinó el contenido de lípidos totales, proteína, cenizas, contenido de humedad, actividad de agua y pH. Los análisis se realizaron por personal del Laboratorio Especializado en Análisis de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro, empleando la metodología descrita en la AOAC (2002): humedad (931.04), cenizas (923.03), extracto etéreo (920.39), proteínas (970.22) y carbohidratos obtenidos por diferencia de los componentes.

#### 4.2.4.3.5 Análisis de actividad de agua

Se usó el equipo Aqualab LITE (previamente calibrado) con higrómetro a punto de rocío, según la AOAC, 978.18. Se colocaron las muestras en charolas y se midió la  $a_w$  de acuerdo con las especificaciones del equipo.

#### 4.2.4.3.6 pH

Se tomaron porciones de 10 g de chocolate y se trituraron en un mortero, se mezclaron con 2 mL de agua destilada recientemente hervida y atemperada a 25 °C hasta formar una pasta. Luego se sumergió el electrodo del potenciómetro (previamente calibrado) y se midió el valor de pH.

#### 4.2.4.4 Preparación del inóculo

Para evaluar el método de preparación del inóculo se siguió el procedimiento de realizado por Uesugi *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Se prepararon dos mezclas de cepas: a) mezcla de cepas de referencia (CR) y b) mezcla de cepas aisladas de chocolate (CC).

#### 4.2.4.4.1 Activación de cepas

De las cepas conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  se tomó una asada de cada una y se transfirió por separado a caldo soya tripticasa fresco (CST) incubándolo por  $24 \pm 2$  h a  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; se realizó un segundo pase tomando  $100\text{ }\mu\text{L}$  de cada tubo de caldo inoculado para transferirlo a CST fresco de manera independiente, los tubos se incubaron nuevamente por  $18 \pm 2$  h a  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.4.4.2 Inóculo a partir de dos tipos de agar

A partir de los tubos de CST incubados por  $18 \pm 2$  h a  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se tomaron  $0.1\text{ mL}$  de cada uno de los cultivos y se sembraron por extensión en superficie en 3 placas de AST y en 3 placas de AST suplementado con  $10\%$  de chocolate (ASTC), ambos tipos de placas se incubaron por  $24 \pm 2$  h a  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las colonias de las tres placas se removieron bajo condiciones asépticas de la superficie del agar usando asa estéril y se colocaron en  $10\text{ mL}$  de solución amortiguadora de fosfatos; se realizaron dos lavados de las cepas centrifugando los tubos a  $6\ 000\text{ rpm}$  por  $3\text{ min}$ , en cada uno se usaron  $10\text{ mL}$  de la solución amortiguadora de fosfatos estéril y se decantó el sobrenadante. La pastilla final de cada cepa fue resuspendida en  $10\text{ mL}$  de solución estéril de chocolate al  $10\%$ ; posteriormente se mezcló el volumen de cada cepa de acuerdo al origen y tipo de agar, y se obtuvo un volumen final de  $50\text{ mL}$ .

La concentración celular en la suspensión de cada inóculo se determinó mediante la preparación de diluciones decimales en diluyente de peptona al  $0.1\%$ , empleando la técnica de vaciado en placa en AST adicionado con rifampicina (ASTR) ( $100\text{ ppm}$ ). Las placas se incubaron a  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{ h}$ .

Finalmente a manera de control, se incluyeron ambos conjuntos de cepas (CR y CC) crecidas en caldo soya tripticasa. La pastilla final de cada cepa fue resuspendida de igual manera en solución estéril de chocolate al  $10\%$  y posteriormente se mezcló el volumen de cada cepa de acuerdo al origen, obteniendo también un volumen final de  $50\text{ mL}$  de cada una de las dos mezclas.



#### 4.2.4.5 Inoculación de *Salmonella enterica* y almacenamiento de chocolate

Dentro de una campana de flujo laminar el chocolate con leche (0.5 kg) se colocó en charolas de acero inoxidable estériles, se distribuyó para cubrir el fondo de la charola (aproximadamente 1 cm de espesor) y se inoculó por aspersión con las suspensiones celulares ( $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) del apartado 4.2.4.4.2; el procedimiento se repitió hasta obtener 1 kg de cada tratamiento. Las muestras inoculadas se dejaron secar dentro de la campana hasta que se alcanzó el valor original de  $a_a$  del chocolate. Las muestras secas se almacenaron en bolsas de plástico herméticamente selladas y protegidas de la luz a  $25 \pm 1$  °C.

#### 4.2.4.6. Cuantificación de *Salmonella enterica*

Se cuantificó la población de *S. enterica* en el chocolate con leche antes y después del secado, y periódicamente durante el almacenamiento por 245 días, cuantificando el patógeno semanalmente al inicio y espaciando el muestreo según la tendencia observada. Para ello, de cada tratamiento se pesaron 3 muestras aleatorias de 10 g de chocolate cada una y se les adicionaron 90 mL de solución amortiguadora de fosfatos, la cual fue previamente calentada a una temperatura de 35 °C. La suspensión fue homogenizada mecánicamente en *Stomacher* por 1 min. La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica de extensión en superficie en ASTR (100 ppm) usando varillas de vidrio; las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 24 h. De cada muestra se seleccionaron al azar algunas colonias para confirmarlas como *S. enterica* mediante pruebas bioquímicas (TSI y LIA). Durante cada día de análisis, se congelaron porciones de chocolate con leche (25 g) de cada tratamiento a  $-70$  °C para posteriormente cuantificar la expresión del gen *otsB*.

#### 4.2.5 Expresión del gen *otsB* en células de *Salmonella enterica*

##### 4.2.5.1 Preparación de muestras

Para las muestras líquidas (controles), inicialmente se descongelaron los inóculos, las cuales se encontraban almacenadas a -70 °C, y posteriormente de cada uno se tomaron 10 mL y se transfirieron a un tubo Falcon estéril. La solución se llevó a centrifugación a 6 000 g por 5 min, se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla en el mismo volumen de buffer fosfato-salino (PBS) estéril. Enseguida la pastilla se resuspendió en 5 mL de PBS.

Para las muestras sólidas, se tomaron 10 g de cada muestra y se añadieron 20 mL de PBS estéril, después cada una se homogenizó mecánicamente en *Stomacher* por 2 min. Posteriormente de cada muestra, se tomaron primero 10 mL en tubo Falcon y se centrifugaron a 6 000 g por 5 min, después de transfirieron los 10 mL restantes y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. Se realizó un lavado de la pastilla en el mismo volumen de buffer fosfato-salino (PBS) estéril y finalmente, se resuspendió la pastilla en 3 mL de PBS.

##### 4.2.5.2 Extracción de ARN

Se utilizó el kit de extracción AllPrep® PowerViral® DNA/RNA Kit (Qiagen®), empleando 200 µL de la preparación anterior de cada muestra, y se siguieron las instrucciones del fabricante. El kit está diseñado para una purificación eficiente de ácidos nucleicos de origen viral o microbiano en muestras con altos niveles de inhibidores de PCR. Para lograr una lisis eficiente utilizó la combinación de un buffer de lisis química fuerte y de tubos *PowerBead Glass* 0.1 mm, ambos incluidos en el kit, así como la adición de β-mercaptoetanol para la extracción de ARN. Adicionalmente, se añadió la solución incluida con Tecnología Removidora de Inhibidores (IRT®) para asegurar la completa remoción de sustancias inhibitoras en la muestra. La concentración de ARN obtenida fue determinada en un NanoDrop ND-1000.

#### 4.2.5.3 Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN previamente obtenidas, se siguió el siguiente procedimiento:

1. De cada una de las muestras se tomó la cantidad necesaria para tener 1  $\mu\text{g}$  de ARN, posteriormente se añadió 1  $\mu\text{L}$  de 10X DNase I Reaction Buffer, 1  $\mu\text{L}$  de DNase I y se completó la reacción a 10  $\mu\text{L}$  con agua libre de RNasas.
2. Las reacciones se dejaron en incubación por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se llevaron a incubación a 65 °C por 10 min.
3. Se agregó a cada una 1  $\mu\text{L}$  de Random Hexamers y 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM) y se incubó a 65 °C por 5 min, inmediatamente después se llevaron a incubación en hielo por 5 min.
4. Después se agregó a cada tubo de reacción 4  $\mu\text{L}$  de 5X First-strand buffer, 2  $\mu\text{L}$  de DTT (0.1 M) y 1  $\mu\text{L}$  de RnaseOUT y se incubaron a 37 °C por 2 min.
5. Inmediatamente se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de retrotranscriptasa M-MLVRT (200 U) a cada tubo de reacción y se llevó a incubación en termociclador, bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min, 70 °C por 15 min y enfriamiento a 4 °C.
6. Las muestras se almacenaron en refrigeración a – 20 °C.

#### 4.2.5.4 Validación de iniciadores por PCR punto final

La expresión del gen *otsB* fue normalizada con el nivel de expresión del gen *16S rRNA*; por lo que inicialmente se buscó la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) óptima para ambos iniciadores (Tabla 7). Dicha validación se realizó mediante un PCR tradicional o punto final, bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, posteriormente una desnaturalización (95 °C por 30 s), alineación (59 °C por 90 s) y extensión (72°C por 90 s); además de una extensión final a 72 °C por 5 min. Finalmente, se corrió un gel de agarosa al 2 % con SyberSafe a 100 V por 15 min para la confirmación de la amplificación.

Tabla 7. Iniciadores para el análisis transcripcional del gen *otsB* de *Salmonella enterica*.

Nombre del gen	Función	Dirección del primer	Secuencia (5'-3')
16S <i>rRNA</i>	Transcripción	Forward	AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT
		Reverse	GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG
<i>otsB</i>	Respuesta al estrés / Producción de trehalosa	Forward	TTAACCGTATCCCCCGAACTC
		Reverse	CCGCGAGACGGTCTAACAAC

Fuente: Modificado de Balaji *et al.*, 2005 y Lee *et al.*, 2009.

#### 4.2.5.5 qPCR

Para esta etapa se usó el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Qiagen®) y el software Rotor-Gene Q Series Version 2.0.2 (Qiagen®), el análisis realizado fue un qPCR de dos pasos con 40 ciclos, bajo las condiciones: 95 °C por 10 s y 60 °C por 45 s. Para la preparación de las muestras se usó la 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen®) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente se utilizó el valor  $C_t$  para la cuantificación de los niveles de ARNm de los genes de interés y se realizó una curva estándar para ambos genes a partir de concentraciones de ADNc conocidas.

#### 4.2.6 Análisis estadístico

Los resultados del contenido de microorganismos indicadores se transformaron a Log UFC  $g^{-1}$  y se calcularon las medianas. La prevalencia de *S. enterica* se expresó en porcentaje y su cuantificación se transformó a Log NMP  $g^{-1}$ . Adicionalmente se empleó un diseño factorial 3 x 2 completamente al azar con dos réplicas, siendo los factores de estudio: a) método de preparación del inóculo y b) origen de las cepas (Tabla 8). La variable de respuesta evaluada fue la población de *S. enterica* (Log UFC  $g^{-1}$ ). Se realizó un análisis de varianza para comparar la diferencia entre las medias de los tratamientos. Todas las pruebas estadísticas se

realizaron usando el Software JMP 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) y los gráficos fueron modelados en GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego California, USA).

Tabla 8. Factores y niveles para el estudio de sobrevivencia y expresión del gen *otsB* en *Salmonella enterica* presente en chocolate

Factores	Tratamientos
Método de preparación del inóculo	Inóculo a partir de placas de agar soya tripticasa (AST)
	Inóculo a partir de placas de agar soya tripticasa + 10 % de chocolate (ASTC)
	Inóculo a partir de caldo soya tripticasa (CST)
Origen de las cepas	Cepas de referencia (CR)
	Cepas aisladas del chocolate (CC)

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Calidad sanitaria de chocolate con leche de venta a granel

Las 100 muestras de chocolate con leche de venta granel en mercados y tiendas de repostería del estado de Querétaro se recolectaron para su análisis microbiológico durante el periodo de octubre-noviembre de 2020 y abril-mayo de 2021. De acuerdo con la Comisión Estatal de Aguas (CEA) de Querétaro, en el primer periodo de recolección la media de la temperatura ambiental fue de 27.5 °C, mientras que para el segundo periodo fue de 32.8 °C. En las muestras recolectadas se cuantificaron coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, hongos y levaduras y se determinó la presencia de *S. enterica*. El contenido de los microorganismos indicadores en el chocolate con leche se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Contenido de microorganismos indicadores en chocolate con leche.

Sitio de muestreo	Número de muestras	Coliformes Totales	Coliformes Fecales	<i>E. coli</i>	Hongos	Levaduras
		Log NMP g <sup>-1</sup>			Log UFC g <sup>-1</sup>	
Mercado	44	< 0.56 (< 0.56 – 0.56) <sup>a</sup>	< 0.56 <sup>b</sup>	< 0.56 <sup>b</sup>	< 1 <sup>b</sup>	< 1 (<1 – 2.45) <sup>a</sup>
Tienda de repostería	56	< 0.56 (< 0.56 – 0.49) <sup>a</sup>	< 0.56 <sup>b</sup>	< 0.56 <sup>b</sup>	< 1 <sup>b</sup>	< 1

<sup>a</sup>El número fuera del paréntesis indica el valor de la mediana de las muestras analizadas y entre paréntesis se indica el valor mínimo y máximo encontrado.

En relación al contenido de coliformes totales, el 97 % de las muestras analizadas se encontraron por debajo del límite de detección de la técnica de NMP para la batería de tubos usada, mientras que el 100 % de las muestras se encontró por debajo del límite de detección para la cuantificación de coliformes fecales. Por otro lado, en el 87 % de las muestras el contenido de levaduras se encontró por debajo del límite de detección para la técnica de vaciado en placa, con la excepción de una muestra que presentó un valor de 2.45 Log UFC g<sup>-1</sup>, proveniente del

mercado. No se detectó la presencia de hongos ( $< 10 \text{ UFC g}^{-1}$ ) en ninguna de las muestras analizadas.

