



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

IVONE FRANCISCA DA SILVA

**ENTEROBACTÉRIAS NA CADEIA PRODUTIVA DO
CACAU AO CHOCOLATE**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Pereira e co-orientação da Dra. Maristela Nascimento.

Prof. Dr. José Luiz Pereira

Orientador

Dra. Maristela Nascimento

Co-orientadora

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Ivone Francisca da Silva, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pelo Prof. Dr. José Luiz Pereira.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Si38e Silva, Ivone Francisca da, 1982-
Enterobactérias na cadeia produtiva do cacau ao
chocolate / Ivone Francisca da Silva. -- Campinas, SP:
[s.n], 2011.

Orientador: José Luiz Pereira.
Coorientador: Maristela Nascimento.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Enterobactérias. 2. Salmonella. 3. Cacau. 4.
Chocolate. I. Pereira José Luiz. II. Nascimento,
Maristela. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Enterobacteriaceae in the cocoa and chocolate production
chain

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Enterobacteriaceae

Salmonella

Cocoa

Chocolate

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

José Luiz Pereira [Orientador]

Maristela Nascimento

Priscilla Efraim

Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Data da defesa: 01/08/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz Pereira
Orientador

Profa. Dra. Priscilla Efraim
Membro

Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira
Membro

Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt
Membro

Dra. Valéria Cristina Amstalden Junqueira
Membro

À Deus por sempre me mostrar o caminho certo a seguir.

À minha mãe Maria do Carmo por não me deixar desistir dos sonhos.

Ao meu pai Ivo pela formação do meu caráter e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradeço a Deus pelo dom da existência e por colocar em meu caminho todos que me cercaram de cuidados e amor. Agradeço a todos os desafios impostos em uma caminhada com espinhos, porém com muitas flores.

Aos meus pais que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, ensinaram a lutar e não acreditar no impossível.

Ao Dr. Leonel Yamaguchi que sempre esteve ao meu lado, compartilhando de minhas lágrimas e de meus sorrisos. Seu amor, estímulo e carinho foram às armas desta vitória. “Sempre juntos, sempre perto.”

Aos amigos e colegas de profissão, Juliana Basso, Leonardo Orlandi, Ana Paula Duarte, Ana Paula Chagas, Rutnéia, Wanderley Pedroso, Juliano de Souza, Marina Copetti, Thaís Brito, Heloísa Hervatin, Camila Rigolo, Thatiane Valente, Raquel de Souza e muitos outros que passaram pela minha vida e deixaram saudades, meu obrigado pelo respeito e pela confiança. Aos amigos do “Projeto Cacau”, João H. Nunes, Fabiana Taminato, Felipe Nakano, Aline Santos, Érika Reolon, Juliana da Silva, Vanessa.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos por ter permitido a realização desse trabalho e principalmente pela minha formação profissional.

Às Dras. Neusely da Silva, Valéria Junqueira, Margarete Okazakii, Neliane Ferraz e Marta Taniwaki. Obrigada pelos desafios propostos, pelos ensinamentos e princípios profissionais que levarei eternamente.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Pereira pela compreensão, pelo apoio, colaboração, confiança, paciência, sem as quais este trabalho não teria se concretizado.

À Dra. Maristela Nascimento pela co-orientação, seriedade, exigência e rigidez que conduziu este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

RESUMO

Os microrganismos são extremamente importantes no processamento do cacau, sob dois aspectos. O primeiro é o aspecto tecnológico, porque desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do sabor do chocolate. O segundo é o aspecto de saúde pública, porque podem transmitir doenças de origem alimentar. O chocolate já foi incriminado em vários surtos de salmonelose e, em alguns deles, a contaminação por *Salmonella* originou-se dos ingredientes de cacau.

O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de enterobactérias, incluindo *Salmonella* em cada etapa do processamento do cacau até a obtenção do chocolate além de determinar características físico-químicas como pH e atividade de água. Foram analisadas 364 amostras, obtidas de produtores e processadores de cacau da Bahia e comerciantes de chocolate do Estado de São Paulo, sendo 119 amostras de cacau durante o pré-processamento nas fazendas produtoras; 150 amostras de derivados processados de cacau e 65 amostras comerciais de chocolate. As polpas de cacau apresentaram resultados microbiológicos e físico-químicos de acordo com a legislação vigente. As sementes que chegam do campo, antes de entrarem na fermentação, não apresentaram contaminação por *E. coli*, o que indica que a matéria prima é uma fonte menos provável de entrada de enteropatógenos, dentre eles *Salmonella*, no pré-processamento do cacau. Na etapa de fermentação não houve o isolamento de *Salmonella*, nem foi observada correlação entre a presença ou contagem de *E. coli* e o tempo de fermentação. Todas as fazendas produtoras apresentaram contaminação por *E. coli*. Durante a etapa de secagem das amêndoas não foi detectada presença de *Salmonella*, já a porcentagem de amostras contaminadas por *E. coli* aumentou em todas as fazendas (40% de amostras contaminadas) com relação a etapa anterior. Nas amêndoas fermentadas e secas foi detectada a presença de *Salmonella* em uma amostra, além de ter sido verificado um aumento na porcentagem de amostras contaminadas por *E. coli* em relação a etapa anterior. Quanto cacau processado, nas amostras de *Nibs* analisadas houve o isolamento de bactérias do grupo enterobactérias e coliformes totais em 17 e 20% das amostras, mesmo após terem sido submetidos a um processo de torração com temperaturas acima de 110°C. Para os demais produtos foi verificada contaminação de até 7% das amostras analisadas. Em relação ao chocolate as amostras analisadas apresentaram resultados microbiológicos dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. Os resultados obtidos nos levam a concluir que: o pré-processamento do cacau é uma etapa onde ocorre a introdução e multiplicação de microrganismos indicadores e patogênicos como a *Salmonella*, sendo que as etapas de secagem e armazenamento se mostraram as mais críticas; a etapa de processamento também oferece risco de introdução e/ou sobrevivência de microrganismos patogênicos como *Salmonella*.

ABSTRACT

Microorganisms are extremely important in the processing of cocoa for many reasons. First of all is the technological aspect because some microorganisms play a key role in the improvement of chocolate flavor. The other aspect is on public health, mainly on the transmission of food-borne diseases. Chocolate has already in several outbreaks of salmonellosis, in some of them *Salmonella* source was cocoa ingredient. Therefore, the aim of this study was to investigate the occurrence of Enterobacteriaceae, including *Salmonella*, throughout cocoa and chocolate chain incremented. Furthermore, physico-chemical properties such as pH and water activity were determined. The amount of 364 samples, obtained from manufacturers of Bahia state and cocoa traders from São Paulo state, were analyzed, including 119 samples of cocoa during the pre-processing on farms, 150 samples of cocoa processed products and 65 samples of commercial chocolate. The results indicated that the microbiological and physical-chemical analyses of the cocoa pulp were according to law. Cocoa sucs before the fermentation process are not source of *Salmonella* and *E.coli*. In the fermentation stage, *Salmonella* was not isolated, but all farms showed contamination by *E. coli*, without correlation between the counting of pathogens and fermentation time. In the drying step, *Salmonella* was not detected as opposed to *E. coli* counting, that increased 40% in all farms with respect to the previous step. In the storage only one sample showed *Salmonella*. In Nibs samples were isolated Enterobacteriaceae and total coliforms in respectively 17% and 20% of samples, despite of roasting processing with temperatures above 110°C. For other products the contamination of 7%. Commercial chocolate samples showed results seconding to the standards established by law. The results lead us to conclude that the pre-processing of cocoa is the stage where there is the introduction and multiplication of indicators microorganisms and *Salmonella*. The drying and storage were the most critical steps. The processing stages, also offer risk of introduction and survival of pathogens such as *Salmonella*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO -----	14
2. OBJETIVOS -----	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	17
3.1. Cacau: Características Gerais -----	17
3.1.1. Classificação -----	19
3.1.1.1. Grupo <i>Criollo</i> -----	19
3.1.1.2. Grupo Forastero -----	19
3.1.1.3. Grupo Trinitários -----	20
3.2. Aspectos Históricos do Cacau e Chocolate -----	21
3.3. O Mercado do Cacau -----	23
3.4. Cadeia Produtiva do Cacau -----	25
3.5. Pré-Processamento do Cacau -----	27
3.5.1. Colheita e Quebra dos Frutos -----	27
3.5.2. Fermentação -----	27
3.5.3. Secagem -----	32
3.6. Obtenção dos Produtos de Cacau -----	33
3.6.1. Definição dos Produtos Processados de Cacau -----	33
3.7. Processamento do Cacau -----	34
3.7.1. Limpeza e Seleção -----	34
3.7.2. Torração -----	34
3.7.3. Moagem -----	37
3.7.4. Prensagem -----	37
3.7.5. Obtenção de Pó de Cacau -----	37
3.8. Processamento do Chocolate -----	38
3.8.1. Mistura -----	38
3.8.2. Refino -----	38
3.8.3. Conchagem -----	39
3.8.4. Temperagem, Refino e Moldagem -----	39
3.9. Tipos de Chocolate -----	39

3.10. Caracterização do Gênero <i>Salmonella</i> -----	40
3.11. Relação entre a presença de <i>Salmonella</i> e bactérias indicadoras -----	43
3.12. <i>Salmonella</i> em Cacau e Chocolate -----	46
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	51
4.1. Amostragem -----	51
4.2. Armazenamento de Amostras -----	51
4.3. Preparo das Amostras -----	52
4.4. Análises Microbiológicas -----	52
4.4.1. Enterobactérias -----	52
4.4.2. Coliformes Totais e <i>E. coli</i> -----	52
4.4.3. <i>Salmonella</i> -----	54
4.5. Determinação da Atividade de Água -----	56
4.6. Leitura do Potencial de Hidrogênio (pH) -----	56
5. RESULTADOS -----	57
5.1. Polpa de Cacau -----	57
5.2. Pré-Processamento do Cacau -----	58
5.2.1. Sementes de Cacau Antes da Fermentação -----	58
5.2.2. Sementes de Cacau Durante o Processo de Fermentação -----	59
5.2.3. Amêndoas Durante o Processo de Secagem -----	62
5.2.4. Amêndoas Estocadas -----	63
5.3. Derivados Processados de Cacau -----	66
5.3.1. <i>Nibs</i> de Cacau -----	68
5.3.2. <i>Liquor</i> (massa) de Cacau -----	69
5.3.3. Torta de Cacau -----	69
5.3.4. Manteiga de Cacau -----	69
5.3.5. Pó de Cacau -----	69
5.4. Chocolate -----	69
6. DISCUSSÃO -----	72
6.1. Polpa de Cacau -----	72
6.2. Pré-Processamento do Cacau -----	73
6.3. Derivados Processados de Cacau -----	73

6.4. Chocolate -----	77
7. CONCLUSÕES -----	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	81
ANEXO 1. Resultados de Análise das Amostras de Polpa de Cacau Congelada -----	90
ANEXO 2. Resultados de Análise das Amostras de Sementes de Cacau Antes da Fermentação -----	91
ANEXO 3. Resultados de Análise das Amostras de Sementes de Cacau Durante o Processo Fermentativo -----	92
ANEXO 4. Resultados de Análise das Amostras de Amêndoas de Cacau Durante o Processo de Secagem -----	93
ANEXO 5. Resultados de Análise das Amostras de Amêndoas de Cacau Estocadas -----	94
ANEXO 6. Resultados de Análise das Amostras de <i>Nibs</i> de Cacau nas Indústrias de Beneficiamento -----	95
ANEXO 7. Resultados de Análise das Amostras de <i>Liquor</i> de Cacau Coletadas nas Indústrias de Beneficiamento -----	96
ANEXO 8. Resultados de Análise das Amostras de Torta de Cacau Coletadas nas Indústrias de Beneficiamento -----	97
ANEXO 9. Resultados de Análise das Amostras de Manteiga de Cacau Coletadas nas Indústrias de Beneficiamento -----	98
ANEXO 10. Resultados de Análise das Amostras de Pó de Cacau Coletadas nas Indústrias de Beneficiamento -----	99
ANEXO 11. Resultados de Análise das Amostras de Chocolate Coletadas no Comércio Varejista -----	100

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química média da amêndoa de cacau expressa em relação à matéria seca, segundo alguns autores -----	18
Tabela 2. Surtos de salmonelose provocados pelo consumo de chocolate -----	47
Tabela 3. Resultados das análises físico-químicas das amostras de polpa de cacau, congelada de seis diferentes marcas comercializadas em Ilhéus/BA e Campinas/SP -----	55
Tabela 4. Resultados das análises microbiológicas das amostras de polpa de cacau, congelada de seis diferentes marcas comercializadas em Ilhéus/BA e Campinas/SP -----	58
Tabela 5. Características físico-químicas de sementes de cacau coletadas antes do processo de fermentação -----	58
Tabela 6. Resultados microbiológicos de sementes de cacau coletadas antes do processo de fermentação -----	59
Tabela 7. Análises microbiológicas de sementes de cacau, coletadas de três diferentes produtores em Ilhéus/BA, durante o processo de fermentação -----	61
Tabela 8. Características físico-químicas e microbiológicas de amêndoas de cacau coletadas nas barcaças de secagem -----	62
Tabela 9. Resultados microbiológicos de amêndoas de cacau coletadas nas barcaças de secagem -----	63
Tabela 10. Características físico-químicas e microbiológicas de amêndoas de cacau coletadas na estocagem -----	63
Tabela 11. Características físico-químicas e microbiológicas de amostras de amêndoas coletadas na etapa de estocagem nas fazendas produtoras -----	64
Tabela 12. Resultados das análises físico-químicas dos processados de cacau coletados nas empresas beneficiadoras -----	67
Tabela 13. Resultados das análises microbiológicas dos “nibs” coletadas nas empresas beneficiadoras de cacau -----	68
Tabela 14. Resultados das análises físico-químicas em chocolates comercializados em Campinas/SP -----	70
Tabela 15. Resultados das análises microbiológicas em chocolates comercializados em Campinas/SP -----	71

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma resumido do processamento das sementes de cacau para produção de chocolate e a relação com as etapas de desenvolvimento de sabor -----	26
Figura 2. Reações observadas na semente de cacau durante a fermentação, após a morte do gérmen -----	30
Figura 3. Reações observadas durante a fermentação do cacau -----	31
Figura 4. Fluxograma de processamentos alternativos das amêndoas de cacau -----	35
Figura 5. Atividade de água das sementes de cacau ao longo da fermentação -----	60
Figura 6. Valores de pH das sementes de cacau ao longo da fermentação do cacau -----	60
Figura 7. Atividade de água durante as etapas de pré-processamento do cacau -----	65
Figura 8. pH das amostras durante as etapas de pré-processamento do cacau -----	66

1. INTRODUÇÃO

A palavra cacau é um termo geral, referindo-se ao fruto e às sementes da espécie *Theobroma cacao* L, da família *Sterculiaceae*. (WOOD & LASS, 1985). O Cacaueiro sempre foi cultivado para aproveitar somente as sementes de seus frutos, que são a matéria-prima da indústria chocolateira. Porém recentemente a polpa começou a despertar o interesse dos produtores, devido ao seu alto rendimento (CEPLAC, 2010). O pré-processamento (fermentação e secagem) é feito pelos próprios produtores, que comercializam as amêndoas no mercado externo e interno, para a produção de chocolate.

O cacau e seus derivados são utilizados na produção de vários produtos, sendo o chocolate o mais importante. Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões são responsáveis por mais de 90% das exportações mundiais de cacau (ICCO, 2008)

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de chocolate, depois dos Estados Unidos, Alemanha e Reino Unido (ICA, 2009 *apud* ABICAB, 2010). A produção brasileira cresceu uma taxa média anual de 5,6% ao ano, de 1992 a 2002 (GARCIA, 2003).

Um dos atributos de maior importância do chocolate consiste em seu sabor, inigualável, conhecido e apreciado mundialmente. Tal sabor é constituído de inúmeros compostos cuja formação depende das características genéticas do cacau e do ambiente de cultivo, bem como das operações de processamento que se iniciam na propriedade agrícola, como a colheita, fermentação e secagem e continuam nas indústrias processadoras de cacau e de chocolate (EFRAIM, 2009).

No processamento, os microrganismos desempenham um papel essencial, uma vez que os produtos de seu metabolismo induzem à formação dos compostos químicos precursores do sabor do chocolate. Em função disso, há excelentes trabalhos que estudam a sucessão microbiana na fermentação do cacau, sua influência no aroma e sabor do chocolate e sua sobrevivência nas etapas posteriores de processamento (ARDHANA & FLEET, 2003; SCHWAN & WHEALS, 2004).

Sob o aspecto de saúde pública, dentre os microrganismos que podem afetar adversamente a qualidade do chocolate está a *Salmonella*. A Comunidade Européia (EC, 2003) destaca o chocolate entre os produtos responsáveis pelos maiores surtos de salmonelose em humanos, disseminando-se por vários países e atingindo grande número de pessoas. Os produtos de cacau não são os únicos ingredientes que podem introduzir *Salmonella* no chocolate, mas foram incriminados em alguns surtos (amêndoas secas, cacau em pó). O sistema APPCC (análise de perigos e pontos críticos de controle) considera as amêndoas uma fonte permanente de *Salmonella* na fabricação de chocolate (ICMSF, 2000).

O controle da matéria-prima é considerado essencial na prevenção de *Salmonella* em chocolate (D'AOUST, 1977; ICMSF, 1988; CORDIER, 1994). Porém, pouco se sabe sobre a presença de *Salmonella* e mesmo outras enterobactérias em produtos brasileiros derivados do cacau. Os relatos encontrados na literatura são muito raros e, no caso de *Salmonella*, predominantemente relacionados à investigação de surtos. Para a adoção de qualquer medida preventiva, são necessários estudos que permitam determinar a prevalência e os pontos de entrada desses microrganismos na cadeia produtiva do cacau.

2. OBJETIVOS

- Verificar a qualidade microbiológica de diferentes marcas comerciais de polpa de cacau.

- Avaliar a prevalência de enterobactérias, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Salmonella* ao longo da cadeia produtiva do cacau, desde a abertura do fruto até a obtenção de amêndoa seca e também em produtos processados (*nibs*, *liquor*, manteiga e pó de cacau) e em chocolates comerciais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. 1. Cacau: Características Gerais

O cacauero pertencente à família *Sterculiaceae*, considerado pelos Astecas um presente dos deuses aos homens foi batizado por Linneu com o nome científico de *Theobroma cacao* L. (*Theos* = Deus + *Broma* = alimento). O nome da planta é de origem Asteca, *cacahuahuatl* (cacauero) e *cacahuatl* (cacau) (LAJUS, 1982; FERRÃO, 2002; ABICAB, 2010).

É uma planta nativa da América, das matas equatoriais da região dos rios Orinoco e Amazonas (LAJUS, 1982; FERRÃO, 2002).

É uma árvore de pequeno porte sendo que a planta nativa pode atingir até oito metros de altura, porém quando cultivado, com a poda não excede mais do que 4 a 5 metros. É componente do sub-bosque da floresta equatorial, vivendo a sombra das árvores de maior porte (FERRÃO, 2002).

Os frutos podem atingir até 25 cm de comprimento e quando maduros apresentam coloração alaranjada, amarela ou roxa, dependendo da espécie. Cada fruto contém cinquenta ou mais sementes, envoltas por uma polpa mucilaginosa. O cacauero pode viver mais de cem anos, a frutificação inicia-se aos três anos, porém a produção é mais abundante dos oito aos trinta anos. As melhores condições de cultivo são em regiões com temperatura que varia de 24 a 28°C (LAJUS, 1982).

O cacauero é cultivado em áreas tropicais e subtropicais, caracterizadas pela fertilidade do solo e pelo equilíbrio das condições climáticas, pois é bastante sensível aos excessos de chuva e sol (ABICAB, 2010).

Temperaturas inferiores a 12°C impedem ou reduzem a frutificação do cacauero, a planta também necessita de um índice elevado de chuva e umidade atmosférica (SEAGRI, 1999).

O cacauero desenvolve-se bem em solos argilosos, fraco-argilosos ou fraco-argilo-arenosos, que possuem boa capacidade de retenção de água, profundos, pH moderadamente ácido e bem drenados (FERRAO, 2002). Exige temperatura sempre superior a 20 graus e, por isso, sua faixa ideal para cultivo, no

Brasil, fica entre os Estados do Espírito Santo, Bahia e Rondônia (ABICAB, 2010).

No Brasil, os cacauzeiros podem produzir até duas colheitas por ano: a primeira (temporão) começa em abril e vai até agosto; a segunda (safra) começa em novembro a fevereiro (CEPLAC, 2010).

A polpa consiste de células parênquimatosas, com 89 a 90% de água, 8 a 13% de açúcares, (principalmente glicose e sacarose), cerca de 0,5% de ácidos não voláteis (principalmente ácido cítrico) e pequenas quantidades de aminoácidos. O pH varia entre 3,6 e 4,0. As sementes são ovais, compostas por dois cotilédones e um embrião (germe), recobertos por uma casca fina e frágil, também chamada de testa. Os cotilédones contêm cerca de um terço de água, um terço de gordura (manteiga de cacau) e um terço de outros componentes (amido, açúcares, bases purínicas, compostos fenólicos e ácidos não voláteis) (CARVALHO, 1997; ICMSF, 2000).

Segundo Lopes (2000), as sementes do cacau *Forastero* possuem em média 82,16% de cotilédones, 16,75% de testa e 1,09% de embrião.

