



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Filipe Manuel Soto Maior Fernandes

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CHOCOLATE PARA USO INDUSTRIAL

Mestrado em Empreendedorismo e Inovação na Indústria Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professor Doutor, Paulo Fernandes

e co-orientação de

Professora Doutora, Carla Barbosa

novembro de 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Filipe Manuel Soto Maior Fernandes

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CHOCOLATE PARA USO INDUSTRIAL

Mestrado em Empreendedorismo e Inovação na Indústria Alimentar

Júri

Presidente

Professor Doutor,

Vogais

Professor Doutor,

novembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Doutor Paulo Fernandes por todo o apoio, dedicação e disponibilidade durante a realização deste trabalho, especialmente no acompanhamento e ajuda durante a realização dos trabalhos laboratoriais e na realização da tese.

À minha co-orientadora Doutora Carla Barbosa por toda a dedicação e disponibilidade ao longo de todo o percurso académico, e principalmente por todo o incentivo e ajuda na realização da tese e para que este trabalho fosse possível.

Agradeço à Frulact por me ter dado a oportunidade de participar no desenvolvimento deste projeto no âmbito do meu Mestrado. Foi um prazer ter trabalhado em conjunto com uma empresa que será sempre uma referencia para mim. Agradeço também a forma como me receberam durante as minhas visitas e pela experiência vivida durante o contato mais direto com a realidade da empresa, um agradecimento especial ao Engenheiro Vitor Alves, que me acompanhou durante as visitas.

Agradeço à Engenheira Carla Ramos e em especial ao Técnico Vítor Monteiro do Laboratório UMA toda a paciência e ajuda durante a realização dos trabalhos laboratoriais.

Agradeço à Modelo e Continente Hipermarcados, SA, principalmente ao Continente de Viana do Castelo todo o apoio que me deram durante os anos do meu percurso académico, permitindo este percurso fosse possível. Agradeço também a todos os meus colegas de trabalho que sempre me incentivaram a continuar.

A todos os meus Amigos que me incentivaram, ajudaram, e tiveram sempre uma palavra de incentivo para continuar durante todo o meu percurso académico.

Aos meus Amigos de Alimentar por todos os bons momentos que passamos juntos e pela ajuda que sempre me deram.

Aos meus Pais porque sempre me incentivaram e apoiaram, pela educação que me deram e por fazerem de mim aquilo que sou hoje, pela motivação e por me fazerem acreditar que com esforço e empenho é sempre possível conseguir o que desejamos.

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de efetuar a caracterização microbiológica de chocolate para uso industrial para adição a lácteos nomeadamente na forma de *stracciatella*. Este trabalho integra-se num projeto da empresa Frulact.

O chocolate, pelas suas características, não possui as condições ideais para o crescimento microbiano, mas a sua contaminação inicial, ou a adquirida durante o processo produtivo pode introduzir espécies de microrganismos potencialmente perigosos para a segurança alimentar e qualidade do produto.

Assim, torna-se importante o conhecimento e caracterização da flora microbiana do chocolate, para garantir um produto seguro para os consumidores e, para a manutenção da qualidade do mesmo, evitando a sua degradação e ainda garantir que, no caso de aplicações industriais como ingrediente, não veicular microrganismos capazes de despoletar contaminações problemáticas.

A presença de bactérias do género *Bacillus*, formadoras de esporos, como *B. licheniformes*, *B. cereus* e *B. subtilis*, no produto devem ser eliminadas, ou reduzidas até valores considerados seguros. Estirpes destas espécies podem ter potencial toxico, e capacidade de degradação do produto.

Neste sentido, este trabalho, debruçou-se sobretudo na análise de matérias primas que dão origem ao chocolate e identificação das espécies predominantes no produto final - o chocolate para a industria.

Relativamente à flora microbiana presente no chocolate era inicialmente de aproximadamente 10^3 ufc/g, sendo essencialmente constituída por esporos bacterianos. O isolamento dos esporos e a sua identificação através de testes bioquímicos permitiu verificar que as estirpes mais frequentemente associadas com amostras de chocolate eram *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e *B. licheniformis*.

Testes realizados com as estirpes esporulantes isoladas, indicam um elevado potencial deteriorativo, principalmente pela produção de proteases, lípases, amílases e lecitinase.

Todas as amostras analisadas permitiram verificar a ausência de *Salmonella* spp em 25g de chocolate.

Testes preliminares de redução da carga microbiana das amostras de chocolate permitiram verificar que o aumento da a_w do chocolate por incorporação de pequenas quantidades de água permite aumentar substancialmente a eficácia de um tratamento térmico na redução da carga microbiana.

Palavras chave: chocolate, tratamento térmico, flora microbiana, esporos, *Bacillus*

ABSTRACT

The present work was carried out aiming at characterizing the microbiological quality of chocolate for industrial purposes namely for addition to dairy preparations, such as in the form of stracciatella. This work is part of a project of the company Frulact.

Due to its characteristics, chocolate does not constitute the ideal environment for microbial growth, but its initial contamination or that acquired during production process can introduce species of microorganisms that are potentially dangerous to food safety and consequently to the final products quality.

Thus, it is important to identify the native microorganisms in chocolate and in its main ingredients, to ensure a safe product for consumers, maintain the quality of the chocolate, avoiding its degradation and also ensure that, in the case of industrial applications as an ingredient, it does not transport micro-organisms capable of enhancing problematic contaminations.

The presence of *Bacillus* spore-forming bacteria such as *B. licheniformes*, *B. cereus* and *B. subtilis* in the product should be eliminated or reduced to values considered safe. Strains of these species are potentially toxic and enhancers of products degradation.

The work presented in this thesis focused mainly on the analysis of chocolate samples raw materials and identification of the predominant species in the final product - the chocolate for the industry.

Concerning the initially microbial flora present in the chocolate, it was approximately 103 ufc/g, being essentially constituted by bacterial spores. Isolation of spores and their identification through biochemical tests showed that the strains most frequently associated with chocolate samples were *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* and *B. licheniformis*.

Tests carried out with isolated sporulating strains revealed a high deteriorative potential, mainly due to the production of proteases, lipases, amylases and lecithinase.

All the analysed samples allowed to verify the absence of *Salmonella spp* in 25 g of chocolate.

Preliminary tests to reduce the microbial load in the chocolate samples have shown that increasing the a_w of the chocolate by incorporating small amounts of water allows a substantial increase in the effectiveness of a heat treatments as the microbial load is also reduced.

Keywords: chocolate, heat treatment, microbial flora, spores, *Bacillus*

ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de tabelas.....	xv
Glossário de Acrónimos e abreviaturas	17
1 Introdução.....	19
1.1 O cacau e o chocolate – Breves referencias históricas	19
1.2 Processo produtivo do chocolate	20
1.2.1 Colheita, fermentação e secagem	21
1.2.2 Processamento de grãos de cacau fermentados: torrefação e produção de licor de cacau	21
1.2.3 A produção de cacau em pó e manteiga de cacau	22
1.2.4 Produção do chocolate moldado.....	23
1.3 Legislação relativa ao chocolate e produtos de chocolate	24
1.4 Qualidade microbiológica do chocolate.....	24
1.4.1 Qualidade microbiológica das matérias primas do chocolate	25
1.4.2 As contaminações mais frequentes no cacau, licor e manteiga de cacau...27	
1.4.3 Presença de bactérias formadoras de esporos no cacau e no chocolate....28	
2 Materiais e Métodos	33
2.1 Recolha da amostra.....	33
2.2 Preparação da amostra para análises microbiológicas	33
2.3 Cálculos e resultados	34
2.4 Contagem de microrganismos totais a 30°C	34
2.5 Contagem de microrganismos termófilos a 55 °C	34
2.6 Contagem de fungos osmofílicos.....	35
2.7 Contagem de esporos de clostrídios sulfito-redutores	35

2.8	Contagem de esporos a 30 °C e 55 °C	35
2.9	Produção de esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> para inoculação em chocolate.....	36
2.10	Resistência térmica dos esporos de <i>Geobacillus</i> em chocolate	36
2.11	Identificação e caracterização fenotípica dos isolados.....	37
2.12	Outros ensaios realizados	37
3	Resultados e discussão	39
3.1	Ensaio microbiológico e resultados obtidos das amostras de matérias-primas e chocolate produzido pela Frulact.....	39
3.2	Caracterização das espécies isoladas	44
3.3	Resistência térmica de esporos no chocolate	47
4	Conclusões.....	49
5	Referências Bibliográficas	51
6	Apêndices.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Uma visão geral sobre o processamento de grãos de cacau. adaptado de (Caligiani et al., 2016)	23
Figura 2 - Espécies dominantes que produzem esporos resistentes ao calor (Lücking et al., 2013)	30
Figura 3 - Sobreviventes (esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>) após tratamento térmico a 125 °C durante 4 min.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados microbiológicos obtidos	42
Tabela 2 - Identificação dos isolados	45
Tabela 3 – Resistência térmica em chocolate com 75% de gordura	47
Tabela 4 - Resultados obtidos no teste de resistência térmica.....	56

GLOSSÁRIO DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

ICCO - The International Cocoa Organization

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

EM - Estados-Membros

LAB - bactérias ácido-láticas

BHI - Brain Heart Infusion

TRS - esporos termorresistentes

t – Tempo

T – Temperatura

NP – Norma Portuguesa

PS – Peptona sal

PCA – Plate count agar

ISO - International Organization for Standardization

MOS – Meio Osmofílico

DG18 – Dichloran-Glycerol agar

TSCE – Tryptone Sulfite Cycloserine Agar

MESP – Meio de esporulação

H₂O- Água

NaCl – Cloreto de sódio

UMA – Unidade de Microbiologia Aplicada

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho foi realizado no âmbito do mestrado em Empreendedorismo e Inovação na Indústria Alimentar da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo em conjunto com a empresa Frulact no âmbito do projeto CHOCOBITS.