El bajo nivel de hongos y levaduras encontrado en el producto final puede deberse al procesamiento del cacao, en donde las altas temperaturas empleadas específicamente para el tostado y el mantenimiento de bajos niveles de  $a_w$  tendrán el efecto paralelo de la reducción de la carga microbiana (Beckett, 2008).

De acuerdo a lo establecido por la NOM-186-SSA1/SCFI-2013, los valores permisibles para la presencia de coliformes totales y hongos y levaduras son los enunciados en la Tabla 10.

Tabla 10. Especificaciones microbiológicas para cacao tostado, chocolate sus variedades y productos similares, derivados del cacao de acuerdo a la NOM-186-SSA1/SCFI-2013

Microorganismo	Limite microbiológico
Coliformes totales $\text{UFC g}^{-1}$	10
Mohos y levaduras $\text{UFC g}^{-1}$ <sup>a</sup>	10

<sup>a</sup> valor establecido solo para cacao tostado

Tomando en cuenta las especificaciones de la norma, las muestras analizadas en este estudio si cumplen con los criterios establecidos, con la excepción de la muestra que presentó un valor de  $2.45 \text{ Log UFC g}^{-1}$  para el recuento de levaduras; sin embargo debido a que este valor solo se presentó en una sola muestra más bien puede asociarse a las condiciones de almacenamiento del producto dentro del mercado. De acuerdo a Copetti *et al.* (2014), la presencia de esta clase de microorganismos puede estar asociada al almacenamiento bajo altos niveles de humedad del producto. Pudiera ser que el alimento pudo haber estado en condiciones abiertas con un flujo continuo de corriente o bien, al ser un producto sin empaque, pudo haber estado en contacto con otro alimento con altos niveles de contaminación fúngica.

No obstante de que en este estudio no se encontró una alta presencia de hongos en ninguna de las muestras analizadas, sí se ha reportado la presencia de hongos xerofílicos como *Bettsia alvei* y *Chrysosporium xerophilum* en muestras de chocolate (Kinderlerer, 1997). En un estudio realizado en Brasil se detectó la presencia de ocratoxina A en muestras de chocolate en bajas concentraciones y una asociación entre el nivel de ocratoxina A y la concentración de sólidos de cacao usados en la formulación de chocolate (Copetti *et al.*, 2014). Debido a la tendencia hacia el consumo de productos derivados del cacao que contienen un mayor porcentaje de sólidos de cacao, se podría esperar una mayor exposición a las aflatoxinas y ocratoxinas derivado de la ingesta de estos productos (Copetti *et al.*, 2014). La NOM-186-SSA1/SCFI-2013 menciona que los productos de cacao y derivados de él no deben contener más de 15 µg/kg de aflatoxinas, con la excepción de los productos que contienen semillas y/o cereales cuyo límite es de 20 µg/kg; sin embargo, no hay un criterio para la presencia de ocratoxina A. Como referencia para conocer el límite establecido para ocratoxina A en chocolate, polvo de chocolate y bebidas de chocolate, la Unión Europea establece el límite de 1 µg/kg (Tafari *et al.*, 2004).

Por otro lado, bacterias de la familia Enterobacteriaceae y coliformes han sido empleados ampliamente como indicadores universales de higiene para el monitoreo de alimentos y ambiente. El monitoreo de las Enterobacterias ha permitido establecer medidas eficientes para prevenir o minimizar la contaminación del producto final (Nascimento *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante resaltar que el nivel de Enterobacterias y/o coliformes totales en muestras de alimentos de baja actividad de agua no puede reemplazar el monitoreo de la presencia de *Salmonella* u otros patógenos, dado que bajos niveles de los indicadores microbianos no pueden garantizar la ausencia de patógenos presentes en el producto final (Cordier, 2007). En estudios realizados previamente por Nascimento *et al.* (2005), en el que se evaluó la presencia de Enterobacterias y coliformes totales en muestras de chocolate con leche provenientes de una fábrica de Brasil, se encontró que el 40 % fueron positivas para Enterobacterias con un rango de 1.0-1.5 Log UFC g<sup>-1</sup> y 40 %



positivas para la presencia de coliformes totales con un rango de 0.6-1.0 Log NMP g<sup>-1</sup>, mientras que ni *E. coli* ni *Salmonella* fueron detectadas en las muestras analizadas. Por otro lado, en estudios realizados en España por Barrera *et al.* (2001), en 30 muestras de tabletas de chocolate de las cuales 9 eran de chocolate con leche, se determinó la presencia de *E. coli* en 2 de las 9 muestras (22.2 %), pero en ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de *Salmonella*, *Shigella*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente se encontró que la concentración de hongos y levaduras, en ninguno de los casos sobrepasaba en valor de 1000 UFC g<sup>-1</sup>; sin embargo, en las placas donde si hubo desarrollo fúngico se pudo identificar la presencia de *Mucor* sp. y *Penicillium* sp. para el chocolate con leche.

De acuerdo con las evaluaciones previas realizadas en muestras de chocolate, los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado previamente por otros autores para la carga microbiana esperada para esta clase de alimentos.

## 5.2 Prevalencia de *Salmonella enterica* en chocolate con leche de venta a granel

La prevalencia de *S. enterica* en las 100 muestras analizadas fue del 6 % (Tabla 11). En el periodo octubre-noviembre de 2020 que se podría considerar temporada de frío en Querétaro, se detectó una muestra positiva (2 %) de las 50 analizadas inicialmente, cabe resaltar que la muestra positiva fue adquirida en un mercado local. Mientras que, en el periodo abril-mayo 2021 que correspondería a los meses cálidos la prevalencia del patógeno fue del 10 %, es decir *Salmonella* estuvo presente en 5 de 50 muestras analizadas.

Tabla 11. Prevalencia de *Salmonella enterica* en muestras de chocolate con leche de venta a granel.

Periodo de análisis	Sitio de muestreo	Positividad +/n (%)	Concentración Log NMP g <sup>-1</sup>
	Mercados	1/21 (4.8 %)	1.97

Octubre - noviembre 2020	Tiendas de repostería	0/29 (0 %)	-
			0.48
	Mercados	3/22 (13.6 %)	NR <sup>1</sup>
Abril - mayo 2021			0.96
	Tiendas de repostería	2/28 (7.1 %)	0.87
			1.18

Positividad: número de muestras positivas entre el total de muestras analizadas.

<sup>1</sup>NR no se realizó la cuantificación de *Salmonella* en la muestra.

La prevalencia de *Salmonella* en chocolate reportada en otros trabajos ha sido mayor. Por ejemplo De Smedt *et al.* (1991), analizaron 240 muestras de chocolate empacado resultando un total de 96 muestras positivas (40 %) a *Salmonella* con una concentración que osciló entre 0.4 a 2 células en 25 g de muestra analizada. En estudios realizados para estimar el riesgo de salmonelosis asociado al consumo de chocolate en México, Torres-Vitela *et al.* (1994) detectaron la presencia de *Salmonella* en 2 de 44 (4.5 %) muestras de chocolate empacado y su ausencia en 56 muestras de chocolate de venta a granel o sin empaque. Más recientemente, Aguilar-Vázquez (2015) realizó la evaluación de 70 muestras de granillo de chocolate de venta a granel, encontrando 18 positivas (26 %) a la presencia de *S. enterica*.

La cantidad de células del patógeno en las muestras positivas a *S. enterica* en este estudio, son similares a las encontradas en los brotes de salmonelosis asociados al consumo de chocolate presentados en la Tabla 4. Sin embargo, en la muestra positiva del periodo octubre-diciembre 2020 el valor obtenido sobrepasa a los niveles encontrados en el estudio de Werber *et al.* (2005), así como también a lo reportado por D'Aoust *et al.* (1975) en donde la concentración de *S. Eastbourne* estuvo entre 2 y 9 células de *Salmonella* por pieza de chocolate. De acuerdo con Ma *et al.* (2009), una baja dosis infectante podría ser una respuesta adaptativa de tolerancia donde las células sobrevivientes al ambiente de baja  $a_a$  son más resistentes al estrés y subsecuentemente, más resistentes durante el trayecto por del tracto gastrointestinal y ambiente gastrointestinal ácido.

Es de gran interés el porcentaje de muestras positivas obtenido en esta evaluación, así como la diferencia obtenida entre los dos periodos de evaluación; ya que durante el periodo de meses cálidos se obtuvo un mayor número de muestras positivas al patógeno en las muestras analizadas. Esto pudiera asociarse a una mayor prevalencia del patógeno en estos meses donde las condiciones ambientales permiten un mejor establecimiento de la bacteria (Zhang *et al.*, 2010).

Así mismo, es importante el nivel de contaminación determinado en cada muestra, lo cual pone en evidencia el deficiente manejo de los productos a granel, ya que podría asociarse este hecho a malas condiciones de almacenamiento o un manejo inadecuado del producto durante su venta. En cuanto a la muestra con el valor más alto de contaminación ( $1.97 \text{ Log NMP g}^{-1}$ ) se podría especular que se trató de una contaminación reciente, en donde el patógeno pudo haberse incorporado al alimento mediante el contacto directo con una persona portadora de *S. enterica*. De acuerdo con las recomendaciones de la FAO y OPS (2016), para la prevención de la contaminación de los alimentos, se sugiere que el manipulador de los alimentos se encuentre en óptimo estado de salud, así como que tenga un correcto aseo de manos e higiene de su vestimenta. Adicionalmente, se debe tener cuidado en el almacenamiento de los alimentos (buenas condiciones de humedad y temperatura), limpieza y mantenimiento continuo de los contenedores donde se encuentran los alimentos y una buena rotación de las materias primas o alimentos.

Al ser un alimento considerado listo para su consumo, el chocolate con leche podría ser de mayor riesgo para el consumidor, los cuales son principalmente niños que poseen un sistema inmune menos resistente y desarrollado. Por otro lado, cuando el chocolate se usa en repostería o preparación de cubiertas de chocolate, se funde a temperaturas de aproximadamente  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para chocolate amargo y de  $44 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para chocolate con leche, las cuales no son un tratamiento térmico suficiente para la inactivación del patógeno. De acuerdo con estudios de Gruzdev *et al.* (2011) cuando *S. enterica* se encuentra en condiciones de desecación con un valor de  $a_w$  de 0.53, es capaz de tener paralelamente una resistencia térmica de hasta  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h. De igual forma, en estudios realizados por Chen *et al.* (2013) sobre la

inactivación térmica de cepas de *S. enterica* adaptadas a condiciones de desecación contra cepas no adaptadas, se encontró que a 150 °C las células adaptadas en arena para aves de corral con una humedad del 20 % tenían la capacidad de sobrevivir por 50 min en comparación con los 10 min de sobrevivencia de las células no adaptadas a las condiciones de desecación.

Durante un análisis microbiológico de frutos o productos frescos, comúnmente se asocia el contenido de *E. coli* con la presencia o ausencia de *S. enterica*; es decir, es posible usar a *E. coli* como microorganismo índice para *Salmonella* (Fernández-Escartín, 2008). Sin embargo, en alimentos con una baja actividad de agua no sería de utilidad el criterio de *E. coli* como microorganismo índice, dado que en este estudio y otros previos del grupo de trabajo realizados por Aguilar-Vázquez (2015) y por Juárez-Arana (2020), no se ha observado una correlación adecuada entre la presencia de *E. coli* y *Salmonella* en alimentos de baja actividad de agua. La ausencia de *E. coli* puede asociarse a una menor estabilidad o capacidad de adaptación en el chocolate en comparación con *S. enterica*. Por lo tanto, al no comportarse como un microorganismo índice de la presencia de *Salmonella* en este tipo de alimento, es de importancia realizar el monitoreo frecuente del patógeno en alimentos de baja actividad de agua como el chocolate.

En un estudio realizado por Forghani *et al.* (2019) se evaluó la sobrevivencia de cepas de *E. coli* enterohemorrágica de los serotipos O45, O121 y O145 y *Salmonella* en harina de trigo con una  $a_w$  de 0.50 a 23 °C, se encontró que *S. enterica* tenía una mayor tolerancia y más estabilidad a la desecación en comparación con los tres serotipos de *E. coli* ya que a las 16 semanas de almacenamiento la diferencia entre ambos tipos de microorganismos fue de  $\sim 2 \text{ Log UFC g}^{-1}$ . De igual manera, Koseki *et al.* (2015), realizaron una comparación de la tolerancia hacia condiciones de desecación entre cepas de *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *E. coli* y *C. sakazakii* inoculadas en una fórmula en polvo para niños, la cual tenía una actividad de agua de  $0.28 \pm 0.03$  y que fue almacenada a 5, 22 y 35 °C, concluyendo que *C. sakazakii* presentaba la mayor tolerancia sin importar la

temperatura de almacenamiento, seguida de *S. enterica*, y por último de *L. monocytogenes* y *E. coli*.

La información de los estudios mencionados sugiere que es necesario profundizar en la resistencia de bacterias patógenas a ambientes de baja actividad de agua.

### 5.3 Evaluación del efecto del origen de la cepa y del método de preparación del inóculo en el comportamiento de *Salmonella enterica* en chocolate con leche

#### 5.3.1 Caracterización bromatológica del chocolate con leche

El chocolate con leche marca Callebaut®, se utilizó en este estudio y provino de un único lote adquirido en Materias Primas para Pastelería y Repostería La Abeja en Querétaro, Qro., y de acuerdo con lo especificado en la etiqueta contenía: 33.6 % mínimo de cacao (30.2 % manteca de cacao y 4.9 % de cacao libre de grasa), 20.8 % mínimo de leche y 36.2 % de materia grasa (30.2 % manteca de cacao y 6 % grasa láctea). Se realizó el análisis proximal del alimento (Tabla 12) y adicionalmente se determinó que el valor del pH del lote de chocolate era de  $5.24 \pm 0.09$  y la actividad de agua de  $0.43 \pm 0.01$ .