A composição química do cacau depende da variedade e origem das amêndoas, das práticas agrícolas e do grau de maturação do fruto (MINIFIE, 1989). A composição química média das amêndoas de cacau está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química média da amêndoa de cacau expressa em relação à matéria seca, segundo alguns autores

Composição (%)	MINIFIE (1970)	GILABERT ESCRIVÁ (1997)	FERNÁNDEZ BARBERY (1999)
Lipídeos	56,0	50,18	53,65
Cinzas	2,8	2,63	2,82
Fibras	-	5,18	5,54
Proteínas	12,0	17,78	13,60
Teobromina	1,4	-	1,06
Cafeína	0,2	-	0,17
Umidade	-	6,69	7,2
Outros (carboidratos)	-	17,54	15,96

Fonte: CRUZ (2002)

3.1.1. Classificação

Ao longo dos anos diversas classificações sistemáticas foram propostas na discriminação das espécies de cacau, sendo que atualmente a mais utilizada é a classificação de Cheesman de 1914 que propôs classificar o cacau não mais nas características dos frutos, nas quais se verificava uma enorme variedade e sim no valor do cacau comercial que as plantas davam origem. Com isso, a classificação seguida internacionalmente é: *Criollo* e *Forastero* (BECKETT, 1994; PIRES, 2003).

3.1.1.1. Grupo *Criollo*

As árvores são de pequeno porte, frágeis e mais susceptíveis a pragas e doenças. Os frutos são alongados, com ponta proeminente. A superfície externa é rugosa, com sulcos longitudinais profundos e casca pouco espessa. As sementes são grandes e ovais, com cotilédone (polpa) branco. São encontrados principalmente na Venezuela, América Central, México, Java e Samoa (LAJUS, 1982; LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001; FERRÃO, 2002).

A fermentação da polpa é geralmente curta, não excedendo a dois dias, é um cacau muito aromático, considerado de ótima qualidade. No que se refere à área cultivada, está em declínio, devido aos elevados custos de produção (devido a alta suscetibilidade à pragas e doenças) que não são compensados pelas cotações que conseguem no mercado (FERRÃO, 2002).

3.1.1.2. Grupo *Forastero*

As árvores são mais robustas, de maior porte e mais resistentes a pragas e doenças. Os frutos são grandes, com cerca de 25 cm de comprimento, mais arredondados, com a casca dura e superfície quase lisa. As sementes são achatadas e o cotilédone apresenta coloração levemente violácea. Cada fruto contém entre 30 e 50 sementes. Esse cacau depois de fermentado apresenta um aroma considerado suave, um gosto mais ácido e adstringente quando comparado ao *Criollo*. São encontrados em todos os países produtores de cacau do mundo (LAJUS, 1982; FERRÃO, 2002).

A fermentação da polpa é mais demorada podendo ultrapassar cinco dias.

O cacau comercial é menos aromático, porém é possível obter-se cacau de excelente qualidade com uma boa tecnologia de pré-processamento (FERRÃO, 2002).

3.1.1.3. Cacau Trinitários

A hibridização natural entre os grupos *Criollo* e *Forastero* deu origem ao grupo Trinitários. Considerados de melhor qualidade que o grupo *Forastero*, possui resistência a pragas e doenças provenientes dessa variedade, com o sabor frutal e suave do grupo *Criollo* (FERRÃO, 2002).

Até a década de 70, os principais problemas agrônômicos que estimularam a pesquisa no Brasil, visavam o melhoramento dos aspectos qualitativos da amêndoa do cacau, tamanho dos frutos, uniformidade das árvores, produtividade e resistência a pragas e doenças. Trabalhos desenvolvidos pela CEPLAC/BA (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) resultaram em diferentes produtos híbridos. A estratégia era pautada em cruzamento entre indivíduos selecionados que apresentassem características de precocidade, qualidades organolépticas (aroma e sabor), teor de gordura, peso da amêndoa seca acima de 1,2g, produção com 1 a 2 anos de antecedência, longevidade, variabilidade, vigor híbrido e resistência às pragas e doenças (CEPLAC, 2010).

Com a introdução do fungo *Moniliophthora perniciosa* (“vassoura-de-bruxa”), na região sul da Bahia, os trabalhos de melhoramento voltaram-se quase que exclusivamente para encontrar fontes de resistência ao fungo, assim o produtor de cacau passou a ter três opções quanto ao uso de material genético: A primeira foi o uso de variedades clonais selecionadas pela CEPLAC, a segunda foi a utilização de propágulos obtidos da variedade Theobahia ou sementes desses materiais, e a terceira opção foi a seleção de cacaueiros resistentes nas próprias fazendas de produtores da região ou em áreas vizinhas (CEPLAC, 2010).

O mercado também conta com o Cacau Fino ou Aromático que são utilizados usualmente para produzir sabores específicos em determina dos produtos. Os grãos correspondentes a esta categoria dão características particulares de aroma ou cor em chocolates finos. Também se usam, embora cada

vez menos, para produzir chocolate em pó utilizado na preparação de certos alimentos e bebidas. A oferta mundial de cacau fino ou aromático é reduzida e representa apenas 5% do total (PUBLITEC, 2010).

3.2. Aspectos Históricos do Cacau e Chocolate

De origem americana, a semente de cacau foi moeda corrente entre os povos centro-americanos, alimento importante das classes nobres, expressão de riqueza quando acumuladas nos celeiros dos grandes senhores (FERRÃO, 2002).

Os nativos americanos torravam e descascavam as sementes que depois eram moídas com auxílio de pedras. Devido ao calor do ambiente, do calor liberado pelo atrito e à elevada quantidade de gordura, formava-se uma substância pastosa e espessa, a que se adicionavam outros ingredientes. Essa iguaria só era acessível aos mais poderosos. Era oferecida aos deuses e depois consumida pelos sacerdotes nos templos (FERRÃO, 2002; ABICAB, 2010).

Da mesma pasta preparava-se uma bebida perfumada pela adição de baunilha, pimentas picantes, pétalas de rosas, vários outros produtos e água quente. Parte da gordura era utilizada pelas mulheres nos seus tratamentos de beleza. A bebida era considerada nutritiva, fortificante e afrodisíaca (FERRÃO, 2002).

Por volta de 1585 houve a necessidade de estabelecer novas plantações nas regiões tradicionalmente produtoras e de expandir a cultura em novas terras americanas devido o grande número de carregamentos para a Europa (FERRÃO, 2002).

A Espanha manteve por todo século XVI os segredos do processo de preparação da pasta de cacau. Em 1605 os italianos aprenderam o processo de tratamento das sementes e assim fez cair o monopólio espanhol do cacau torrado na Europa. O conceito passou rapidamente para a Áustria, posteriormente a corte francesa e com o consumo cada vez mais acelerado o cacau produzido nas colônias espanholas das Américas já não era mais suficiente para o abastecimento do mercado europeu, iniciaram-se então novas plantações nas colônias francesas e inglesas da América. Em meados 1660 o consumo de cacau

chegou a Inglaterra, posteriormente a Holanda e Alemanha (FERRÃO, 2002).

O cacau chegou ao Brasil, pelo Estado do Pará, em 1746, sendo posteriormente levado para o Estado da Bahia, onde a cultura se desenvolveu em bases econômicas (ABICAB, 2010). Em 1822 a cultura do cacau foi introduzida na África, primeiro em São Tomé e Príncipe, depois Gana, Nigéria e Costa do Marfim (FERRÃO, 2002).

A primeira indústria de chocolate foi na Alemanha. Em 1818, Gaspar van Hooten introduziu a técnica de retirada da gordura das sementes, que posteriormente deu origem ao *chocolate em pó*. A gordura retirada (manteiga de cacau) passou a ter grande valor na área farmacêutica e cosmética (FERRÃO, 2002).

Em 1847 a empresa Fry and Son, preparou o primeiro *chocolate sólido*. Alguns anos mais tarde, Rod Lindt introduziu a conchagem das massas e adicionou durante essa operação um suplemento de manteiga de cacau, assim apareceu o chocolate *fondant*. Em 1913 Suchard em Montreal fez o primeiro *chocolate recheado*, em 1926 na fábrica de Neuchatel desenvolveu o *creme de chocolate* e em 1934 produziu pela primeira vez na fábrica da Nestlé em Vevey o *Chocolate branco*. Em 1945 surgiu no mercado o primeiro leite com chocolate, em garrafas de vidro esterilizado. Em 1954, a Suchard lançou pela primeira vez no mercado o chocolate em pó instantâneo (FERRÃO, 2002).

Quanto aos aspectos de cultura do cacau, a experiência foi mostrando que as sementes de só exibiam o característico e desejado *flavor* na torra com uma tecnologia pós-colheita que foi se aperfeiçoando ao longo dos tempos (FERRÃO, 2002).

O beneficiamento (fermentação e secagem) do cacau, para obtenção de um produto de qualidade organoléptica superior, apesar da disponibilidade de tecnologias para tal, nunca foi considerado uma vez que não existem preços diferenciados no mercado para produtos de melhor qualidade. A indústria compra o produto indistintamente e faz um blend de cacau de cada região, portanto não há estímulo para o agricultor melhorar a qualidade do produto (MORORÓ, 2011).

Somente no início do século passado iniciou-se os estudos visando conhecer melhor a composição da semente de cacau, antes e depois da tecnologia pós-colheita, as transformações que se ocorrem durante o processo e a definição de técnicas mais aperfeiçoadas e cientificamente apoiadas visando a melhoria da qualidade do produto final. Mesmo assim, poucos dos conhecimentos científicos adquiridos foram incorporados na melhoria dos métodos e na preparação do produto para o comércio (FERRÃO, 2002).

3.3. O Mercado do Cacau

Em 1910 o Brasil era o maior produtor mundial de cacau, com 29 mil toneladas anuais. No decênio 1920-1930 a lavoura cacauera atravessou um período de muita agitação e intranquilidade, principalmente pelas mudanças produzidas pela Primeira Guerra Mundial (RANGEL, 1982). Mesmo assim, até meados do século XX os produtores latino-americanos (México, Venezuela, Equador e Brasil) dominavam a produção mundial. No final da década de 80, com a chegada da enfermidade causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (“vassoura-de-bruxa”), ocorreu um dramático declínio na produção, passando de 378.000 toneladas em 1990/1991, para 118.700 toneladas em 1999/2000. Esta enfermidade disseminou-se rapidamente, atingindo mais de 90% da região produtora da Bahia. Consideráveis esforços vêm sendo feitos para controlar a “vassoura-de-bruxa”, com a substituição de um terço das plantações por variedades mais resistentes (GRAY, 2001).

Na década de 90, em virtude dos preços internacionais baixos, condições climáticas desfavoráveis e principalmente o aparecimento da doença ‘vassoura-de-bruxa’, o Brasil se viu obrigado a importar cacau em amêndoas para abastecer suas indústrias e preservar os empregos dos funcionários existentes no parque industrial do cacau. Em 1992/93 foi realizada a primeira importação significativa, 2.171 toneladas de cacau em amêndoas (ZUGAIB, 2008).

As exportações, que em 1990/91 atingiam 112 mil toneladas e se reduziram vertiginosamente para 764 toneladas em 2007/08. Além disso, o Brasil mudou também de comportamento, ou seja, ao invés de exportar somente a

matéria-prima, passou a exportar também produtos semi-industrializados ou processados com maior valor agregado, de 1983 a 2007 a exportação brasileira de manteiga de cacau aumentou de 12% para 39%, e do cacau em pó de 4% para 35% (ZUGAIB, 2008).

Em dezembro de 2009 o Brasil exportou 326,3 toneladas de cacau em grãos, equivalente a 3.938 sacas e 66.648,3 toneladas de produtos processados, como *liquor*, manteiga, torta e pó de cacau. (CACAUTH, 2010a)

A cultura cacauera difundiu-se para algumas dezenas de países, situados na faixa de clima tropical, com grande incremento no cultivo. Hoje a produção de cacau está concentrada na Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões são responsáveis por mais de 90% das exportações mundiais (ICA, 2009 *apud* ABICAB, 2010). Sendo que o Brasil vem mantendo uma posição de destaque, sendo o primeiro entre os países latino americanos (FERRÃO, 2002; ICCO 2008).

Em 2007/2008 a produção mundial de cacau chegou a quase 3,7 milhões de toneladas, um aumento de 9% em comparação com a safra anterior. A produção cresceu 13% na África e 11% na América, em contrapartida na Ásia e Oceania a produção caiu quase 8%. A África foi o maior produtor de cacau com 72% da produção mundial (ICCO, 2008).

O processamento do cacau em derivados (*liquor* de cacau, torta de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó) e chocolate é realizado predominantemente na Europa e na América do Norte, destacando-se a Alemanha e os Estados Unidos (CACAUTH, 2010b). Há, entretanto, uma tendência crescente de processamento nos locais de origem, cuja cota total passou de 32% em 1999/2000, para quase 36% em 2003/04. Este aumento se deve, em parte, às políticas estatais de fomento à exportação de produtos semi-acabados, com valor agregado, em lugar do cacau em grão. Como decorrência, tem-se observado grandes investimentos, pelas empresas multinacionais, em plantas de beneficiamento nos países de origem. O Brasil destaca-se como o 5º país do mundo no processamento de cacau, atrás apenas de Estados Unidos, Holanda, Costa do Marfim e Alemanha (ICCO, 2004). O maior parque moageiro de cacau está implantado no centro da região produtora de Ilhéus e Itabuna na Bahia.

O cacau e seus derivados são utilizados na produção de vários produtos como confeitaria, panificação e bebidas, sendo o chocolate o mais importante. Os principais compradores externos são a Holanda (34%), os Estados Unidos (25%), a Argentina (16%) e o Canadá (8%) (AGRIANUAL, 2004). No mercado doméstico, destinam-se às indústrias de chocolates e achocolatados instaladas principalmente nas regiões Sul e Sudeste. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de chocolate, depois dos Estados Unidos, China e Alemanha (ABICAB, 2010).

3.4. Cadeia Produtiva do Cacau

A cadeia de produção agro-industrial do cacau é descrita em quatro etapas:

1) a cultura do cacau nas fazendas produtoras, que englobam o plantio e o pré-processamento, até a obtenção das amêndoas de cacau;

2) a indústria de primeira transformação do cacau ou indústria de moagem do cacau, que parte da amêndoa para produzir os derivados de cacau (*liquor*, manteiga, torta e cacau em pó e torta);

3) a indústria de chocolate cobertura, que através de processos de produção adequados utiliza os derivados de cacau para a fabricação do chocolate cobertura;

4) a indústria de produtos de chocolate ou indústria chocolateira, que trabalha o chocolate cobertura para obtenção de produtos finais (bombons, barras, tabletes, figuras, confeitos de chocolate, etc.) (GARCIA, 2003).

A Figura 1 apresenta um fluxograma resumido das etapas de processamento das sementes de cacau.

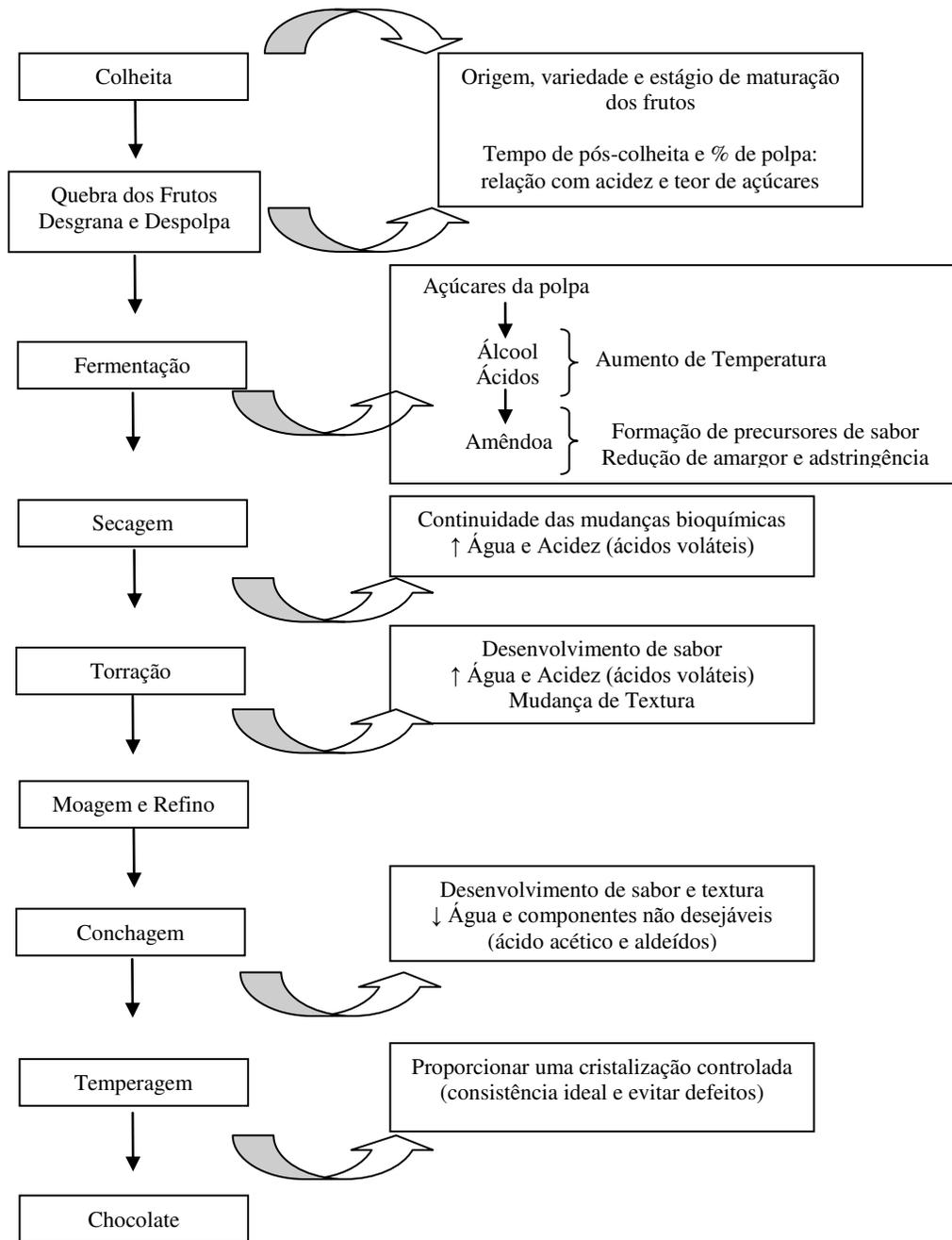


Figura 1. Fluxograma resumido do processamento das sementes de cacau para produção de chocolate e a relação com as etapas de desenvolvimento de sabor (MATTIETTO, 2001)

3.5. Pré-processamento do cacau

3.5.1. Colheita e Quebra dos frutos

A colheita dos frutos maduros é realizada manualmente. Posteriormente os frutos são partidos evitando-se que as sementes sejam danificadas. As sementes são retiradas com a polpa aderida, e submetidas à fermentação. O intervalo entre a quebra e o início da fermentação não deve ser superior a 24 horas para que não ocorram reações químicas indesejáveis. Sementes provenientes de quebras em dias diferentes não devem ser fermentadas juntas, pois isso conduz a uma fermentação desigual (EFRAIM, 2004).

A maturidade do fruto é muito importante para a boa fermentação, pois amêndoas de frutos muito maduros podem apresentar germinação, com risco de contaminação interna devido a ruptura da casca fina. Em casos de frutos colhidos antes da maturidade, a polpa contém baixos teores de açúcar, portanto a fermentação pode ser lenta (LAJUS, 1982).

3.5.2. Fermentação

É uma das etapas de pré-processamento que mais afetam a qualidade dos produtos obtidos a partir do cacau, é nela que inicia a formação do sabor do chocolate. Nesta etapa ocorre reações bioquímicas no interior dos cotilédones que causa a morte do embrião e o desenvolvimento de compostos característicos conhecidos como os precursores do sabor de chocolate (ROHAN & CONNELL, 1964; SCHWAN & WHEALS, 2004; LAGUNES-GALVÉZ *et al.*, 2007).

Segundo Schwan (1996), o cacau brasileiro é muito ácido, característica que dificulta a aceitação no mercado internacional, sendo que a alternativa encontrada é a retirada de parte da polpa (20%) antes da fermentação. Essa polpa retirada é utilizada na produção de sucos, sorvetes, geleias, licores, álcool, vinagre e outros produtos (ICMSF, 2000).

Um processo de fermentação controlado é fundamental para o desenvolvimento dos precursores de chocolate. As sementes não fermentadas são incapazes de produzir tal sabor (BRANDEAU, 1970).

Na fermentação, são fatores de grande importância, o sistema, a temperatura do ambiente e da massa, o pH e acidez da polpa e do cotilédone, o revolvimento da massa, o tempo de processamento e a microbiota presente (ROHAM & CONNEL, 1964; LOPEZ & QUESNEL, 1973, FERRÃO, 2002).

A duração do processo de fermentação irá variar de acordo com o tipo de cacau, condições climáticas da região e a técnica utilizada. O final da fermentação pode ser observado pelo entumescimento da amêndoa, cor dos cotilédones, odor da massa e queda de temperatura (LAJUS, 1982).

A técnica de fermentação em montes é realizada principalmente em Gana, Nigéria e Costa do Marfim. As sementes são amontoadas no chão sobre folhas de bananeira e recobertas com o mesmo material (ROHAN & CONNEL, 1964).

A fermentação em cestos, técnica bastante utilizada na Nigéria, é realizada com a forração e cobertura dos cestos com folhas de bananeira (FORSYTH & QUESNEL, 1957).

A fermentação em bandejas, desenvolvida por ROHAN & CONNEL (1964), consiste em 12 bandejas de madeira que são empilhadas sendo que a superior é coberta por folhas de bananeira. Cada bandeja é dividida ao meio por uma tabua removível. Após 24 horas de fermentação, a pilha é recoberta com sacos bem ajustados. Não é necessária manipulação ao longo da fermentação.

Na América utiliza-se o método de fermentação em caixas, conhecido como “cochos de fermentação”. São construídas de madeira com paredes divisórias removíveis e drenos nos lastros para saída do mel e ventilação da massa (MARAVALTHAS, 1971; CEPLAC, 1980).