O objetivo do trabalho, foi a caracterização microbiológica de chocolate para uso industrial a usar futuramente pela Frulact para adição a preparados de *stracciatella* nomeadamente para iogurte.

Os trabalhos realizados tiveram como objetivo, a caracterização microbiológica inicial do chocolate e matérias primas, verificação da eficácia dos tratamentos térmicos realizados pela Frulact, estudos de morte térmica, verificar a eficiência do tratamento na redução de esporos bacterianos e *Salmonella* spp, eventualmente presentes.

1.1 O cacau e o chocolate – Breves referencias históricas

O cacau é o ingrediente essencial do chocolate, responsável pelo seu sabor e características de fusão na boca. O cacau tem um percurso longo até chegar ao consumidor final, integrando vários circuitos de abastecimento. Tem origem normalmente em regiões menos desenvolvidas e por vezes em pequenos países produtores, sendo depois encaminhado para a indústria transformadora, até chegar ao consumidor final, que se situa principalmente nas regiões mais desenvolvidas do globo. Como qualquer outra planta, o fornecimento e disponibilidade do cacau está dependente de fatores como as condições meteorológicas, de doenças, pragas e fatores económicos (Beckett, 2009).

O cacau, já era conhecido no México e na América Central, cerca de mil anos antes de Cristóvão Colombo ter descoberto a América. Inicialmente, o chocolate era apreciado como uma mistura de grãos torrados de cacau e milho temperado com pimenta, baunilha ou canela. Apenas na primeira metade do século XVII o cacau foi introduzido na Alemanha. Inicialmente o cacau foi tratado como um produto de luxo, e só após a introdução do açúcar e da produção ser alargada é que este se tornou um produto alimentar com uma difusão em todo o mundo (Belitz , Grosch , & Schieberle 2009).

Atualmente, segundo os dados de 2013 referidos pela *The International Cocoa Organization* (ICCO), a produção mundial de cacau em grão decresceu 3,7% em 2012/2013 em relação ao ano anterior. No entanto a produção situou-se em 3,931 milhões de toneladas, sendo a Costa do Marfim e o Gana os maiores produtores com 85 mil toneladas.

O consumo de chocolate gerou vendas de 101 bilhões de Dólares americanos em todo o mundo, e que 35% de todo o chocolate consumido foi produzido na Europa, com a Suíça a ser o maior produtor e também o maior consumidor de chocolate, com uma média de 8,8kg *per capita* (Statista, 2015). Em Portugal, o negócio do chocolate vale 200 milhões de euros. Com um consumo per capita de aproximadamente 1,7 kg/ano, incluindo as tabletes de culinária para confeccionar sobremesas (Elisabete Tavares, 2017).

Inicialmente os chocolates eram produzidos a partir de cacau, moendo-se na presença de açúcar. Atualmente, o chocolate é normalmente produzido a partir de licor de cacau, com introdução de sacarose, manteiga de cacau, aromatizantes, e ocasionalmente outros ingredientes, como produtos de leite e frutos secos (Belitz et al., 2009).

Para além do chocolate ter como destino o consumidor final sendo apresentado como produto final, este é muitas vezes usado como constituinte de outros alimentos. Pode ser integrado na forma de chocolate em pó, pastilhas ou em barra, que será posteriormente fundido e misturado com outros ingredientes das formulações de outros alimentos, ou mesmo no formato de pepitas, que são introduzidos diretamente noutras matrizes.

1.2 Processo produtivo do chocolate

A principal matéria-prima utilizada na produção do chocolate, o cacau, é obtida das sementes da árvore tropical *Theobroma cacao*, de duas espécies principais, o *Criollo* (Nativo) e o *Forastero*. Este, é posteriormente misturado e integrado num processo produtivo de chocolate. Este processo de produção do chocolate resulta de cinco etapas principais, a mistura dos ingredientes, a conchagem, a refinação, a têmpera e a cristalização final (Schumacher et al., 2009).

1.2.1 Colheita, fermentação e secagem

A produção de cacau, colheita, fermentação e secagem são etapas do processo realizadas ainda nos países de origem. Estes processos variam conforme a espécie do cacau e a região onde foi produzido, e que tem influência sobre o aroma e sabor do cacau e dos produtos produzidos.

A fermentação foi considerada a primeira etapa do processo de produção do cacau, e é um processo que consiste na abertura dos grãos e fermentação da polpa e das sementes (da Silva do Nascimento et al., 2010). Esta etapa tem grande importância, devido às reações bioquímicas que ocorrem no interior do grão (Caligiani et al., 2016).

As características microbiológicas do cacau durante esta etapa foram descritas por (Ardhana & Fleet, 2003) num trabalho sobre a ecologia microbiana da fermentação do grão de cacau na Indonésia, onde refere quais as espécies dominantes em cada estágio da fermentação. Na primeira etapa, os microrganismos dominantes são principalmente fungos filamentosos, leveduras e bactérias ácido lácteas, seguindo-se uma maior predominância de *Penicillium citrinum*, *Kloeckera apis*, *Candida tropicalis* e *Lactobacillus*. Na última etapa de fermentação predominam espécies de *Bacillus*, principalmente *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis*.

Após a fermentação, segue-se uma etapa de secagem. No final da fermentação o grão de cacau possui uma humidade de aproximadamente 55%, um valor demasiado elevado para poder ser armazenado, embalado e enviado para os países produtores de chocolate, tornando-se assim necessário reduzir este teor de humidade até valores de cerca de 6% (Caligiani et al., 2016).

1.2.2 Processamento de grãos de cacau fermentados: torrefação e produção de licor de cacau

Um passo-chave da produção do chocolate é a torrefação, realizada nos países de transformação, é nesta etapa que se desenvolvem os aromas e sabor de particular relevância para o chocolate.

Antes da torrefação as sementes de cacau são limpas para remover pedras, metais e outros materiais que possam estar presentes. Normalmente a torrefação é aplicada a grãos de cacau inteiros, por ação de ar quente com temperaturas inferiores a 150°C em intervalos de tempo entre 30 a 120 minutos.

Numa fase posterior da trituração dos grãos é obtido o licor de cacau, que é depois transformado em pó de cacau e outros produtos do chocolate (Cooper et al., 2007). O uso do licor de cacau para a produção de chocolate negro é comum - este processo implica uma prensagem, mistura, conchagem e têmpera.

1.2.3 A produção de cacau em pó e manteiga de cacau

O cacau em pó é normalmente utilizado na produção de algumas bebidas chocolatadas, recheios de bolos, gelados e outros

O licor de cacau é aquecido a 95 -105 °C, e pressionado para extração de uma grande parte da gordura, a manteiga de cacau (Gu, House, Wu, Ou, & Prior, 2006). A pasta de cacau pode ser alcalinizada para favorecer a agregação, mas sabe-se que este passo reduz consideravelmente o teor de polifenóis.

A manteiga obtida é separada, filtrada e utilizada como ingrediente na produção de chocolate e de derivados do cacau (Caligiani et al., 2016)

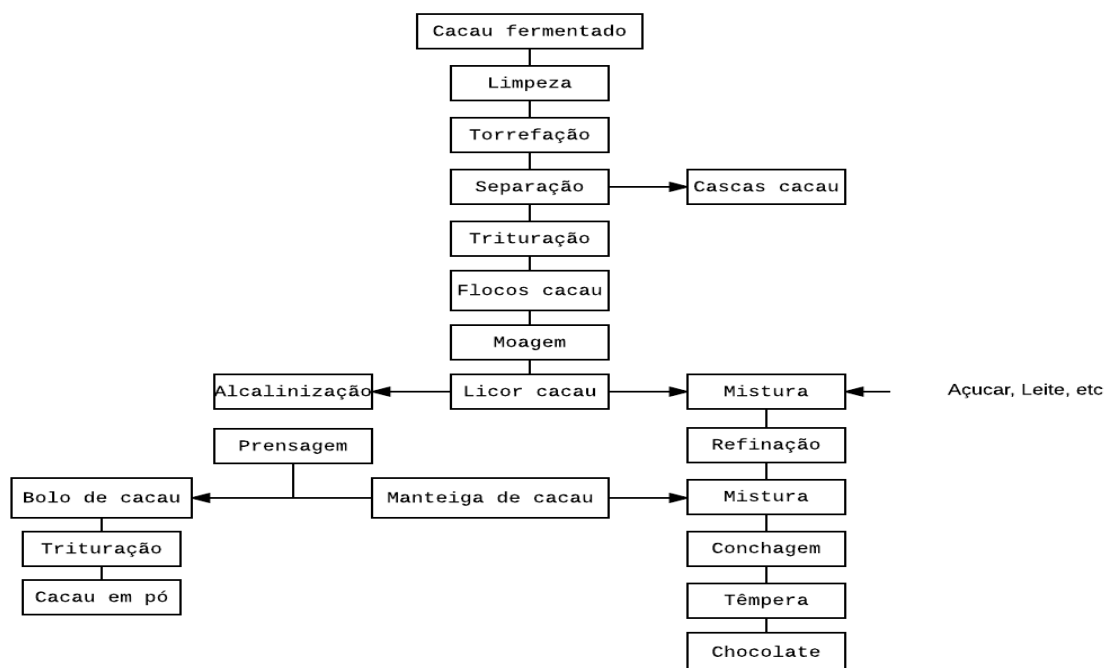


Figura 1 - Uma visão geral sobre o processamento de grãos de cacau. adaptado de (Caligiani et al., 2016)

1.2.4 Produção do chocolate moldado

O chocolate como produto final, é obtido a partir do licor de cacau, alcalinizado e misturado com açúcar, manteiga de cacau, emulsificantes, aromatizantes e outros ingredientes como avelã, amêndoas e leite. Esta mistura é homogeneizada, sendo a mistura uniforme posteriormente refinada em partículas mais finas.