Tabla 12. Caracterización bromatológica del lote de chocolate con leche empleado en el estudio.

Muestra	Humedad (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
1	$1.43 \pm 0.25^1$	$1.70 \pm 0.04$	$31.30 \pm 0.99$	$3.15 \pm 0.09$	$62.41 \pm 0.01$
2	$1.44 \pm 0.36$	$1.71 \pm 0.02$	$30.63 \pm 0.18$	$3.33 \pm 0.09$	$62.88 \pm 0.00$
3	$1.61 \pm 0.29$	$1.72 \pm 0.02$	$32.14 \pm 1.77$	$3.32 \pm 0.10$	$61.20 \pm 0.01$

<sup>1</sup>Los valores representan la media de dos datos  $\pm$  desviación estándar.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el chocolate empleado para este estudio sí cumplió con los porcentajes mínimos para su clasificación de “Chocolate con leche” de acuerdo a la NOM-186-SSA1/SCFI-2013 enunciados en la Tabla 3.

El chocolate con leche es descrito por Rousseau (2020) como un alimento sólido constituido de una matriz de manteca de cacao cristalizada con partículas sólidas de azúcar, cacao y leche en polvo. Dicha matriz podría asociarse a la permanencia de los microorganismos presentes, ya que de acuerdo con Podolak *et al.* (2010), en modelos similares al alimento donde se evaluó la sobrevivencia de *S. enterica*, como en crema de cacahuete, se ha observado que el patógeno tiende a agruparse dentro o cerca de la fase acuosa de la suspensión del alimento, donde además podría haber una mayor disponibilidad de nutrientes, dicha agrupación cerca de un mejor ambiente para el microorganismo parece determinar su viabilidad en alimentos de baja  $a_a$ .

En cuanto a los datos obtenidos de la composición del alimento y su relación con la sobrevivencia del patógeno, y de acuerdo con D'Aoust (1994) se podría esperar que el alto contenido de grasa presente en el chocolate (31.36 %) confiera protección a las células de *S. enterica* en su contacto con los ácidos gástricos mediante la encapsulación de la bacteria en una micela lipídica. Adicionalmente, en relación con el contenido de carbohidratos, del cual se esperaría que la mayor proporción fuera sacarosa, de acuerdo con Beuchat *et al.* (2017) se podría correlacionar con una mayor permanencia del patógeno en alimentos con alta proporción de sacarosa, incluso superando el tiempo de la vida de anaquel del propio alimento.

### 5.3.2 Comportamiento de *Salmonella enterica* en chocolate con leche

Como se mencionó en la metodología para evaluar el efecto del origen de las cepas y del método de preparación del inóculo se emplearon dos mezclas de cepas. La primera mezcla se preparó con una cepa de *S. enterica* obtenida en este estudio y 4 cepas aisladas previamente de chocolate por el grupo de trabajo; a este inóculo se le denominó cepas de chocolate o CC. El segundo inóculo estuvo constituido por 5 cepas de referencia ATCC y se le denominó cepas de referencia o CR. Ulteriormente se procedió a evaluar la sobrevivencia de ambos conjuntos de cepas (CR y CC) cuando ambos eran crecidos en placas de agar soya tripticasa (AST) y

placas de agar soya tripticasa suplementado con 10 % de chocolate con leche (ASTC). Adicionalmente y como control, se incluyeron dos tratamientos de ambos conjuntos de cepas crecidas en caldo soya tripticasa (CST). Todos los tratamientos, incluyendo el control, las células del patógeno fueron resuspendidas en una suspensión de chocolate al 10 % (pH  $6.36 \pm 0.07$ ). Los inóculos preparados fueron posteriormente asperjados en el chocolate con leche y secados en campana de flujo laminar hasta que el alimento regreso a su actividad de agua original.

Para iniciar la investigación, se estandarizó la forma de aplicación del inóculo en el chocolate. En estudios preliminares, se determinó que mediante la aspersión de 7 mL de las suspensiones de los inóculos en 0.5 kg del alimento resultaba en un nivel inicial similar de la población de *S. enterica* para cada tratamiento, independientemente del origen de las cepas y de la forma de preparación de los inóculos, la población de *Salmonella* fue similar (Tabla 13).

Tabla 13. Contenido de *Salmonella enterica* en las suspensiones empleadas como inóculos.

Tipo de cepa	<i>S. enterica</i> (Log UFC mL <sup>-1</sup> )		
	Medio de crecimiento		
	Agar soya tripticasa	Agar soya tripticasa + 10 % chocolate	Caldo soya tripticasa
Cepas de referencia (CR)	10.33 ± 0.15 <sup>A</sup>	10.40 ± 0.00 <sup>A</sup>	8.30 ± 0.00 <sup>B</sup>
Cepas de chocolate (CC)	10.34 ± 0.05 <sup>A</sup>	10.47 ± 0.14 <sup>A</sup>	8.78 ± 0.00 <sup>C</sup>

Los valores representan la media ± desviación estándar de dos réplicas con un dato cada una. Los tratamientos seguidos de letras mayúsculas diferentes son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Las condiciones de crecimiento de las células usadas en el inóculo pueden influenciar su respuesta al estrés ya que su expresión genética cambia dependiendo de los tratamientos y puede estar asociada a una resistencia cruzada a otros

ambientes de estrés. De acuerdo con estudios realizados por Gruzdev *et al.* (2012), la exposición *S. enterica* a ambientes con altas concentraciones de solutos durante su crecimiento en un medio sólido puede inducir resistencia cruzada hacia otros tipos de estrés.

Después de la inoculación de los chocolates, se realizó el secado de los mismo dentro de una campana de bioseguridad por 55 min. El tiempo de secado se estableció en estudios preliminares tomando en cuenta el tiempo en el que la  $a_a$  del chocolate regresó a su nivel original ( $0.43 \pm 0.01$ ), el cual es el valor de  $a_a$  antes de ser asperjado con el inóculo. Adicionalmente, se cuantificaron las poblaciones del patógeno en el momento de la inoculación en el alimento (con 7 mL de inóculo por cada 0.5 kg) y después del tiempo de secado del mismo.



Tabla 14. Población de *Salmonella enterica* antes y después del secado del chocolate durante su inoculación.

Etapa	<i>S. enterica</i> (Log UFC g <sup>-1</sup> )					
	AST CR	AST CC	ASTC CR	ASTC CC	CST CR	CST CC
Antes del secado del alimento	8.11 ± 0.09	8.17 ± 0.32	8.09 ± 0.09	8.08 ± 0.11	5.56 ± 0.11	5.56 ± 0.20
Después del secado del alimento	7.78 ± 0.07	7.62 ± 0.11	7.68 ± 0.16	7.68 ± 0.23	6.63 ± 0.39	5.64 ± 0.19

CR: Cepas de referencia; CC: cepas aisladas de chocolate; AST: Agar soya tripticasa; ASTC: Agar soya tripticasa + 10 % de chocolate; CST: Caldo soya tripticasa.

En la Tabla 14, se puede observar que durante el proceso de inoculación y secado del alimento, la población cuantificada de *S. enterica* es menor en los tratamientos provenientes de caldo; la dificultad de no tener inóculos con altas poblaciones de *Salmonella* crecidas a partir de caldo ha sido reportado previamente en estudios de Uesugi *et al.* (2006). Durante la preparación de los inóculos a partir de las placas, al recolectar células de tres placas la concentración fue mayor. Para tener una concentración similar en el caldo, hubiera sido necesario hacer una concentración de células.

Sin embargo, se observó que el secado no afectó la viabilidad de las células inoculadas. En los inóculos obtenidos a partir de las placas de agar la reducción de las poblaciones osciló entre 0.3 y 0.6 Log UFC g<sup>-1</sup>, mientras que, por ejemplo en las muestras inoculadas con la mezcla CST CR, se recuperó mayor cantidad (1.07 Log UFC g<sup>-1</sup>) que en las muestras analizadas antes del secado. Esto último pudiera asociarse a una breve adaptación al sustrato (chocolate) por parte de las cepas de referencia (CR) durante el tiempo del secado del alimento, sin embargo, después de los 7 días de almacenamiento ambos conjuntos de cepas (CR y CA) tienen casi el mismo comportamiento.

En estudios realizados por Wiertzema *et al.* (2019), evaluaron el efecto de la preparación de inóculos de *S. enterica*, *Enterococcus faecium* y *Cronobacter sakazakii* en su tolerancia a la desecación. De cada microorganismo prepararon dos inóculos provenientes de caldo (usando directamente la pastilla bacteriana y una suspensión de células) y uno proveniente de agar (suspensión de células provenientes de agar soya tripticasa suplementado con 0.6 % de extracto de levadura), los inocularon en leche en polvo descremada, harina orgánica de soya y harina de trigo, y los sometieron a desecación. Encontraron que la forma de preparación del inóculo repercute en la sobrevivencia de las bacterias durante el secado en un desecador por un periodo de 4 a 6 días. Observaron que el inóculo preparado con la suspensión de células crecidas en caldo redujo en promedio ~ 1 Log UFC g<sup>-1</sup>, el inóculo preparado con la pastilla bacteriana ~ 0.79 Log UFC g<sup>-1</sup> y el inóculo con las células provenientes de agar ~ 0.52 Log UFC g<sup>-1</sup>; por lo que

concluyeron que la preparación del inóculo a partir de las células provenientes del agar promueve que la población bacteriana se mantenga más estable después de la desecación. Así mismo, Uesugi *et al.* (2006) evaluaron diferentes tipos de inóculo y su relación con la sobrevivencia de *S. enterica* en almendras, y observaron que después de la inoculación del alimento y un periodo de 24 h de secado, hubo reducciones de 1.7 y 3.7 Log UFC por almendra con los inóculos preparados con células de placa y de caldo, respectivamente.

En relación a la disminución de la poblaciones de *S. enterica* durante la inoculación del chocolate antes del secado del mismo (AST CR: 2.22 Log UFC g<sup>-1</sup>, AST CC: 2.17 Log UFC g<sup>-1</sup>, ASTC CR: 2.31 Log UFC g<sup>-1</sup>, ASTC CC: 2.39 Log UFC g<sup>-1</sup>), ésta fue calculada inmediatamente después de la entrada del inóculo en el alimento y su disminución podría asociarse al efecto de *shock* osmótico ocasionado por el contacto repentino del patógeno con un ambiente de baja actividad de agua, lo cual puede ocasionar cambios en su turgencia, crecimiento y división celular, con el objetivo de mantener un equilibrio en su presión osmótica; es decir, cuando las células son expuestas particularmente a un ambiente de estrés hiperosmótico, estas tienden a perder agua ocasionando además una pérdida de metabolitos intracelulares, afectando sus procesos de división celular, replicación del ADN y absorción de nutrientes (Pradhan y Negi, 2019). En otra evaluación realizada por Mossel y Koopman (1965) en donde estudiaron del efecto de *shock* osmótico, inocularon comida de pescado seca con *S. enterica*, y observaron una disminución de aproximadamente 2 Log UFC g<sup>-1</sup> inmediatamente después de la inoculación; estos hallazgos confirmaron la hipótesis de que la disminución de población está asociada al cambio de  $a_w$  al cual está sometido el patógeno al contacto con el alimento.

Durante el almacenamiento del chocolate con leche a 25 °C durante 245 días, *Salmonella* mostró una tendencia a la disminución (Tabla 15, Figura 4). En los primeros siete días de almacenamiento, se observó una pérdida abrupta de la viabilidad en los inóculos preparados con las cepas que provenían de caldo; para el día 28 la población ya se encontraba por debajo de los 2 Log UFC g<sup>-1</sup>, el límite de

detección de la técnica de extensión por superficie cuando se inocular únicamente una placa.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Tabla 15. Comportamiento de *S. enterica* en chocolate con leche almacenado a 25 °C.

Día	Cepas de Referencia (Log UFC g <sup>-1</sup> )						Cepas del Chocolate (Log UFC g <sup>-1</sup> )					
	Agar Soya Trypticasa		Agar Soya Trypticasa + 10% de chocolate		Caldo Soya Trypticasa		Agar Soya Trypticasa		Agar Soya Trypticasa + 10% de chocolate		Caldo Soya Trypticasa	
0	7.78 <sup>1</sup>	± 0.07	7.68	± 0.16	6.63	± 0.39	7.62	± 0.11	7.68	± 0.23	5.64	± 0.19
7	6.14	± 0.31	6.67	± 0.10	2.58	± 0.27	6.35	± 0.06	6.43	± 0.10	2.26	± 0.55
14	5.88	± 0.15	6.57	± 0.14	NR <sup>2</sup>	± NR	6.40	± 0.06	6.31	± 0.03	NR	± NR
21	6.29	± 0.03	6.62	± 0.06	2.10	± 0.17	6.63	± 0.02	6.32	± 0.06	2.00	± 0.00
28	6.07	± 0.25	6.41	± 0.42	< 2		5.69	± 0.64	6.26	± 0.42	< 2	
56	6.14	± 0.16	6.55	± 0.22	< 2		6.42	± 0.22	6.09	± 0.11	< 2	
77	5.79	± 0.32	6.03	± 0.58	< 2		5.96	± 0.36	5.73	± 0.32	< 2	
98	6.18	± 0.09	6.45	± 0.30	< 2		6.41	± 0.19	6.27	± 0.17	< 2	
119	5.39	± 0.61	6.08	± 0.59	< 2		5.73	± 0.82	5.52	± 0.54	< 2	
140	4.80	± 0.13	5.45	± 0.32	< 2		5.03	± 0.52	4.88	± 0.57	< 2	
161	4.69	± 0.09	5.30	± 0.54	< 2		5.40	± 0.58	5.19	± 1.26	< 2	
182	4.00	± 0.44	4.77	± 0.46	< 2		4.74	± 0.45	4.08	± 0.51	< 2	
203	3.93	± 0.22	5.16	± 0.06	< 2		5.26	± 0.13	4.34	± 0.38	< 2	
224	4.08	± 0.26	4.59	± 0.05	< 2		4.97	± 0.03	4.15	± 0.72	< 2	
245	3.10	± 0.17 <sup>C</sup>	3.90	± 0.18 <sup>B</sup>	< 2		4.71	± 0.08 <sup>A</sup>	2.96	± 0.27 <sup>C</sup>	< 2	

<sup>1</sup>Los datos representan la media de seis datos ± la desviación estándar.