O revolvimento da massa é um processo muito importante, pois permite a aeração das sementes o que controla o nível de acidez e a temperatura, influenciando na atividade enzimática necessária para o desenvolvimento do sabor característico do chocolate (SCHWAN *et al*, 1990). Segundo alguns autores o revolvimento deve ser realizado já após as primeiras 24 horas do início da fermentação (FORSYTH & QUESNEL, 1957; FERRÃO, 2002).

A fermentação do cacau inicia-se naturalmente pela ação da atividade microbiana na polpa que envolve as sementes. Ação microbiana inicia-se logo

após a quebra do fruto pela contaminação natural da polpa mucilagínosa (SCHWAN, 1996).

No interior dos frutos sadios a polpa é considerada estéril e contamina-se imediatamente durante a quebra dos frutos pelas mãos dos operadores e posteriormente pela exposição ao ambiente (LAJUS, 1982).

Segundo Schwan (1996), os principais microrganismos responsáveis pela fermentação do cacau brasileiro proveniente da Bahia são as leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Torulospora* e *Kluyveromyces*, as bactérias lácticas *Lactobacillus ssp*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus lactis* e as bactérias acéticas *Acetobacter pasteurians*, *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter aceti* e *Gluconobacter oxydans*.

Primeiramente, ocorre a proliferação de leveduras, que iniciam a conversão anaeróbica da sacarose, glucose e frutose em etanol e CO₂. Nesta etapa o pH da polpa é de aproximadamente 3,6. A temperatura da massa eleva-se para 30-35°C e as células da polpa começam a se romper nas primeiras 24 a 36 horas, levando a uma exsudação aquosa chamada de mel (LOPEZ & QUESNEL, 1973; MINIFIE, 1989).

As bactérias lácticas podem fermentar uma extensa gama de açúcares, inclusive pentoses. Podem atacar os ácidos málico e cítrico, produzindo ácido láctico, acético e dióxido de carbono levando a uma queda na acidez inicial e elevação do pH (DRUMMOND, 1998).

Após os dois primeiros dias do processo de fermentação, com a aeração da massa, redução dos açúcares, presença de etanol e ácido láctico, temperatura entre 35-40°C e pH acima de 4,0 há a interrupção do crescimento das bactérias lácticas e inicia-se a ação das bactérias acéticas que na presença de oxigênio, convertem o etanol em ácido acético e água. Essa reação é exotérmica elevando a temperatura da massa a 50°C ou mais (DRUMMOND, 1998).

O aumento da temperatura da massa e a ação do etanol e dos ácidos, principalmente do acético, sob os cotilédones leva à morte do embrião entre o segundo e o terceiro dias de fermentação, a partir desse momento os grãos de

cacau passam a denominarem-se amêndoas (MACRE *et al*, 1993; ZAMALLOA, 1994). A Figura 2 apresenta as reações observadas na semente de cacau durante a fermentação, após a morte do gérmen (BECKETT, 1994).

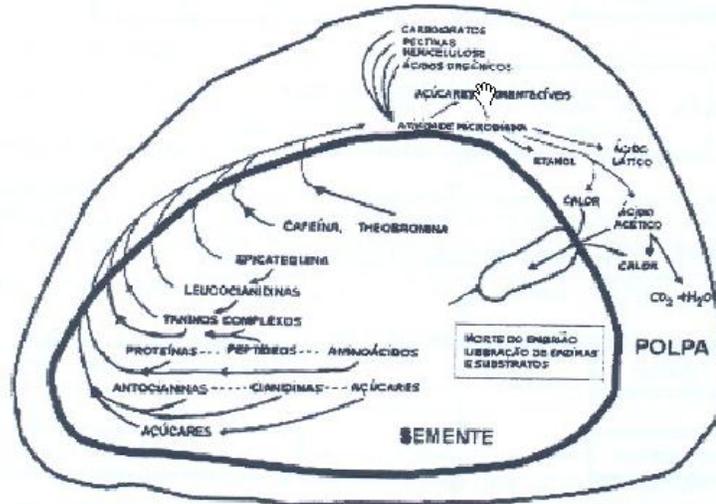


Figura 2. Reações observadas na semente de cacau durante a fermentação, após a morte do gérmen (BECKETT, 1994)

Geralmente a fermentação do cacau tipo *Criollo* leva de 2 a 3 dias e do tipo *Forastero* de 5 a 8 dias (BECKETT, 1994). No entanto, o tempo de fermentação do cacau também está relacionado à disponibilidade de amêndoas no mercado, ou seja, quanto menor a quantidade de amêndoas fermentadas e secas disponíveis para compra, menor tende a ser o tempo que o produtor de cacau fermenta as sementes (EFRAIM, 2009).

A Figura 3 apresenta as fases e reações observadas durante a fermentação.

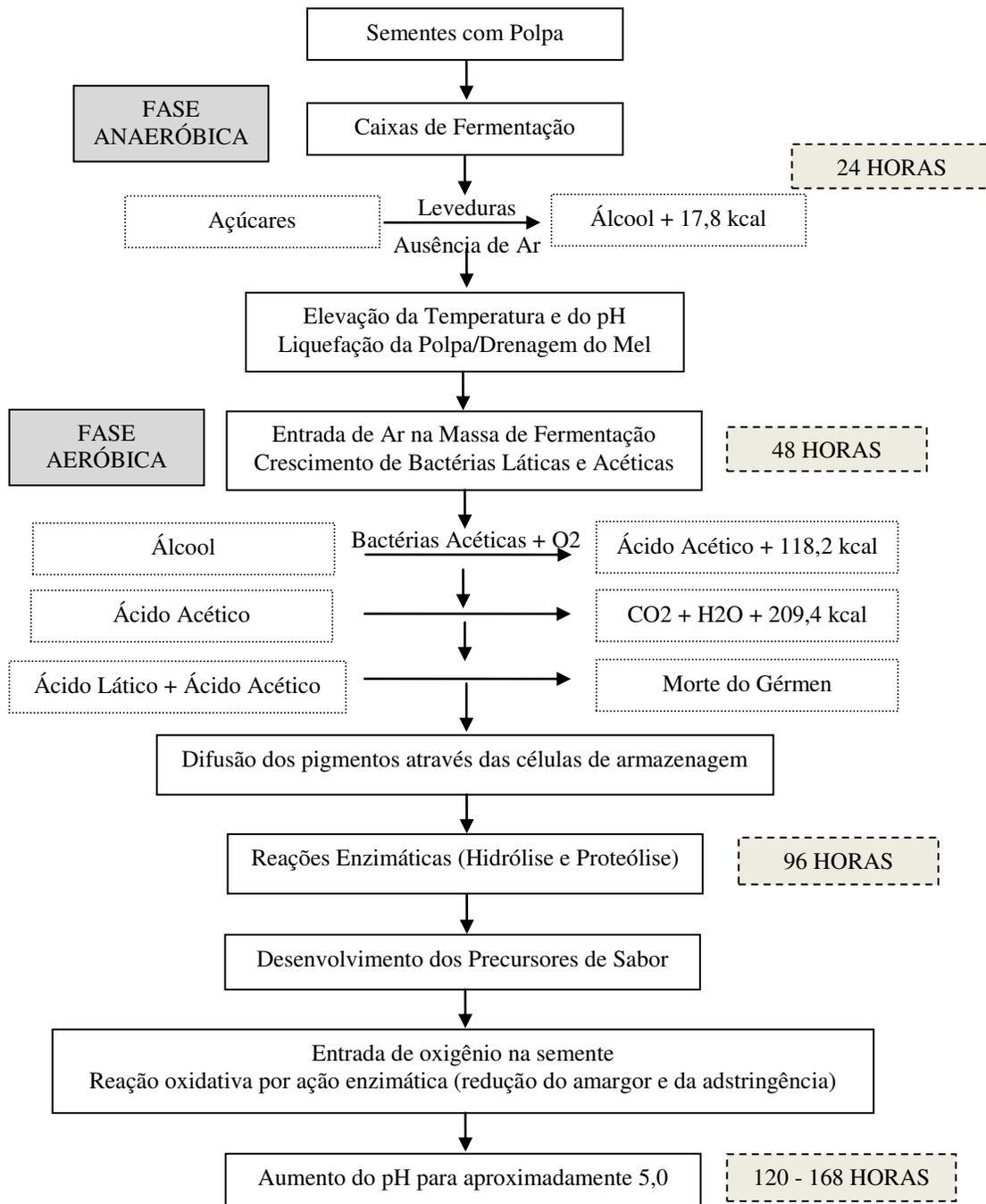


Figura 3. Reações observadas durante a fermentação do cacau (LOPEZ, 1974 *apud* EFRAIM, 2004)

3.5.3. Secagem

Terminada a fermentação, as amêndoas que possuem uma umidade de 40-50% devem ser secas imediatamente até uma umidade final de 6-8%. Esta etapa é fundamental para que ocorra a inibição de reações bioquímicas e o crescimento de microrganismos indesejáveis. Durante o processo de secagem, dependendo das condições do ambiente (períodos com ausência de sol contínuo) a perda de umidade pode ocorrer muito lentamente favorecendo o desenvolvimento microbiano indesejável nesta etapa. A secagem pode ser realizada naturalmente com exposição ao sol, ou artificialmente utilizando-se secadores rotativos ou fornos (HANCOCK & FOWLWER, 1994; ICMSF, 2000).

As sementes são espalhadas e revolvidas frequentemente para proporcionar a remoção uniforme da umidade (GARCIA, 1985).

No Brasil, para secagem natural são utilizadas instalações construídas em alvenaria de pedras ou tijolos, com lastro de madeira de 6 a 12 m de comprimento e cobertura de zinco ou alumínio móvel, com rodas e trilhos de ferro denominadas barcaças. A velocidade de secagem deve ser tal que permita a migração da umidade e de compostos voláteis como o ácido acético formado na fermentação, do interior dos cotilédones para a superfície das amêndoas, de forma que sejam eliminados uniformemente. Quanto mais rápida a secagem, conforme geralmente ocorre em secadores nos quais as temperaturas alcançadas são superiores a 40°C, maior a acidez final das amêndoas, pela dificuldade em se eliminar o ácido acético. Durante a etapa de secagem a volatilização do ácido acético faz com que o pH das amêndoas de cacau se eleve e permaneça entre 5-6. Dessa forma, cuidados são requeridos no sentido de se evitar o desenvolvimento de fungos produtores de toxinas e de microrganismos putrefativos que possam afetar o sabor das amêndoas. Durante a secagem, deve-se evitar ainda o contato das amêndoas com fumaça, produzida pela combustão da madeira utilizada como fonte de aquecimento de secadores rotativos artificiais, pois esta afeta o sabor das amêndoas de cacau, bem como dos produtos obtidos (EFRAIM, 2009).

Devido à redução da atividade de água (aw) das amêndoas no decorrer da secagem, um pequeno grupo de microrganismos é capaz de se desenvolver ao

longo dos dias (SCHWAN & WHEALS, 2004). Segundo Copetti (2009), no início da secagem, as amêndoas ainda apresentam uma aw elevada, assim há condições para o desenvolvimento leveduras, fungos filamentosos e bactérias.

O armazenamento das sementes após secagem também deve ser acompanhado, evitando ambientes com elevada umidade e pouca circulação de ar, pois as amêndoas de cacau são higroscópicas e seu ganho de umidade durante o armazenamento pode levar ao desenvolvimento de fungos e outros microrganismos. A umidade deve ser mantida entre 6 e 7%. Deve-se controlar também focos de infestação por insetos e outras pragas (BECKETT, 1994).

3.6. Obtenção dos Produtos de Cacau

3.6.1. Definição dos produtos processados de cacau

O processamento do cacau gera os produtos intermediários da fabricação do chocolate, definidos abaixo:

“*Nib*” de cacau: é a amêndoa de cacau fragmentada (separação dos cotilédones), após a remoção da casca e gérmen (BECKETT, 2008).

Massa, pasta ou *liquor*: é o produto obtido após moagem dos “*Nibs*” torrados (FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008).

Torta de cacau: trata-se do *liquor* ou massa de cacau prensada, após a separação da manteiga de cacau (MINIFIE, 1989; FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008).

Manteiga de cacau: é a gordura obtida pela prensagem do *liquor*. (BECKETT, 2008).

Pó de cacau: é a torta de cacau finamente triturada. O pH varia entre 5,2 e 5,6 no pó de cacau natural e 6,8 e 7,5 no pó de cacau alcalinizado (MINIFIE, 1989).

3.7. Processamento do cacau

3.7.1. Limpeza e Seleção

Antes do processamento industrial, as amêndoas fermentadas e secas são submetidas à limpeza para a separação de impurezas como fibras, insetos, pedras, metais, etc. que podem interferir nas demais fases do processamento. (MINIFIE, 1989; FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008). São utilizados equipamentos como peneiras e magnetos que combinam ventilação e vibração (MINIFIE, 1989).

Essa fase é importante para evitar danos ao maquinário nas fases posteriores, bem como para garantir a qualidade do sabor no produto final (KLEINERT, 1994).

Após a limpeza, as amêndoas podem ser torradas inteiras ou então quebradas em pequenos fragmentos, denominados *nibs*, que devem ser separados de forma eficiente da testa (casca que envolve as amêndoas) e do gérmen, antes da torração (FAO, 2001).

3.7.2. Torração

A torração é um tratamento térmico que tem como objetivo complementar o desenvolvimento das reações químicas responsáveis pelo desenvolvimento de cor e sabor do chocolate que foram iniciadas na fermentação. Nesta etapa ocorre também a redução da água, ácidos voláteis e outras substâncias presentes nas amêndoas que podem conferir amargor e acidez no produto final, além da redução no número de microrganismos. Auxilia também na separação da casca, pois esta se torna mais quebradiça e pode ser removida por ventilação (MINIFIE, 1989; FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008).

Segundo Beckett (1994), torração pode atingir temperaturas que variam de 110 a 140°C por um tempo de 45 minutos a uma hora. As condições de tempo e temperatura da torração variam de acordo com o equipamento e produto requerido (MINIFIE, 1989).

A torração pode ser realizada nas amêndoas inteiras, nos "*nibs*" de cacau e até mesmo na pasta de cacau (*liquor*) (ICMSF, 2000). No caso da torração das

amêndoas inteiras, elas passam por um processo de pré torração ou secagem, que reduz a umidade para 3-4% e facilita a remoção da casca e a fragmentação em “*nibs*” (CARVALHO, 1997).

A Figura 4 apresenta os métodos alternativos de processamento das amêndoas de cacau descritos por Fadini (1998).

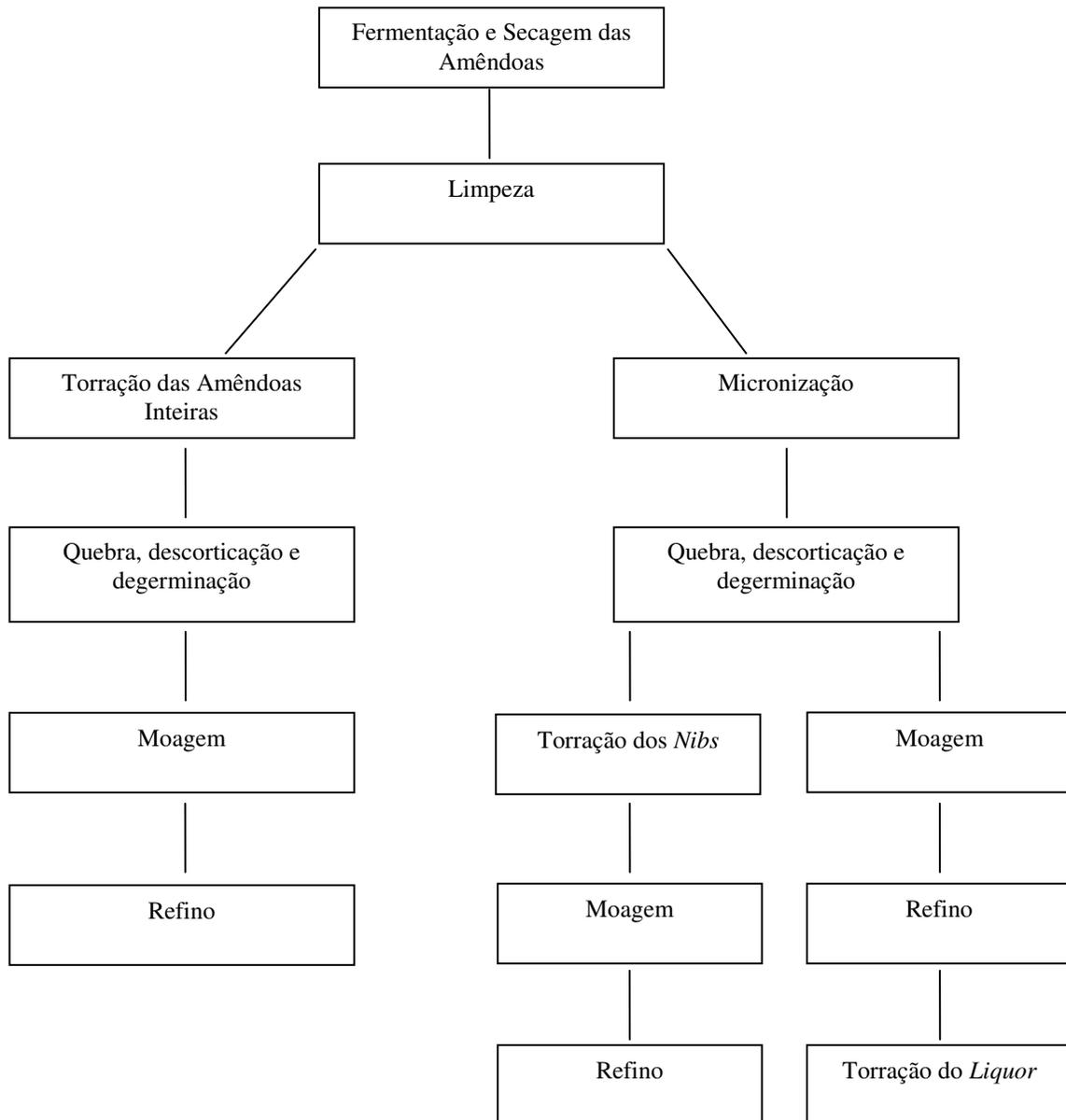


Figura 4. Fluxograma de processamentos alternativos das amêndoas de cacau.

A torração das sementes inteiras apresenta as seguintes desvantagens: grande demanda de energia necessária para penetrar na testa e atingir os cotilédones; a torração nunca é uniforme devido a variação nos tamanhos dos grãos; risco de contaminação do cotilédone pelos contaminantes presentes na superfície da casca (THORZ *et al.*, 1984; BECKETT, 1994). A vantagem de torrar as amêndoas inteiras é que a casca se solta facilmente facilitando a remoção (BECKETT, 1994).

O binômio tempo/temperatura depende de vários fatores como a origem e o período de colheita do cacau, os tratamentos anteriores à torrefação, a umidade, o tamanho das amêndoas e as características do sabor desejado. (SCHWAN & WHEALS, 2004).

O tempo e temperatura da torração também determinam as características químicas finais como pH, teores de umidade e de lipídeos totais, o tipo e teor de compostos aromáticos, açúcares redutores e aminoácidos livres. A reação de Maillard é a principal responsável pela formação de sabor desejadas do cacau (PEZOA-GARCÍA, 1989; ROSLI *et al.*, 1996).

A torração também é importante para a eliminação do ácido acético e outros compostos voláteis indesejáveis formados na fermentação, a umidade das amêndoas ou dos *nibs* no início do processo de torração deve ser de 5 a 7%, pois a água auxilia na liberação destas substâncias. Com isso, a torração deve ser realizada de forma lenta para que não ocorra a desidratação da superfície dos cotilédones, já que quando a desidratação ocorre de forma rápida há a formação de uma película na superfície externa que impede a evaporação de água (MEINERS *et al.*, 1984). Na torração também ocorre a inativação de enzimas capazes de degradar a manteiga de cacau e há o desenvolvimento da cor característica do chocolate (PEZOA-GARCÍA, 1989; ZOMALLOA, 1994).

Segundo Beckett (1994) e Minifie (1989), outro tratamento térmico pode ser realizado após a torração, para destruir os microrganismos que não foram destruídos nos primeiros estágios da torração. Segundo esses autores, uma esterilização final assegura a destruição de bactérias termoresistentes e esporos.

3.7.3. Moagem

Após a torração, os *nibs* devem ser pré-moídos em moinhos de martelos, pinos ou discos e posteriormente é realizada a moagem fina em moinhos de discos, de esferas ou de cilindros até a granulometria de 20 a 40 μm (NIEDIEK, 1994).

Devido ao calor liberado na operação e ao alto teor de gordura, cerca de 55%, os *nibs* são convertidos em uma massa fluida denominada *liquor*. (FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008).

A moagem dos *nibs* além de reduzir o tamanho das partículas para que possa ser transformadas em *liquor*, também objetiva remover o máximo de gordura do interior das células, melhorando a viscosidade e posterior separação das frações de torta e manteiga de cacau (BECKETT, 2008).

3.7.4. Prensagem

Na etapa de prensagem o *liquor* é submetido a altas pressões e temperatura entre 95 e 105°C para separar a manteiga da torta de cacau com 12 a 22% de gordura final. (MINIFIE, 1989; FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008).

A manteiga de cacau é o ingrediente de maior importância na composição do chocolate, estando geralmente presente na proporção de 25-35%. É responsável pelo brilho, textura e maciez do chocolate (BISPO, 1999).