Outros passos importantes no processo de produção do chocolate são a têmpera e a conchagem, necessários para obter um chocolate mais fino, de sabor, e texturas mais otimizadas de acordo com as preferências dos consumidores/mercados. Esta etapa é realizada em tinas rotativas circulares ou alongadas a temperaturas de 65-75 °C, realizada durante algumas horas ou dias, e é fundamental para garantir que o chocolate adquira as propriedades organoléticas desejadas. É também nesta fase que são habitualmente adicionados emulsificantes, manteiga de cacau e intensificadores de sabor e aroma.

O efeito da conchagem no chocolate resulta na redução da acidez, devido à libertação de ácido acético e outros compostos voláteis por evaporação, perda de humidade e uma distribuição mais uniforme das partículas de gorduras (Caligiani et al., 2016).

A última etapa da produção do chocolate é a têmpera. No processo de têmpera, que é uma etapa longa e complexa, a massa de chocolate é gradualmente arrefecida até 27 °C, e aquecida de novo a 37 °C. que volta a ser lentamente arrefecida até ao estado sólido, conduzindo assim à desejada cristalização uniforme do chocolate (Cervellati, Greco, Costa, Guerra, & Speroni, 2008).

1.3 Legislação relativa ao chocolate e produtos de chocolate

A legislação que regula a comercialização, rotulagem e produção de chocolate e outros produtos de cacau é a Diretiva 2000/36/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de junho de 2000 relativa aos produtos de cacau e de chocolate destinados à alimentação humana, e adotada pela legislação nacional através do Decreto-Lei nº 229 de 27/9/2003. Diário da república I Serie A nº 224 de 27/9/2003 p. 6319 ("EUR-Lex- Acesso ao direito da União Europeia,").

O Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005, na sua versão consolidada de 7 de março de 2014, com todas as alterações relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, refere que em circunstâncias normais, não se exige a realização de testes regulares dos seguintes alimentos prontos para consumo: açúcar, mel e produtos de confeitaria, incluindo produtos de cacau e de chocolate.

1.4 Qualidade microbiológica do chocolate

Os microrganismos que mais frequentemente estão relacionados com o chocolate são, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *B. cereus* (da Silva do Nascimento et al., 2010), (Lima, Kamphuis, Nout, & Zwietering, 2011) e (Beckett, 2009). Alguns destes microrganismos estão associados à ocorrência de doença pelo que agências e autoridades legisladoras, têm vindo também a regular sobre o chocolate.

No relatório da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) de 2015, que apresenta os resultados de 2013 em 32 países Europeus, 28 Estados-Membros (EM) e

quatro países da EFSA não membros da (EU) (EFSA, 2015). Os dados apresentados resumem a ocorrência de zoonoses e surtos de origem alimentar identificados pela EFSA e o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC). Este documento refere que a maioria dos surtos que implicam ovos e ovo-produtos foram causados por *Salmonella*. O estudo refere também que, doces e chocolates representaram o segundo veículo alimentar mais reportado em surtos de *Salmonella* em 2013, embora esses surtos tenham sido reportados principalmente pela Polónia (EFSA, 2015). No relatório da EFSA de 2016, com dados de 2014, chocolates e doces, representam 1,5% dos casos reportados. Relativamente a surtos de *Salmonella*, o valor decresceu para 3,1% (EFSA, 2016)

1.4.1 Qualidade microbiológica das matérias primas do chocolate

A qualidade microbiológica do chocolate é reflexo da qualidade microbiológica das matérias primas que lhe dão origem, tais como a manteiga, pó e licor de cacau e é também afetada pelas operações de processamento que por motivo de contaminação cruzada condiciona a estabilidade microbiológica.

O cacau é considerado um dos principais responsáveis por surtos de *Salmonella* spp nos humanos (EFSA, 2015).

Num estudo realizado no Brasil, que teve como objetivo investigar a presença de *Salmonella*, *Escherichia coli* e coliformes totais em todas as etapas de pré processamento do cacau foram consideradas quatro etapas do processamento, nomeadamente: (1) produção primária, colheita e pré-processamento do grão, (2) transformação dos grãos em produtos semiacabados, como manteiga, licor e pó de cacau, (3) indústria de produção do chocolate e (4) indústrias de transformação de chocolate (Garcia, 2003).

Na primeira etapa do processo, a contaminação ocorre pelo contacto de facas e outros utensílios usados na colheita. Muita desta microflora é responsável pela fermentação natural que ocorre nos primeiros dias. Na primeira fase do processo dá-se uma fermentação alcoólica realizada sobretudo por leveduras, seguindo-se uma maior atividade

de bactérias lácticas e posteriormente bactérias acéticas, cuja atividade metabólica resulta numa diminuição do pH. Na fase seguinte, a flora é caracterizada pela presença de bactérias aeróbicas formadoras de esporos, cujo metabolismo resulta normalmente num aumento do pH e no aparecimento de fungos filamentosos à superfície (da Silva do Nascimento et al., 2010).

Após a fermentação o cacau é submetido a uma secagem ao sol diretamente no chão, protegido da humidade e da chuva. No final da secagem o cacau é acondicionado em sacos e armazenados antes de ser enviado para as indústrias transformadoras. Esta armazenagem é normalmente realizada na ausência das melhores condições de higiene, estando exposto a vetores de contaminação como o solo, insetos, roedores e aves (Foods, 2000).

O controlo das matérias-primas é considerado essencial prevenir o aparecimento de *Salmonella* spp. no chocolate, no entanto, existe ainda um desconhecimento grande sobre a contaminação das matérias-primas. A contaminação com *Salmonella* na fase que antecede a fermentação não é inesperada, tendo em conta as práticas usadas na colheita (Garcia, 2003).

De acordo com (Garcia, 2003) foi concluído que a contaminação por *Salmonella*, através do ambiente, equipamentos e trabalhadores é possível através de vetores como o solo e águas contaminadas, já que os resultados obtidos mostram que as sementes não estavam contaminadas, indicando por isso que a matéria-prima não é uma fonte provável para patógenos como a *Salmonella*.

Durante a fermentação, o meio quente e ácido não é favorável para o crescimento e multiplicação de *Salmonella*. No entanto, o estudo refere que a possibilidade de existir sobrevivência e crescimento não pode ser descartado para a *Salmonella*, mesmo em condições adversas.

Durante a secagem não foi detetada a presença de *Salmonella*, mas existiu um aumento de *E. coli* durante esta fase, este aumento pode ser devido ao processo de secagem, uma etapa que potencia a contaminação. Esta etapa pode ser a mais crítica na contaminação de *Salmonella* devido à exposição dos grãos ao ar, solo e outros vetores de contaminação como animais domésticos, aves e os trabalhadores que pisam as sementes, abrindo caminho para a introdução de contaminações.

Após a secagem, os grãos de cacau são armazenados, nesta fase foram identificadas amostras contaminadas com *Salmonella* (10%) num dos produtores. Esta foi a única amostra contaminada em 119 amostras analisadas.

Este estudo conclui, que as condições de produção observadas na produção de cacau, é possível concluir que as aves e insetos que entram em contacto direto com as sementes/grãos de cacau no processo de secagem ao ar livre são vetores da contaminação fecal de grãos de cacau, introduzindo *E. coli* e possivelmente, *Salmonella*. Outros fatores importantes que podem contribuir para a contaminação do cacau, são a manipulação, armazenamento por longos períodos em contacto com o ambiente (Garcia, 2003).

1.4.2 As contaminações mais frequentes no cacau, licor e manteiga de cacau

Os grãos de cacau são a principal matéria-prima da indústria do chocolate. Os grãos de cacau são provenientes de plantações em regiões tropicais e são sujeitos a uma fermentação na primeira etapa de produção do chocolate, esta fermentação tem influencia na qualidade final do chocolate. (Ardhana & Fleet, 2003)

Num estudo realizado em 3 locais de fermentação na Indonésia, onde foram determinadas as espécies presentes nos grãos de cacau, durante os 3 primeiros dias do processo.

No ensaio foram detetadas e quantificadas espécies de fungos filamentosos, que cresceram nas primeiras horas de fermentação, reduzindo até quantidade não detetáveis após 24-36 horas de fermentação. As espécies principais que foram isoladas foram *Penicillium citrinum*, *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus wentii*. As espécies cresceram a 35 °C, mas não a 40 °C, apenas *Aspergillus versicolor* cresceu a 40 °C, mas não a 45 °C.