<sup>2</sup>No se realizó la cuantificación de la población.

Diferentes letras mayúsculas en la última cuantificación de cada tratamiento expresan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la prueba de Tukey.

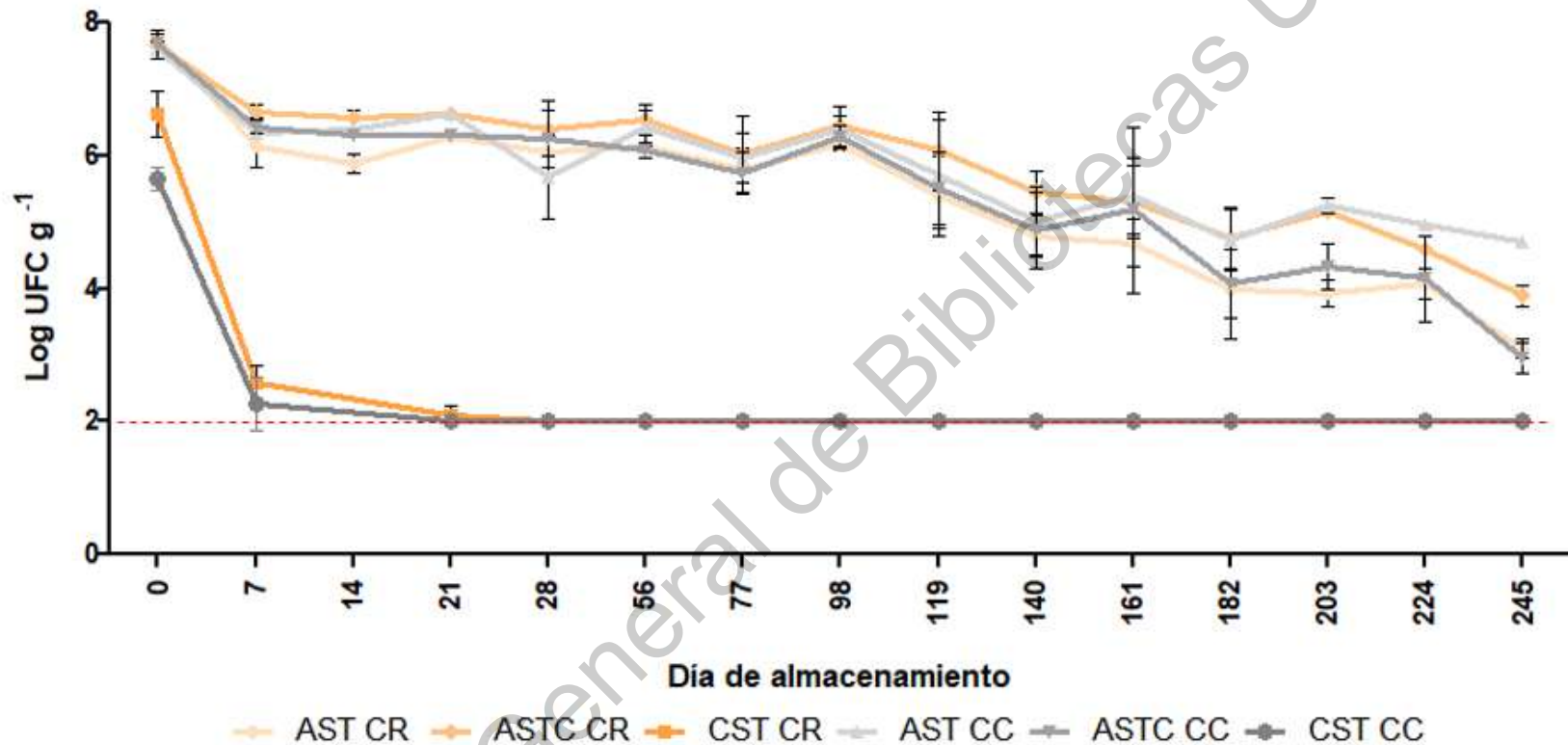


Figura 4. Comportamiento de *S. enterica* en chocolate con leche durante el almacenamiento a 25 °C.

AST CR: Agar soya tripticasa con cepas de referencia; ASTC CR: Agar soya tripticasa + 10 % de chocolate con cepas de referencia; AST CC: Agar soya tripticasa con cepas del alimento; ASTC CC: Agar soya tripticasa + 10 % de chocolate con cepas del alimento; CST CR: Caldo soya tripticasa con cepas de referencia; CST CC: Caldo soya tripticasa con cepas del alimento. Los datos representan la media de seis datos  $\pm$  la desviación estándar. Los tratamientos CST CR y CST CC se mantuvieron debajo del límite de detección de la técnica de extensión en superficie ( $< 100$  UFC  $g^{-1}$ ) a partir del día 21.

En contraste, en los chocolates inoculados con las mezclas de cepas provenientes de agar, la disminución en la población fue gradual. Independientemente del origen de las cepas, a los 7 días se observó en promedio una disminución de  $\sim 1.29 \text{ Log UFC g}^{-1}$ , la cual se mantuvo de manera estable a través del tiempo hasta el día 140 de almacenamiento, y a partir de ese momento la disminución fue mayor y muy heterogénea. Algunos estudios han reportado que previo a la contaminación del alimento, los microorganismos pueden sufrir exposición a uno o más factores de estrés, como desecación, inanición, calor, frío, acidez y presencia de diferentes compuestos químicos, presentes comúnmente en ambientes industriales de procesamiento (Shaker *et al.*, 2008), por lo que la exposición a estas condiciones puede conferir protección cruzada al patógeno hacia otros ambientes estresantes a los que pudiera estar expuesto posteriormente. En estudios realizados por Osaili *et al.* (2017), se observó que la exposición previa de algunos serotipos de *S. enterica* a condiciones de calor o desecación previa a su inoculación, está asociado a un alargamiento de su viabilidad durante el almacenamiento en alimentos de baja  $a_a$ .

De acuerdo con algunas investigaciones, se ha determinado que la sobrevivencia de *S. enterica* en alimentos secos como pescado, leche en polvo, cocoa, nueces, alimento de aves y ganado, etc., está asociada a la  $a_a$  presente; sin embargo, la interacción de la  $a_a$  con factores ambientales como la temperatura, también puede considerarse determinante en la sobrevivencia del patógeno (Joven *et al.*, 1984, Beuchat y Mann, 2010). Adicionalmente, en estudios realizados por Joven *et al.* (1984), se observó que *S. enterica* mostraba una mejor sobrevivencia y altas poblaciones en alimentos secos con una  $a_a$  de entre 0.43 y 0.53, en comparación con alimentos con una  $a_a$  de 0.75; por lo que podría suponerse que el chocolate con leche usado brindaría el ambiente de actividad de agua ( $0.43 \pm 0.01$ ) en el cual se ha reportado una larga sobrevivencia del patógeno.

En cuanto al tiempo de sobrevivencia reportado en estudios previos para *S. enterica*, de acuerdo con los resultados de Tamminga *et al.* (1976), donde se realizó la inoculación de *S. Eastbourne* y *S. Typhimurium* en barras de chocolate con leche

almacenadas a temperatura ambiente, después de 19 meses fue posible recuperar células de *S. Eastbourne*, mientras que para *S. Typhimurium* se observó una muerte más rápida la población y solo fue detectable hasta 15 meses.

Por otro lado, en un estudio realizado por Baylis *et al.* (2004) donde se buscó evaluar la sobrevivencia de *E. coli* de los serotipos O157:H7, O26:H11 y O111:H- en chocolate con leche (25 % de sólidos de cocoa) inoculado con el patógeno y almacenado a 22 y 38 °C, se registró la sobrevivencia de los diferentes serotipos hasta por 90 y 43 días respectivamente; mientras que en muestras del alimento almacenadas a 10 °C fue posible detectar el patógeno hasta 365 días después de almacenado. Por otro lado, en estudios realizados en almendras inoculadas con *S. enterica*, almacenadas a 23 °C y con un nivel de inóculo inicial de 10.8 Log UFC por almendra, se observó una reducción promedio de  $0.25 \pm 0.05$  Log UFC por mes, siendo detectable el patógeno hasta después de 550 días con un nivel de  $4.4 \pm 0.5$  Log UFC por almendra. Cabe destacar que en este estudio se usó un inóculo preparado a partir de células provenientes de agar y placas de AST para la cuantificación periódica (Uesugi *et al.*, 2006).

La cuantificación periódica del patógeno se realizó en agar soya tripticasa suplementado con rifampicina (100 ppm) que es un medio no selectivo. De acuerdo con Karolenko *et al.* (2020), el uso de medios simples adicionados con antibióticos es suficiente para la cuantificación de los microorganismos añadidos resistentes al antibiótico, evitando la interferencia de la población microbiana nativa del chocolate.

Para apreciar de manera más clara el efecto de la viabilidad de *S. enterica* en chocolate, en la Tabla 16 se presentan los logaritmos de reducción en cada tiempo de muestreo.



Tabla 16. Reducción de la población de *S. enterica* en chocolate con leche almacenado a 25 °C.

Día	Cepas de Referencia (Log UFC g <sup>-1</sup> )			Cepas de Chocolate (Log UFC g <sup>-1</sup> )		
	Agar Soya Tripti- casa	Agar Soya Tripti- casa + 10% de cho- colate	Caldo Soya Tripti- casa	Agar Soya Tripticasa	Agar Soya Tripti- casa + 10% de cho- colate	Caldo Soya Tripti- casa
7	1.64 ± 0.37	1.01 ± 0.14	4.05 ± 0.27	1.27 ± 0.06	1.25 ± 0.18	3.38 ± 0.45
14	1.91 ± 0.15	1.11 ± 0.14	NR ± NR	1.22 ± 0.06	1.37 ± 0.03	NR ± NR
21	1.49 ± 0.03	1.05 ± 0.06	4.53 ± 0.17	0.98 ± 0.02	1.36 ± 0.06	5.68 ± 0.00
28	1.72 ± 0.20	1.26 ± 0.56	4.63	1.92 ± 0.66	1.42 ± 0.65	3.64
56	1.64 ± 0.13	1.12 ± 0.36	4.63	1.19 ± 0.28	1.59 ± 0.32	3.64
77	2.00 ± 0.27	1.65 ± 0.70	4.63	1.65 ± 0.37	1.95 ± 0.53	3.64
98	1.61 ± 0.04	1.23 ± 0.44	4.63	1.21 ± 0.20	1.41 ± 0.39	3.64
119	2.39 ± 0.55	1.59 ± 0.73	4.63	1.89 ± 0.82	2.16 ± 0.76	3.64
140	2.98 ± 0.13	2.23 ± 0.49	4.63	2.59 ± 0.51	2.80 ± 0.30	3.64
161	3.09 ± 0.09	2.37 ± 0.03	4.63	2.21 ± 0.04	2.49 ± 0.03	3.64
182	3.79 ± 0.44	2.90 ± 0.17	4.63	2.88 ± 0.67	3.60 ± 0.43	3.64
203	3.85 ± 0.22	2.51 ± 0.06	4.63	2.36 ± 0.13	3.34 ± 0.38	3.64
224	3.71 ± 0.26	3.08 ± 0.05	4.63	2.64 ± 0.03	3.53 ± 0.72	3.64
245	4.68 ± 0.17	3.78 ± 0.17 <sup>B</sup>	4.63	2.91 ± 0.67	4.72 ± 0.43	3.64

Los datos de reducción por cada día de almacenamiento corresponden a la diferencia de seis datos ± desviación estándar respecto a la población del día cero. NR: no realizado.

En los cuatro tratamientos provenientes de agar, se observó que la mayor disminución de la población de *S. enterica* ocurrió en el tratamiento de agar soya tripticasa con 10 % de chocolate con cepas del chocolate (ASTC CC) y en el tratamiento de agar soya tripticasa y cepas de referencia (AST CR) sin haber diferencias significativas entre ambos ( $p \leq 0.05$ ), mientras que la mejor sobrevivencia del patógeno a los 245 días de almacenamiento se obtuvo a partir del tratamiento de agar soya tripticasa y cepas del chocolate (AST CC).

En coincidencia con los resultados obtenidos, en estudios dirigidos por Osaili *et al.* (2017) donde se inoculó *S. enterica* en muestras de halva (dulces elaborados con pasta de ajonjolí) se observó que la sobrevivencia de células de *S. enterica* estresadas previamente por calor y desecación era ligeramente mejor en comparación con células no estresadas, ambas almacenadas a 10 y 25 °C. Por otro lado, en estudios realizados por Guo *et al.* (2019) se observó que la viabilidad de *S. Typhimurium* y su resistencia térmica en células cultivadas en AST y en AST suplementado con diferentes porcentajes sacarosa, mejoraba en este último; por lo que se concluyó que la exposición de *S. enterica* a medios suplementados con sacarosa resultaba en el mejoramiento de su viabilidad ante tratamientos térmicos.

