

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

**ESTUDO PARA MINIMIZAR AS PERDAS DE FLAVONÓIDES
DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE CACAU
PARA PRODUÇÃO DE CHOCOLATE**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

PRISCILLA EFRAIM

Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. NELSON HORACIO PEZOA GARCÍA

Orientador

Dra. DENISE CALIL PEREIRA JARDIM

Co-orientadora

CAMPINAS - 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Efraim, Priscilla
Ef77e Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante
a fermentação de sementes de cacau para produção de
chocolate / Priscilla Efraim. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Nelson Horacio Pezoa Garcia
Co-orientador: Denise Calil Pereira Jardim
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Cacau. 2.Chocolate. 3.Flavonóides. 4.Fermentação.
5.Enzimas – Inibidores. I.Pezoa Garcia, Nelson Horacio.
II.Jardim, Denise Calil Pereira. III.Univerisdade Estadual
de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García

Universidade Estadual de Campinas

Orientador

Prof^a. Dra. Délia Rodriguez Amaya

Universidade Estadual de Campinas

Membro

Prof^a. Dra. Hilary Castle de Menezes

Universidade Estadual de Campinas

Membro

Prof^a. Dra. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix

Universidade Estadual de Campinas

Membro

Dedico aos meus pais, Betty e Simão,
pela enorme importância em minha vida, pelo
apoio constante, por toda dedicação, carinho
e amor.

**“Conhecer não é o ato através do qual
um sujeito transformado em objeto recebe
dócil e passivamente os conteúdos que o
outro lhe dá ou lhe impõe. O conhecimento
pelo contrário, exige uma presença curiosa
do sujeito em face do mundo. Requer sua
ação transformadora. Demanda uma busca
constante. Implica invenção e reinvenção.”**

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que certamente me acompanhou e me acompanhará sempre, por toda minha vida e em todos os momentos;

Ao Professor Horacio e a Denise, orientadores maravilhosos, que não apenas auxiliaram e participaram do trabalho científico, como também me proporcionaram grandes exemplos de vida (de integridade, amizade e perseverança);

Ao Beto, por todo carinho, ajuda e amor;

Às minhas queridas amigas/irmãs Bin, Ju e Ka, que já fazem parte da minha vida há muito tempo (graças a Deus!);

À Professora Eva Magalhães, pelo grande apoio no início do trabalho, pelo carinho e atenção;

À Amanda por toda ajuda durante o trabalho;

À Nádia e ao Aduino pela grande ajuda e amizade;

À Marinalda, e à pesquisadora Maria Luiza Tucci pela experiente e valiosa colaboração;

Ao pessoal do CEREAL CHOCOTEC (Ana Lúcia, Marise, Luccas, Fernanda, Cris, Ana Elisa, Lu, Magali, Marquinhos, Marina, Lindalva) por todo apoio, ajuda, carinho;

Ao Mauro e Eliana Coelho, que forneceram os frutos utilizados no trabalho;

Ao pessoal do Laboratório de Frutas (Aninha, Pri, Alê, Ana Vânia, Fer, Rafa, Dani, Elisângela, Joyce, Marcus);

Ao Renato e ao Professor Marcos Eberlin por todo auxílio e por ceder o equipamento do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas;

À Prof^a. Hélia e ao Cláudio Aguiar por toda ajuda no início do trabalho;

Ao Rodrigo pela valiosíssima amizade; ao Gonzaga pelo maravilhoso alto astral;

À CAPES pelo apoio financeiro;

À todos que auxiliaram neste trabalho.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Situação mundial da cacauicultura	6
3.1.1 Perspectivas para o cacau brasileiro.....	8
3.2 O Cacau.....	9
3.2.1 Aspectos Gerais.....	9
3.2.2 Valor Ecológico	10
3.2.3 Variedades	10
3.2.4 As sementes de cacau Forastero.....	12
3.3 Pré-processamento do cacau	14
3.3.1 Quebra dos frutos.....	14
3.3.2 Fermentação	14
3.3.3 Secagem	19
3.3.4 Torração	19
3.4 Processamento do Chocolate.....	20
3.4.1 Mistura dos ingredientes	20
3.4.2 Refino.....	21
3.4.3 Conchagem.....	21
3.5 Compostos Fenólicos	22
3.5.1 Polifenóis.....	22
3.5.2 Polifenóis do cacau	30
3.6 Enzimas presentes no cacau.....	34
3.7 Efeitos à saúde do cacau e do chocolate	36