3.7.5. Obtenção de Pó de Cacau

A torta passa por mais um processo de moagem, obtendo-se um pó fino. O cacau em pó pode ser utilizado na fabricação de bebidas achocolatadas, recheios para biscoitos, sorvetes, confeitos para bolos, sobremesas e pudins. Devido ao seu forte sabor, o conteúdo no produto final é baixo, normalmente inferior a 5% (ICMSF, 2000). Para aumentar a solubilidade, pode ser feita uma alcalinização, que eleva o pH, pode melhorar o sabor (menos adstringente, menos amargo e menos ácido) e intensifica a coloração marrom. Para isso, o pó (ou os "*nibs*", o *liquor* ou a torta) são aquecidos com alcali (usualmente hidróxido de sódio ou carbonato de potássio) em temperaturas entre 85 e 115°C (ICMSF, 2000).

3.8. Processamento do chocolate

O chocolate é definido no Codex Standard 87-1981 (CODEX, 1981) como o produto homogêneo obtido por um processo de manufatura adequado, da mistura de um ou mais dos seguintes ingredientes: *nibs* de cacau, massa de cacau, torta de cacau e pó de cacau, com ou sem a adição de ingredientes opcionais permitidos (açúcar, leite em pó e outros) e/ou agentes flavorizantes.

O Codex Alimentarius (2003) define o chocolate como o produto homogêneo, obtido por um adequado processo de manufatura de produtos de cacau, podendo ser combinado com leite e derivados, açúcares ou adoçantes, além de outros aditivos e agentes flavorizantes.

A fabricação é composta de seis etapas básicas: mistura, refino, conchagem, temperagem e resfriamento/modelagem.

3.8.1. Mistura

Na etapa de mistura, os produtos de cacau e os outros ingredientes são misturados até a obtenção de uma massa homogênea, de consistência plástica refinável. Para facilitar a mistura, os ingredientes líquidos devem ser adicionados antes dos ingredientes sólidos. A definição dos tipos e quantidade de ingredientes depende do tipo de chocolate que será fabricado, podendo incluir, além de um ou mais derivados de cacau, açúcar, leite em pó, lecitina e baunilha. O chocolate branco não contém *liquor* de cacau, sendo elaborado apenas com manteiga de cacau, leite e açúcar. O chocolate amargo tem maior teor de *liquor* de cacau (CARVALHO, 1997).

3.8.2. Refino

No refino, a massa passa por cilindros, ajustados para reduzir progressivamente o tamanho das partículas e completar a homogeneização da mistura. Essa etapa tem um papel fundamental na textura, comportamento de fusão e propriedades reológicas do chocolate. Partículas menores do que 25 μ m não são percebidas e garantem uma boa fusão do chocolate na boca. Partículas maiores que 25 μ m são percebidas e dão uma sensação áspera ou arenosa.

Partículas muito menores causam uma sensação pegajosa. Na mistura refinada, 90% das partículas devem alcançar dimensões em torno de 20 μ m (CARVALHO, 1997, COHEN *et al.*, 2004).

3.8.3. Conchagem

Na etapa de conchagem, a massa é submetida à agitação e cisalhamento, sob temperatura controlada (geralmente entre 60 e 70°C), para suavizar o sabor e melhorar as características reológicas. Nessa etapa ocorrem redução da acidez (eliminação de ácidos voláteis indesejáveis), reação de Maillard (aperfeiçoamento da cor e do sabor) e redução da umidade (diminui a viscosidade). Pode durar horas ou dias, dependendo do tipo de chocolate, temperatura, tipo de concha, umidade inicial e umidade final desejada. Chocolates com maior teor de *liquor* de cacau exigem maior tempo de conchagem. Chocolates sem adição de leite pode exigir temperaturas maiores (70-85°C) do que chocolates adicionados de leite (50-65°C) (VISSOTTO, 2000, COHEN *et al.*, 2004).

3.8.4. Temperagem (pré-cristalização), resfriamento e moldagem

A temperagem consiste na cristalização dos ácidos palmítico, esteárico e oleico, presentes na manteiga de cacau. Esse processo é realizado por meio de tratamentos térmicos (40-45 °C) e mecânicos. De 2 a 4% da gordura presente na mistura, cristaliza na temperagem. Esse processo é importante por conferir características como brilho, contração do volume facilitando a desmoldagem, dureza e quebra a temperatura ambiente, rápida e completa fusão na boca, rápido despreendimento de aroma e sabor na degustação (COHEN *et al.*, 2004).

3.9. Tipos de chocolate

A Anvisa define o chocolate como: o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (ou pasta ou *liquor*) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (BRASIL, 2005).

De acordo com o Codex Alimentarius (2003), o chocolate recebe diferentes classificações de acordo com a quantidade de derivados de cacau, leite e açúcar na sua composição, sendo que os mais frequentemente comercializados no Brasil são o chocolate meio-amargo, chocolate ao leite e chocolate branco.

Chocolate meio-amargo: Contém no mínimo 35% de sólidos de cacau (matéria seca), dos quais no mínimo 18% deve ser manteiga de cacau e 14% sólidos de cacau livres de gordura.

Chocolate ao leite: Contém no mínimo 25% de sólidos de cacau (matéria seca), incluindo no mínimo 2,5% de sólidos de cacau livres de gordura, e um teor mínimo de sólidos derivados do leite entre 12 e 14% (incluindo no mínimo 2,5 e 3,0 % de gordura do leite).

Chocolate branco: Contém no mínimo 20% de manteiga de cacau (matéria seca) e 14% de sólidos derivados do leite (incluindo no mínimo 2,5 e 3,5 % de gordura do leite).

3.10. Caracterização do gênero *Salmonella*

O habitat primário da *Salmonella* spp é o trato intestinal de animais como aves, répteis, mamíferos, ocasionalmente insetos. Por ser excretada nas fezes pode ser transmitida por insetos e por outros organismos vivos para diferentes lugares (JAY, 2005).

A classificação mais conhecida é baseada na sorotipagem sendo o esquema utilizado na divisão em sorotipos o de Kauffmann-White, que se baseia nas diferenças encontradas em estruturas superficiais das células que são antigênicas, como o antígeno capsular Vi, os antígenos somáticos "O", presentes na parede celular e os antígenos flagelares (SILVA *et al*, 2010).

A *Salmonella* é uma bactéria gram-negativa, capaz de crescer em diversos meios de cultura, formando colônias visíveis em 24h a 37°C. Geralmente é incapaz de fermentar lactose, sacarose ou salicina, porém a glicose e outros monossacarídeos podem ser fermentados com produção de gás. Embora utilize aminoácidos como fontes de nitrogênio, o sorotipo Typhimurium em alguns casos utiliza nitratos, nitritos e NH₃ como únicas fontes de nitrogênio. A fermentação da

lactose não é comum para esse microrganismo, porém alguns sorotipos podem utilizar este açúcar (JAY, 2005; ICMSF, 1996).

O pH ótimo de crescimento é próximo ao neutro, entre 6,6 e 8,2. De acordo com Jay (2005), valores acima de 9,0 e abaixo de 4,0, são considerados bactericidas, no entanto o ICMSF (1996) descreve que a faixa de pH para o desenvolvimento da *Salmonella* varia de 3,8 a 9,5.

Os parâmetros de pH, atividade de água (*aw*), conteúdo nutricional e temperatura estão todos relacionados ao desenvolvimento da *Salmonella*. Em relação à atividade de água, a inibição do microrganismo foi observada em valores abaixo de 0,94, em meios com pH neutro (JAY, 2005; ICMSF, 1996).

Salmonella tem sido encontrada em alimentos preparados e embalados como mistura para bolo, massas de biscoito e mixes a base de milho, farelo de coco, saladas, maionese, leite entre outros (JAY, 2005; FDA/CFSAN, 2005; WHO, 2005).

A infecção alimentar por *Salmonella*, denominada Salmonelose ocorre pela ingestão de alimentos que contenham cerca de $10^7 - 10^9$ células/g de alimento, no entanto foram relatados casos com 100 células/100g de alimento. Os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão do alimento, embora períodos mais curtos e longos já tenham sido relatados. Os sintomas consistem em náuseas, vômitos dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia, geralmente acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência, os quais persistem por 2 a 3 dias (JAY, 2005).

Como os sintomas da salmonelose são muito parecidos com os sintomas de outras doenças entéricas, a determinação de *Salmonella* em um indivíduo depende da identificação do microrganismo nas fezes. O tratamento é realizado através de hidratação oral, mas em casos mais severos pode necessitar de hidratação intravenosa, antibióticos como Ampicilina, Sulfametoxazol-trimetoprim, Ciprofloxacina (CDC, 2010).

Um pequeno número de pessoas com *Salmonella* pode desenvolver dor nas articulações, irritação dos olhos e dor ao urinar. Isso é chamado de síndrome

de Reiter. Essa síndrome pode durar meses ou anos, e pode levar à artrite crônica (CDC, 2010).

São relatados nos Estados Unidos mais de 40 mil casos e 400 óbitos provocados por salmonelose todo ano. Acredita-se que esse número seja trinta vezes maior, devido aos casos mais leves não diagnosticados ou não notificados (CDC, 2010).

As crianças são mais susceptíveis à doença, principalmente as menores de cinco anos de idade que juntamente com os idosos e imunosuprimidos são mais propensas a desenvolver infecções graves. A taxa de mortalidade em média é de 4,1%, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida; 2% entre o primeiro e os 50 anos e de 15% em pessoas acima de 50 anos (JAY, 2005).

Com relação à patogenicidade, como muitas outras espécies patogênicas entéricas, a *Salmonella* invade as células dos mamíferos no trato intestinal por meio da indução dos arranjos de actina, o que resulta na formação de pseudópodos que englobam a bactéria. A invasão das células epiteliais pela *Salmonella* ocorre após a adesão às microvilosidades via uma fímbria do tipo 1 manose-específica. As espécies de *Salmonella* causam uma mudança na aparência da superfície da célula hospedeira que adquire forma de esguicho. Esse efeito esguicho resulta na internalização da bactéria em uma vesícula endocítica. O efeito da bactéria na célula hospedeira é denominado arrepio. O arrepio e a internalização da bactéria são acompanhados por rearranjos extensivos da actina em torno do microrganismo invasivo. A invasão é aumentada sob condições anaeróbicas, quando as células estão no estágio estacionário e quando a osmolaridade é alta. A vesícula pode coalescer, o que pode ser seguido pela multiplicação bacteriana, levando a uma possível morte celular. O microrganismo pode sobreviver nos fagócitos devido à sua resistência aos estresses oxidativos por meio da produção de catalase e de superóxido dismutase e da resistência às defensinas (peptídeos tóxicos), (FORSYTHE, 2002).

3.11. Relação entre a presença de Salmonelas e bactérias indicadoras

Os microrganismos indicadores são comumente utilizados para avaliar a segurança e higiene de produtos e processos. Um grupo de indicadores deve ser de detecção fácil e rápida, ser facilmente distinguível de outros membros da microbiota do alimento, possuir um histórico de associações constantes com o patógeno cuja presença visa indicar, sua concentração e seu crescimento devem ter uma relação inversamente proporcional à qualidade do produto e seu crescimento não deve ser afetado por outros microrganismos. (FORSYTHE , 2002; JAY, 2005).

Durante a história da utilização de indicadores de segurança dos alimentos, assumiu-se que os patógenos de interesse eram provenientes de fontes intestinais, resultado de uma contaminação fecal de origem direta ou indireta. Desse modo, indicadores sanitários foram historicamente utilizados para detectar contaminação fecal de águas e possível presença de patógenos intestinais (JAY, 2005).

Segundo Jay (2005) apesar da presença de um grande número de coliformes e *E. coli* em alimentos ser altamente indesejável, sua eliminação na maioria dos alimentos *in natura* é praticamente impossível.

Os microrganismos indicadores mais usualmente utilizados são os Coliformes, *E. coli*, as Enterobactérias e os Estreptococos fecais (FORSYTHE, 2002).

As Enterobactérias são utilizadas como indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, uma vez que são facilmente inativadas pelos sanitizantes, além de serem capazes de colonizar vários nichos de plantas processadoras de alimentos (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

A família *Enterobacteriaceae*, é composta por bactérias Gram-negativas na forma de bastonetes retos, não produtoras de esporos, anaeróbias facultativas e oxidase negativa (exceto o gênero *Plesiomonas*). São quimiorganotróficas com metabolismo respiratório fermentativo, a maioria produzindo ácidos e gás na fermentação da glicose e outros carboidratos. São mesófilas, mas cepas psicrotólicas não são incomuns, principalmente nos gêneros *Yersinia*, *Citrobacter*,

Enterobacter, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Hafnia* (BRENNER & FARMER, 2005; SILVA *et al*, 2010).

As enterobactérias estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e no homem (BRENNER & FARMER, 2005; SILVA *et al*, 2010).

Várias espécies são patogênicas para plantas e animais, levando a perdas econômicas na agricultura e indústria de alimentos como a *Erwinia* e *Pectobacterium* que provocam alterações em milho, batatas, maçãs e outros produtos vegetais, a *Yersinia ruckeri* e espécies de *Edwardsiella* que provocam doenças em peixes e a *Klebsiella* e *Citrobacter freundii* que causam mastite em bovinos. Vários gêneros são patogênicas ao homem como a *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Enterobacter sakazakki*, e cepas de *E. coli* enteropatogênicas, incluindo as enterohemorrágicas como a *E. coli* O157:H7. Mas o gênero de maior importância para saúde pública em todo o mundo é a *Salmonella*. (BRENNER & FARMER, 2005; SILVA *et al*, 2010).

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies se enquadram nessa definição, dentre as quais estão tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas (espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*) (BRENNER & FARMER, 2005).

A capacidade de fermentar a lactose produzindo gás e/ou ácido em meios de cultura contendo lactose são características utilizadas nos métodos tradicionais de determinação destes microrganismos (SILVA *et al*, 2010; BRENNER & FARMER, 2005). São caracterizados como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos. Tem sido reportado com crescimento em temperaturas que variam de -2 °C até 50 °C e em pHs entre 4,4 e 9. Devido ao fato de serem destruídos com certa facilidade pelo calor, sua contagem pode ser útil em testes de contaminação pós-processamento. (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

O grupo de coliformes termotolerantes, anteriormente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5 – 45,5 °C, com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal (*E. coli*), porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal (várias cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*). Em função disso, o termo coliformes fecais tem sido, gradativamente, substituído por coliformes termotolerantes (BRENNER & FARMER, 2005; SILVA *et al*, 2010).

A *Escherichia coli* é uma bactéria do grupo dos coliformes termotolerantes, seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. É distinguida dos demais termotolerantes pelas características de crescimento no Agar L-EMB (Levine Eosina Azul de Metileno) e pelo perfil dos testes de indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato (IMViC). *E.coli* foi inicialmente introduzida como indicador em 1892 na Austrália e em 1895 nos Estados Unidos. Foi usada para indicar a contaminação da água por matéria fecal e, conseqüentemente, alertar para a presença potencial de patógenos entéricos, como *Salmonella*. O padrão foi mudado para coliformes totais em 1915, pelo U.S. Public Health Service, baseada na premissa (questionável) de que todos os coliformes apresentavam igual valor como indicadores de contaminação fecal (BRENNER & FARMER, 2005; SILVA *et al*, 2010).

3.12. *Salmonella* em Cacau e Chocolate

O número crescente e a gravidade de doenças transmitidas por alimentos, em todo o mundo, têm aumentado consideravelmente o interesse do público em relação à segurança alimentar (FORSYTHE, 2002). Segundo esses mesmos autores, os riscos de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos devem ser reduzidos ao máximo durante a sua produção.

Do ponto de vista de saúde pública, os microrganismos que mais podem afetar a qualidade microbiológica do chocolate são os fungos toxigênicos e *Salmonella*. Em relação à *Salmonella*, a Comunidade Europeia destaca o chocolate entre os produtos associados com grandes surtos de salmonelose em humanos, atingindo vários países e afetando um grande número de pessoas (WERBER *et al.*, 2005).

Durante muito tempo, os parâmetros de qualidade considerados importantes no chocolate foram suas características físico-químicas e organolépticas. Contudo, após o recolhimento de produtos de chocolate contaminados com *Salmonella* Cubana em meados de 1960 a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (EUA) emitiu as primeiras normas sanitárias para esta indústria, bem como apoiou os estudos sobre o comportamento de *Salmonella* em produtos de chocolate (CORDIER, 1994).

Nas últimas décadas, uma série de surtos de salmonelose tem sido associada ao consumo de alimentos prontos para o consumo com baixa umidade, incluindo chocolate em pó, fórmula infantil, amêndoas cruas, aveia torrada de cereais matinais, temperos desidratados, batata “chips”, coco desidratado, cereais infantis e, mais recentemente, a manteiga de amendoim e lanches infantis feitos de arroz e milho (GMA, 2009).

Segundo a Associação das Companhias de Alimentos, Bebidas e Produtos de Consumo (GMA, 2009) é comum acreditar que a baixa contaminação por *Salmonella* não é um problema em alimentos com baixa umidade, devido ao seu não desenvolvimento nessas condições. Entretanto, já foi evidenciado que mesmo em baixa contagem esse microrganismo pode desencadear um processo infeccioso (WERBER *et al.* 2005, WATERMAN & SMALL, 1998).

Infecções por *Salmonella* associadas ao consumo de produtos de confeitaria, doces, chocolate e cacau em pó, embora raros, são conhecidos desde o final da década de 60 (D'AOUST, 1977).

De 1970 até 2002, seis grandes surtos relacionados a produtos de chocolate, foram relatados e bem documentados. Esses casos encontram-se sumariados na Tabela 2.

Tabela 2. Surtos de salmonelose provocados pelo consumo de chocolate

Ano	País	Sorotipo	Veículo	Fonte da contaminação	Contagem de <i>Salmonella</i> (UFC/g)	Idade média da população atingida
1970	Suécia	Durham	Produtos de chocolate	Pó de cacau	-	110 atingidos, 53% ≤ 15 anos
1973-1974	USA, Canadá	Eastbourne	Bolas de chocolate	Amêndoas de cacau	2,5	200 atingidos, idade média 3 anos
1982	Inglaterra, Wales	Napoli	Barras de chocolate	Desconhecida	2 a 23	272 atingidos, 58% ≤ 15 anos
1985-1986	Canadá	Nima	Moedas de chocolate	Desconhecida	-	-
1987	Noruega, Finlândia	Typhimurium	Produtos de chocolate	Contaminação por aves (especulada)	≤ 1	349 atingidos, idade média 6 anos
2001-2002	Alemanha e outros países da Europa	Oraniemburg	Duas marcas de chocolate	Desconhecida	1,1 a 2,8	439 atingidos, idade média 15 anos

Fonte: Werber *et al.* (2005)

Na maioria dos casos, os surtos foram epidêmicos, disseminados geograficamente e atingiram um grande número de pessoas, principalmente crianças. Nos casos em que foi determinada, a população de *Salmonella* no produto era muito baixa (≤ 1 a 23 UFC/g). Em alguns casos a fonte da contaminação do chocolate por *Salmonella* foi rastreada até os produtos de cacau (amêndoas, pó de cacau) usados como matéria-prima (WERBER *et al.*, 2005).

Em 1985-1986 houve um surto no Canadá envolvendo moedas de chocolate, foi encontrada *Salmonella* a níveis de 0,04 células/g (HOCKIN *et al.*, 1989).

De março a junho de 2006, o Centre for Infections (CFI) HPA (Health Protection Agency) do Reino Unido recebeu um total de 59 isolados (humanos) de *Salmonella* Montevideo na Inglaterra e País de Gales. A idade média da

população atingida, nos casos confirmados, foi de dois anos. A curva epidêmica sugere uma fonte contínua de exposição (HPA, 2006a). A FSA (Food Standards Agency) do Reino Unido divulgou um alerta, anunciando o recolhimento de vários tipos de chocolate suspeitos de contaminação com o sorotipo Montevideo de *Salmonella* (HPA, 2006b). Segundo a empresa, a contaminação com *Salmonella* ocorreu na mistura de cacau, leite e açúcar (“crumb”) usado na confecção dos chocolates.

Também em 2006, a empresa Cadbury Schweppes realizou um recolhimento de mais de um milhão de barras de chocolate nos mercados do Reino Unido e da Irlanda, devido à contaminação por *Salmonella* (FSA, 2006).

Em 2010, a Nestlé de Burlington/US paralisou uma de suas linhas de produção para limpeza, após a detecção de *Salmonella* em chips de chocolate. (FOOD PRODUCTIONDAILY, 2010)

Cordier (1994) destacou algumas características que aumentam o risco do chocolate como fonte de salmoneloses. A primeira é a persistência dessa bactéria no produto contaminado, havendo relatos de sobrevivência por vários anos. A segunda é a dose infectiva extremamente baixa, porque os ingredientes protegem as células no estômago, favorecendo a colonização. Nos surtos investigados, a dose infectiva média encontrada para *Salmonella* Napoli foi de 1,6 células/g, para *Salmonella* Eastbourne foi de 0,2 a 1,0 células/g e para *Salmonella* Nima foi 0,005 a 0,025 células/g. A terceira é uma maior resistência térmica das cepas de *Salmonella* no chocolate, provavelmente em função da baixa atividade de água e alto conteúdo de gordura. Ainda segundo esse autor, as temperaturas atingidas no processamento do chocolate não seriam suficientes para destruir as células eventualmente presentes.

De acordo com Penha & Mata (1999) e Krapf & Gantenbein-Demarchi (2010), as sementes de cacau estão expostas a microrganismos após a colheita, durante a fermentação e no processo de secagem, e podem ser contaminadas com patógenos como a *Salmonella*.

Na etapa de secagem, devido à redução da atividade de água (aw) nas amêndoas, o número de microrganismos capaz de se desenvolver é menor

(SCHWAN & WHEALS, 2004). Segundo Copetti (2009), no início do processo de secagem, onde as amêndoas ainda apresentam uma *aw* elevada, pode ocorrer o desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. De acordo com Ostovar & Keeney (1973), em virtude do baixo pH do cacau fermentado há uma certa restrição quanto aos grupos bacterianos capazes de se desenvolver, sendo que a microbiota bacteriana predominante nas amêndoas secas é constituída predominantemente pelo gênero *Bacillus*.