En este estudio se eligió almacenar el chocolate con leche a  $25 \pm 1$  °C, considerando que es la temperatura a la cual se mantiene durante su venta a granel y algunas veces durante el almacenamiento por parte del consumidor. En estudios realizados por Uesugi *et al.* (2006), se observó que hubo una mayor estabilidad de la población de *Salmonella* Enteritidis PT 30 a -20 y 4 °C inoculada sobre granos de almendra, sin reducción poblacional durante 18 meses y 6 meses respectivamente, en comparación con un almacenamiento a 23 °C donde hubo una tasa de reducción de  $0.25 \pm 0.05$  Log UFC por mes.

En cuanto a la asociación entre la viabilidad y la temperatura de almacenamiento de los chocolates inoculados con el patógeno, se ha reportado que la viabilidad de *S. enterica* se asocia al cambio en la fluidez de su membrana celular,

la cual incrementa su permeabilidad junto con su fluidez en temperaturas más altas, lo cual puede permitir la entrada de compuestos fenólicos presentes en el alimento (Al-Nabulsi y Holley, 2006). De acuerdo con Calatayud *et al.* (2013), la presencia de cocoa pudiera estar asociada a la presencia de catequinas, las cuales tienen la característica de alterar la bicapa lipídica de las membranas de las bacterias mediante su entrada directa en ella y por lo tanto, alterar su función de barrera.

Algunos estudios han demostrado que el origen y el serotipo de las cepas pueden influir en su capacidad de sobrevivencia en alimentos de baja a<sub>a</sub>. Forghani *et al.* (2019) inocularon diferentes serotipos de cepas de *E. coli* enterohemorrágica y *S. enterica* en harina de trigo, encontrando que algunas fueron dominantes al transcurrir el tiempo de almacenamiento. Los autores concluyeron que la evaluación de las diferencias genómicas entre cepas y serotipos podrían ser importantes para el entendimiento de los factores que les permiten una larga sobrevivencia y dominancia a través del tiempo. Adicionalmente, Komitopoulou y Peñaloza (2009), observaron que la sobrevivencia de *S. enterica* es dependiente del serotipo y de la matriz alimenticia donde se encuentre el patógeno. Por otra parte, los resultados de Zoz *et al.* (2017) sobre la evaluación de la resistencia a la desecación de *L. monocytogenes* probando cepas de diferentes orígenes, no mostraron correlación entre la resistencia a la desecación y el origen de la cepa.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, no se pudo observar un efecto claro de la incorporación de chocolate con leche durante la preparación de los inóculos sobre la viabilidad de *Salmonella*. En estudios posteriores sería interesante estudiar la incorporación de diferentes proporciones de chocolate al agar soya tripticasa y evaluar su efecto en la sobrevivencia de *Salmonella*.

#### **5.4 Determinación de la expresión del gen *otsB* en *Salmonella enterica* en chocolate con leche**

Durante el proceso de inoculación, secado y almacenamiento del chocolate con leche inoculado con los cuatro tipos de mezclas, se tomaron muestras de chocolate (25 g) y se congelaron a -70 °C para cuantificar la expresión del gen *otsB*.

Debido a la pandemia por Covid-19, el tiempo de experimentación estuvo limitado para prevenir contagios, y no fue posible trabajar en el mejoramiento de la extracción de ARN de las muestras de chocolate con leche almacenadas a -70°C. Por lo tanto, se decidió trabajar únicamente con las muestras provenientes de los diferentes inóculos o muestras líquidas, las cuales tenían una mayor concentración celular. No obstante, se incluyeron en la experimentación dos extracciones realizadas a partir de muestras sólidas (Tabla 17).

Tabla 17. Concentración de ARN extraído a partir de las suspensiones celulares de *S. enterica* empleadas como inóculos.

Tipo de muestra		Tratamiento	Código	Réplica	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
Suspensiones celulares	Controles	CST CR	Muestra 4	2	30	2.35	5.20
		CST CC	Muestra 5	2	28.5	2.35	3.55
	Inóculos	AST CR	Muestra 1	1	709.5	2.12	2.28
			Muestra 9	2	643.4	2.11	2.29
		AST CC	Muestra 1	1	1347.1	2.11	2.29
			Muestra 10	2	1028.0	2.11	2.29
		ASTC CR	Muestra 2	1	1105.4	2.14	2.32
			Muestra 11	2	1075.5	2.13	2.30
		ASTC CC	Muestra 3	1	686.6	1.96	1.46
			Muestra 12	2	629.8	2.12	2.28
Chocolate con leche	0 días de almacenamiento	ASTC CC	Muestra 6 <sup>1</sup>	2	7.5	2.66	2.13
	26 semanas de almacenamiento	AST CR	Muestra So	1	0.8	5.71	1.42

<sup>1</sup>La muestra inoculada se secó en campana de bioseguridad durante 55 min. <sup>2</sup>La muestra fue almacenada por 26 semanas a 25 °C.

AST CR: Agar soya tripticasa con cepas de referencia; ASTC CR: Agar soya tripticasa + 10 % de chocolate con cepas de referencia; AST CC: Agar soya tripticasa con cepas del alimento; ASTC CC: Agar soya tripticasa + 10 % de chocolate con cepas del alimento; CST CR: Caldo soya tripticasa con cepas de referencia; CST CC: Caldo soya tripticasa con cepas del alimento.

De acuerdo a los valores indicativos de pureza del ARN, la proporción 260/280 se debe encontrar en el rango de 2.0-2.2, sin embargo, aquellas muestras con un valor  $> 1.7$  se pueden considerar de pureza aceptable (Banco Nacional de ADN, 2020). Basándose en estos valores, únicamente la muestra de chocolate almacenada durante 26 semanas, no se encontró dentro de este rango, posiblemente por una mala calidad del ARN. En cuanto a la relación 260/230, aquellas muestras con un valor superior a 2 se encuentran con una pureza óptima, las de un valor  $< 1.8$  pudieran tener una posible contaminación de ARN con sales, carbohidratos y fenoles, por último aquellas menores a 1.5 pueden tener ARN altamente contaminado (Banco Nacional de ADN, 2020). En 10 de las 12 muestras analizadas el ARN fue de buena calidad.

Posterior a la extracción de ARN, se procedió a la síntesis de ADN complementario y a la validación de los oligonucleótidos. Para esto, estudios preliminares se probaron varias temperaturas de alineamiento ( $T_m$ ) propuestas por algunos autores y la hoja técnica de ambos iniciadores. Para el par de oligonucleótidos del gen *16S rRNA* se evaluaron las temperaturas de 53.5 y 56.3 °C y para el gen *otsB* 53.5 y 57.3 °C; sin resultados de amplificación satisfactorios para ambos casos. Por lo tanto, se decidió probar la temperatura de 59 °C para los 2 pares de oligonucleótidos, encontrando un buen alineamiento en ambos casos. La confirmación cualitativa de los genes amplificados se realizó mediante una electroforesis (Figura 5).



Figura 5. Validación de  $T_m$  para iniciadores de *16S rRNA* y *otsB*.

En la parte superior e inferior del gel: Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb; Carril 2: control positivo para amplificación de *otsB* (parte superior) y para *16S rRNA* (parte inferior). Del carril 3 al 14: Muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, I, So, 9, 10, 11 y 12 amplificadas para *otsB* (parte superior) y para *16S rRNA* (parte inferior).

De acuerdo con los iniciadores empleados para este experimento, se esperaba un tamaño de amplicón de 132 pb y de 97 pb para *otsB* y *16S rRNA* respectivamente, lo cual coincidió para todas las muestras como se puede observar en la Figura 5, con excepción de la “Muestra 6 (inóculo ASTC CC)” y la “Muestra So (chocolate con leche inoculado con ASTC CR y almacenado durante 26 semanas)” las cuales no amplificaron para *otsB* pero si para *16S rRNA*. Posiblemente la falta de amplificación de estas muestras, y de acuerdo a la relación 260/230, está asociada a la alta presencia de contaminantes. En el chocolate con leche están presentes fenoles y carbohidratos que pudieron inhibir la actividad de la enzima *Green Taq DNA Polymerase* la cual fue usada para la PCR punto final (Porebski et al., 1997).

Para llevar a cabo la cuantificación de los genes *16S* y *otsB* otb mediante la técnica de qPCR, se realizaron diluciones seriadas de una muestra de ADN complementario con la finalidad de obtener una curva de validación para cada iniciador. La curva de validación del gen *16S* y del *otsB* se muestran en la Figura 6 y la Figura 7, respectivamente.

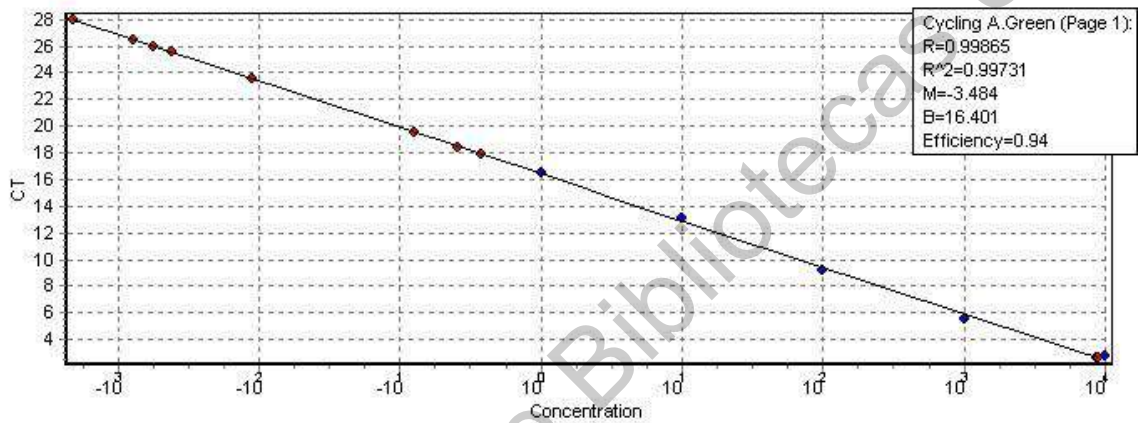


Figura 6. Curva de validación de qPCR para *16S rRNA*.

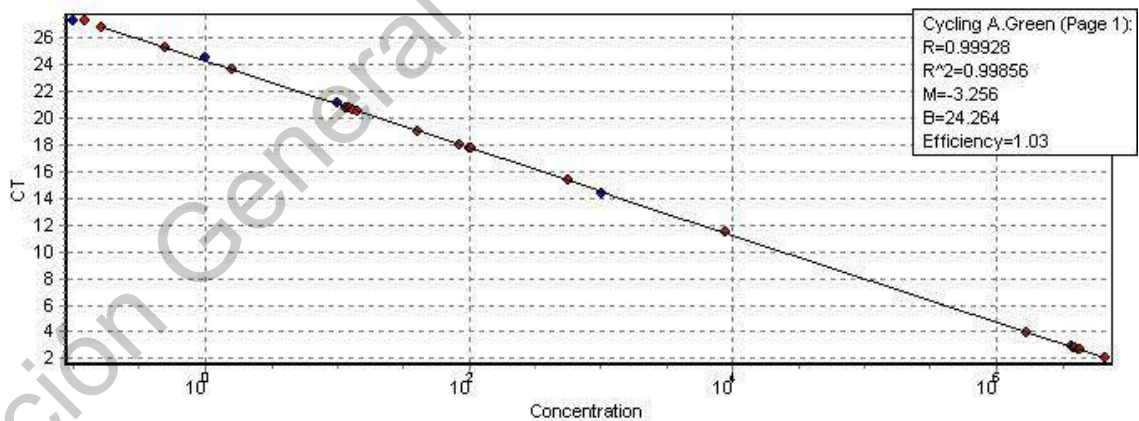


Figura 7. Curva de validación de qPCR para *otsB*

En ambos casos la técnica qPCR fue adecuada ya que mostraron una eficiencia cercana al 100 %. Adicionalmente, se obtuvo la curva de fusión o *melt curve* (Figura 8). Se observó la especificidad de los iniciadores al haber un solo pico de disociación o *melt peak* y por lo tanto, la especificidad de los productos

amplificados. El pico anterior al pico de disociación, aproximadamente a 80 °C, perteneciente a la muestra de control negativo, puede estar asociado a la formación de productos inespecíficos, más comúnmente, dímeros de iniciadores o *primers* (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

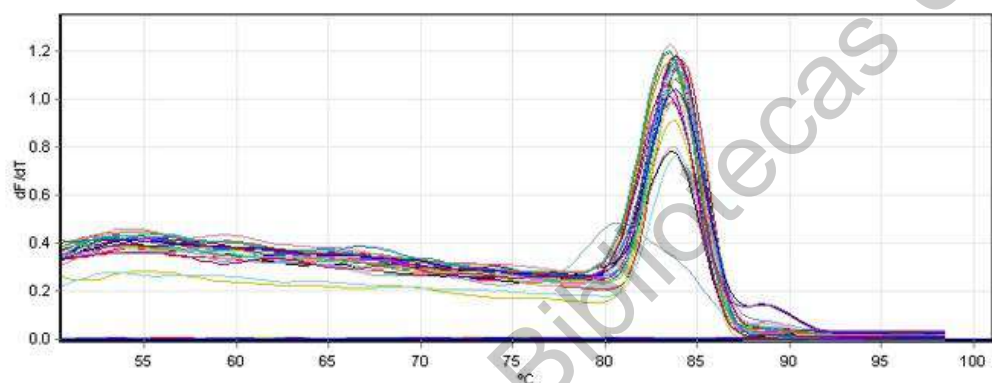


Figura 8. Curva de fusión para productos amplificados por qPCR.