3.7.1 Efeito antioxidante dos polifenóis do cacau	37
3.7.2 Inibição da ativação e função das plaquetas.....	38
3.7.3 Manteiga de cacau: a principal gordura do chocolate	39
3.7.4 Possíveis efeitos negativos do cacau e do chocolate à saúde.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Material	43
4.1.1 Frutos de cacau.....	43
4.1.2 Inibidores Enzimáticos	43
4.1.3 Equipamentos	43
4.1.4 Reagentes	44
4. 2 Métodos	44
4.2.1 Caracterização física dos frutos e sementes.....	45
4.2.2 Fermentação e tratamento dos ensaios	45
4.2.3 Secagem	47
4.2.4 Caracterização física das amêndoas fermentadas e secas	47
4.2.5 Preparo dos nibs	48
4.2.6 Características físico-químicas dos nibs	48
4.2.7 Determinação dos compostos fenólicos.....	49
4.2.8 Preparo dos chocolates.....	52
4.2.9 Análise Sensorial.....	57
4.2.10 Determinação do teor de cobre remanescente	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1 Caracterização física dos frutos e sementes	61
5.1.1 Frutos	61
5.1.2 Sementes	62
5.2 Parâmetros avaliados durante a fermentação e secagem das sementes de cacau	62
5.2.1 Sólidos solúveis.....	62
5.2.2 Temperatura do ambiente e da massa de fermentação.....	63

5.2.3 Controle do pH da massa de sementes de cacau durante a fermentação	65
5.3 Caracterização física das amêndoas fermentadas e secas.....	66
5.4 Classificação das amêndoas fermentadas e secas	68
5.5 Características físico-químicas dos nibs de cacau	70
5.5.1 Acidez Titulável, pH e ácidos orgânicos.....	70
5.5.2 Composição Química das amêndoas de cacau	73
5.5.3 Compostos Fenólicos Totais das sementes frescas, durante a fermentação e ao término da secagem.....	75
5.5.4 Proantocianidinas totais das sementes frescas, durante a fermentação e ao término da secagem.....	77
5.5.5 Flavan-3-óis e procianidinas das sementes frescas, em diferentes dias de fermentação e ao término da secagem	78
5.6 Caracterização dos chocolates produzidos a partir dos liquors obtidos dos diferentes ensaios de fermentação.....	84
5.6.1 Propriedades reológicas dos chocolates produzidos a partir dos liquors obtidos dos diferentes ensaios de fermentação	85
5.7 Análise Sensorial dos chocolates produzidos a partir dos liquors obtidos dos diferentes ensaios de fermentação.....	87
5.8 Teores residuais Sulfato de Cobre	92
5.9 Atividade inibidora das substâncias químicas adicionadas.....	93
6. CONCLUSÕES	95
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO I - Controle do pH da massa de sementes de cacau durante a fermentação	107
ANEXO II - Controle da temperatura das caixas de fermentação e média obtida para cada ensaio.....	108
ANEXO III: Intensidades obtidas por espectrometria de massas dos flavonóides das sementes de cacau durante as etapas de fermentação e secagem.....	109
ANEXO IV - Controle de temperatura e umidade do ambiente de fermentação em diferentes tempos.....	110

TABELAS

Tabela 1 - Concentração em base seca dos polifenóis totais, catequina e epicatequina em <i>liquors</i> de cacau de diferentes países.....	2
Tabela 2 – Distribuição percentual da produção mundial de cacau entre 1993 e 2002.	7
Tabela 3 - Composição das células de armazenamento dos polifenóis em relação ao tecido total de sementes de cacau da variedade <i>Forastero</i>	13
Tabela 4 - Principais classes de compostos fenólicos.	23
Tabela 5 - Classificação dos flavonóides encontrados em alimentos.	25
Tabela 6 - Quantidades de flavan-3-ol e procianidinas ($\mu\text{g/g}$) em amêndoas de cacau desengorduradas ao longo da fermentação.	33
Tabela 7. Caracterização das principais enzimas ativas durante a fermentação de sementes de cacau	34
Tabela 8 - Programa desenvolvido para o Reômetro Brookfield modelo RVDVIII.	55
Tabela 9 – Formulação utilizada na produção dos chocolates a partir dos <i>liquors</i> obtidos em cada ensaio.	57
Tabela 10 – Caracterização dos frutos de cacau <i>in natura</i> da variedade <i>Forastero</i>	61
Tabela 11 – Dimensões e massa média das sementes de cacau <i>in natura</i>	62
Tabela 12 – Valores obtidos para sólidos solúveis da polpa aderida às sementes de cacau durante a etapa de fermentação.....	62
Tabela 13 – Controle de temperatura e umidade da sala climatizada utilizada para a fermentação de sementes de cacau em diferentes tempos.	63
Tabela 14– Caracterização física das amêndoas fermentadas e secas dos diferentes ensaios	67
Tabela 15 - Composição em frações das amêndoas de cacau dos diferentes ensaios.....	68