Quando a secagem é realizada de forma eficiente e as amêndoas são estocadas com umidade de 6 a 8% em ambiente com umidade relativa entre 65 e 70%, estas manterão a umidade inicial, resistindo ao desenvolvimento de fungos e infestação por insetos (THOMPSON, 2001).

Segundo Barrile *et al* (1970) *apud* Coppetti (2009) o processo de torração não necessariamente reduz a contaminação das amêndoas a níveis aceitáveis, uma vez que a redução alcançada após tratamento térmico por 30 – 40 min a 145 – 150°C é de 2 log UFC/g.

De acordo com Minifie (1989), espera-se que nas etapas subsequentes como a alcalinização o produto torne-se livre de contaminação bacteriana.

A literatura dispõe de diversos trabalhos relacionados à resistência térmica de cepas de *Salmonella* e sua sobrevivência em substratos com baixa atividade de água. Um estudo realizado para investigar a inativação térmica de *Salmonella* durante o processo de conchagem foi realizado com diferentes produtos de cacau e chocolate em diferentes temperaturas. Os ensaios realizados com manteiga de cacau indicaram que houve detecção de *Salmonella*, mesmo após tratamento térmico a 60°C/5h e 50°C/24h. Em *liquor* de cacau, o patógeno não foi completamente inativado após conchagem de 23h a 70°C (KRAPF & GANTENBEIN-DEMARCHI, 2010).

Mattick *et al.* (2001) avaliaram a resistência térmica de diferentes sorotipos e *Salmonella* em meios com atividade de água variando de 0,65 a 0,90 em uma faixa de temperatura entre 50 e 80°C. Verificaram que em temperaturas superiores a 70°C, as células de *Salmonella* foram mais tolerantes em baixos valores de atividade de água.

A ICMSF (1980) relata que, sem um controle rigoroso do final da fermentação, a elevação do pH até a faixa de 6,0 a 7,0 pode levar ao predomínio de bactérias como *Enterobacter* e *Escherichia*, com desenvolvimento de odor desagradável. Se essas enterobactérias podem sobreviver e se multiplicar, *Salmonella* também poderia. Não há relatos de isolamento de *Salmonella* no material fermentado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Para este trabalho foram analisadas 364 amostras de diferentes produtos de cacau, obtidas de produtores e processadores de cacau da Bahia e comerciantes de chocolate de São Paulo, em duas épocas distintas.

Foram analisadas 30 amostras de polpa de cacau congelada de 6 marcas comerciais, coletadas no mercado varejista de Ilhéus/BA e Campinas/SP.

As amostras do pré-processamento do cacau foram coletadas em 3 diferentes propriedades rurais do Estado da Bahia, sendo 30 amostras de sementes de cacau antes do início do processo fermentativo; 30 amostras de sementes de cacau durante a etapa de fermentação (9 amostras com 3-4 dias de fermentação, 11 com 5-7 dias e 10 no final do processo). Durante o processo de secagem das amêndoas nos terreiros foram coletadas 30 amostras e 29 amostras de amêndoas de cacau foram coletadas no estoque. Totalizando 119 amostras.

Os produtos processados de cacau (nibs, liquor, manteiga e pó de cacau) foram coletados e enviados por duas empresas processadoras de Ilhéus/BA, sendo 15 amostras de cada tipo de produto de cada empresa. Totalizando 149 amostras.

Com relação aos chocolates comerciais, foram adquiridas no varejo de Campinas/SP, 65 amostras de chocolate de 19 marcas diferentes, sendo 22 de chocolate ao leite, 22 de chocolate branco, 17 de chocolate amargo e meio amargo e 4 amostras de cacau em pó.

4.2. Armazenamento das amostras

As Sementes e Amêndoas de Cacau que logo após a coleta foram congeladas e assim mantidas até o dia anterior a análise, quando foram transferidas para um refrigerador para o descongelamento. As amostras de Polpa de Cacau Congeladas seguiram o mesmo padrão de descongelamento.

Os produtos processados de cacau (*nibis*, *liquor*, manteiga e pó de cacau) e chocolates foram recebidos e armazenados à temperatura ambiente.

4.3. Preparo das amostras

Para as análises de enterobactérias, coliformes totais e *E.coli*, foram homogeneizadas 25g de amostra em 225 ml de água peptonada 0,1%, sendo realizadas, em seguida, diluições decimais seriadas.

Para análise de *Salmonella* foram homogeneizadas 25g de amostra em 225 ml do meio de pré-enriquecimento. Para polpa, semente, amêndoa e manteiga de cacau foi utilizado água peptonada tamponada (BPW, Acumedia, EUA); já para “nibs”, liquor, torta, pó de cacau e chocolate foi utilizado leite desnatado reconstituído a 10%, suplementado com verde brilhante.

Para a análise das sementes e amêndoas, a pesagem foi realizada sem que a fragmentação das mesmas, pois seu conteúdo contém compostos tóxicos para *Salmonella*.

4.4. Análises microbiológicas

4.4.1. Enterobactérias

As amostras foram analisadas segundo o método da American Public Health Association (APHA), (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

De cada diluição decimal selecionada foi inoculado 1 ml em Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG, Acumedia, EUA), utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade. As placas foram incubadas a 35°C/18-24 horas. Os resultados foram expressos em UFC/g.

4.4.2. Coliformes totais e *Escheria coli*

Para as contagens de coliformes totais e *E. coli* foi utilizado o método oficial de Número Mais Provável (NMP) da American Public Health Association (APHA), (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

De cada diluição selecionada foi inoculado 1 ml em uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST, Acumedia, EUA) contendo 10 ml do meio.

Os tubos de LST foram incubados a 35°C/24 horas. Após esse período, foi observado o crescimento através da produção de gás. Em caso positivo, os tubos seguiram para a etapa subsequente, em caso negativo (sem produção de gás) os tubos foram re-incubados até completar 48 horas. Para a confirmação de coliformes totais foi utilizado caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB, Oxoid, RU), incubado a 35°C/24 horas. Os tubos de VB com produção de gás foram confirmativos para a presença de coliformes totais utilizando a tabela de número mais provável (NMP).

Para a contagem de *E.coli* foi utilizado caldo *E. coli* (EC, Oxoid, RU). Os tubos foram incubados em banho-maria a 45,5°C/24 horas e após esse período foi verificado o crescimento através da produção de gás. Para confirmação de *E. coli*, os tubos positivos (com produção de gás) foram estriados por esgotamento em placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-BEM, Oxoid, RU). As placas foram incubadas a 35,0°C/24 horas.

Para a confirmação das colônias típicas foram realizadas coloração de gram e as provas bioquímicas de indol, Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e Citrato (IMViC).

Para o teste de Citrato, foi inoculado uma alçada da cultura na rampa do ágar e foi incubado a 35°C/96 horas. O crescimento foi verificado com viragem alcalina alterando a cor do meio de verde para azul. As cepas de *E. coli* são citrato negativo.

O teste de indol foi realizado inoculando uma alçada da cultura no Caldo Triptona 1 % incubando a 35°C/24 horas. Após esse período foi adicionado cinco gotas do reagente de Kovacs (Laborclin, BR) para cada 4 ml de cultura. Os tubos foram agitados levemente e foi observado o desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura em caso positivo. Em caso negativo o anel permaneceu da cor do reagente, amarelo. As cepas de *E. coli* são indol positivo.

Para o teste de Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VM-VP), foi inoculado uma alçada de cultura no caldo VM-VP, o qual foi incubado a 35°C/48 horas. Para o teste de VP foi transferido assepticamente, 1 ml da cultura para um

tubo de ensaio, onde foi adicionado 0,6 ml da solução de α -Naftol 5 %. Após agitação foi adicionado 0,2 ml de KOH 40 % e novamente foi agitado. Para acelerar a reação foi adicionado uma pitada de cristais de creatina. Os tubos foram deixados em repouso por até uma hora e foi verificada a presença de uma coloração rósea ou vermelha, indicando teste positivo, ou a permanência do meio na mesma cor dos reagentes (amarelado), indicando o teste negativo. A cultura restante do caldo VMVP foi re-incubada por mais 48 horas para a realização do teste de VM, onde foi adicionado 5 gotas da solução de vermelho de metila para cada 2,5 ml da cultura. Foi observada imediatamente a alteração do meio para uma coloração vermelha indicando teste positivo, ou uma coloração amarelada, indicando teste negativo. As cepas de *E. coli* são VM positivas e VP negativas.

Os tubos de EC que foram confirmados quanto a presença de *E. coli* foram anotados e a determinação do número mais provável foi realizada utilizando a tabela de NMP.

4.4.3. *Salmonella*

A análise de *Salmonella* foi realizada pela metodologia adaptada da Food and Drug Administration (ANDREWS & HAMMACK, 2006).

As amostras foram inoculadas em caldo de pré-enriquecimento e incubadas a 35°C/18-24h. Após o pré-enriquecimento, foi transferido 1 ml da cultura para 10 ml do Caldo Tetrionato (TT, Difco, EUA) e 0,1 ml para o Caldo Caldo Rappaport-Vassilidis Modificado (RV, Difco, EUA). Os meios de enriquecimento seletivo foram incubados a 35°C/24 horas e a 42°C/24 horas, respectivamente.

Para o plaqueamento seletivo diferencial, foi estriada uma alçada do caldo TT em placas de Ágar Entérico de Hectoen (HE, Difco, EUA), Ágar Bismuto Sulfito (BS, Difco, EUA) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Difco, EUA). O mesmo procedimento foi repetido com o caldo RV. As placas de HE e XLD foram incubadas invertidas a 35°C/24 horas e as placas de BS por 48 horas.

Após o período de incubação das placas, foi observada a presença de colônias típicas em cada meio:

Ágar HE: Colônias transparentes, verde azuladas, com ou sem centro preto. Colônias de cepas fermentadoras de lactose ou sacarose são de cor salmão e não transparentes.

Ágar XLD: Colônias de cor rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente ao redor. Cepas lactose positivas produzem colônias amarelas com ou sem centro preto.

Ágar BS: Colônias castanhas, cinzas ou pretas, com ou sem brilho metálico. Algumas cepas podem apresentar colônias verdes com pouco ou nenhum escurecimento do meio ao redor.

De cada placa foram selecionadas duas colônias para a confirmação preliminar, inoculando cada colônia, através de picada no fundo e estria na rampa, em um tubo de Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI, Difco, EUA) e em um tubo de Ágar Lisina Ferro (LIA, Oxoid, RU), ambos inclinados. Os tubos foram incubados a 35°C/24 horas.

Após incubação foi observada a ocorrência de reações típicas de *Salmonella* em TSI (rampa alcalina, vermelha e fundo ácido, amarelo, com ou sem produção de H₂S) e LIA (fundo e rampa alcalino, roxo, sem alteração do meio, com ou sem produção H₂S).

As culturas em TSI foram transferidas para Ágar Nutriente (NA, Acumedia, EUA), incubadas a 35°C/24 horas e em seguida procedeu-se à confirmação bioquímica pelas provas de Indol, VP, Ureia e β-Galactosidase e a prova sorológica fazendo a detecção dos antígenos somáticos (Poli O) e flagelar (Poli H).

O teste de Indol e VP foi realizado seguindo o mesmo procedimento descrito para confirmação de *E. coli*, sendo que as cepas de *Salmonella* são Indol e VP negativa.

O teste de Uréia foi realizado inoculando uma alçada da cultura na rampa do Ágar Uréia (Difco, EUA), que foi incubado a 35°C/24 horas. O crescimento foi verificado com viragem alcalina alterando a cor do meio de pêssego para rosa escuro. As cepas de *Salmonella* são urease negativas.

Para o teste de β -Galactosidase foi suspensa uma alçada de cada cultura em um tubo com 5 mL de orto-nitrofenil- β -galactosidase (ONPG, Sigma, EUA). Incubou-se a 37°C/24 horas. O desenvolvimento de uma cor amarela no líquido é indicativo de teste positivo. A maioria das cepas de *Salmonella* são negativas.

A sorologia somática foi realizada a partir das culturas em TSI emulsionando uma alçada da cultura em uma gota do anti-soro somático polivalente anti-*Salmonella* (Probac, BR) sobre uma lâmina de vidro. Após a emulsificação a lâmina foi sobreposta sobre um fundo escuro bem iluminado e observada a aglutinação (sorologia positiva).

Para a sorologia flagelar, foi transferida uma alçada da cultura em TSI para tubos de Ágar Nutriente semi-sólido (0,4% de ágar) não inclinado. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e a partir desta cultura foi realizado o teste de aglutinação em lâmina, conforme descrito no teste sorológico somático, substituindo o anti-soro somático pelo anti-soro flagelar anti-*Salmonella* (Probac, BR).

4.5. Determinação de atividade de água

Para a leitura da atividade de água, foi utilizado o higrômetro Aqua Lab[®] da Braseq que utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado. As amostras foram maceradas, transferidas para frascos do kit Aqua lab[®] e colocadas em estufa até atingirem a temperatura de 25°C, depois foram inseridas no equipamento onde se obteve a leitura direta (Braseq Aqua Lab[®], BR).

4.6. Leitura do potencial de hidrogênio (pH)

Para a leitura do pH das amostra foram pesadas 10g, maceradas, e colocadas em um Becker de 150 ml, adicionando-se 100 ml de água deionizada, as quais foram agitadas por aproximadamente 20 min ou até que a amostra estivesse completamente homogeneizada. Então, foi imerso o eletrodo (Digimed DM 20, BR) no Becker que continha a amostra para a realização da leitura do resultado (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

5. RESULTADOS

5.1. Polpa de Cacau

Os resultados médios das análises microbiológicas e as características físico-químicas das amostras de polpa de cacau congelada, das marcas A, B, C, D, E e F, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

A média de atividade de água variou de 0,975 a 0,985 e o pH de 3,50 a 3,74. Penha e Matta (1999) obtiveram resultados de atividade de água e pH que variaram de 0,900 a 0,940 e 3,16 a 3,64, respectivamente.

Uma amostra (20%) da marca A apresentou contagem de enterobactérias de 1,0 Log UFC/g. Em 3 (60%) das 5 amostras da marca F analisadas foi verificado a presença deste grupo microbiano, entre 1,0 e 2,0 Log UFC/g. Já as Marcas B, C, D e E apresentaram resultados inferiores ao limite de detecção do método (1,0 Log UFC/g). Não foram isolados coliformes totais, *E. coli* e *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 3. Resultados das análises físico-químicas das amostras de polpa de cacau congelada, de seis diferentes marcas comercializadas em Ilhéus/BA e Campinas/SP.

Marca Comercial	Resultados*	
	Atividade de Água	pH
A	0,977 ± 0,003	3,73 ± 0,054
B	0,976 ± 0,005	3,68 ± 0,070
C	0,982 ± 0,007	3,60 ± 0,067
D	0,975 ± 0,002	3,66 ± 0,018
E	0,984 ± 0,006	3,74 ± 0,094
F	0,985 ± 0,004	3,50 ± 0,019

* Média de cinco repetições ± desvio padrão.

Tabela 4. Resultados das análises microbiológicas das amostras de polpa de cacau, congelada de seis diferentes marcas comercializadas em Ilhéus/BA e Campinas/SP.

Produtos	Resultados*						
	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias		Coliformes Totais		<i>E. coli</i>	
		% Positivas	Log UFC/g	% Positivas	Log NMP/g	% Positivas	Log NMP/g
A	Ausente	20	1,00 ± 0,00	0	-	0	-
B	Ausente	0	-	0	-	0	-
C	Ausente	0	-	0	-	0	-
D	Ausente	60	1,63 ± 0,64	0	-	0	-
E	Ausente	0	-	0	-	0	-
F	Ausente	0	-	0	-	0	-

*Contagens médias ± desvio padrão das amostras positivas

5.2. Pré-processamento do cacau

5.2.1. Sementes de Cacau Antes da Fermentação

Os resultados das análises físico-químicas das sementes de cacau com polpa, analisadas antes do início da fermentação estão apresentados na Tabela 5.

Os resultados médios de atividade de água variaram de 0,976 a 0,980 e o pH de 4,75 a 4,87.

Tabela 5. Características físico-químicas de sementes de cacau com polpa coletadas antes do processo de fermentação.

Produtor	Resultados*	
	Atividade de Água	pH
X	0,980 ± 0,01	4,87 ± 0,18
Y	0,979 ± 0,01	4,82 ± 0,29
Z	0,976 ± 0,00	4,75 ± 0,50

* Média de dez amostras ± desvio padrão.

A Tabela 6 apresenta os resultados microbiológicos das sementes de cacau analisadas antes do início da fermentação.

Em 100% das amostras não foram detectados *E. coli* e *Salmonella*. As propriedades X e Y apresentaram contaminação de 40% e 80% para enterobactérias, com contagens médias de 3,95 e 3,75 Log UFC/g.

Na propriedade X a média de contaminação das amostras positivas foi de 5,3 Log UFC/g e na propriedade Y foi de 5,0 Log UFC/g.

Em relação a coliformes totais, 40% e 70% das amostras dos produtores X e Y apresentaram contaminação por esse grupo, com resultados variando de 0,56 a 2,2 Log NMP/g. A media de contaminação das amostras positivas na propriedade X foi de 1,8 Log NMP/g e na propriedade Y de 1,2 Log NMP/g.

Não foi detectada contaminação por enterobactérias (limite de detecção 1,0 Log UFC/g) ou coliformes totais (limite de detecção 0,48 NMP/g) na propriedade Z.

Tabela 6. Resultados microbiológicos de sementes de cacau com polpa coletadas antes do processo de fermentação.

Produtor	Resultados						
	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias		Coliformes Totais		<i>E. coli</i>	
		% Positivas	Log UFC/g	% Positivas	Log NMP/g	% Positivas	Log NMP/g
X	Ausente	40	3,95 ± 1,51	40	1,54 ± 0,64	0	-
Y	Ausente	80	3,75 ± 1,50	70	1,06 ± 0,39	0	-
Z	Ausente	0	-	0	-	0	-

*Contagens médias ± desvio padrão das amostras positivas.

5.2.2. Sementes de Cacau Durante o Processo de Fermentação

Nesta etapa, foram coletadas 30 amostras de sementes de cacau, sendo 20 amostras durante a fermentação e 10 ao final do processo.

As Figuras 5 e 6 apresentam os resultados de atividade de água e pH em relação ao tempo. Aos 3 dias de fermentação a média de Atividade de Água (aw) foi de 0,995 e após o término do processo a média de aw foi de 0,974 (Figura 3).

Essa redução na aw é devido a liquefação e desprendimento do cotilédone das sementes.

Em relação ao pH, a Figura 4 apresenta os resultados de acordo com o tempo de fermentação, sendo que a média inicial aos 3 dias foi de 5,1 e ao final a média foi de 4,9. O menor pH registrado foi 4,3 aos 5 dias de fermentação, etapa onde ocorria a ação das bactérias lácticas na degradação do etanol em ácido láctico, acético e dióxido de carbono.

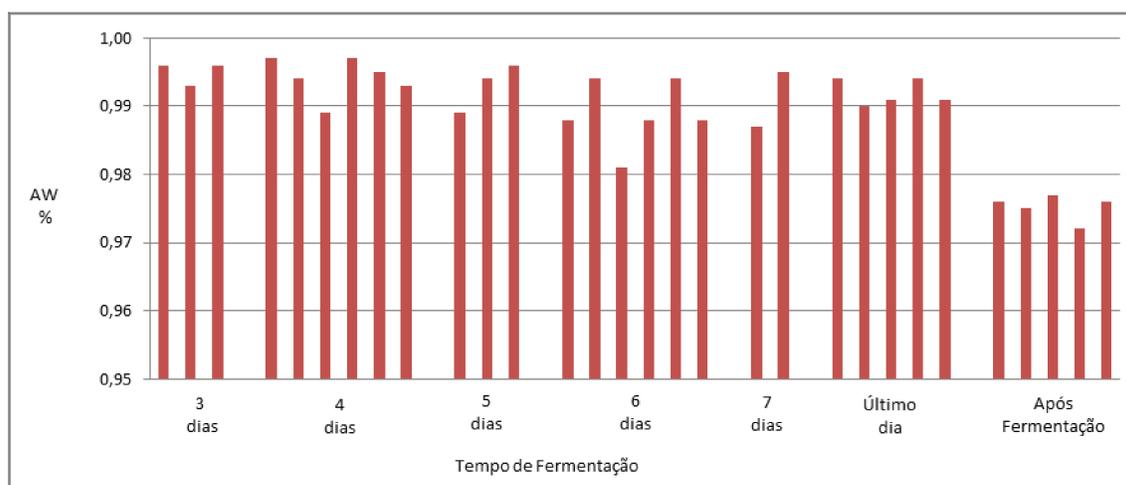


Figura 5. Atividade de Água das sementes de cacau ao longo da fermentação

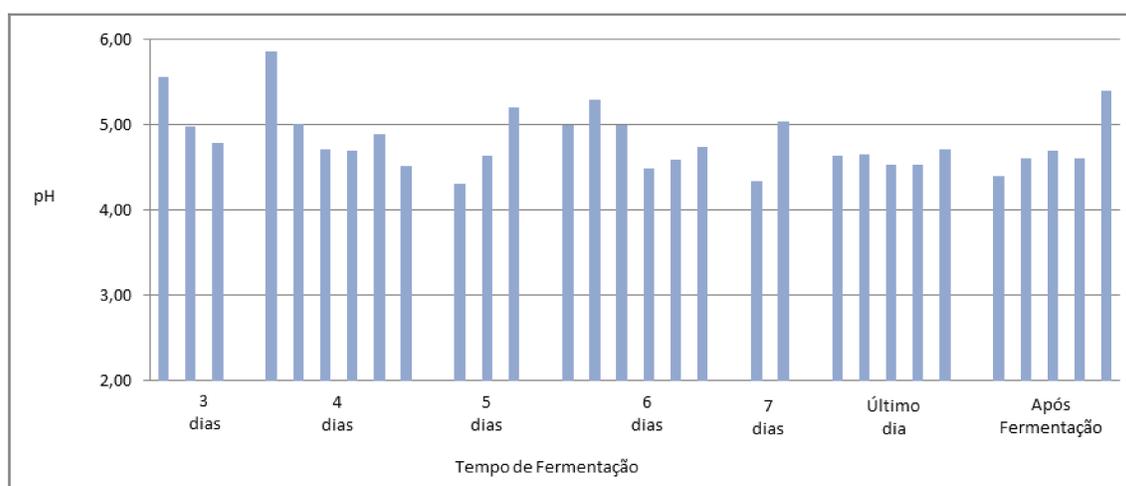


Figura 6. Valores de pH das sementes de cacau ao longo da fermentação

Conforme descrito na Tabela 7, o percentual de contaminação por enterobactérias nos produtores X, Y e Z foi de 10%, 30% e 10%, sendo que as contagens variaram de 1,5 a 6,4 Log UFC/g (Anexo 3).