As leveduras presentes no grão, tiveram um aumento no inicio da fermentação e durante as 24-36h seguintes, diminuindo posteriormente. A levedura *Kloeckera apis* foi a espécie dominante, esta levedura é responsável por 70-90% da população de leveduras durante esta fase inicial. Outras leveduras como *Kloeckera javanica* e *Kloeckera africana* também

contribuíram para a fermentação. Depois de *Kloeckera apis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* foram as leveduras mais significativas na fermentação.

As bactérias detetadas neste estudo foram bactérias ácido-láticas (LAB), bactérias acéticas e algumas espécies de bacilos.

A principal espécie de LAB isolada foi *Lactobacillus cellobiosus*, responsável por 60-85% das bactérias ácido-láticas. Outras LAB foram isoladas, como *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus hilgardii*. Nenhuma das bactérias isoladas cresceu a 50 °C, mas *Lactobacillus cellobiosus* cresceu bem a 45-47 °C, *Lactobacillus plantarum* cresceu a 40-45 °C e *Lactobacillus hilgardii* não cresceu a 45 °C e teve um baixo crescimento a 40 °C. Nenhuma das estirpes deu reação positiva para reações de celulase, amilase, lipase e protease.

Nas bactérias acéticas, *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter aceti* contribuíram para a fermentação. *Acetobacter pasteurianus* foi a espécie isolada predominante, e com maior resistência durante a fermentação. Nenhuma das espécies teve crescimento significativo com temperaturas superiores a 35 °C e nenhuma demonstrou ser produtora de celulase, amilase, protease ou lipases nas condições testadas.

As espécies de *Bacillus* presentes, cresceram durante toda a fermentação, ao contrário do que ocorreu com outras espécies, que deixavam de ter crescimento nas primeiras horas de fermentação. As espécies de *Bacillus* permaneceram com populações elevadas, sendo isoladas na maioria dos ensaios espécies de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. A maioria das espécies tiveram crescimento a 50 °C, exceto *Bacillus cereus* e *Bacillus sphaericus*, e deram reações positivas para a produção de protease e amilase (exceto *B. pumilus* e *B. sphaericus*) e lipase (*B. cereus* e *B. sphaericus*).

Outras espécies foram isoladas, embora em quantidade relativamente diminuta como *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus kristinae* e *Pseudomonas cepacea* (Ardhana & Fleet, 2003).

1.4.3 Presença de bactérias formadoras de esporos no cacau e no chocolate

Bactérias formadoras de esporos são contaminantes importantes no processamento de laticínios, mas o seu controlo no ambiente de produção e no alimento são ainda difíceis, devido ao pouco conhecimento sobre as suas origens, termoresistência, capacidade de deterioração e potencial tóxico (Lücking, Stoeckel, Atamer, Hinrichs, & Ehling-Schulz, 2013).

Está descrita a presença de elevadas taxas de contaminação com bactérias formadoras de esporos resistentes ao calor em leite em pó, pó de cacau e extratos de gelatina (E. De Clerck, 2004). O aparecimento de endósporos altamente resistentes ao calor, capazes de sobreviver ao tratamento térmico para obtenção de produtos estéreis, é uma preocupação, pois com a realização de tratamentos térmicos altamente severos os alimentos contaminados, parecem aumentar a capacidade de adaptação e seleção de bactérias produtoras de esporos extremamente resistentes (B. Pettersson, 1996; F. Postollec, 2012).

Num estudo (Lücking et al., 2013) efetuado para a caracterização de bactérias formadoras de esporos em produtos lácteos foram isoladas 467 espécies, destas 379 foram relacionadas com produtos contaminados, 10 de amostras de esfregaços dos equipamentos e 93 do ambiente de processamento.

Os resultados obtidos mostram que foram isoladas 379 estirpes formadoras de esporos ligadas à deterioração. Das 379 espécies isoladas 75% pertenciam ao género *Bacillus*, 9% são *Geobacillus* e 6% são *Paenibacillus*. A grande maioria das espécies isoladas são mesófilas e apenas 7 são estritamente termófilas. As espécies isoladas foram, *B. lincheniformes*, *B. cereus*, *B. thermoamylovorans*, *B. subtilis* e *Geobacillus stearothermophilus*.

Quanto à caracterização de formadores de esporos e resistência térmica as suspensões foram aquecidas 20 min a 100 °C. Como resultado 27% das estirpes sobreviveram a este tratamento térmico, sendo classificadas como termorresistentes, e 330 estirpes não cresceram.

No que diz respeito à sua origem alimentar, os isolados termorresistentes foram detetados em todas as categorias de alimentos analisados: 14% foram obtidos a partir de produtos intermédios não transformados e matéria-prima, 23% de ingredientes desidratados e 56% de alimentos processados.

Os formadores de esporos termorresistentes poderiam ser atribuídos a cinco géneros e 17 espécies diferentes. Metade das amostras pertenciam a sete espécies mesófilos, e dez espécies termófilas ou termotolerantes.

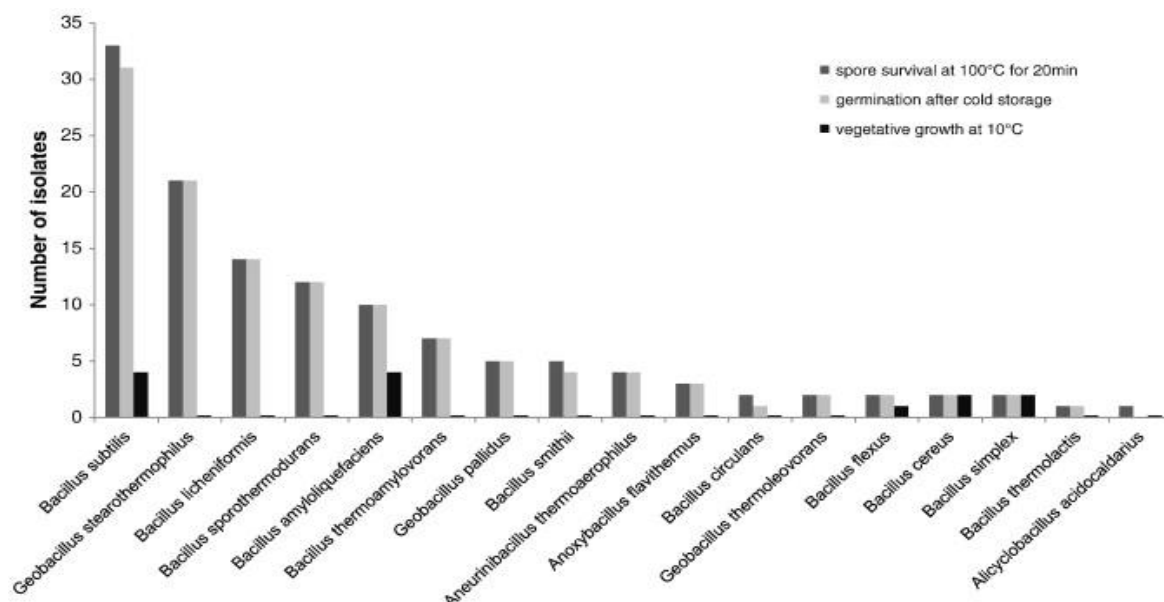


Figura 2 - Espécies dominantes que produzem esporos resistentes ao calor (Lücking et al., 2013)

As espécies dominantes que produzem esporos resistentes ao calor foi *B. subtilis* (26%), seguido por *G. stearothermophilus* (17%) e *B. licheniformis* (11%). Foi também testado o seu potencial para crescer e germinar a temperaturas baixas (10 °C), 13 isolados foram capazes de crescer e quase todas as estirpes isoladas foram capazes de crescer e germinar quando voltavam a ser colocadas na sua temperatura ótima de 30, 37 e 55 °C.

O ambiente de processamento dos alimentos, bem como as matérias-primas alimentares, tais como pó de cacau e especiarias, foram identificadas como importantes fontes de contaminação. Foram observadas diferenças significativas no potencial de resistência térmica de esporos e deterioração, não só entre diferentes espécies, mas também entre diferentes estirpes dentro de uma espécie. Mais importante ainda, o estudo indica que o potencial de deterioração dos esporos mesófilos que produzem esporos termorresistentes é muito maior do que o potencial de deterioração de isolados termorresistentes pertencentes a espécies estritamente termófilas, embora estes últimos sejam frequentemente encontrados em alimentos e não associados com a sua deterioração.

As bactérias formadoras de esporos altamente resistentes ao calor, que produziram esporos sobreviventes 125°C durante 30 min, foram encontrados entre mesófilos, bem como entre os isolados termófilos. De acordo com (Lücking et al., 2013) as bactérias aeróbias formadoras de esporos altamente resistente ao calor são um problema para a qualidade de alimentos, mais do que uma questão de segurança alimentar.

Com base nos trabalhos anteriormente referidos foi implementado o estudo das matrizes de chocolate do projeto CHOCOBITS em avaliação neste trabalho validando assim a sua utilização pela Frulact

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos desde a recolha da amostra até à sua análise que permitiram a caracterização microbiológica das matrizes em estudo de chocolate e das matérias-primas.

2.1 Recolha da amostra

A recolha de amostra de chocolate foi sempre feita na Frulact, ao longo da etapa de processamento. Este processamento consistia numa simulação de esterilização do chocolate recorrendo à adição de água com vista ao aumento da eficiência do processo térmico de estabilização do chocolate.

Neste sentido, após a colocação do chocolate, de acordo com a formulação pretendida no equipamento piloto da empresa, o sistema com aquecimento é iniciado e adicionada água na percentagem correspondente à formulação pretendida a 90 °C.