La cuantificación relativa de la expresión de *otsB* se llevó a cabo mediante el método de Pfaffl y ésta fue normalizada al gen de referencia *16S rRNA*. De acuerdo al método de Pfaffl (2001), la expresión relativa del gen de interés debe ser calculada basada en la eficiencia y  $\Delta C_t$  de una muestra contra un control, y expresada en comparación con un gen de referencia, en este caso el *16S rRNA* y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta C_{P_{target}}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta C_{P_{ref}}(control-sample)}}$$

La expresión del gen *otsB* en las muestras de inóculos de *S. enterica* y de chocolate almacenadas a -70 °C, se muestra en la Figura 9.



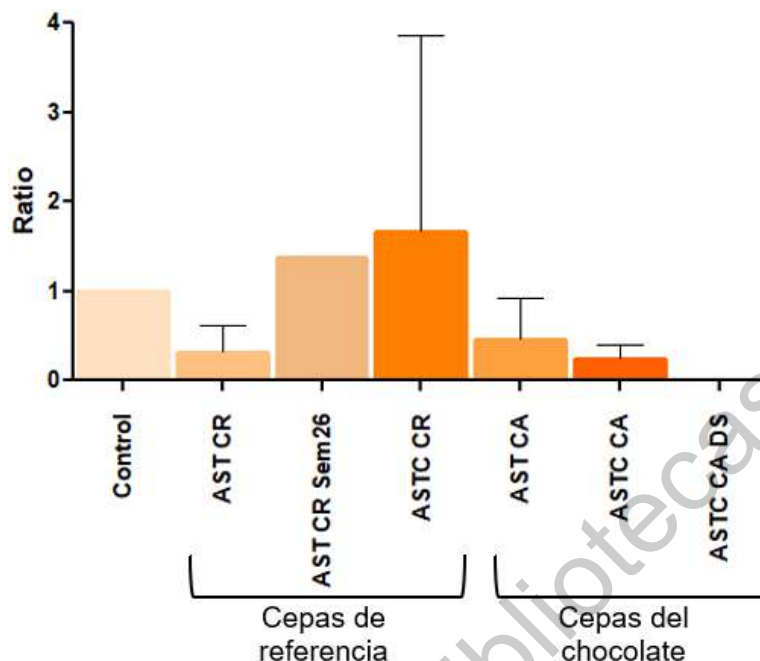


Figura 9. Cuantificación relativa de la expresión de *otsB* en inóculos de *S. enterica*.

Control: expresión de células no estresadas de *S. enterica*; AST CR: inóculo preparado en agar soya tripticasa y cepas de referencia. AST CR Sem26: chocolate con leche almacenado por 26 semanas con inóculo preparado en agar soya tripticasa y cepas de referencia; ASTC CR: inóculo preparado en agar soya tripticasa + 10 % de chocolate y cepas de referencia; AST CC: inóculo preparado en agar soya tripticasa + 10 % de chocolate y cepas del chocolate; ASTC CC: inóculo preparado en agar soya tripticasa y cepas del chocolate ; ASTC CC: inóculo preparado en agar soya tripticasa + 10 % de chocolate y cepas del chocolate después del secado del alimento.

Se observó que la expresión del gen *otsB*, que participa en la síntesis de trehalosa, en los inóculos de las cepas de referencia y del alimento preparados a partir de placas de agar soya tripticasa (AST CR y AST CC), y de agar soya tripticasa con 10 % de chocolate con cepas del alimento (ASTC CC) se encontró disminuida con respecto al control; en cambio, el tratamiento de agar soya tripticasa suplementado con 10 % de chocolate y cepas de referencia (ASTC CR) mostró una expresión 1.7 veces más alta que la del control. Por otro lado, en la muestra sólida de chocolate con leche (AST CR) que se almacenó por 26 semanas, la expresión de *otsB* fue 1.4 veces la del control.

Es sabido que la composición de un alimento provee energía y nutrientes directamente a los microorganismos, y en algunos casos puede ocasionar efectos citotóxicos, debido a esto, se ha concluido que la matriz alimenticia indudablemente determina, en los microorganismos presentes en ella, el patrón de crecimiento y metabolismo celular, incluidos los niveles de transcripción (Chen *et al.*, 2021). En estudios realizados por Deng *et al.* (2012) donde se realizó una secuenciación del transcriptoma de *S. enterica* expuesta a condiciones de desecación y estrés por inanición, se determinó que las células se encuentran en estado de dormancia con < 5 % de su genoma siendo transcrito en comparación con el 78 % de células en caldo Luria Bertani. En el presente estudio, en el chocolate con leche inoculado con las cepas que presentan una mayor sobrevivencia al paso del tiempo (AST CC), dicha sobrevivencia pudiera estar asociada a una mayor expresión de mecanismos de sobrevivencia derivados del estrés hiperosmótico regulados por *rpoS*, tales como la síntesis de trehalosa. Sin embargo, es importante evaluar en estudios posteriores la expresión del gen *otsB* durante todo el periodo de almacenamiento de los chocolates con leche inoculados con *Salmonella* para comprobar si la síntesis de trehalosa es un mecanismo activo que le permite sobrevivir.

Adicionalmente, se ha observado que la diferencia de resistencia al estrés entre cepas podría deberse a la sensibilidad al estrés de cada cepa, principalmente asociada a las mutaciones en el gen *rpoS*, o bien, a una disminución de la expresión de los genes dependientes de RpoS (Jørgensen *et al.*, 2000). De acuerdo con Guillén *et al.* (2020) en donde se evaluó la resistencia al estrés de 15 cepas de *S. enterica* pertenecientes a 11 serovares, para la mayoría de los agentes evaluados, entre los que se encontraba estrés por pH, calor y NaCl, la variabilidad de la resistencia intraserovar (*S. Typhimurium*) fue comparable con la variabilidad interserovar a pesar de las similitudes genéticas de las cepas pertenecientes al mismo serovar. Por lo que posteriormente sería importante la evaluación transcriptómica de cada cepa para estudiar su sobrevivencia en este alimento y los mecanismos expresados en cada serotipo y su comportamiento a través del tiempo durante su permanencia en el alimento.

La síntesis de trehalosa se ha asociado con la disminución del daño celular durante condiciones de inanición o desecación, y con la disminución de la fluidez intracelular mediante un proceso denominado vitrificación. Dicho proceso disminuye la difusión y por ende, la tasa de acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo que hace más lento el deterioro de la célula (Lebre *et al.*, 2017).

En algunas cepas de *S. Tennessee*, se ha visto una mayor producción de trehalosa, modificaciones de la membrana y formación de flagelos en comparación con *S. Typhimurium* LT2 (cepa control), de acuerdo a estos estudios realizados por Li *et al.* (2012), una mayor redirección de energía por parte de *S. Tennessee* hacia la biosíntesis de esta proteína y al ensamblaje de flagelos le permite a esta cepa una mayor resistencia hacia la desecación y condiciones de inanición. En concordancia a lo anterior, de acuerdo con Elbein *et al.* (2003) la ausencia de trehalosa y modificaciones de la envoltura celular en *S. Typhimurium* LT2 asociados a las mutaciones en *rpoS*, podrían asociarse a su baja tolerancia a la desecación.

Adicionalmente, en estudios realizados por Balaji *et al.* (2005) se encontró que *S. Typhimurium* entra en *shock* osmótico por la presencia de NaCl 0.3 M, causando que *ostB* se exprese 370 veces más a los 13 min, siendo detectable desde los 6 min. Por otra parte, Li *et al.* (2012) detectaron un incremento significativo en la síntesis de trehalosa en células de *Salmonella* que habían sido equilibradas a una  $a_a$  de 0.11 por 5 días. Por último, de acuerdo con Purvis *et al.* (2005), el análisis de extractos celulares muestra que los niveles intracelulares de trehalosa están correlacionados con la osmotolerancia hacia sales inorgánicas y azúcares, además de la tolerancia al calor; por otra parte se observó que la síntesis del disacárido es superior en ambientes con pentosas (arabinosa y xilosa) que en presencia de hexosas (glucosa y manosa).

En cuanto a la pérdida de cultivabilidad, Lesne *et al.* (2000), menciona que *S. Typhimurium* C52 expuesta a condiciones de desecación entra en este estado gradualmente, reportando que este patógeno pierde dicha capacidad en agar nutritivo aproximadamente a las 9 semanas; adicionalmente en el estudio también se reportó que la pérdida de virulencia en este tipo de células ocurre mucho más

rápido, dentro de las primeras 3 semanas de ocurrir la desecación. Sin embargo, en este estudio no se asoció la entrada de las células presentes en el alimento al estado VBNC debido a que aún a los 245 días de almacenamiento los recuentos poblacionales permanecieron estables para los cuatro tratamientos.

Entre las principales preocupaciones asociadas al estudio de *Salmonella*, se encuentra la patogenicidad que ésta pudiera presentar bajo diferentes condiciones, en específico en condiciones de desecación. De acuerdo con estudios realizados por Habimana *et al.* (2014) se observó que cuando ratones eran infectados con células de *S. Agona* en estado VBNC provocado por condiciones de desecación, en un nivel de  $10^8$ , los ratones permanecían sin síntomas durante el periodo de observación además de que el patógeno no fue aislado en muestras de hígado y bazo. Por otra parte, Roy *et al.* (2021) evaluó la expresión de genes de virulencia en *S. Kentucky* bajo diferentes condiciones de glucosa (0, 0.025, 0.05 y 0.4 %), observando que con una concentración de 0.025 %, incubación de 37 °C y pH de 7.0, aumenta la expresión de los genes de virulencia *rpoS*, *rpoH*, *hila* y *avrA*, mientras que, por el contrario, disminuye significativamente la expresión de los mismos bajo una concentración de 0.4 % de glucosa. Por lo tanto, con base en los estudios anteriores, se podría considerar la adición de solutos, tales como la glucosa, para el control de la virulencia del patógeno en alimentos de baja actividad de agua.

Resulta interesante además, evaluar el comportamiento de *Salmonella* estresada bajo condiciones de refrigeración. Abdelhamid y Yousef (2020) mencionan que se observó una expresión mayor (2 veces más) de *proV*, *kdpA* y *otsB* y de 50 veces más de *rpoS* en células de *Salmonella* (Tennessee y Eimsbuettel) estresadas por desecación y posteriormente incubadas a 4 °C por 2 días, mientras que a los 14 días la expresión de *rpoS* y *proV* aumentó significativamente. Por el contrario, los genes *hila* e *invA* fueron reprimidos durante ambos periodos de incubación. Sería importante evaluar dicho comportamiento con las cepas presentes en este estudio, dado que el chocolate es un alimento que de forma original o ya preparado, es comúnmente almacenado en refrigeración.

Por otro lado, ante la elevación de la  $a_a$  del ambiente extracelular después de la desecación, Maserati *et al.* (2018) proponen que las membranas regresan a un estado de hidratación por lo que la acumulación de trehalosa ya no sería necesaria. Además, en cuanto las condiciones de la célula sean más favorables, aumentaría la tasa metabólica y por ende, la activación el catabolismo para la producción de ATP, por lo que la continuación de la síntesis de trehalosa sería un desperdicio de energía y fuente de carbono. De acuerdo con Finn *et al.* (2013), el operón *otsBA* involucrado en la síntesis de trehalosa no continuaron expresados después de la rehidratación de *S. Typhimurium*, lo que podría sugerir que este operón está ligado exclusivamente a la sobrevivencia en ambientes de baja  $a_a$ . En consecuencia, de acuerdo con Purvis *et al.* (2005), la expresión de TreA, responsable de la hidrolisis de trehalosa en dos moléculas de glucosa en el periplasma, aumentaría como se observó en muestras húmedas en comparación con muestras secas.

De acuerdo con Maserati *et al.* (2018), la mayor expresión genética en muestras húmedas, está asociada a la formación de proteínas flagelares, proteínas de membrana, sistemas de exportación y proteínas de respuesta al estrés. Dicho acontecimiento pudiera sugerir que la rehidratación puede desencadenar respuestas de estrés en estas células; sin embargo, hasta nuestro conocimiento no se sabe de estudios sobre la expresión de genes asociados a la virulencia de *S. enterica* estresada por tiempos prolongados en alimentos de baja actividad de agua.

Por último, como continuación de este estudio, podría realizarse la cuantificación de los genes expresados por *Salmonella* durante condiciones de rehidratación del chocolate, con la finalidad de entender los cambios en los genes de virulencia y de estrés en la célula; dichas condiciones pudieran ser conferidas al patógeno durante la preparación de alimentos donde, por ejemplo, el chocolate entre en contacto con medios líquidos como leche o agua, sin un tratamiento térmico posterior.

## VI. CONCLUSIONES

Como resultado de esta investigación, se obtuvo el perfil microbiológico de un alimento de baja actividad de agua de consumo regular, como lo es el chocolate con leche de venta a granel.

La prevalencia de *S. enterica* (4.8 %) en las muestras de chocolate con leche obtenidas en los mercados locales durante los meses fríos fue muy similar a lo reportado en los estudios de Torres-Vitela *et al.* (1995). Sin embargo, durante los meses cálidos, este porcentaje se elevó considerablemente (13.6 %) para las muestras del mismo origen. Esto último pudiera asociarse a la mayor prevalencia del patógeno en el país durante la temporada cálida.

La prevalencia de *Salmonella* fue mayor en mercados, lo cual evidencia el mal manejo sanitario de los alimentos de venta a granel en este tipo de establecimientos y la falta de regulaciones sanitarias para la venta y/o distribución de estos alimentos.

Independientemente del origen de las cepas y del método de preparación del inóculo, *Salmonella* mostró una tendencia a la inactivación, sin embargo aún fue detectada después de 245 días de almacenamiento (aproximadamente 8 meses). El estudio aún sigue en proceso.

No fue posible observar de una manera clara si la adición de chocolate (10 %) al agar empleado para el crecimiento de las cepas, favorece la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* en el chocolate.