Nos produtores X e Z apenas uma amostra apresentou contaminação por enterobactérias com contagem de 4,52 e 3,04 Log UFC/g, respectivamente. O produtor Y apresentou a menor (1,5 Log UFC/g) e maior (6,4 Log UFC/g) contagem desses microrganismos (Anexo 3), com média de 3,46 Log UFC/g.

A contaminação por coliformes totais, apesar da baixa contagem, apresentou alta ocorrência, 70% no produtor X, 60% no produtor Y e 20% no produtor Z, em 17 % das amostras foi observada contaminação >3,0 Log NMP/g (Anexo 4). Estes resultados foram obtidos em sementes com 3, 4, 6 e 7 dias de fermentação. Além disso, foi evidenciada contaminação por *E. coli* em 30% das amostras da propriedade X, 30% na propriedade Y e 10% na propriedade Z (Tabela 7), variando de 9,2 a >3,0 Log NMP/g (Anexo 3).

Após o processo fermentativo, uma amostra (10%) do produtor Z apresentou contaminação por *E. coli*, 1,0 Log NMP/g. O produtor Y apresentou apenas contaminação por Coliformes totais em 67% das amostras após o processo fermentativo (Anexo 4).

A presença de *Salmonella* não foi detectada nesta fase do processo.

Tabela 7. Análises microbiológicas de sementes de cacau coletadas de três diferentes produtores em Ilhéus/BA, durante o processo de fermentação

Produtor	Resultados*						
	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobacterias		Coliformes Totais		<i>E. coli</i>	
		% Positivas	Log UFC/g	% Positivas	Log NMP/g	% Positivas	Log NMP/g
X	Ausente	10	4,52 ± 0,00	70	≥1,65 ± 1,00	30	1,61 ± 0,61
Y	Ausente	30	3,46 ± 2,58	60	≥1,80 ± 1,36	30	≥1,96 ± 0,94
Z	Ausente	10	3,04 ± 0,00	20	0,76 ± 0,29	10	0,96 ± 0,00

*Contagens médias ± desvio padrão das amostras positivas

5.2.3. Amêndoas durante o processo de secagem

A Tabela 8 apresenta os resultados de atividade de água e pH de amêndoas de cacau coletadas durante a secagem natural ao sol, em três propriedades rurais do sul da Bahia. Foram coletadas amostras do início ao fim do processo de secagem.

Os resultados de atividade de água variaram de 0,536 a 0,990 e o pH de 4,65 a 6,12.

Tabela 8. Características físico-químicas e microbiológicas de amêndoas de cacau coletadas nas barcaças de secagem

Produtor	Resultados*	
	Atividade de Água	pH
X	0,817 ± 0,08	5,25 ± 0,42
Y	0,722 ± 0,15	5,16 ± 0,39
Z	0,809 ± 0,12	5,13 ± 0,31

*Média de 10 amostras ± desvio padrão

A Tabela 9 apresenta os resultados das análises microbiológicas de amêndoas de cacau coletadas durante a secagem natural, ao sol, em três propriedades rurais do sul da Bahia. Em relação às enterobactérias, as contagens médias variaram de 3,68 a 4,26 Log UFC/g. No produtor X, o percentual de contaminação foi de 60%, no produtor Y 100% e no produtor Z 80%.

Em 63% das amostras avaliadas, os resultados de coliformes totais foram maiores que 3,0 Log NMP/g e 21% destas amostras apresentaram valores maiores 3,0 Log NMP/g para *E. coli* (Anexo 4). Não foi detectada *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 9. Resultados microbiológicos de amêndoas de cacau coletadas nas barcaças de secagem.

Produtor	Resultados*						
	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobacterias		Coliformes Totais		<i>E. coli</i>	
		% Positivas	Log UFC/g	% Positivas	Log NMP/g	% Positivas	Log NMP/g
X	Ausente	60	3,68 ± 0,46	90	≥2,57 ± 0,64	30	1,07 ± 0,18
Y	Ausente	100	4,18 ± 1,66	100	≥2,95 ± 0,27	50	≥2,42± 0,85
Z	Ausente	80	4,26 ± 1,58	70	≥2,68 ± 0,97	40	≥2,05± 1,24

*Contagens médias ± desvio padrão das amostras positivas.

5.2.4. Amêndoas estocadas

A Tabela 10 apresenta os resultados físico-químicos das amostras de amêndoas de cacau estocadas coletadas em três propriedades rurais do sul da Bahia.

Os resultados médios de atividade de água variaram de 0,650 a 0,730 e o pH de 4,79 a 5,11.

Tabela 10. Características físico-químicas e microbiológicas de amêndoas de cacau coletadas na estocagem

Produtor	Resultados*	
	Atividade de Água	pH
X	0,680 ± 0,06	4,97 ± 0,37
Y	0,730 ± 0,02	4,79 ± 0,31
Z	0,650 ± 0,09	5,11 ± 0,66

*Média ± desvio padrão

Das 29 amostras coletadas, 55% obtiveram contagem de enterobactérias acima de 1,0 Log UFC/g, sendo que em 17% os índices foram maiores que 5,0

Log UFC/g (Anexo 5). O percentual de contaminação por Enterobactérias foi de 30%, 89% e 50% nos produtores X, Y e Z, respectivamente (Tabela 11).

A contaminação por coliformes totais variou de <math><0,5</math> (8 amostras) a >3,0 Log NMP/g (12 amostras), sendo que o percentual de contaminação nos produtores X, Y e Z foi de 60%, 89% e 70%, respectivamente.

A contaminação por *E. coli* foi verificada em 14 amostras, em 5 destas a contagem foi igual ou superior a 3,0 Log NMP/g. O produtor X apresentou uma contaminação percentual de 10%, o produtor Y, de 89% e o produtor Z, de 50% (Tabela 11).

Foi detectada a presença de *Salmonella* em uma amostra (3%) coletada no produtor "Y". As amostras coletadas nesse produtor também apresentaram o maior percentual de contaminação por enterobactérias (89%) e *E. coli* (89%). A cepa de *Salmonella* isolada foi identificada através de provas sorológicas como pertencente ao sorogrupo E (1,3,19).

Tabela 11. Características físico-químicas e microbiológicas de amostras de amêndoas coletadas na estocagem de fazendas produtoras

Produtor	Resultados*					
	Enterobacterias		Coliformes Totais		<i>E. coli</i>	
	%	Log	%	Log	%	Log
	Positivas	UFC/g	Positivas	NMP/g	Positivas	NMP/g
X	30	3,13 ± 1,89	60	≥2,16 ± 0,99	10	≥3,04 ± 0,00
Y	89	4,19 ± 1,07	89	≥2,56 ± 0,70	89	≥2,18 ± 0,83
Z	50	4,29 ± 0,98	70	≥2,44 ± 0,86	50	≥1,57 ± 0,88

*Contagens médias ± desvio padrão das amostras positivas

As Figuras 7 e 8 apresentam os resultados médios de atividade de água e pH nas diferentes etapas do pré-processamento do cacau nos três produtores.

Observamos nos três produtores a progressiva redução de atividade de água nas diferentes etapas do pré-processamento.

Logo após a colheita a polpa do cacau apresenta cerca de 90% de água. Durante o processo de fermentação, devido a liquefação e desprendimento do

cotilédone das sementes é comum a redução na atividade de água, o que não foi possível observar na Figura 7, devido ao trabalho com a média dos resultados dos diferentes estágios da fermentação.

Durante a secagem observamos a redução na atividade de água nas amêndoas, em relação às etapas anteriores nos três produtores. O mesmo ocorreu com as amêndoas estocadas, no entanto, devido à alta umidade relativa do ar da região sul da Bahia, esperava-se um aumento na atividade de água em relação à etapa de secagem (Figura 7). Esse resultado é explicado devido ao trabalho com a média dos resultados em diferentes estágios de secagem das amêndoas.

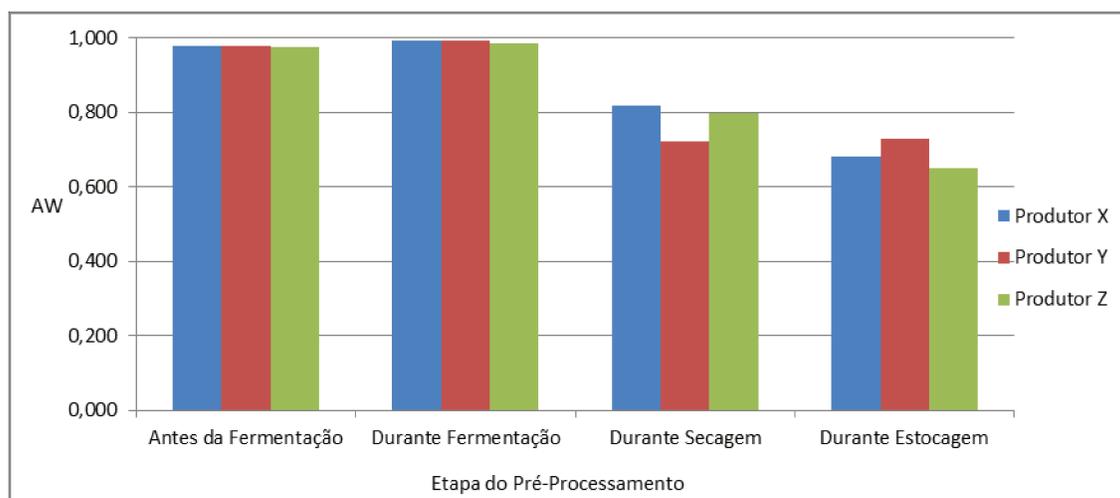


Figura 7. Atividade de água durante o pré-processamento do cacau

Em relação ao pH também foi verificado um comportamento semelhante nas amostras dos três diferentes produtores.

Apesar de alguns autores citarem o pH das sementes de cacau antes da fermentação como 3,6 e 4,0, a média dos resultados obtidos nesta fase foi de 4,81. Durante o processo de fermentação espera-se a redução de pH devido a produção de ácido acético e lático, porém no final desta etapa ocorre o aumento do pH para aproximadamente 5,0 devido ao aumento da temperatura da massa e

volatilização do ácido acético. Este fenômeno estende-se durante a etapa de secagem das amêndoas.

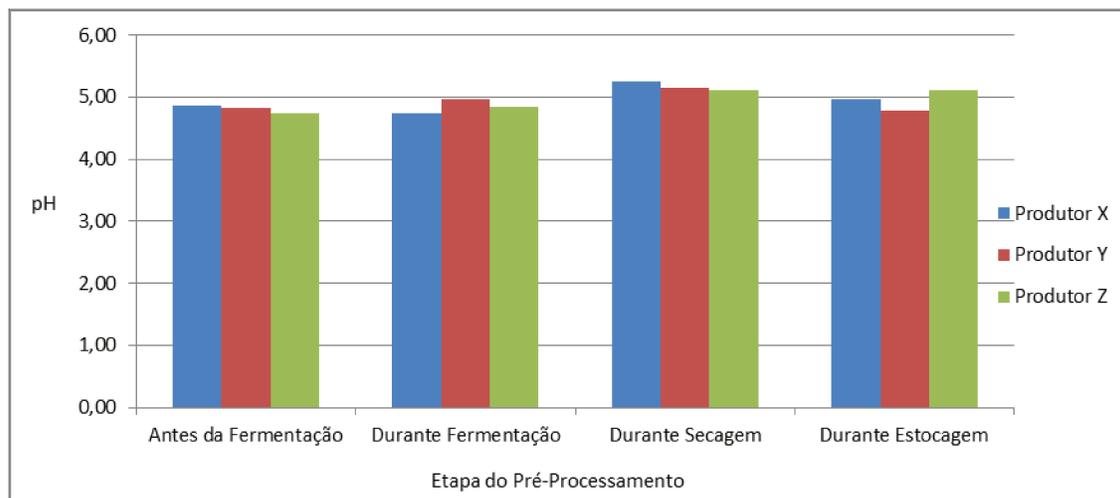


Figura 8. pH das amostras durante as etapas de pré-processamento do cacau

5.3. Derivados processados de cacau

A Tabela 12 apresenta os resultados das determinações físico-químicas dos produtos processados de cacau coletados nas indústrias beneficiadoras.

As amostras de *nibs* de cacau apresentaram resultados de atividade de água compreendidos entre 0,422 e 0,567 e pH de 4,98 a 5,67 (Anexo 6), com resultados médios de 0,496 e 5,38 (Tabela 12).

O *liquor* de cacau apresentou resultados de atividade de água entre 0,222 e 0,796, com média de 0,460 e o pH variou entre 5,54 e 7,12 (Anexo 7) com resultados médios de 0,460 e 5,84 (Tabela 12)

Para as amostras de torta de cacau os resultados de atividade de água variaram de 0,147 a 0,484 e do pH de 5,51 a 7,87 (Anexo 8), com resultados médios, respectivamente, de 0,320 e 6,99 (Tabela 12).

Na manteiga de cacau, os resultados de atividade de água ficaram compreendidos de 0,409 e 0,563 e o pH entre 5,40 e 8,48 (Anexo 9) com média de 0,499 e 7,12 (Tabela 12).

Os valores médios de atividade de água foram de 0,390 e 0,359 no cacau em pó alcalinizado e natural, respectivamente. Em relação ao pH, o pó alcalinizado apresentou pH médio de 7,31 e o pó natural 5,68 (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados das análises físico-químicas dos processados de cacau coletados nas empresas beneficiadoras

Produto de Cacau	Resultados*	
	Atividade de Água	pH
<i>Nibs</i>	0,496 ± 0,05	5,38 ± 0,16
<i>Liquor</i>	0,460 ± 0,11	5,84 ± 0,29
Torta	0,320 ± 0,08	6,99 ± 0,78
Manteiga	0,499 ± 0,04	7,12 ± 0,79
Pó Natural	0,359 ± 0,03	5,68 ± 0,10
Pó Alcalinizado	0,390 ± 0,07	7,31 ± 0,46

*Média ± desvio padrão

A Tabela 13 apresenta os resultados médios microbiológicos das amostras positivas para enterobactérias, coliformes totais e *E. coli*.

Tabela 13. Resultados das análises microbiológicas dos produtos processados de cacau coletados nas empresas beneficiadoras

Produto de Cacau	Indústria	Resultados*					
		Enterobactérias		Coliformes Totais		<i>E. coli</i>	
		% Positivas	Log UFC/g	% Positivas	Log UFC/g	% Positivas	Log UFC/g
<i>Nibs</i>	A	0	-	13,3	0,71 ± 0,22	0	-
	B	33,3	1,28 ± 0,46	26,7	1,06 ± 0,39	6,7	0,56 ± 0,00
<i>Liquor</i>	A	0	-	0	-	0	-
	B	0	-	13,3	0,76 ± 0,29	0	-
Torta	A	0	-	0	-	0	-
	B	13,3	1,15 ± 0,21	0	-	0	-
Manteiga	A	6,7	1,00 ± 0,00	6,7	0,56 ± 0,00	0	-
	B	0	-	0	-	0	-
Pó	A	0	-	0	-	0	-
	B	0	-	13,3	0,71 ± 0,22	0	-

*Contagens médias ± desvio padrão das amostras positivas

5.3.1. *Nibs* de cacau

Em nenhuma das 30 amostras de *nibs* foi detectada a presença de *Salmonella* e *E. coli*. Enterobactérias foram isoladas apenas na indústria B, onde 33% das amostras apresentaram contagens entre 1,0 e 2,0 Log UFC/g (Tabela 13). Em seis (20%) das 30 amostras foi detectada a presença de coliformes totais, com contagem média de 0,71 Log NMP/g para a indústria A e 1,06 Log NMP/g para a indústria B.

Uma amostra da indústria B apresentou *E. coli* (0,56 Log NMP/g).

5.3.2. *Liquor* (massa) de cacau

Em nenhuma das 30 amostras foi detectada a presença de *Salmonella* e *E. coli*. Em duas (7%) amostras foi detectada a presença de coliformes totais, sendo ambas da indústria B, com contagens de 0,56 a 0,96 Log NMP/g e média de 0,76 Log NMP/g. A presença de enterobactérias não foi detectada, possivelmente porque o limite de detecção do método (1,0 Log UFC/g) é menor do que o usado na contagem de coliformes totais (0,5 Log NMP/g).

5.3.3. Torta de cacau

Apenas duas amostras da Indústria “B” apresentaram contagens de enterobactérias de 1 e 1,30 Log UFC/g. Em nenhuma das 30 amostras foi detectada a presença de *Salmonella*, coliformes totais e *E. coli*.

5.3.4. Manteiga de cacau

Em nenhuma das 30 amostras foi detectada a presença de *Salmonella* e *E. coli*. Foi verificada a presença de enterobactérias em uma amostra da indústria “A”, com contagem de 1,0 Log UFC/g. Em outra amostra da mesma indústria foi constatada a presença de coliformes totais, com contagem de 0,56 Log NMP/g.

5.3.5. Pó de cacau

As contagens de enterobactérias foram menores que 1,0 Log UFC/g em todas as amostras analisadas. Os coliformes totais foram detectados em duas amostras da indústria B, com contagem média de 0,71 Log NMP/g. Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* e contaminação por *E. coli* menor que 0,5 Log NMP/g.

5.4. Chocolate

A Tabela 14 apresenta os resultados médios referentes à determinação do pH e da atividade de água em 61 amostras de chocolate em barra (22 de chocolate ao leite, 22 de chocolate branco e 17 de chocolate meio amargo) e 4 amostras de chocolate em pó coletadas no varejo de Campinas/SP.

Tabela 14. Resultados das análises físico-químicas em chocolates comercializados em Campinas/SP

Tipo de Chocolate	Resultados*	
	Atividade de água	pH
Ao Leite	0,440 ± 0,07	6,47 ± 0,18
Meio Amargo	0,419 ± 0,07	6,14 ± 0,39
Branco	0,443 ± 0,06	6,69 ± 0,18
Em Pó	0,493 ± 0,04	7,07 ± 0,17

* Média ± desvio padrão

O chocolate ao leite apresentou média de atividade de água de 0,440 e pH de 6,47. Para o chocolate meio amargo a média de atividade de água foi de 0,419 e do pH foi de 6,14. Esse foi o produto para o qual foi obtida a menor atividade de água (0,311) e que apresentou a maior variação de pH. Já o chocolate branco apresentou atividade de água de 0,443 e pH de 6,69, sendo o produto com a maior atividade de água (0,588) dentre os analisados. Para o chocolate em pó foram obtidos valores de atividade de água de 0,493 e pH de 7,07, com valor médio de atividade de água muito semelhante aos dos chocolates em barra e valor médio de pH ligeiramente maior.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas. Com relação aos demais grupos de microrganismos, 22,7% (5/22) das amostras de chocolate ao leite apresentaram enterobactérias, com contagens entre 1,0 e 3,7 Log UFC/g, e 13,6% (3/22) apresentaram coliformes totais, entre 0,5 e 1,0 Log NMP/g. Em relação às amostras de chocolate branco, 22,7% (5/22) apresentaram enterobactérias, com contagem entre 1,0 e 1,5 Log UFC/g e uma amostra (4,5%) apresentou coliformes totais (0,6 Log NMP/g). Dentre as 17 amostras de chocolate meio amargo, duas (11,7%) apresentaram contaminação por enterobactérias (1,3 e 1,5 Log UFC/g). Já nas amostras de chocolate em pó

não foi detectada a presença de contaminação por nenhum dos microrganismos pesquisados, conforme Tabela 15.

Tabela 15. Resultados das análises microbiológicas em chocolates comercializados em Campinas/SP

Tipo de Chocolate	Contaminação Microbiológica			
	Enterobactérias		Coliformes totais	
	% Positivas	Log UFC/g	% Positivas	Log UFC/g
Ao leite	22,7	1,69 ± 1,1	13,6	1,14 ± 0,8
Meio-Amargo	11,7	1,39 ± 0,1	0	-
Branco	22,7	1,17 ± 0,2	4,5	0,56 ± 0,00
Em pó	0	-	0	-

*Contagens médias ± desvio padrão das amostras positivas

6. DISCUSSÃO

6.1. Polpa de cacau

A variação de pH observada nas amostras (3,48-3,82) atende ao padrão de identidade e qualidade para polpa de cacau que estabelece pH mínimo de 3,40 (BRASIL, 2000).

A Instrução Normativa nº 01 de 07 de Janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura estabelece como padrão de qualidade microbiológica para polpas de frutas: contagem de bolores e leveduras de 3,70 Log UFC/g (5×10^3 UFC/g), de coliformes fecais de 0,0 Log UFC/g (1 UFC/g) e ausência de *Salmonella* em 25 gramas. Já, a RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001 da ANVISA estabelece contagem de coliformes termotolerantes máxima de 2 Log UFC/g (10^2 UFC/g) e ausência de *Salmonella* em 25 gramas, não mencionando limite para bolores e leveduras.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* e coliformes em nenhuma das 30 amostras analisadas. Portanto, todas as amostras atendem aos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira.