Neste momento eram retiradas as amostras correspondentes ao tempo (t) zero, para frascos estéreis. Esta recolha foi efetuada num ambiente não estéril.

Após o sistema atingir a temperatura (T) de 130 °C foi iniciada a contagem do tempo para recolha de amostras aos 15 min e 30 min.

A recolha destas amostras, foi efetuada para os frascos estéreis, à chama e com libertação de vapor de água do sistema, de forma a ter o meio envolvente o mais estéril possível durante a recolha.

No final dos 30 minutos foi iniciada a evaporação com pressão de -0,9bar durante 20 minutos e recolhida a última amostra (placa de chocolate), para frascos estéreis, mas sem condições de assepsia durante a recolha.

2.2 Preparação da amostra para análises microbiológicas

A preparação das amostras analisadas, foi efetuada de acordo com a Norma Portuguesa (NP) 1829:1982, por pesagem assética de 10g de chocolate e respetiva diluição até 100g com Peptona sal (PS) (Merck, Darmstadt, Germany).

As diluições décimais usadas nas análises foram efetuadas com PS (Merck, Darmstadt, Germany), de acordo com a norma International Organization for Standardization (ISO) 6887-1:1999.

2.3 Cálculos e resultados

Todos os cálculos e respetiva apresentação de resultados finais relativamente à quantificação de microrganismos nas amostras de chocolate, foram efetuados de acordo com a norma ISO 7218:2007/Amd.1:2013, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations AMENDMENT 1, e com as normas específicas para o parâmetro em questão, sempre que necessário.

2.4 Contagem de microrganismos totais a 30°C

A partir da suspensão mãe (preparada a partir da amostra, segundo descrito no ponto 2.2), foram preparadas diluições decimais sucessivas, tendo a quantificação sido realizada por inoculação em meio Plate count agar (PCA) (Merck, Darmstadt, Germany), segundo a norma ISO 4833-1:2013.

A incubação foi realizada em aerobiose e simultaneamente em anaerobiose, com recurso a um vaso de anaerobiose (Oxoid) e um kit de anaerobiose (AnaeroGen 2,5L, Thermo Scientific, Oxoid, Japan).

2.5 Contagem de microrganismos termófilos a 55 °C

A partir da suspensão mãe (preparada da amostra, segundo descrito no ponto 2), foram preparadas diluições decimais sucessivas, tendo a quantificação sido realizada por inoculação em meio PCA (Merck, Darmstadt, Germany), segundo a norma NP 463:1984.

A incubação a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Memmert BE500) foi realizada em aerobiose e simultaneamente em anaerobiose, com recurso a um vaso de anaerobiose (Oxoid) e um kit de anaerobiose (AnaeroGen 2,5L, Thermo Scientific, Oxoid, Japan).

2.6 Contagem de fungos osmofílicos

A contagem de fungos osmofílicos, foi realizada com as mesmas amostras de chocolate descritas anteriormente.

A partir da suspensão mãe, foram preparadas diluições decimais sucessivas, tendo a quantificação sido realizada adaptando o descrito na norma ISO 21527-1/2:2008, por inoculação em meio osmofílico (MOS) com a seguinte composição para 1000 mL (Frutose 60 g, extrato de levedura 5 g e Agar 15 g, com pH7, e posterior esterilização em autoclave a 121°C durante 15 min) e incubação a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Certomat h, Germany). O meio MOS, foi usado em substituição do meio Dichloran-Glycerol agar (DG18) referido na norma.

2.7 Contagem de esporos de clostrídios sulfito-redutores

A suspensão mãe foi colocada em banho de água, para inativação das formas vegetativas durante 10 min a 80°C , seguido de um arrefecimento imediato em banho de gelo.

A partir da suspensão mãe foram preparadas diluições decimais sucessivas, tendo a quantificação sido realizada segundo a norma NP 2262:1986, por inoculação em meio Tryptone Sulfite Cycloserine Agar (TSCE) (Biokar, Beauvais, France) e incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Binder, Germany)

A contagem foi realizada segundo a norma usada, a partir das colônias típicas desenvolvidas.

2.8 Contagem de esporos a 30°C e 55°C

A suspensão mãe foi colocada em banho de água, para inativação das formas vegetativas durante 10 min a 80°C , no final foram arrefecidas em banho de gelo.

A partir da suspensão mãe, foram preparadas diluições decimais sucessivas, e inoculadas em meio PCA (Merck, Darmstadt, Germany), durante 48 horas na estufa a 30 °C (Sanyo Incubator, USA) e 55 °C (Mettler BE500).

2.9 Produção de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* para inoculação em chocolate

Foram produzidos esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, para posterior inoculação em amostras de chocolate previamente esterilizadas em autoclave (Raypa sterilclav-28), durante 15 min a 121 °C.

A produção de esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, foi realizada segundo descrito por (Dlugokenski et al., 2011).

Os esporos produzidos foram inoculados em meio de esporulação (MESP) com a seguinte composição para 1000 mL (Peptona 3 g, Triptona 5 g, extrato de carne 3 g, extrato de levedura 5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, $\text{C}_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, KHPO_4 0,05 g, Agar 16 g, com pH7,2, e posterior esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 min), a 57 °C em placas de 120 mm (100 µL, 200 µL, 300 µL) até 10 dias.

2.10 Resistência térmica dos esporos de *Geobacillus* em chocolate

Após a produção e quantificação dos esporos de *Geobacillus*, foi preparada uma suspensão, para posterior inoculação em diferentes amostras de chocolate.

A amostra de chocolate foi colocada a 44 °C (SalvisLab, Switzerland) durante 2/3 horas, para este ficar líquido. Posteriormente foi distribuído em garrafas de diluição e acrescentada H_2O de acordo com a percentagem desejada em cada formulação.

As amostras foram esterilizadas, durante 15 min a 121 °C em autoclave de bancada (Raypa sterilclav-28).

Após a esterilização, foram inoculados os esporos nas amostras (100 µL, $2,0 \times 10^8$ ufc/mL). Estas amostras foram novamente colocadas na autoclave (Raypa sterilclav-28), durante 4 min a 121 °C.

Simultaneamente foram inoculados esporos em amostras iguais às anteriores, mas sem tratamento térmico, agitando de forma a homogeneizar a amostra e os esporos.

Posteriormente foram efetuadas diluições decimais em PS (Merck, Darmstadt, Germany), e inoculadas em PCA (Merck, Darmstadt, Germany), durante 48 h a 57 °C (Memmert BE500).

No final foram efetuadas as contagens e cálculos, para verificar a eficiência do tratamento térmico nas diferentes formulações, comparando com as amostras iguais, mas sem o tratamento térmico.

2.11 Identificação e caracterização fenotípica dos isolados

Foram efetuados, para identificação fenotípica das espécies de esporos isolados, a coloração de Gram, teste de catálase e galerias bioquímicas. A utilização das galerias foi efetuada de acordo com o descrito pelo fabricante, inoculando a cultura num padrão McFarland 0,5, para BBL *Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit*, BBL *Crystal™ Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID Kit* e API® 50 CH – *Performance of carbohydrate metabolism tests*. Foram ainda realizados testes complementares, como testes de crescimento em NaCl e teste de nitratos.

Na caracterização dos isolados em termos de potencial deteriorativo, foi determinada a atividade lipolítica segundo a metodologia descrita por (G. Kouker, 1987), e a atividade proteolítica seguindo a metodologia descrita por (Saran, Isar, & Saxena, 2007), a produção de amilase e de lecitinase. Foram determinadas segundo as metodologias descritas por (Candy, 2009) e (Chakraborty, 2011). Os métodos utilizados foram os descritos nos artigos referidos a 6 °C e 37 °C.

2.12 Outros ensaios realizados

Para além da caracterização anteriormente descrita, foram realizadas outras análises complementares ao estudo noutras amostras de chocolate, tais como: a contagem de

microrganismos psicotróficos em anaerobiose e aerobiose, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella*. Estas análises foram realizadas na Unidade de Microbiologia Aplicada (UMA), laboratório com acreditação IPAC nºL0359, segundo métodos normalizados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio microbiológicos e resultados obtidos das amostras de matérias-primas e chocolate produzido pela Frulact

De acordo com o Regulamento (CE) Nº 2073/2005, o cacau e produtos de chocolate, em condições normais não exigem testes regulares. Estes produtos estão incluídos nos alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, que tem como limite 100 ufc/g.

Neste trabalho, foram analisadas 12 amostras de matéria-prima e chocolate produzido e sujeito a diferentes tratamentos pela Frulact, em diferentes parâmetros microbiológicos apresentados na Tabela 1. Os códigos usados nas amostras, foram fornecidos pela Frulact.

Estas análises, permitiram verificar a presença e quantificação de alguns microrganismos, com importância na produção e utilização do chocolate. O chocolate produzido pela Frulact, tem como objetivo a posterior incorporação em produtos lácteos, como o iogurte ou sobremesas com base de leite em forma de *stracciatella*.

Os resultados obtidos, permitem verificar que na maioria das amostras, a flora microbiana presente raramente ultrapassa os 10^3 ufc/g em microrganismos totais e termófilos, no caso dos esporos os valores raramente foram inferiores a 10^2 ufc/g.

Relativamente às matérias-primas, os valores obtidos na quantificação de esporos são inferiores aos obtidos no chocolate, exceto na de *massa cacau lascada*. Este facto pode ser explicado por um maior contacto do produto com equipamentos, o ar e com os manipuladores.