En cuanto al origen de la cepa, tampoco se pudo observar una relación clara entre el origen de la cepa y la mayor o menor sobrevivencia de las mismas en el chocolate con leche.

En la muestra de chocolate con leche inoculada con *Salmonella* y almacenada durante 26 semanas a 25 °C se observó una expresión importante del gen *otsB*, lo cual pudiera estar asociado a su permanencia en el alimento debido a la síntesis de trehalosa. Sin embargo, sería importante evaluar la expresión de este y otros genes de sobrevivencia en ambientes hiperosmóticos a lo largo de todo el

almacenamiento para elucidar que mecanismos se asocian con la permanencia del patógeno en el alimento.

Para finalizar, aún queda como posible extensión de este estudio, la aplicación de tratamientos que puedan suprimir la expresión de los mecanismos de sobrevivencia, tales como la adición de glucosa al alimento; sin embargo se debe evaluar el porcentaje de funcionalidad para cada matriz para evitar la alteración de las características organolépticas deseadas en cada alimento.

Dirección General de Bibliotecas UAG

## VII. REFERENCIAS

- Abdelhamid, A. G., and Yousef, A. E. (2020). Collateral adaptive responses induced by desiccation stress in *Salmonella enterica*. *LWT*, 133, 110089.
- Afoakwa, E. (2010). Industrial chocolate manufacture—processes and factors influencing quality. *Chocolate Science and Technology*. 1, 35-57.
- Afolabi, I. S. (2014). Moisture migration and bulk nutrients interaction in a drying food systems: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
- Aguilar-Vázquez, J. C. (2015). *Incidencia y comportamiento de Salmonella en alimentos de baja actividad de agua*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional UAQ. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/780>
- Al-Nabulsi, A. A., and Holley, R. A. (2006). Enhancing the antimicrobial effects of bovine lactoferrin against *Escherichia coli* O157: H7 by cation chelation, NaCl and temperature. *Journal of applied Microbiology*, 100(2), 244-255.
- Anderson, D., and Lucore, L. (2012). Validating the reduction of *Salmonella* and other pathogens in heat processed low-moisture foods. *Alliance for Innovation & Operational Excellence, Alexandria, VA*.
- Arvelo, M., Delgado, T., Maroto, S., Rivera, J., Higuera, I. y Navarro, A. (2016). *Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura/Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C
- Asociación del Sector de Confitería y Chocolates (ASCHOCO). (2017). *México un gran productor de cacao*. Consultado el 21 de abril de 2020. <http://www.confimex.org.mx/>
- Aviles, B. (2012). *Influence of Physiological State, Prolonged Dry Storage, and Passage through Simulated Digestion on the Survival and Gene Expression of Salmonella enterica sv. Tennessee*. [tesis de maestría, Virginia Polytechnic Institute and State University]. Virginia Tech Electronic Theses and Dissertations. <http://hdl.handle.net/10919/77002>



- Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R., and Ponder, M. (2013). Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3), 252-259.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. and Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), 109.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. (4ta Ed., pp. 1-25). México: Pearson Educación.
- Balaji, B., O'connor, K., Lucas, J., Anderson, J. and Csonka, L. (2005). Timing of induction of osmotically controlled genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, determined with quantitative real-time reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8273-8283.
- Banco Nacional de ADN. (2020). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca)*. Consultado el 14 de septiembre de 2021. <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Barrera, M. C., Blanco, M. J., and Agut, M. (2001). Análisis microbiológico de tabletas de chocolate y cacao em polvo. *Alimentaria*, 38(326), 71-74.
- Barrile, J., Ostovar, K. and Keeney, P. (1971). Microflora of cocoa beans before and after roasting at 150 °C. *Journal of Milk and Food Technology* 34, 369–371.
- Baylis, C., MacPhee, S., Robinson, A., Griffiths, R., Lilley, K., and Betts, R. (2004). Survival of *Escherichia coli* O157: H7, O111: H- and O26: H11 in artificially contaminated chocolate and confectionery products. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 35-48.
- BBC (2017, 9 de junio). *Mars recalls chocolates over Salmonella fear*. Consultado el 12 de mayo de 2020. <https://www.bbc.com/news/business-40226415>
- Beckett, S. (2008). *The Science of Chocolate*, (2da. Ed., pp. 39-57). UK: RSC Publishing.

- Beuchat, L. R., and Mann, D. A. (2010). Factors affecting infiltration and survival of *Salmonella* on in-shell pecans and pecan nutmeats. *Journal of food protection*, 73(7), 1257-1268.
- Beuchat, L. R., Mann, D. A., Kelly, C. A., and Ortega, Y. R. (2017). Retention of viability of *Salmonella* in sucrose as affected by type of inoculum, water activity, and storage temperature. *Journal of food protection*, 80(9), 1408-1414.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. and Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*., 38(7), 2465-2467.
- Burgess, C., Gianotti, A., Gruzdev, N., Holah, J., Knochel, S., Lehner, A., Margas, E., Esser, S., Sela, S. and Tresse, O. (2016). The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 221, pp.37-53.
- Busta, F. and Speck, M. (1968). Antimicrobial effect of cocoa on salmonellae. *Applied Microbiology*, 16(2), 424.
- Calamita, G., Bishai, W. R., Preston, G. M., Guggino, W. B., & Agre, P. (1995). Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29063-29066.
- Calatayud, M., López-de-Dicastillo, C., López-Carballo, G., Vélez, D., Muñoz, P. H., and Gavara, R. (2013). Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. *Food Chemistry*, 139(1-4), 51-58.
- Callebaut. (s.f.). Finest Belgian Chocolate – Milk Recipe 823. Consultado el 22 de julio de 2020. <https://www.callebaut.com/es-ES/chocolate-cacao-frutos-secos/823nv/823>
- Cánovas, D., Fletcher, S., Hayashi, M. and Csonka, L. (2001). Role of Trehalose in Growth at High Temperature of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 183(11), 3365-3371.

- Cardona, F. (2019). *Actividad del agua en alimentos: concepto, medida y aplicaciones*. Consultado el 22 de noviembre de 2021. <http://hdl.handle.net/10251/121948>
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., y García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: a review. *Food Research International*, 45(2), 545-556.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). (2020). *Industria del cacao en México*. Consultado el 06 de junio de 2020. [http://www.cedrssa.gob.mx/post\\_industria\\_del\\_-n-cacao\\_en\\_mn-xico-n.htm](http://www.cedrssa.gob.mx/post_industria_del_-n-cacao_en_mn-xico-n.htm)
- Chen, S., He, S., Xu, X., & Wang, H. (2021). Transcriptomic responses of foodborne pathogens to the food matrix. *Current Opinion in Food Science*.
- Chen, Z., Diao, J., Dharmasena, M., Ionita, C., Jiang, X., and Rieck, J. (2013). Thermal inactivation of desiccation-adapted *Salmonella* spp. in aged chicken litter. *Applied and environmental microbiology*, 79(22), 7013-7020.
- Coburn, B., Grassl, G., and Finlay, B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112-118.
- Contreras-Soto, M., Medrano-Félix, J., Chaidez, C., Ibarra-Rodríguez, J., Martínez-Urtaza, J., y Castro-del Campo, N. (2018). Los últimos 50 años de *Salmonella* en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista Bio Ciencias*, 6, 26.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., and Taniwaki, M. H. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International journal of food microbiology*, 178, 13-20.
- Copetti, M., Iamanaka, B., Frisvad, J., Pereira, J. and Taniwaki, M. (2011). Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28(8), 1499-1504.
- Cordier, J. (2014). Methodological and sampling challenges to testing spices and low-water activity food for the presence of foodborne pathogens. *In The*

*Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices* (pp. 367-386). Springer, New York, NY.

- Cordier, J. L. (2008). Production of powdered infant formula and microbiological control measures. In J. M. Faber, & S. Forsythe (Eds.), *Enterobacter sakazakii* (pp. 145-185). Washington, DC: ASM Press.
- Crowe, J., Carpenter, J., and Crowe, L. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 73-103.
- Crucello, A., Furtado, M., Chaves, M. and Sant'Ana, A. (2019). Transcriptome sequencing reveals genes and adaptation pathways in *Salmonella* Typhimurium inoculated in four low water activity foods. *Food Microbiology*, 82, 426-435.
- D'Aoust, J., Aris, B., Thisdele, P., Durante, A., Brisson, N., Dragon, D., Lachapelle, G., Johnston, M. and Laidley, R., (1975). *Salmonella* eastbourne outbreak associated with chocolate. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 8(4), 181-184.
- D'Aoust, J. (1977). *Salmonella* and the chocolate industry. A review. *Journal of Food Protection*, 40(10), 718-727.
- D'Aoust, J. Y. (1994). *Salmonella* and the international food trade. *International journal of food microbiology*, 24(1-2), 11-31.
- De Smedt, J.M., Chartron, S., Cordier, J.L., Graff, E., Hoekstra, H., Lecoupeau, J.P., Lindblom, M., Milas, J., Morgan, R.M., Nowacki, R. and O'Donoghue, D. (1991). Collaborative study of the International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery on *Salmonella* detection from cocoa and chocolate processing environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*, 13(4), 301-308.
- Decagon Devices. (2006). *Fundamentals of water activity*. Consultado el 06 de abril de 2020. <https://www.graintec.com.au/media/12856/Fundamentals.pdf>
- Delamarche, C., Thomas, D., Rolland, J. P., Froger, A., Gouranton, J., Svelto, M., Agre, P., and Calamita, G. (1999). Visualization of AqpZ-mediated water

permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *Journal of bacteriology*, 181(14), 4193-4197.

Deng, X., Li, Z., and Zhang, W. (2012). Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food microbiology*, 30(1), 311-315.

Ding, T., Yu, Y. Y., Hwang, C. A., Dong, Q. L., Chen, S. G., Ye, X. Q., and Liu, D. H. (2016). Modeling the effect of water activity, pH, and temperature on the probability of enterotoxin a production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of food protection*, 79(1), 148-152.

Dirección General de Epidemiología (DGE). (2018). *Anuario de Morbilidad, 1984 - 2018*. Consultado el 24 de marzo de 2020. <http://187.191.75.115/anuario/html/anuarios.html>

Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., Weigend, M. and Luebert, F. (2011). *Cacao. Theobroma cacao* L. (1era Ed., pp. 3-6). Perú: Giacomotti Comunicación Gráfica S.A.C

Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.

Eun, Y., Jeong, H., Kim, S., Park, W., Ahn, B., Kim, D., Park, E., Park, S., Hwang, I. and Son, H. (2019). A large outbreak of *Salmonella enterica* serovar Thompson infections associated with chocolate cake in Busan, Korea. *Epidemiology and health*, 41.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA-ECDC). (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12).

Fernández, M. (2018). *Validación de PCC de tostado de cacao en una planta de producción de chocolate* [tesis, Pontificia Universidad Javeriana] Repositorio Institucional – Pontificia Universidad Javeriana. <http://hdl.handle.net/10554/39073>

- Fernández-Escartín, E. (2008). *Microbiología e inocuidad de los alimentos* (2da. Ed., pp. 77-82). México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ferrigno, F., Murino, T., Romano, E. and Akkerman, R. (2013). *Salmonella* contamination in chocolate products: Simulation model and scenario analysis. In *Proceedings of the 12th International Conference on System Science and Simulation In Engineering (ICOSSSE13)*.
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A. and Fanning, S. (2013) Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology*. 4, 331.
- Finn, S., Händler, K., Condell, O., Colgan, A., Cooney, S., McClure, P., Amézquita, A., Hinton, J. and Fanning, S. (2013). ProP is required for the survival of desiccated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells on a stainless steel surface. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4376-4384.
- Food and Drug Administration (FDA). (2012). *Bad bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins*. Second edition. Silver Spring: Center for Food Safety and Applied Nutrition of the Food and Drug Administration (FDA), US Department of Health and Human Services.
- Food and Drug Administration (FDA). (2014). BAM Chapter 5: *Salmonella*. Consultado el 23 de abril de 2020. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>
- Food-Info. (2017). *¿Cuál es el pH de los alimentos?*. Consultado el 08 de marzo de 2020. <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp65.htm>
- Forghani, F., den Bakker, M., Liao, J. Y., Payton, A. S., Futral, A. N., and Diez-Gonzalez, F. (2019). *Salmonella* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroups O45, O121, O145 in wheat flour: effects of long-term storage and thermal treatments. *Frontiers in microbiology*, 10, 323.
- García, E. y Fernández, I. (2012). *Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación*. Consultado el 06 de abril de 2020. <http://hdl.handle.net/10251/16339>

- Garmiri, P., Coles, K., Humphrey, T. and Cogan, A. (2008). Role of outer membrane lipopolysaccharides in the protection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from desiccation damage. *FEMS Microbiology Letters*, 281(2), 155-159.
- Gill, O. N., Bartlett, C. L. R., Sockett, P. N., Vaile, M. S. B., Rowe, B., Gilbert, R. J., Dulake, C., Murell, H. C. and Salmaso, S. (1983). Outbreak of *Salmonella napolí* infection caused by contaminated chocolate bars. *The Lancet*, 321(8324), 574-577.
- Goepfert, J. and Biggie, R. (1968). Heat resistance of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg 775W in milk chocolate. *Applied Microbiology* 16, 1939–1940.
- González, M. (1992). *Historia del chocolate en México*. (1era Ed., pp. 101-110 ). México: Maass Ediciones.
- González-Lauck, W. (2005). Cacao en México: competitividad y medio ambiente con alianzas (Diagnóstico rápido de producción y mercadeo). *United States Agency International Development. Chemonics International Inc.*
- Greenwood, M. and Hooper, W. (1983). Chocolate bars contaminated with *Salmonella napolí*: an infectivity study. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 286(6375), 1394.
- Gruzdev, N., Pinto, R. and Sela, S. (2011). Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1667-1673.
- Guillén, S., Marcén, M., Mañas, P., and Cebrián, G. (2020). Differences in resistance to different environmental stresses and non-thermal food preservation technologies among *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains. *Food Research International*, 132, 109042.
- Guo, Y., Cui, X., Ou, L., Isowaki, C., Masuda, Y., Honjoh, K. I., and Miyamoto, T. (2019). Effects of Sucrose on Heat Resistance and Gene Expression in

Salmonella Typhimurium. *Food Science and Technology Research*, 25(6), 903-913.