Este resultado condiz com os obtidos por PENHA & MATA (1999), que realizaram uma avaliação microbiológica de polpa de cacau utilizada para o preparo de sucos e sorvetes e não detectaram presença de *Salmonella* e coliformes termotolerantes. SANTOS *et al.* (2004) analisando 24 amostras de polpa de fruta de diferentes sabores, comercializadas em São Luís-MA, também não detectaram a presença destes microrganismos.

ABREU *et al.* (2003), analisaram 265 amostras de polpa de frutas de 21 sabores, sendo de oito diferentes marcas comerciais. Nenhuma amostra apresentou *Salmonella* e 15% apresentaram níveis de contaminação por coliformes termotolerantes acima dos padrões estabelecidos pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001).

NASCIMENTO *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes, ausência de *Salmonella* e 42,5% de contaminação por coliformes termotolerantes, com

contagem entre 0,60 e 3,38 Log NMP/g em 40 amostras de polpas de frutas de sabores distintos comercializadas em feiras livres da cidade de São Luís-MA.

As enterobactérias podem ser utilizadas como indicadores de qualidade ou higiene na indústria de alimentos, visto que são termolábeis e facilmente inativadas por sanitizantes (BRENNER & FARMER, 2005). Quatro (13,33%) das 30 amostras analisadas apresentaram enterobactérias. Apesar da baixa contaminação observada (1,0 e 1,63 Log UFC/g), falhas de boas práticas de manipulação ou quebra da cadeia de frio, podem favorecer a multiplicação desta população microbiana, resultando em risco a saúde do consumidor, uma vez que o produto será consumido sem prévio tratamento térmico.

6.2. Pré-processamento do cacau

De acordo com Jay (2005), a contaminação por *Salmonella* e *E. coli* via manipuladores e ambiente é possível, pois, embora seu habitat primário seja o trato intestinal de animais, homens e insetos, esta pode ser disseminada no ambiente por ação de vetores e por solo e água contaminados por fezes.

Neste estudo foi detectada *Salmonella* em apenas uma (0,84%) das 119 amostras analisadas, devido a esta baixa ocorrência, não foi possível usar esse dado para avaliar o risco de cada etapa para a introdução do patógeno no processo. Então, optou-se por avaliar a evolução da contaminação das amostras por *E. coli* como indicativo de contaminação fecal ao longo do processo.

No interior dos frutos sadios, as sementes de cacau são estéreis e contaminam-se durante a quebra dos frutos pelas mãos dos operadores, facões utilizados na quebra e cestos utilizados para coleta e transporte das sementes (LAJUS, 1982; NASCIMENTO *et al*, 2009). Contudo, os resultados mostraram que as sementes que chegam do campo, antes de entrar na fermentação, não apresentaram contaminação por *E. coli*. Esse dado parece indicar que a matéria-prima é uma fonte menos provável de entrada de enteropatógenos, dentre eles *Salmonella*, no pré-processamento do cacau.

Durante a fermentação, o ambiente ácido e quente não favorece a multiplicação de *Salmonella*, que tem temperatura de crescimento variando entre 5

e 46°C (temperatura ótima entre 35 e 43°C) e pH entre 3,8 e 9,5 (pH ótimo entre 7,0 e 7,5) (ICMSF, 1996). Entretanto, sua sobrevivência e, mesmo, eventual multiplicação não podem ser descartadas. A ICMSF (1980) relata que, sem um controle rigoroso do final da fermentação, a elevação do pH até a faixa de 6,0 a 7,0 pode levar ao predomínio de bactérias como *Enterobacter* e *Escherichia*. Apesar de não ter sido isolada *Salmonella*, nem observada correlação entre a presença ou contagem de *E. coli* e o tempo de fermentação, todas as fazendas produtoras apresentaram contaminação por *E. coli* entre 20 e 30% das amostras.

Durante a secagem não foi detectada presença de *Salmonella*, já a porcentagem de amostras contaminadas por *E. coli* aumentou em todas as fazendas (30 a 60% de amostras contaminadas) com relação a etapa anterior. Não foi observada correlação entre a presença ou contagem de *E. coli* e o tempo de secagem. Essa etapa, provavelmente, é a mais crítica para a introdução de enteropatógenos. As amêndoas ficam expostas ao ambiente por vários dias, podendo sofrer contaminação através da poeira (os arredores não são pavimentados), dos animais (especialmente aves domésticas e silvestres) e dos insetos. Além disso, eventualmente, para auxiliar no desprendimento da mucilagem restante nas amêndoas, os funcionários das fazendas umedecem o cacau e realizam o pisoteamento (ICMSF, 2000). Prática essa que promove o aumento da umidade e atividade de água do produto, favorecendo a introdução e possível desenvolvimento de contaminantes microbiológicos.

Para a estocagem ou comercialização, as amêndoas são acondicionadas em sacas de aninhagem ou *nylon*, que dificultam o acesso de pássaros ao material. Contudo, muitas vezes ficam em contato direto com o solo e nem sempre fechadas, permitindo a entrada de outros vetores como insetos e roedores. Na fazenda “Y”, a porcentagem de amostras contaminadas por *E. coli* aumentou em relação a etapa anterior e foi detectada uma amostra contaminada por *Salmonella* (sorogrupo E). Nesta propriedade, o volume de produção é menor e o tempo de estocagem nos galpões é maior. A fazenda “X”, onde se observou a menor

porcentagem de amostras contaminadas por *E. coli*, tem um volume de produção grande, de saída rápida, resultando em um menor tempo de estocagem.

De acordo com Werber (2005) *Salmonella* sorotipos Enteritidis e Typhimurium representaram 65% e 23% (respectivamente) dos casos notificados de salmoneloses não-tifóide em 2001, assim, os outros sorotipos incluindo a *S. Oranienburg* representavam 12%. Em 2001 o Instituto Robert Koch (RKI) recebeu a notificação de 439 relatos de *S. Oranienburg* em 16 Estados da Alemanha. Sessenta questionários exploratórios foram recebidos de oito estados e 43 (88%) dos 49 pacientes investigados afirmaram o consumo de chocolate. Esse autor também relata outros sorotipos de *Salmonella* envolvidos em surtos onde o principal veículo foi o chocolate ou seus sub-produtos como Eastbourne, Napoli e Nina.

Portanto baseado nos resultados obtidos e nas condições observadas nas fazendas produtoras, pode-se concluir que as aves (galinhas, pombos, pardais e outros pássaros) e os insetos, freqüentemente em contato com o material em secagem provavelmente são vetores contínuos de contaminação fecal das amêndoas, introduzindo *E. coli* e podendo introduzir *Salmonella*. Outros pontos críticos que podem contribuir para a contaminação do cacau por estes enteropatógenos são: a prática de pisoteio das amêndoas, o tempo de permanência do produto no estoque e as características do ambiente de armazenamento das amêndoas.

6.3. Derivados processados de cacau

Segundo Jay (2005), o pH ótimo de crescimento da *Salmonella* é próximo da neutralidade (6,6 a 8,2), sendo considerados bactericidas valores acima de 9 e abaixo de 4. Em relação à atividade de água, a inibição do crescimento de enterobactérias em geral ocorre em valores abaixo de 0,94. Todos os produtos analisados apresentaram pH dentro da faixa de desenvolvimento de *Salmonella*, porém com atividade de água abaixo de 0,60, condição inóspita ao crescimento do patógeno. Entretanto, o fato dos produtos derivados do cacau apresentarem

valores de atividade de água desfavoráveis ao crescimento da *Salmonella* não impede a contaminação e permanência de células viáveis deste ou de outros enteropatógenos.

O processamento das amêndoas de cacau em derivados segue, basicamente, as etapas de seleção e limpeza, torrefação, moagem, prensagem e pulverização. A torrefação é a única etapa que pode reduzir significativamente a contagem microbiana, embora a alcalinização também represente barreira. Diferentes autores relatam a resistência térmica de alguns sorotipos de *Salmonella*, principalmente em substratos de baixa a_w , no entanto esta resistência sempre está relacionada a temperaturas menores que 100°C.

De acordo com o ICMSF (2000), o controle de *Salmonella* deve ser baseado em um “layout” adequado da linha de processamento, separando as áreas de manipulação antes da torrefação, das áreas de processamento depois da torrefação. A possibilidade de contaminação cruzada, entretanto, não é desprezível, podendo ser provocada pelo ar, poeira, equipamentos e trânsito de pessoal. O ambiente e os produtos de cacau utilizados no processamento do chocolate devem ser analisados regularmente, para a detecção de *Salmonella*.

Neste estudo, apesar dos *nibs* analisados terem sido submetidos a um processo de torração com temperaturas acima de 110°C, houve o isolamento de bactérias do grupo de enterobactérias, coliformes totais e *E. coli* em 17, 20 e 3,3% das amostras. Para os demais produtos foi verificada contaminação de até 7% das amostras analisadas. A persistência desses contaminantes nas amostras, apesar de baixa ($\leq 2,0$ Log UFC ou NMP/g) pode indicar sobrevivência ao tratamento térmico ou recontaminação pós-processo.

Barrile et al. (1971) em seus estudos utilizando amêndoas oriundas de seis países produtores, obtiveram redução de apenas 2 ciclos logarítmicos da microbiota inicial após torrefação a 150° C por 40 minutos. De acordo com Minifie (1989), a microbiota final do pó de cacau, é quase exclusivamente introduzida nos processos subsequentes de moagem da torta, pelos microrganismos presentes no ambiente de produção.

Em qualquer desses casos, fica claro que, se houver a presença de *Salmonella* nas amêndoas, dependendo do grau de contaminação e das condições empregadas no processo, os produtos do seu processamento podem permanecer contaminados, atingindo posteriormente o processamento do chocolate.

6.4. Chocolate

Nenhuma das 65 amostras de chocolate analisadas apresentou contaminação por *Salmonella* e *E. coli*, estando, portanto, de acordo com a legislação vigente que estabelece ausência de *Salmonella* em 25 g e contagem máxima para coliformes termotolerantes de 10 NMP/g (BRASIL, 2001).

As investigações de alguns surtos de salmonelose envolvendo chocolate mostram que as causas não são apenas a utilização de produtos derivados de cacau contaminados, pois também foi identificada como uma causa a contaminação cruzada, decorrente da separação inadequada de zonas limpas e sujas dentro das fábricas (WERBER *et al.*, 2005).

Confirmando essa teoria há um estudo publicado por Vitela *et al.* (1994), realizado no México no qual foram analisadas 44 amostras de chocolates embalados e 56 amostras de chocolate não embalado quanto a presença de *Salmonella*. O estudo revelou a presença de *Salmonella* em duas amostras, sendo ambas amostras de chocolate embalado, o que demonstra que a maior possibilidade de contaminação ocorre durante o processamento industrial do chocolate.

Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2005) as etapas de mistura, refino, conchagem e temperagem, do chocolate apresentam baixa influência sobre a microbiota final do produto. Mesmo em uma conchagem com temperaturas entre 60-80°C, os microrganismos não seriam eliminados por estarem protegidos pela baixa aw e o alto teor de gordura do chocolate.

A presença de membros da família *Enterobacteriaceae* em 18,5 % das amostras mesmo que com baixas contagens indica que as condições de processamento e/ou armazenamento destes produtos podem possibilitar uma eventual contaminação por patógenos como a *Salmonella* e *E. coli*. Fato este preocupante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que existem relatos na literatura sobre a ocorrência de surtos de *Salmonella*, veiculados por chocolate, com baixas doses infectantes, até mesmo 1,0 UFC/g (D'AOUST *et al*, 1977)

Portanto, a presença de condições que possibilitem a contaminação do produto por estes microrganismos deve ser evitada através do monitoramento constante da qualidade das matérias-primas empregadas no processo, bem como da manutenção de boas práticas de fabricação.

7. CONCLUSÕES

Em relação às etapas de pré-processamento do cacau, podemos concluir que:

- Os resultados obtidos nas análises da polpa de cacau demonstram que 100% das amostras apresentaram resultados microbiológicos satisfatórios e de acordo com a legislação vigente;
- O isolamento de enterobactérias em níveis de 5 log UFC/g nas sementes de cacau coletadas após a quebra dos frutos, indica que dependendo do manuseio realizado ainda no campo, pode introduzir patógenos como a *Salmonella* nesta etapa do processo;
- Durante a etapa de fermentação, onde não era esperado o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e indicadores, devido a competição com a microbiota atuante, verificou-se elevados índices de contaminação por coliformes totais e *E. coli*;
- A etapa de secagem das amêndoas apresentou os maiores índices de contaminação;
- As amostras de amêndoas de cacau estocadas apresentaram elevados índices de contaminação com o isolamento de enterobactérias, coliformes totais e *E. coli*. Nessa etapa também houve o isolamento de *Salmonella*, indicando o potencial das indústrias de moagem estar recebendo matéria-prima contaminada com esse microrganismo.

As análises dos produtos de cacau processado demonstraram que:

- Mesmo após o processo de torração em temperaturas superiores a 110°C, houve o isolamento de bactérias do grupo Coliformes e até mesmo *E. coli* nos *Nibs* de cacau, indicando que ou o processo térmico não é efetivo para destruição total dos microrganismos ou após esta etapa, em algum ponto da linha de processamento, ocorre uma re-contaminação;
- O *liquor*, a torta, a manteiga e o pó de cacau apresentaram baixas contaminações, indicando que estas etapas do processo não oferecem risco eminente da presença de microrganismos patogênicos;

- Os chocolates apresentaram níveis de contaminação dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB. Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados. A História: Cacau e Chocolate. Disponível em: <http://www.abicab.org.br/index_home.htm>. Acesso em: 08/11/2010.

ABREU, M. C.; NUNES, I. F. S.; OLIVEIRA, M. M. A. Perfil microbiológico de polpas de frutas comercializadas em Teresina, PI. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 112, p. 78-81, 2003.

AGRIANUAL 2004: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2004.

ANDREWS, W.H. & HAMMACK, T.S., 2006. Salmonella. In Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 5, updated june 2006.

ARDHANA, M.M. & FLEET, G.H. The microbial ecology of cocoa bean fermentation in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, 86:87-89, 2003.

BARRILE, J. C., AND J. F. CONE. Effect of added moisture on the heat resistance of Salmonella anatum in milk chocolate. **Appl. Microbiol.** 19:177-178, 1970.

BARRILE , J.C., OSTOVAR, K., KEENEY, P. G. Microflora of cocoa beans before and after roasting at 150° C. **Milk Food Technol**, v. 34, n. 7, p.369-371, 1971.

BECKETT, S.T. 1994. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 2nd ed. London: Black Academic & Professional. 407 p.

BECKETT, S.T. 2008. **The science of chocolate**. 2nd ed. Royal Society of Chemistry Paperbaks: Londres. 234p.

BISPO, E.S. **Processo de Alcalinização dos “Nibs” de cacau (*Theobroma cacao* L.) e avaliação da qualidade do pó**. 1999. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

BRANDEAU, J. **El cacau**. Barcelona, Editorial Blume, 1970. 297p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial**, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

BRASIL. Instrução Normativa Nº1 de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial**, Brasília, Seção I, p. 54-58, 10 de janeiro de 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para chocolate e produtos de cacau. **Diário Oficial**, DF, 23 set. 2005. Seção 1.

BRENNER, D.J.& FARMER III, J.J. FAMILY I. Enterobacteriaceae. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R. & Staley, J.T. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science + Business Media Inc., 2005. p.587-607.

CACAUTH, 2010a. **Cacau no Brasil e no Mundo**. Relatório Nº 38. TH Consultoria em 19/01/2010. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/>>. Data de acesso: 10/06/2010.

CACAUTH, 2010b. **Cacau no Brasil e no Mundo**. Relatório Nº 3/10. TH Consultoria em 20/04/2010. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/>>. Data de acesso: 18/05/2011.

CARVALHO, P.V. **Treinamento Tecnológico de Chocolates**. Nestlé, Caçapava, 1997.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira: **Normas técnicas para o cultivo do cacau no Recôncavo Baiano**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, 1980, 43p.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira: **Radar Técnico**. Disponível em: <www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>. Data de Acesso: 20/12/10.

CDC. Center for Disease Control and Prevention, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella>>. Acesso em: 09/10/2010.

CODEX ALIMENTARIUS, 1981. Codex standards for cocoa products and chocolate. Standard 87-1981.

CODEX ALIMENTARIUS. 2003. Codex Standard for Chocolate and Chocolate Products. CODEX STAN, 87-1991. Rev. 1-2003.

COHEN, K.O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M.N.H. Revisão: Temperagem ou pré cristalização do chocolate. **Braz. J. Food Technol.** 7(1):23-30. 2004.

COPETTI, M.V. **Microbiota do cacau: Fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CORDIER, J. L. HACCP in the chocolate industry. **Food Control** 5:171-175. 1994.

CRUZ, C.L.C.V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de micro-ondas**. 2002. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

D'AOUST, J.Y. *Salmonella* and the chocolate industry. A review. **J. Food Protection** 40(10):718-717, 1977.

DRUMMOND, M.C.M. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Theobroma cacao* L.), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**. 1998. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1998.

EC (European Commission), 2003. **Salmonella in Foodstuffs**. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66en.pdf>>. Acesso em: 22/11/06.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FADINI, A. L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração frente ao processo por microondas**. 1998. 122 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

FSA. Food Standards Agency. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2006/aug/cadbury>>. Acesso em: 04/01/11.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Codex Alimentarius Standards and Codes. Codex Standard for Cocoa (cacao) Mass

(cocoa/chocolate liquor) and Cake – CODEX STAN 141-1983, Rev. 1-2001. 2001. Disponível em: < <http://www.codexalimentarius.net>>. Acesso em: 20/11/10

FDA/CFSAN. Foodborn Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook “Bad Bug Book”. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, December 2, 2005.

FOOD PRODUCTIONDAILY, 2010. Headlines: Quality and Safety. Disponível em: <<http://www.foodproductiondaily.com/Quality-Safety/Salmonella-found-in-chocolate-product-at-Nestle-plant-report>>. Acesso em: 13/01/11.

FERRÃO, J.E.M. 2002. **Cacau: Tecnologia pós-colheita**. Ligalu edições: Lisboa. 303p.

FORSYTH, W.G.C. & QUESNEL, V.C. Cacau glycosidade and colour changes during fermentation. **J. Sci. Food Agri.** 8: 505-509, 1957.

FORSYTHE, STEPHEN J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2002. 424 p.

GARCIA, A. E. B. O Brasil e as exportações mundiais de derivados de cacau. **Informações Econômicas** 33(7):47-61. 2003.

GARCIA, J.J.S. Beneficiamento, armazenamento e padronização do cacau. **Sistema de produção do cacau na Amazônia Brasileira**. Belém, CEPLAC/DEPEA, cap.9, 86-104, 1985.

GMA, ASSOCIATION OF FOOD, BEVERAGE AND CONSUMER PRODUCTS COMPANIES. **Control of Salmonella in low-moisture foods**. – 2009.

GRAY, A. **The World Cocoa Market Outlook**, LMC International, 2001, 29p.

HOCKIN, J.C.; D'AOUST, J.Y.; BOWERING, D.; JESSOP, J.H.; KHANNA, B.; LIOR, H.; MILLING, M.E. An international outbreak of *Salmonella* nima from imported chocolate. **Journal Food Prot.** 52:51-54, 1989.

HANCOCK, B.L. & FOWLER, M.S. Cocoa bean production and transport. In: BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 2ed., p. 8-25. London: Black Academic & Professional, 1994.

HPA (Health Protection Agency - UK), 2006a. National increase in human *Salmonella* Montevideo infections in England and Wales: March to June 2006. **CDR (The Communicable Disease Report) Weekly** 16(26):1-2.

HPA (Health Protection Agency - UK), 2006b. HPA view on FSA Food Alert announcing the recall of a number of confectionary products. *CDR (The Communicable Disease Report) Weekly* 16(26):2.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1980. **Microbial Ecology of Foods – Vol. II – Food Commodities**. Academic Press, New York.

ICMSF, 1988. **Microrganisms in Foods 4 – Application of the Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality**. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

ICMSF, 1996. **Microrganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, ISBN 0 412 47350 X.

ICMSF, 2000. **Microrganisms in Foods 6 – Microbiological Ecology of Food Commodities**. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland

ICMSF, 2005. **Cocoa, chocolate, and confectionery**. In: **Microorganisms in food, Volume 6: Microbial Ecology of Food Commodities**. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, New York, 467-476.

ICCO. **Boletín trimestral de estadística del cacao**. 30 (4), 2004.

ICCO. 2008. **Annual Report 2007/2008**. Disponível em: <<http://www.icco.com>>. Acesso em: 12/07/2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo - Brasil). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4^a ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005. p. 104-105.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6^a ed Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. 711p.

KRAPF. T.; GANTENBEIN-DEMARCHI, C. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. during conching. **Food Science and Technology**. V. 43, 4^a ed, p 720-723, 2010.

KLEINERT, J. Cleaning, roasting and winnowing. In: BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 2ed., p. 55-69. London: Black Academic & Professional, 1994.

KORNACKI, J.L. & JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F.P., and K. Ito (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 8, p. 69-82.

LAGUNES-GÁLVEZ, S.; LOISEAU, G.; PAREDES, J.L.; BAREL, M. GUIRAUD, J.P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p.124-130, 2007.

LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. 1982. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

LOPES, A.S. & QUESNEL, V.C., Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 24, n. 3, p. 319-324, 1973.

LOPES, A.S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. 2000. 112p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MACRAE, R.; ROBINSON, R.K. & SADLER, M.J. Cocoa. In: **Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition**. London: Academic Press, 1993. v.2, p. 1073-1097.