A amostra CHOCO 25 também apresentou valores de esporos superiores, uma vez que esta amostra foi retirada do equipamento sem o tratamento térmico completo.

A quantificação de *Salmonella*, efetuada às amostras CHOCO 1 e CHOCO 3 permitiu verificar que em ambas o resultado foi ausente em 25 g, como descrito por (Garcia, 2003), que refere que as matérias-primas não são uma fonte de contaminação, e que a sua

presença, pode indicar condições de higiene insuficientes durante o processo, desde a colheita até à produção do chocolate.

AMOSTRA	DATA	A (UFC/G)	B (UFC/G)	C (UFC/G)	D (UFC/G)	E (UFC/G)	F (UFC/G)	G (UFC/G)	H (UFC/G)	I (UFC/G)	J (UFC/G)	K PRESENÇA (25 G)	L (UFC/G)	M (UFC/G)	N (UFC/G)
CHOCO 1	20/10/15	1,5 x 10 ²	N _e =7,0 x 10	<10	<10	N _e =8,2 x 10	N _e =9,1 x 10	Presente (3,0 x 10 ² ufc/g)	<10	<10	<10	Ausente	<1	Presente (2,0 x 10 ufc/g)	---
CHOCO 3	20/10/15	N _e =7,0 x 10	<10	<10	<10	<10	<10	<100	<10	<10	<10	Ausente	<1	<10	---
CHOCO 5	18/11/15	2,6 x 10 ²	Presente (3,0 x 10 ufc/g)	---	---	N _e =7,0 x 10	N _e =6,0 x 10	Presente (2,0 x 10 ² ufc/g)	---	---	---	---	Presente<4 (1 ufc/g)	N _e =7,0 x 10	Presente (3,0 x 10 ufc/g)
CHOCO 6	18/11/15	<10	<10	---	---	<10	<10	<100	---	---	---	---	Presente<4 (2 ufc /g)	Presente (2,0 x 10 ufc/g)	<10
CHOCO 7	18/11/15	N _e =4,0 x 10	Presente (3,0 x 10 ufc/g)	---	---	1,5 x 10 ²	N _e =7,0 x 10	Presente (4,0 x 10 ² ufc/g)	---	---	---	---	<1	N _e =4,0 x 10	N _e =6,4 x 10
CHOCO 8	18/11/15	N _e =1,0 x 10 ²	Presente (2,0 x 10 ufc/g)	---	---	1,2 x 10 ²	N _e =7,0 x 10	<100	---	---	---	---	1,1 x 10	2,5 x 10 ²	2,1 x 10 ²
CHOCO 25	09/12/15	9,3 x 10 ²	<10	---	---	5,2 x 10 ²	N _e =9,0 x 10	<100	---	---	---	---	<1	1,7 x 10 ³	N _e =5,0 x 10
CHOCO 26	09/12/15	<10	<10	---	---	<10	<10	Presente (1,0 x 10 ² ufc/g)	---	---	---	---	<1	Presente (2,0 x 10 ufc/g)	<10
CHOCO 27	09/12/15	<10	<10	---	---	<10	<10	<100	---	---	---	---	<1	<10	<10

MANTEIGA CACAU EMB. 1	21/01/16	Presente (3,0 x 10 ufc/g)	<10	---	---	<10	<10	---	---	---	---	<1	<10	<10
MANTEIGA CACAU EMB. 1	21/01/16	<10	<10	---	---	<10	<10	---	---	---	---	<1	<10	<10
MASSA CACAU LASCADA	21/01/16	1,3 x 10 ³	1,0 x 10 ³	---	---	1,2 x 10 ³	1,6 x 10 ³	---	---	---	---	N _e =6,0	7,0 x 10 ²	1,7 x 10 ³

Tabela 1 - Resultados microbiológicos obtidos

Legenda:

A - Contagem Microrganismos totais a 30°C (aerobiose); **B** - Contagem Microrganismos totais a 30°C (anaerobiose); **C** – Contagem Microrganismos psicrotróficos (aerobiose); **D** – Contagem Microrganismos psicrotróficos (anaerobiose); **E** – Contagem Microrganismos Termófilos (55 °C, aerobiose); **F** – Contagem Microrganismos Termófilos (55 °C, anaerobiose); **G** – Contagem Fungos osmofílicos; **H** – Contagem *Enterobacteriaceae*; **I** – Contagem *E. coli*; **J** – Contagem de *Staphylococcus coag. +*; **K** – Pesquisa de *Salmonella*; **L** – Contagem de esporos de clostrídios sulfito-redutores; **M** – Contagem de esporos a 30 °C; **N** – Contagem de esporos a 55 °C.

A quantificação de fungos osmofílicos, permitiu verificar apenas a sua presença em níveis de aproximadamente 10^2 ufc/g em algumas das amostras com tratamento térmico. Na produção de chocolate, a presença de fungos osmofílicos verifica-se durante as primeiras horas de fermentação (Ardhana & Fleet, 2003), sendo reduzidos para concentrações não detetáveis após 24-36 horas. A sua presença nos níveis encontrados sugere uma contaminação ambiental do produto em amostras sujeitas a tratamento térmico (amostra CHOCO 26).

A presença destes níveis de fungos osmofílicos no produto final, pode ser resultado do local onde está a ser processado o chocolate, uma vez que o principal produto processado nesta unidade são frutas, o que pode levar a uma contaminação através do ambiente e dos equipamentos usados.

A quantificação de esporos nas amostras, foi efetuada a 30 °C e 55 °C, para pesquisa e quantificação de espécies esporulantes mesófilas e termófilas. A presença destes microrganismos nas amostras pode ser importante, uma vez que estes microrganismos podem ser patogénicos ou causadores de degradação das características do próprio produto. Os resultados obtidos permitiram verificar que na mesma amostra não existiu uma diferença significativa na contagem a 30 °C e a 55 °C.

A presença de microrganismos formadores de esporos, em todo o processo de produção do chocolate está descrito em (Ardhana & Fleet, 2003), o que veio a comprovar-se neste estudo, uma vez que foram detetados esporos bacterianos em todas as amostras de matéria-prima e chocolate. A análise, mostra que a maioria das estirpes isoladas cresceram a 55 °C, o que também vem de acordo com o descrito no estudo referido.

Dentro do conjunto de amostras analisadas existiram algumas diferenças, principalmente entre as matérias-primas e o produto final, o que pode indicar que esta contaminação ocorreu durante o processamento. De acordo com (Lücking et al., 2013) a presença de bactérias formadoras de esporos, no processamento pode ser preocupante, principalmente devido ao desconhecimento das suas capacidades termorresistentes, capacidade de deterioração e potencial toxico, uma vez que são contaminantes importantes.

A presença de bactérias formadoras de esporos resistentes ao calor, foi descrito (Lücking et al., 2013) como um problema para a qualidade do produto, mais do que para a segurança alimentar.

No entanto existem relatos que a presença de estirpes como *B. cereus* podem provocar toxinfecções alimentares. Estirpes isoladas de *B. pumilus* foram reportadas (From, Hormazabal, & Granum, 2007) como causadora de toxinfecções alimentares, causada pela produção de uma toxina em arroz cozinhado, mesmo em temperaturas baixas (15°C). Outras estirpes como *B. licheniformis*, foram relacionadas com toxinfecções alimentares resultantes da produção de toxinas em leite cru e alimentos para bebês produzidos industrialmente (Salkinoja-Salonen et al., 1999).

Considerando o limite de detecção do método pode dizer-se que os resultados obtidos permitem garantir que o chocolate tratado termicamente a 121°C durante 4 min tem menos de 10 ufc/g.

3.2 Caracterização das espécies isoladas

Após a quantificação dos microrganismos presentes nas amostras, efetuou-se o isolamento das espécies produtoras de esporos e respetiva identificação fenotípica. Esta identificação foi realizada com galerias bioquímicas, tendo sido realizados ensaios bioquímicos posteriores para verificar a atividade proteolítica, amilolítica, lipolítica e de produção de lecitinase das estirpes presentes nas amostras.

Tabela 2 - Identificação dos isolados

ESTIRPE	ATIVIDADE PROTEOLÍC A		ATIVIDADE LIPOLÍTIC A		ATIVIDADE AMILOLITICA		ATIVIDADE LECITINASE	
	48h 37°C	6°C 7dias s	48h 37°C	6°C 7dias s	48h 37°C	6°C 7dias	48h 37°C	6°C 7dias
ISOLADO CHO1 (<i>Bacillus pumilus</i>)	+	-	+	-	+	-	-	-
ISOLADO CHO2 (<i>Bacillus pumilus</i>)	+	-	+	-	+	-	-	-
ISOLADO CHO3 (<i>Bacillus megaterium</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
ISOLADO CHO4 (<i>Bacillus lentus</i>)	-	-	-	-	+	-	-	-
ISOLADO CHO5 (<i>Bacillus subtilis</i>)	-	-	+	-	+	-	+	-
ISOLADO CHO6 (<i>Bacillus megaterium</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
ISOLADO CHO7 (<i>Bacillus subtilis</i>)	-	-	-	-	+	-	+	-
ISOLADO CHO8 (<i>Paenibacillus polymyxa</i>)	-	-	-	-	+	-	+	-
ISOLADO CHO9 (<i>Bacillus subtilis</i>)	+	-	-	-	+	-	+	-
ISOLADO CHO10 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	+	-	-	-	+	-	+	-
ISOLADO CHO11 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	+	-	-	-	+	-	+	-
ISOLADO CHO12 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	+	-	+	-	+	-	-	-
ISOLADO CHO13 (<i>Brevibacillus laterosporus</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-
ISOLADO CHO14 (<i>Brevibacillus non REACTIVE</i>)	+	-	-	-	+	-	+	-

Os resultados obtidos, apresentam-se na Tabela 2 documentados.