Habimana, O., Nesse, L. L., Møretrø, T., Berg, K., Heir, E., Vestby, L. K., and Langsrud, S. (2014). The persistence of *Salmonella* following desiccation under feed processing environmental conditions: a subject of relevance. *Letters in applied microbiology*, 59(5), 464-470.

Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Sakae, K., and Miyazaki, Y. (2005). Ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6657-6663.

Hockin, J., D'Aoust, J., Bowering, D., Jessop, J., Khanna, B., Lior, H. and Milling, M. (1989). An international outbreak of *Salmonella* nima from imported chocolate. *Journal of Food Protection*, 52(1), 51-54.

Howells, A., Bullifent, H., Dhaliwal, K., Griffin, K., De Castro, A., Frith, G., Tunnaclyffe, A. and Titball, R. (2002). Role of trehalose biosynthesis in environmental survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Research in Microbiology*, 153(5), pp.281-287.

Hurst, W., Tarka, S., Powis, T., Valdez, F. and Hester, T. (2002). Cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature*, 418(6895), 289-290.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2005. Cocoa, chocolate, and confectionery. In: ICMSF, Microorganisms in food. Microbial Ecology of Food Commodities, vol. 6. Blackie Academic and Professional, New York (467e479).

Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (2010). *Guía tecnológica del cultivo de cacao (Theobroma cacao L)*. Consultado el 06 de junio de 2020. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/12/Guia-CACAO-2010.pdf>

Jacinto, I. y Torres, L. (2015). *Estudio de mercado para chocolate negro artesanal de mesa en Xalapa, Ver.* [ponencia]. Cuarto Coloquio Internacional de



Investigación en Ciencias Administrativas y Gestión para el Desarrollo, Veracruz. <https://www.uv.mx/dcadministrativas/files/2015/09/Ponencia-3-Ines-Jacinto.pdf>

- Jones, T., Vail, K. and McMullen, L. (2013). Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress. *International Journal of Food Microbiology*, 165(2), 97-110.
- Jørgensen, F., Leach, S., Wilde, S. J., Davies, A., Stewart, G. S., and Humphrey, T. (2000). Invasiveness in chickens, stress resistance and RpoS status of wild-type *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 and serovar Enteritidis phage type 4 strains. *Microbiology*, 146(12), 3227-3235.
- Juárez-Arana, C. D. (2020). *Efecto de la radiación UV-C y aire caliente sobre la inocuidad y calidad de semillas de chía, amaranto y ajonjolí*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional UAQ. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1873>
- Juven, B. J., Cox, N. A., Bailey, J. S., Thomson, J. E., Charles, O. W., and Shutze, J. V. (1984). Survival of *Salmonella* in dry food and feed. *Journal of Food Protection*, 47(6), 445-448.
- Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hansen, A., Lassen, J., Hirn, J., Jahkola, M., Montenegro, M. and Helmuth, R. (1990). Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12), 2597-2601.
- Karolenko, C. E., Bhusal, A., Gautam, D., and Muriana, P. M. (2020). Selenite cystine agar for enumeration of inoculated *Salmonella* serovars recovered from stressful conditions during antimicrobial validation studies. *Microorganisms*, 8(3), 338.
- Kaushik, J. and Bhat, R. (2003). Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the

- compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26458-26465.
- Kinderlerer, J. L. (1997). Chrysosporium species, potential spoilage organisms of chocolate. *Journal of applied microbiology*, 83(6), 771-778.
- Komitopoulou, E., and Peñaloza, W. (2009). Fate of *Salmonella* in dry confectionery raw materials. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1892-1900.
- Krapf, T. and Gantenbein-Demarchi, C. (2010). Thermal inactivation of *Salmonella* spp. during conching. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 720-723.
- Lee, S. H., Jung, B. Y., Rayamahji, N., Lee, H. S., Jeon, W. J., Choi, K. S., Kweon, C. H. and Yoo, H. S. (2009). A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *Journal of Veterinary Science*, 10(1), 43-51.
- Lesne, J., Berthet, S., Binard, S., Rouxel, A., and Humbert, F. (2000). Changes in culturability and virulence of *Salmonella typhimurium* during long-term starvation under desiccating conditions. *International journal of food microbiology*, 60(2-3), 195-203.
- Li, H., Bhaskara, A., Megalis, C., and Tortorello, M. (2012). Transcriptomic analysis of *Salmonella* desiccation resistance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(12), 1143-1151.
- Liu, T., Liljebjelke, K., Bartlett, E., Hofacre, C., Sanchez, S., and Maurer, J. (2002). Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1227-1232.
- Ma, L., Zhang, G., Gerner-Smidt, P., Mantripragada, V., Ezeoke, I., and Doyle, M. P. (2009). Thermal inactivation of *Salmonella* in peanut butter. *Journal of food protection*, 72(8), 1596-1601.
- Manpreet, S., Rekha, C., Kumar, K. and Sandeep, S. (2017). Development of Milk Chocolate Using Response Surface Methodology (RSM). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 2881-2894.

- Maserati, A., Lourenco, A., Diez-Gonzalez, F., and Fink, R. C. (2018). iTRAQ-based global proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to desiccation, low water activity, and thermal treatment. *Applied and environmental microbiology*, 84(18), e00393-18.
- Mattick, K., Jorgensen, F., Legan, J., Cole, M., Porter, J., Lappin-Scott, M., and Humphrey, J. (2000). Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1274-1279.
- Medina, J. (2014). *Estudio de aplicación de la metodología APPCC para el control de calidad del proceso de elaboración de tabletas de chocolate*. [Tesis de maestría, Universidad de Valladolid]. Repositorio Documental UVA. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/14344>.
- Mossel, D. A. A., and Koopman, M. J. (1965). Losses in viable cells of salmonellae upon inoculation into dry animal feeds of various types. *Poultry science*, 44(3), 890-892.
- Nascimento, M., Reolon, E., Santos, A., Moreira, V. and Silva, N. (2015). *Enterobacteriaceae* contamination in chocolate processing. *Food Control*, 47, 291-297.
- NOM-109-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. *Diario Oficial de la Federación*.
- NOM-111-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. *Diario Oficial de la Federación*.
- NOM-112-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. *Diario Oficial de la Federación*.
- NOM-186-SSA1/SCFI-2013. (2013). Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federación*.

- NOM-210-SSA1-2014. (2015). Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. *Diario Oficial de la Federación*.
- Olaimat, A. N., Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Al-Holy, M., Ayyash, M. M., Mehyar, G. F., Jaradat, Z. W. and Ghoush, M. A. (2017). Survival and inhibition of *Staphylococcus aureus* in commercial and hydrated tahini using acetic and citric acids. *Food Control*, 77, 179-186.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2016). Manual para manipuladores de alimentos. Consultado el 22 de julio de 2021. <http://www.fao.org/3/i5896s/i5896s.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2003). Norma para el Chocolate y los Productos del Chocolate. Codex Stan, 87-1981.
- Organización Mundial de la Salud. (2018, 20 de febrero). *Salmonella* (no tifoidea). Centro de prensa. Consultado el 23 de marzo de 2020. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal))
- Ortiz, L., Graziani, L. and Gervaise, R. (2009). Evaluación de varios factores sobre características químicas del grano de cacao en fermentación. *Agronomía Tropical*, 59(1), 73-79.
- Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Nazzal, D. S., and Shaker, R. R. (2017). Effect of storage temperatures and stresses on the survival of *Salmonella* spp. in halva. *Letters in applied microbiology*, 65(5), 403-409.
- Pan American Health Organization (2015). *Peligros Biológicos*. Consultado el 09 de abril de 2020. [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=en)

- Pearson, L. and Marth, E. (1990). Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of cocoa, carrageenan, and sugar in a milk medium incubated with and without agitation. *Journal of Food Protection*, 53(1), 30-37.
- Pedro, M. A. M., Telis-Romero, J., and Telis, V. R. N. (2010). Effect of drying method on the adsorption isotherms and isosteric heat of passion fruit pulp powder. *Food Science and Technology*, 30, 993-1000.
- Peña-Meléndez, M., Perry, J. J., and Yousef, A. E. (2014). Changes in thermal resistance of three *Salmonella* serovars in response to osmotic shock and adaptation at water activities reduced by different humectants. *Journal of food protection*, 77(6), 914-918.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. and Elliott, P. (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919-1936.
- Porebski, S., Bailey, L. G., and Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter*, 15(1), 8-15.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 58(4), 755-805.
- Pradhan, D., and Negi, V. D. (2019). Stress-induced adaptations in *Salmonella*: a ground for shaping its pathogenesis. *Microbiological research*, 229, 126311.
- Pui, C., Wong, W., Chai, L., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, N., Ubong, A., Farinazleen, M., Cheah, Y. and Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18(2).
- Purvis, J. E., Yomano, L. P., and Ingram, L. O. (2005). Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3761-3769.

- Romantsov, T., Guan, Z., and Wood, J. (2009). Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1788(10), 2092-2100.
- Rousseau, D. (2020). Aqueous droplets as active fillers in oil-continuous emulsions. *Current Opinion in Food Science*.
- Roy, P. K., Ha, A. J. W., Mizan, M. F. R., Hossain, M. I., Ashrafudoulla, M., Toushik, S. H., Nahar, S., Kim, Y. K. and Ha, S. D. (2021). Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poultry Science*, 101209.
- Sabalette, T. (2010). *Atlas de bacteriología: Género Salmonella*. Consultado el 23 de marzo de 2020. [http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Genero\\_Salmonella.html](http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Genero_Salmonella.html)
- Sánchez-Maldonado, A., Lee, A., and Farber, J. (2018). Methods for the control of foodborne pathogens in low-moisture foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 177-208.
- Scott, V. (1989). Interaction of factors to control microbial spoilage of refrigerated foods. *Journal of Food Protection*, 52(6), 431-435.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). *Cacao Mexicano*. Consultado el 20 de marzo de 2020. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256425/B\\_sico-Cacao.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256425/B_sico-Cacao.pdf)
- Shaker, R. R., Osaili, T. M., Abu Al-Hasan, A. S., Ayyash, M. M., and Forsythe, S. J. (2008). Effect of desiccation, starvation, heat, and cold stresses on the thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula. *Journal of food science*, 73(7), M354-M359.
- Spector, M. and Kenyon, J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45(2), 455-481.

- Stobinska, H., Krysiak, W., Nebesny, E. and Kozanecka, E. (2006). Effects of convective roasting conditions on microbial safety of cocoa beans. *Acta Agrophysica* 7, 239–248
- Tafari, A., Ferracane, R., and Ritieni, A. (2004). Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food chemistry*, 88(4), 487-494.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., and Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tamminga, S., Beumer, R., Kampelmacher, E. and Van Leusden, F. (1976). Survival of *Salmonella* eastbourne and *Salmonella* typhimurium in milk chocolate prepared with artificially contaminated milk powder. *Epidemiology & Infection*, 79(3), 333-337.
- Torres-Vitela, M., Fernández-Escartín, E. and Castillo, A. (1995). Risk of salmonellosis associated with consumption of chocolate in Mexico. *Journal of Food Protection*, 58(5), 478-481.
- Tournu, H., Fiori, A. and Van Dijck, P. (2013). Relevance of trehalose in pathogenicity: some general rules, yet many exceptions. *PLoS Pathogens*, 9(8).
- Uesugi, A., Danyluk, M. and Harris, L. (2006). Survival of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 on inoculated almonds stored at -20, 4, 23, and 35 C. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1851-1857.
- Valenzuela, A. (2007). El chocolate, un placer saludable. *Revista chilena de nutrición*, 34(3), 180-190.
- Vega, C. and Kwik-Urbe, C. (2012). *Theobroma cacao—An Introduction to the Plant, Its Composition, Uses, and Health Benefits*. In *Cocoa butter and related compounds* (pp. 35-62). AOCS Press.
- Villa, R. (2015). *Influence of different factors on desiccation survival and thermal resistance of Salmonella and radiofrequency pasteurization of low-moisture*

*foods* [tesis de doctorado, Washington State University] Research Exchange Libraries. <http://hdl.handle.net/2376/6237>

- Werber, D., Dreesman, J., Feil, F., Van Treeck, U., Fell, G., Ethelberg, S., Hauri, A., Roggentin, P., Prager, R., Fisher, I. and Behnke, S. (2005). International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infectious Diseases*, 5(1), p.7.
- White, A., Gibson, D., Kim, W., Kay, W. and Surette, G. (2006). Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3219-3227.
- Wiertzema, J.R., Borchardt, C., Beckstrom, A.K., Dev, K., Chen, P., Chen, C., Vickers, Z., Feirtag, J., Lee, L., Ruan, R. and Baumler, D.J., (2019). Evaluation of methods for inoculating dry powder foods with *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium*, or *Cronobacter sakazakii*. *Journal of food protection*, 82(6), 1082-1088.
- Zhang, Y., Bi, P., and Hiller, J. E. (2010). Climate variations and *Salmonella* infection in Australian subtropical and tropical regions. *Science of the Total Environment*, 408(3), 524-530.
- Zoz, F., Grandvalet, C., Lang, E., Iaconelli, C., Gervais, P., Firmesse, O., Guyot, S. and Beney, L. (2017). *Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: Influence of serotype, origin, virulence, and genotype. *International journal of food microbiology*, 248, 82-89.