MARAVALHAS, N. Considerações sobre beneficiamento do cacau na Bahia. **Cacau Atualidades**. 8(4) : 12-15, 1971.

MATTICK, K. L. F; JORGENSEN, P; WANG, J; POUND, M. H; VANDEVEN, L. R; WARD, J. D; LEGAN, H. M; LAPPIN-SCOTT; T. J. HUMPHREY. Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of Salmonella serovars at low water activity. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 4128-6136, 2001.

MATTIETO, R.A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 2001. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MEINERS, A.; KREITEN, K.; JOIKE, H. **Silesia-essenzenfabrik Gerhard Hanke K. G.** Alemanha, 1984. V. 2, 887p. (Silesia Confiserie Manual, 3).

MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa, and confectionery: Science and Technology**. 3^a ed., New York: Chapman & Hall, 1989.

MORORÓ R. C. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC): **Radar Técnico**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos>>. Acesso em: 03/01/11.

NASCIMENTO, A.R.; FILHO, J.E.M.; MARINHO, S.C.; MARTINS, A.G.L. A.; SOUSA, M.R.; SILVA, W.A.S.; CASTILLO, F.A.; OLIVEIRA, M. B. Incidência de microrganismos contaminantes em polpas de frutas comercializadas in natura em feiras livres da cidade de São Luís/MA. **Boletim da CEPPA**, v. 24,n. 1,p.249-258, jan./jun. 2006.

NASCIMENTO, M.S.; SILVA, N.; SILVA, I.F; SILVA, J.C; MARQUES, E.R; SANTOS, A.R.B. Enteropathogens in cocoa pre-processing. **Food Control**, 21 : 408-411, 2009.

NIEDIEK, E.A. Particle size reduction. In: BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 2ed. London: Chapman & Hall, 1994. Cap. 7, p. 83 – 100.

OSTOVAR, K. & KEENEY, P.G. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. **Journal of Food Science**, 38: 611-617, 1973.

PENHA, E.M., MATA, V.M.. 1999. Características físico-químicas e microbiológicas da polpa de cacau. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira** 33(11):1945-1949.1999.

PEZOA-GARCÍA, N.H. **Contribution a l'étude d'un capteur por controlar em continu procede de torrèfaction**. 170p. 1989. These (Docteur) – Université de Technologie de Compiègne, Compiègne.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento de cacauero com ênfase na produtividade, qualidade dos frutos e resistência à doenças**. 220p. 2003. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

PUBLITEC. **Cacau. Um produto do tropico americano que hoje faz parte das delícias do mundo inteiro**. Disponível em: <www.publitechbrasil.com.br/pdf/177g.pdf>. Acesso em: 20/12/10.

RANGEL, J.F. **CEPLAC/Cacau, Ano 25**, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura: Brasília-DF, 1982, 142p.

ROHAM, T. A.; CONNELL, M. The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of food Science**, Chicago, v. 29, p. 460-463, 1964.

ROSLI, W.I.W; JINAP, S.; RUSSLY, A.R. Effect of roasting time and temperature on volatile components profiles during nib roasting. In. **Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference**. Salvador, Brasil, Cocoa Producers Alliance. P. 977 – 991. 1996.

SANTOS, F. A.; SALLES, J. R. J.; CHAGAS FILHO, E.; RABELO, R. N. Análise qualitativa de polpas congeladas de frutas, produzidas pelo SUFRUTS,MA. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 119, p.14-22, 2004.

SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Aspectos Gerais: Cacaueiro**. Governo do Estado da Bahia: Bahia, sd. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/cacau1.htm>>. Acesso em: 12/01/11.

SCHWAN, R.F.; LOPEZ, A.; SILVA, D.O.; VANETTI, M.C.D. Influencia da frequência e intervalos de revolvimento sobre a fermentação do cacau e qualidade do chocolate. **Agrotipica**. 2(1): 22-31, 1990.

SCHWAN, R.F., Microbiology of cocoa fermentation: A study to improve quality. In: **12ª Conferencia Internacional de Pesquisa em Cacau**. Salvador, BA, novembro, 1996.

SCHWAN, R.F. & WHEALS, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 44:1-17, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo, SP: Varela, 2010. 624 p.

THOMPSON, S. S. MILLER, K. B. & LOPEZ, A.S. Cocoa and coffee. In: **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. . In: DOYLER, M.P.; BEAUCHAT, L.R. & MONTVILLE, T.J (eds), 2nd ed, 2001, p. 721-733.

THORZ, M.S. & SCHIMITT, A. Thin film liquor roasting and pre-treatment technology. **The Manufacturing Confectioner**. 65-70, jun. 1984.

VISSOTTO, F.Z., 2000. Processo de fabricação de chocolate. In: **Manual Técnico do Seminário Produtos Diet e Light**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, Junho de 2000, 154 p.

VITELA, R. T; ESCARTIN, E. F.; CASTILLO, A. Risk of Salmonellosis Associatede with Consupcion of Chocolate in México. **Journal of food Protection**, V. 58, N°5, p. 478-481, 1994.

WATERMAN, S.R. & SMALL, P.L.C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. **Applied Environmental Microbiology**. 64:3882-3886, 1998.

WEBER, D., DREESMAN, J., FEIL, F. *et al*. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. **BMC Infectious Diseases** 5:7-17. 2005

WOOD, G.A.R. & LASS, R.A. **Cocoa** 4th ed. Longman Scientific and Technical: New York. 1985.

WHO (World Health Organization), 2005. Drug-resistant *Salmonella*. **Fact Sheet nº 139**, Revised April 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fsl139/en/>>. Acesso em: 10/06/10.

ZAMALLOA, W.A.C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no Estado de São Paulo**. 1994. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ZUGAIB, A.C.C. Mudanças Cambiais e o Efeito dos Fatores de Crescimento ou Declínio das Receitas de Exportações Brasileiras de Cacau em Amêndoas. In: **Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira**. Ilhéus: Junho de 2008, 19p. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Mudanças%20Cambiais%20e%20Exportação%20de%20Cacau.pdf>>. Acesso em: 10/06/10.

ANEXO 1. Resultados de análise das amostras de Polpa de Cacau Congelada.

Marca comercial	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
A	0,977	3,69	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,979	3,71	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,981	3,69	Ausente	10	<3,0	<3,0
	0,974	3,82	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,975	3,74	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B	0,968	3,72	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,978	3,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,980	3,59	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,975	3,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,981	3,77	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
C	0,985	3,58	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,985	3,6	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,984	3,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,986	3,67	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,969	3,50	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
D	0,978	3,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,976	3,65	Ausente	10	<3,0	<3,0
	0,973	3,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,975	3,69	Ausente	40	<3,0	<3,0
	0,975	3,65	Ausente	190	<3,0	<3,0
E	0,982	3,74	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,977	3,58	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,981	3,78	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,990	3,80	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,990	3,81	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
F	0,987	3,50	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,988	3,49	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,986	3,50	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,985	3,48	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,979	3,53	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0

ANEXO 2. Resultados de análise das amostras de Sementes de Cacau Antes da Fermentação.

Produtor	Atividade de Água	pH	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
X	0,985	4,76	<10,0	<3,0	<3,0
	0,977	4,46	7,5x10 ⁵	28	<3,0
	0,981	4,89	<10,0	<3,0	<3,0
	0,990	5,10	<10,0	<3,0	<3,0
	0,992	4,90	<10,0	<3,0	<3,0
	0,978	4,87	2,6x10 ³	3,6	<3,0
	0,977	4,83	2,7x10 ⁴	93	<3,0
	0,975	4,87	<10,0	<3,0	<3,0
	0,971	4,90	1,2x10 ²	<3,0	<3,0
	0,976	5,11	<10,0	150	<3,0
Y	0,984	5,17	6,8x10 ³	3,6	<3,0
	0,984	4,71	7,9x10 ²	23	<3,0
	0,983	4,98	3,8x10 ²	9,2	<3,0
	0,986	5,11	10	3,6	<3,0
	0,979	4,96	<10,0	<3,0	<3,0
	0,975	4,91	2,4x10 ⁵	9,2	<3,0
	0,973	4,95	1,8x10 ⁴	<3,0	<3,0
	0,976	4,34	2,7x10 ⁴	43	<3,0
	0,975	4,41	4,5x10 ⁵	23	<3,0
	0,970	4,61	<10,0	<3,0	<3,0
Z	0,978	4,30	<10,0	<3,0	<3,0
	0,974	4,50	<10,0	<3,0	<3,0
	0,974	4,50	<10,0	<3,0	<3,0
	0,977	4,60	<10,0	<3,0	<3,0
	0,978	4,50	<10,0	<3,0	<3,0
	0,972	6,00	<10,0	<3,0	<3,0
	0,977	4,70	<10,0	<3,0	<3,0
	0,978	5,00	<10,0	<3,0	<3,0
	0,978	5,00	<10,0	<3,0	<3,0
	0,977	4,40	<10,0	<3,0	<3,0

ANEXO 3. Resultados de análise das amostras de Sementes de Cacau Durante o Processo de Fermentação.

Produtor	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
X	0,993	4,97	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,994	5,00	Ausente	<10,0	15	15
	0,989	4,71	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
	0,989	4,31	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,996	5,20	Ausente	<10,0	38	<3,0
	0,988	4,48	Ausente	<10,0	>1,1x10 ³	<3,0
	0,994	4,59	Ausente	<10,0	9,2	<3,0
	0,988	4,74	Ausente	<10,0	15	<3,0
	0,987	4,33	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,995	5,03	Ausente	3,3 x 10 ⁴	>1,1x10 ³	1,1x10 ²
Y	0,996	5,56	Ausente	3,0 x 10 ²	>1,1x10 ³	29
	0,997	5,85	Ausente	2,4 x 10 ⁶	>1,1x10 ³	23
	0,988	4,99	Ausente	30	>1,1x10 ³	>1,1x10 ³
	0,994	5,29	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,981	4,99	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,994	4,64	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
	0,99	4,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,991	4,53	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
	0,994	4,53	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
	0,991	4,71	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
Z	0,996	4,78	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,997	4,70	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
	0,995	4,88	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,993	4,51	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,994	4,63	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,976	4,40	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,975	4,60	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,977	4,70	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,972	4,60	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,976	5,40	Ausente	1,1 x 10 ³	9,2	9,2

ANEXO 4. Resultados de análise das amostras de Amêndoas de Cacau Durante o Processo de Secagem.

Produtor	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
X	0,603	5,19	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,828	4,96	Ausente	7,5x10 ³	>1,1x10 ³	<3,0
	0,875	5,35	Ausente	<10,0	93	<3,0
	0,846	5,21	Ausente	1,1x10 ⁴	4,6x10 ²	7,4
	0,834	5,97	Ausente	3,4x10 ³	1,1x10 ³	<3,0
	0,867	5,06	Ausente	<10,0	23	<3,0
	0,823	5,97	Ausente	1,6x10 ⁴	>1,1x10 ³	<3,0
	0,813	5,05	Ausente	3x10 ³	>1,1x10 ³	<3,0
	0,824	4,67	Ausente	<10,0	>1,1x10 ³	15
	0,855	5,07	Ausente	8,4x10 ²	93	15
Y	0,733	4,65	Ausente	4,5x10 ⁵	>1,1x10 ³	>1,1x10 ³
	0,721	5,20	Ausente	6,6x10 ⁴	>1,1x10 ³	23
	0,635	4,82	Ausente	1,8x10 ⁵	>1,1x10 ³	>1,1x10 ³
	0,629	5,03	Ausente	60	1,5x10 ²	<3,0
	0,665	5,12	Ausente	4,1x10 ²	>1,1x10 ³	43
	0,595	5,05	Ausente	5,9x10 ⁶	>1,1x10 ³	>1,1x10 ³
	0,990	5,21	Ausente	5,4x10 ³	>1,1x10 ³	<3,0
	0,536	5,31	Ausente	1,3x10 ⁵	>1,1x10 ³	<3,0
	0,986	5,05	Ausente	2x10 ²	>1,1x10 ³	<3,0
	0,725	6,12	Ausente	5,6x10 ³	>1,1x10 ³	<3,0
Z	0,990	4,92	Ausente	7,4x10 ⁴	>1,1x10 ³	<3,0
	0,668	5,63	Ausente	1,1x10 ⁷	>1,1x10 ³	<3,0
	0,938	5,42	Ausente	4,7x10 ²	>1,1x10 ³	43
	0,636	5,26	Ausente	7,7x10 ³	>1,1x10 ³	1,1x10 ³
	0,844	5,43	Ausente	1,4x10 ⁵	>1,1x10 ³	>1,1x10 ³
	0,912	4,71	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,854	4,69	Ausente	1,4x10 ⁵	>1,1x10 ³	<3,0
	0,736	5,10	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,758	5,00	Ausente	6,6x10 ²	3	3
	0,752	5,10	Ausente	3,4x10 ²	<3,0	<3,0

ANEXO 5. Resultados de análise das amostras de Amêndoas de Cacau Estocadas.

Produtor	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
X	0,744	4,12	Ausente	$6,4 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
	0,699	5,01	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,643	4,86	Ausente	<10,0	23	<3,0
	0,596	4,86	Ausente	<10,0	7,4	<3,0
	0,64	5,3	Ausente	<10,0	43	<3,0
	0,658	4,77	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,664	5,3	Ausente	$3,9 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^3$	<3,0
	0,625	5,4	Ausente	10	$>1,1 \times 10^3$	<3,0
	0,749	5,02	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,78	5,08	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
Y	0,728	4,78	Ausente	$1,4 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
	0,74	4,71	Presente	$1,1 \times 10^3$	21	7,4
	0,733	4,4	Ausente	$2,7 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
	0,746	4,91	Ausente	$4,2 \times 10^3$	93	43
	0,717	4,62	Ausente	$1,7 \times 10^4$	93	93
	0,746	4,44	Ausente	$2,9 \times 10^2$	$>1,1 \times 10^3$	29
	0,745	4,8	Ausente	$1,8 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
	0,726	5,44	Ausente	$2,2 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
	0,686	5	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
Z	0,735	4,29	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,673	5,11	Ausente	$1,9 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$	38
	0,678	4,91	Ausente	$4,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	<3,0
	0,648	4,6	Ausente	<10,0	35	27
	0,646	4,72	Ausente	<10,0	9,2	<3,0
	0,704	5,14	Ausente	$7,5 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$	7,2
	0,687	6,49	Ausente	$2,3 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
	0,663	5,62	Ausente	$2,1 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	8,9
	0,673	5,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,395	4,57	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0

ANEXO 6. Resultados de análise das amostras de *Nibs* de Cacau coletadas nas indústrias de beneficiamento.

Indústria	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
	-	5,51	Ausente	<10,0	7,4	<3,0
	-	5,50	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	-	5,34	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	-	5,36	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	-	5,46	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,526	5,13	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,475	5,47	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
A	0,446	5,42	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,462	5,53	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,496	5,38	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,422	5,48	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,434	5,53	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,467	5,57	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,437	5,67	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,448	5,51	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,567	5,21	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,563	5,34	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,505	5,25	Ausente	10	23	<3,0
	0,545	5,61	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,548	5,01	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
	0,563	4,98	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,457	5,53	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B	0,471	5,29	Ausente	90	<3,0	<3,0
	0,502	5,21	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,483	5,39	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,481	5,40	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,483	5,40	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	0,553	5,32	Ausente	10	<3,0	<3,0
	0,548	5,34	Ausente	15	23	<3,0
	0,511	5,32	Ausente	10	9,2	3,6

ANEXO 7. Resultados de análise das amostras de *Liquor* de Cacau coletados nas indústrias de beneficiamento.

Indústria	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
A	0,522	5,59	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,465	5,77	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,489	5,60	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,488	5,87	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,517	5,67	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,495	5,87	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,516	5,77	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,528	6,05	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,475	5,78	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,503	5,89	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,488	5,56	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,534	5,96	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,537	5,54	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,488	5,85	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,481	5,61	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	B	0,437	5,69	Ausente	<10	<3,0
0,368		5,65	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,371		5,83	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,446		5,72	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,483		5,92	Ausente	<10	9,2	<3,0
0,431		6,09	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,224		5,83	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,274		5,83	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,222		7,12	Ausente	<10	3,6	<3,0
0,461		5,86	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,796		5,82	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,460		6,20	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,390		5,74	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,405		5,80	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,491	5,76	Ausente	<10	<3,0	<3,0	

ANEXO 8. Resultados de análise das amostras de Torta de Cacau coletadas nas indústrias de beneficiamento.

Indústria	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
A	0,293	5,60	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,334	5,51	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,335	5,53	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,300	5,56	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,326	5,66	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,316	6,91	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,311	6,91	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,295	6,88	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,300	6,89	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,284	6,91	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,257	7,50	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,244	7,49	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,249	7,49	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	0,240	7,53	Ausente	<10	<3,0	<3,0
	B	0,350	6,59	Ausente	<10	<3,0
0,281		7,71	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,340		6,55	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,308		7,34	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,276		7,83	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,256		6,92	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,292		6,80	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,147		6,90	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,260		7,87	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,450		7,75	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,395		7,79	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,452		6,85	Ausente	<10	<3,0	<3,0
0,484		7,85	Ausente	20	<3,0	<3,0
0,471	7,81	Ausente	10	<3,0	<3,0	
0,447	7,73	Ausente	<10	<3,0	<3,0	

ANEXO 9. Resultados de análise das amostras de Manteiga de Cacau coletadas nas indústrias de beneficiamento.

Indústria	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)	
A	-	6,73	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	-	6,98	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	-	7,27	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	-	6,33	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	-	7,42	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,522	6,15	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,510	6,46	Ausente	10	<3,0	<3,0	
	0,521	7,16	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,519	6,05	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,525	7,23	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,500	7,28	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,506	6,64	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,513	6,61	Ausente	<10,0	3,6	<3,0	
	0,521	7,37	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	0,544	8,27	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	B	0,478	7,35	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
		0,512	6,63	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
		0,477	6,81	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
		0,437	7,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
0,45		8,22	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,469		7,27	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,488		7,06	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,428		7,19	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,409		7,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,527		5,47	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,513		5,4	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,563		7,92	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,483		8,48	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,507		8,29	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
0,547	8,14	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0		

ANEXO 10. Resultados de análise das amostras de Pó de Cacau coletados nas indústrias de beneficiamento.

Indústria	Tipo	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
A	Natural	0,338	5,57	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,332	5,64	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,37	5,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,347	5,75	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,41	5,81	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
B	Alcalino	0,393	6,43	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,388	6,85	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,347	6,88	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,387	6,89	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,393	6,89	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,334	6,93	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,397	6,95	Ausente	<10,0	7,4	<3,0
A		0,37	6,96	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,306	6,96	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,44	7	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,397	7,03	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,411	7,08	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,579	7,28	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,523	7,37	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,385	7,5	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,431	7,54	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,352	7,55	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,319	7,57	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,456	7,57	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A		0,312	7,6	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,282	7,74	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,458	7,76	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
B		0,444	7,97	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
A	0,303	8,13	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
A	0,355	8,24	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	

ANEXO 11. Resultados de análise das amostras de Chocolate coletadas no comércio varejista.

Tipo	Marca Comercial	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
Ao leite	1	0,354	6,43	Ausente	4,4 x 10 ³	93	<3,0
	2	0,369	6,43	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	5	0,395	6,62	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	6	0,564	6,93	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	5	0,428	6,55	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	7	0,391	6,54	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	7	0,564	6,4	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	3	0,382	6,44	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	8	0,562	6,18	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	4	0,45	6,58	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	9	0,504	6,34	Ausente	10	3	<3,0
	10	0,387	6,62	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	11	0,413	6,16	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	3	0,365	6,46	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	5	0,378	6,26	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	4	0,366	6,65	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	2	0,531	6,46	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	16	0,451	6,5	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	18	0,504	6,31	Ausente	20	9,2	<3,0
	17	0,432	6,28	Ausente	30	<3,0	<3,0
19	0,490	6,64	Ausente	10	<3,0	<3,0	
3	0,403	6,55	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
Branco	19	0,387	6,71	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	1	0,402	6,79	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	2	0,400	6,74	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	3	0,588	6,82	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	3	0,391	6,83	Ausente	35	<3,0	<3,0
	4	0,409	6,71	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	5	0,473	6,98	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	6	0,426	6,72	Ausente	<10,0	3,6	<3,0
	5	0,417	6,75	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
	7	0,397	6,64	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
7	0,522	6,74	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	

ANEXO 11. Continuação.

Tipo	Marca Comercial	Atividade de Água	pH	<i>Salmonella</i> (em 25g)	Enterobactérias (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)	
Branco	3	0,372	6,79	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	8	0,386	6,66	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	5	0,475	6,71	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	11	0,428	6,83	Ausente	10	<3,0	<3,0	
	2	0,406	6,67	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	3	0,480	6,59	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	4	0,465	6,82	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	16	0,492	6,28	Ausente	10	<3,0	<3,0	
	17	0,460	6,55	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	18	0,401	6,41	Ausente	10	<3,0	<3,0	
	5	0,560	6,54	Ausente	20	<3,0	<3,0	
	Meio Amargo	2	0,322	5,77	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0
		6	0,478	7,48	Ausente	20	<3,0	<3,0
7		0,355	6,19	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
7		0,480	6,22	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
3		0,340	6,37	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
8		0,402	6,31	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
4		0,311	5,88	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
11		0,397	5,91	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
2		0,470	5,86	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
3		0,551	5,86	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
5		0,372	5,95	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
5		0,533	6,04	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
Pó		16	0,442	5,96	Ausente	30	<3,0	<3,0
	17	0,462	6,06	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	18	0,399	6,07	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	19	0,443	6,12	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	1	0,372	6,37	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	4	0,474	6,91	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
	14	0,473	7,06	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0	
3	0,470	7,02	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0		
15	0,556	7,31	Ausente	<10,0	<3,0	<3,0		