Verificou-se que as estirpes mais frequentemente isoladas foram *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e *B. licheniformis*.

Após a identificação das estirpes e confirmação de Gram (+), as estirpes foram testadas a 37 °C durante 48 h e a 6 °C durante 7 dias para verificar a sua atividade proteolítica, amilolítica, lipolítica e de lecitinase.

Verificou-se que a 6 °C nenhuma das estirpes apresentou atividade proteolítica, amilolítica, lipolítica, lecitinase durante o tempo de incubação realizado. E que a 37 °C algumas das estirpes tiveram atividade proteolítica (57%), lipolítica (29%), amilolítica (71%) e de lecitinase (50%).

A presença de estirpes com atividade proteolítica, lipolítica, amilolítica e de lecitinase, pode afetar de forma relevante a qualidade do produto, uma vez que podem levar a degradação do produto. Estes esporos podem ser um dos principais problemas da contaminação das amostras, alterando de forma significativa a qualidade, mesmo que não sejam prejudiciais para a saúde do consumidor.

As estirpes isoladas, foram principalmente do género *Bacillus*. A presença de esporos desta espécie em chocolate, foi já descrita noutros estudos (Lücking et al., 2013), que referem também, que as estirpes tiveram capacidade de voltar a crescer, após serem colocadas em temperaturas de 13°C.

Este fenómeno dever ser tido em consideração ao longo do estudo, uma vez que o chocolate produzido será incorporado em produtos refrigerados, o que em amostras com contaminação inicial considerável, pode despoletar novamente crescimento, quando retirados da temperatura de conservação, ou em caso de abusos de temperatura.

Mesmo sem ser isolada nenhuma estirpe de *B. cereus*, a sua potencial presença no chocolate não pode ser ignorada, devido à sua toxicidade, uma vez que a presença desta espécie pode causar dois tipos de doença, dependendo da estirpe presente, estirpes eméticas, ou causadora de diarreias (Kumari & Sarkar, 2016).

As quantificações das amostras de chocolate analisadas apresentam valores que se encontram muito longe do valor com que a toxicidade destas estirpes normalmente se manifesta , na ordem dos 10^5 ufc/g a 10^8 ufc/g (Kumari & Sarkar, 2016).

Neste caso será muito importante que o tratamento térmico do chocolate consiga reduzir os valores de esporos de *Bacillus* presentes, pois, segundo (Rajkovic et al., 2008) a toxina emética do *B. cereus* pode resistir a condições de pH extremos, tratamentos térmicos severos e com elevada atividade proteolítica, que não é inativada pelo processamento nem no trato intestinal.

Como se verificou, todas as amostras possuem esporos, sendo isoladas diferentes espécies, podendo, no entanto, existirem outras espécies e estirpes presentes.

3.3 Resistência térmica de esporos no chocolate

O teste de resistência térmica de esporos no chocolate, foi realizado com uma amostra de chocolate com 75% de gordura, tendo sido efetuado para verificar a influencia da adição de água numa amostra inoculada com uma solução de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* (foi inoculado um volume de 100 µl, correspondendo a uma concentração final de aproximadamente 10^7 ufc/g de esporos).

Este ensaio foi realizado durante 4 minutos a 121°C em autoclave.

Este ensaio permitiu verificar a influência que a adição de água tem no efeito do tratamento térmico. Os resultados obtidos apresentam-se resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resistência térmica em chocolate com 75% de gordura

CHOCO75%GORDURA	4MIN121°C (UFC/G)	S/TRATAMENTO (UFC/G)	REDUÇÃO LOG10
AMOSTRA CHOCOLATE 10G	1,3E+07	1,3E+07	0,03
AMOSTRA CHOCOLATE 9,8G+2%H ₂ O	9,9E+06	2,5E+07	0,41
AMOSTRA CHOCOLATE 9,6G+4%H ₂ O	8,0E+06	2,0E+07	0,39
AMOSTRA CHOCOLATE 9,4G+6%H ₂ O	5,5E+05	2,1E+07	1,57
AMOSTRA DE 10,0G DE H ₂ O	1,3E+00	1,1E+07	6,91

Verificou-se que as amostras que sofreram o tratamento térmico, apresentam uma redução da quantidade de esporos, com exceção da amostra sem adição de água, que não sofreu qualquer redução.

A Figura 3, mostra de forma gráfica o efeito que o tratamento térmico teve nas amostras analisadas.

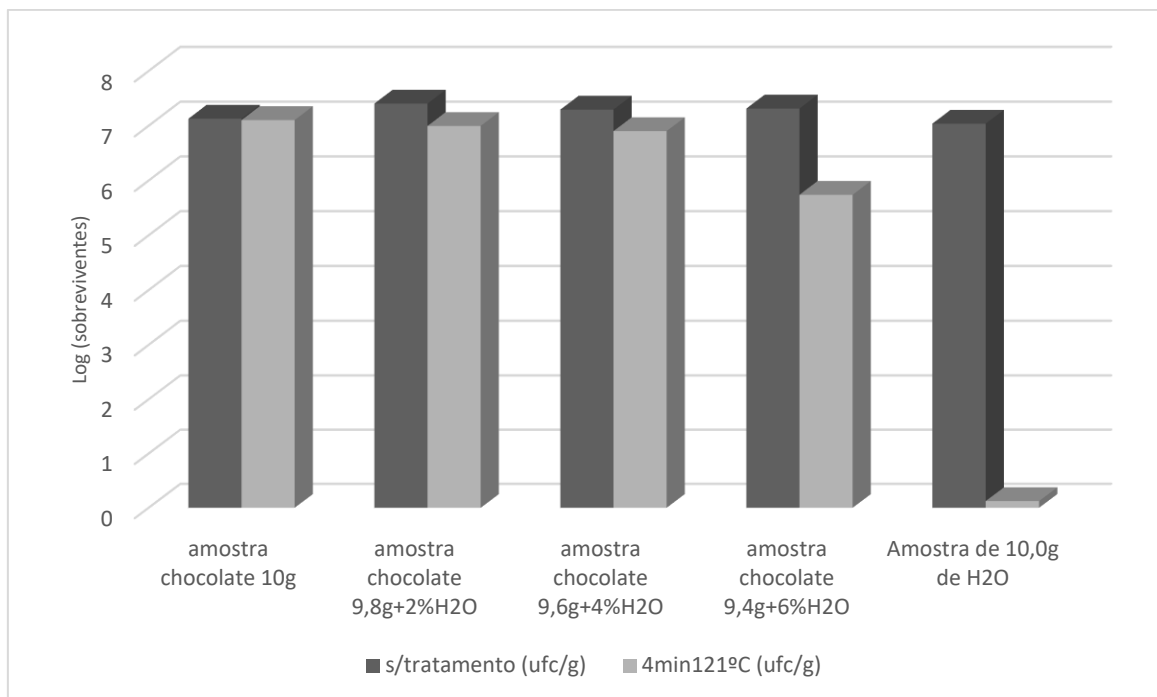


Figura 3 - Sobreviventes (esporos de *Geobacillus stearothermophilus*) após tratamento térmico a 125 °C durante 4 min

Neste gráfico mostra-se que a adição de água na amostra influencia a eficácia do tratamento térmico. Este facto pode ser devido à própria matriz do chocolate, nomeadamente em termos de elevada percentagem de gordura presente e baixa atividade da água, o que aumenta a resistência térmica dos esporos. No entanto este foi apenas um ensaio preliminar, já que os cálculos do tempo de redução decimal a diferentes temperaturas, e com adição de diferentes quantidades de água deverão ser realizados em condições isotérmicas, o que não foi o caso em virtude do elevado tempo de aquecimento e arrefecimento da autoclave durante os ensaios.

A presença de esporos termorresistentes em chocolate em pó foi já descrita (E. De Clerck, 2004), pelo que a realização de testes com esporos comprovadamente de resistência térmica elevada são fundamentais para a validação do tratamento térmico a efetuar.

A capacidade de esporos altamente resistentes a tratamentos térmicos severos foi também descrito por (B. Pettersson, 1996), o que pode ser uma preocupação para a produção de um chocolate estéril.

4 CONCLUSÕES

Este trabalho, realizado para caracterizar a flora microbiana em chocolate e verificar a eficácia do tratamento térmico na redução da mesma, permitiu concluir que as amostras analisadas possuíam uma flora microbiana muito variada, com incidência particular na presença de esporos bacterianos do género *Bacillus*.

Verificou-se também que embora a flora microbiana presente nas amostras de chocolate e matéria-prima fosse inferior a 10^3 ufc/g, as quantificações presentes nas matérias-primas foram inferiores às presentes nas amostras de chocolate.

O trabalho realizado, permitiu concluir que as amostras analisadas revelaram ausência de *Salmonella* (em 25g de chocolate) para *Salmonella*, e que os critérios microbiológicos estavam de acordo com os exigidos pelo Regulamento (CE) Nº2073/2005.

Concluiu-se ainda que a presença de fungos osmofílicos nas amostras analisadas podem ser resultado de contaminação durante a produção na empresa, já que não seria de esperar a presença de fungos no produto final, em particular, após a realização do tratamento térmico.

Relativamente à pesquisa de esporos, todas as amostras possuíam uma determinada quantidade de esporos, e que estes eram principalmente termófilos e muitos deles com atividade proteolítica, lipolítica, amilolítica e de lecitinase. Sendo por isso de alertar que esta situação pode ser um constrangimento para a qualidade do produto final, já que a inserção deste chocolate em matrizes com uma atividade de água elevada, como é o caso de alguns produtos láteos, poderá colocar em risco a qualidade do produto.

Note-se que a presença de esporos nas amostras, pode ainda ser causadora de problemas de saúde para os consumidores, pois muitas das estirpes são potenciais produtoras de toxinas, que podem levar a estados de doença.

Com este trabalho, foi também possível perceber que em amostras já contaminadas com esporos, a sua eliminação é dificultada pelas características do produto, sendo altamente resistentes aos tratamentos térmicos.

No entanto, verificou-se que as amostras com adição de água obtiveram maior redução de *esporos de Geobacillus stearothermophilus* que a amostra só com chocolate, e que a amostra com 6% de água foi a que teve uma maior redução.

Em suma, o trabalho realizado permitiu retirar conclusões importantes para o desenvolvimento do produto final.

Será, no entanto, necessário em futuros ensaios, verificar como surge a contaminação com fungos, e porque aumentam as quantificações de esporos nas amostras de chocolate, analisado também os equipamentos e local onde são produzidas as amostras, por forma a evitar eventuais contaminações cruzadas, particularmente em etapas após o tratamento térmico.

Recomenda-se ainda uma continuidade do estudo no sentido de avaliar o comportamento do chocolate, quando incorporado em iogurte, um alimento com condições adversas para os microrganismos, uma vez que tem um pH baixo e com temperaturas de conservação de refrigeração, e particularmente em relação ao crescimento de estirpes esporulantes potencialmente deterioradoras. Neste sentido a validação da eficiência do tratamento térmico, na redução da flora microbiana presente, e muito em particular, na redução adequada da concentração de esporos presentes deverá ser realizada através de estudos adicionais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87–99. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3
- B. Pettersson, F. L., P. Hammer, E. Stackebrandt, F.G. Priest. (1996). *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. In (Vol. 46, pp. 759–764): *International Journal of Systematic Bacteriology*.
- Beckett, S. T. (2009). *INDUSTRIAL CHOCOLATE - MANUFACTURE AND USE* (B. P. Ltd Ed. Stephen T. Beckett ed.).
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry, 4th revised and extended ed.* (S.-V. B. Heidelberg Ed.).
- Caligiani, A., Marseglia, A., Palla, G., Caballero, B., Finglas, P. M., & Toldrá, F. (2016). Cocoa: Production, Chemistry, and Use. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 185–190). Oxford: Academic Press.
- Candy, P., Roy, S., Thakur, A.R. and Chaudhuri, S.R. (2009). Comparative study on characterisation of three staphylococcal isolates from varied origin. In (Vol. J. Culture Collections, 6 (1), pp. 52–60).
- Cervellati, R., Greco, E., Costa, S., Guerra, M. C., & Speroni, E. (2008). A comparison of antioxidant properties between artisan-made and factory-produced chocolate. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(10), 1866–1870. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01765.x
- Chakraborty, S. P., Mahapatra, S.K., Roy, S. (2011). Biochemical characters and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates. In (Vol. 1, pp. 212–216): *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.
- Cooper, K. A., Campos-Gimenez, E., Alvarez, D. J., Nagy, K., Donovan, J. L., & Williamson, G. (2007). Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2841–2847. doi:10.1021/jf063277c
- da Silva do Nascimento, M., da Silva, N., da Silva, I. F., da Silva, J. d. C., Marques, É. R., & Barbosa Santos, A. R. (2010). Enteropathogens in cocoa pre-processing. *Food Control*, 21(4), 408–411. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.015
- Długokęski, R. E. F., Sella, S., Guizelini, B. P., Vandenberghe, L. P. S., Woiciechowski, A. L., Soccol, C. R., & Minozzo, J. C. (2011). Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 713–719. doi:10.1007/s00253-011-3160-3
- E. De Clerck, T. V., T. Hebb, J. Geerinck, J. Devos, P. De Vos. (2004). Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. In (Vol. 70, pp. 3664–3672): *Applied and Environmental Microbiology*.
- EFSA, E. F. S. A. (2015). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013*. EFSA Journal 2015;13(1):3991.

EFSA, E. F. S. A. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. In.

Elisabete Tavares, M. C. (2017). Negócios de chocolate. *Negócios de chocolate. Expresso, Exame*.

EUR-Lex- Acesso ao direito da União Europeia. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>

F. Postollec, A. G. M., M. Bernard, M.L. Divanac'h, S. Pavan, D. Sohier. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. In (Vol. 158, pp. 1–8): *International Journal of Food Microbiology*.

Foods), I. I. C. o. M. S. f. (2000). *Microorganisms in foods 6: Microbiological ecology of food commodities*.

From, C., Hormazabal, V., & Granum, P. E. (2007). Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 319-324. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005

G. Kouker, K. E. J. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. In (Vol. 53(1), pp. 211–213): *Appl Environ Microbiol*.

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

Gu, L. W., House, S. E., Wu, X. L., Ou, B. X., & Prior, R. L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4057-4061. doi:10.1021/jf060360r

ICCO, I. C. O. *ICCO Annual Reports 2012/2013*. Retrieved from <http://www.icco.org/>

Kumari, S., & Sarkar, P. K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69, 20-29. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.012>

Lima, L. J. R., Kamphuis, H. J., Nout, M. J. R., & Zwietering, M. H. (2011). Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food Microbiology*, 28(3), 573-582. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.011>

Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 270-279. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004>

Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., In't Veld, P., . . . Debevere, J. (2008). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology*, 46(5), 536-541. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02350.x

Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kampfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., & Scoging, A. C. (1999). Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4637-4645.

Saran, S., Isar, J., & Saxena, R. K. (2007). A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. In (Vol. 70).

Schumacher, A. B., Brandelli, A., Schumacher, E. W., Macedo, F. C., Pieta, L., Klug, T. V., & de Jong, E. V. (2009). Development and evaluation of a laboratory scale

conch for chocolate production. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(3), 616-622. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01877.x
Statista, T. S. P. (2015). Statistics and facts on the chocolate industry. Retrieved from <https://www.statista.com/topics/1638/chocolate-industry/>

6 APÊNDICES

Tabela 4 - Resultados obtidos no teste de resistência térmica

Choco75%gordura 30/12/2015

4min121°C	A					F				
	amostra chocolate 10g/garrafa					s/tratamento				
	c1	d1	c2	d2	Resultado	c1	d1	c2	d2	Resultado
	1	119	-5	19		120	-5	10	-6	
	2	131	-5	11		172	-5	14	-6	
	3	109	-5	10		117	-5	12	-6	
	Resultado ufc/g				1,3E+07	Resultado ufc/g				1,3E+07
4min121°C	B					G				
	amostra chocolate 9,8g+0,2gH2O/garrafa					s/tratamento				
	c1	d1	c2	d2	Resultado	c1	d1	c2	d2	Resultado
	1	86	-5	10		246	-5	19	-6	
	2	99	-5	11		269	-5	26	-6	
	3	110	-5	12		257	-5	23	-6	
	Resultado ufc/g				9,9E+06	Resultado ufc/g				2,5E+07
4min121°C	C					H				
	amostra chocolate 9,6g+0,4gH2O/garrafa					s/tratamento				
	c1	d1	c2	d2	Resultado	c1	d1	c2	d2	Resultado
	1	76	-5	8		210	-5	26	-6	
	2	89	-5	8		194	-5	18	-6	
	3	85	-5	7		186	-5	18	-6	
	Resultado ufc/g				8,0E+06	Resultado ufc/g				2,0E+07

Controles

PCA p/A;B;C;D	NEGATIVO
PCA p/F;G;H;I	NEGATIVO
PCA p/E;K;L;M	NEGATIVO
K 55°C	<1
K 30°C	<1
K ESP 30°C	<1
K ESP55°C	<1
L 55°C	<1
L 30°C	<1
L ESP 30°C	<1
L ESP55°C	<1
M 55°C	<1
M 30°C	<1
M ESP 30°C	<1
M ESP55°C	<1

4min121°C	D					I					
	amostra chocolate 9,4g+0,6gH2O/garrafa					s/tratamento					
	c1	d1	c2	d2	Resultado	c1	d1	c2	d2	Resultado	
	1	45	-4	5		-3	4,5E+05	200	-5		17
	2	99	-4	3	-3	9,3E+05	214	-5	22	-6	2,1E+07
	3	66	-4	5	-3	6,5E+05	209	-5	19	-5	2,1E+07
	Resultado ufc/g					5,5E+05	Resultado ufc/g				
4min121°C	E					J					
	Amostra de 10,0g de H2O					s/tratamento					
	c1	d1	c2	d2	Resultado	c1	d1	c2	d2	Resultado	
	1	0	0	-1		1,0E+00	102	-5	9		-6
	1	0	0	-1	1,0E+00	120	-5	10	-6	1,2E+07	
	2	0	0	-1	2,0E+00	111	-5	9	-6	1,1E+07	
	Resultado ufc/g					1,3E+00	Resultado ufc/g				