Tabela 16 – Resultados da prova de corte efetuada nas amêndoas fermentadas e secas.....	69
Tabela 17 – Valores de acidez titulável, pH e ácidos orgânicos das amêndoas fermentadas e secas de cacau.	70
Tabela 18 - Composição química das amêndoas fermentadas e secas e da semente fresca liofilizada.	73
Tabela 19 – Teor de fenólicos totais de sementes frescas, durante a fermentação e ao término da secagem dos diferentes ensaios	75
Tabela 20 – Concentração das proantoacianidinas totais das amêndoas de cacau durante a fermentação e na etapa de secagem.....	77
Tabela 21 – Teor de perda total dos flavan-3-óis e procianidinas desde o início do processo (semente fresca) ao término da etapa de secagem.....	82
Tabela 22 - Umidade e tamanho de partículas dos chocolates	84
Tabela 23 - Parâmetros reológicos e coeficientes de correlação médios dos chocolates produzidos a partir dos <i>liquors</i> dos diferentes ensaios	86
Tabela 24 - Resultados médios obtidos no teste de aceitabilidade das amostras de chocolate produzidas a partir dos <i>liquors</i> dos diferentes ensaios	87

FIGURAS

Figura 1 – Frutos verdes e maduros de cacau da variedade <i>Forastero</i>	9
Figura 2 – Corte transversal de um fruto de cacau da variedade <i>Forastero</i>	11
Figura 3 – Corte longitudinal de semente de cacau;	13
Figura 4 – Reações observadas na semente de cacau durante a fermentação, após a morte do gérmen.	17
Figura 5 - Reações observadas durante a fermentação do cacau (LOPEZ, 1974 <i>apud</i> VASCONCELOS, 1999).	18
Figura 6 - Estrutura básica e sistema numérico de flavonóides	25
Figura 7 - Esquema da biossíntese e interconexão entre flavonóides.	28
Figura 8 – Fluxograma de pré-processamento e processamento dos chocolates a partir de frutos de cacau.	44
Figura 11 – Concha longitudinal utilizada para pré-tratamento dos <i>liquors</i>	54
Figura 12 – Reograma de Casson.....	56
Figura 13 – Ficha de avaliação sensorial utilizada no estudo.....	59
Figura 14 – Variação da temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação para os diferentes ensaios: A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).	64
Figura 15– Controle de pH da polpa nas caixas de fermentação dos diferentes ensaios: A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).	66

Figura 16 - Espectro típico obtido por Ressonância Magnética Nuclear para determinação dos ácidos orgânicos presentes nas sementes fermentadas e secas dos diferentes ensaios.....	71
Figura 17. Concentração dos principais ácidos orgânicos monitorados para os diferentes ensaios após fermentação e secagem das sementes.....	72
Figura 18 - Espectrograma típico obtido no espectrômetro de massas Q-Trap com os flavan-3-ol (unidade monomérica) e procianidinas (unidades poliméricas).	79
Figura 19 – Histogramas referentes aos teores de flavan-3-óis (unidades monoméricas) e procianidinas (unidades poliméricas) mantidos nos diferentes dias de processo: a. até o terceiro dia de fermentação; b. até o sétimo dia de fermentação e c. ao término da etapa de secagem.....	81
Figura 20 - Distribuição em frequência dos valores da escala atribuídos pelos consumidores às amostras de chocolate quanto à aceitabilidade global (a), do sabor (b), do aroma (c); dulçor (d) e amargor (e)	91
Figura 21 - Reação de degradação de composto fenólico pela atuação da enzima polifenoloxidase catalisada pelo cobre iônico.....	94

RESUMO

As sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.) da variedade *Forastero* são extremamente ricas em compostos fenólicos, que representam em média 15 a 20% de seu peso seco e desengordurado, sendo que 60% pertencem à classe dos flavonóides, compostos apontados atualmente como responsáveis pela prevenção de doenças coronárias, diminuição do colesterol sérico, auxiliares do sistema imunológico, entre outros. Durante a etapa de fermentação, são perdidos, em média, 70% dos flavonóides devido a importantes reações bioquímicas que ocorrem principalmente pela diminuição do pH, aumento de temperatura (45-50°C) e atuação de certas enzimas presentes no fruto ou produzidas pelos microrganismos que participam desta etapa. Tais reações são, em parte, responsáveis pela redução do amargor e da adstringência melhorando assim o desenvolvimento do sabor do chocolate. Desta forma, o presente trabalho visou modificar a etapa de fermentação de sementes de cacau para a produção de chocolate rico em flavonóides sem prejudicar seu sabor. Para isso, procurou-se inibir as enzimas que são possivelmente as principais responsáveis pela perda dos flavonóides através da adição de inibidores químicos (bissulfito de sódio e sulfato cúprico) na etapa de fermentação. Foram realizados sete experimentos distintos: ensaios A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); ensaios B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e ensaios D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente). Os resultados indicaram que, de uma forma geral, todos os tratamentos propostos mantiveram maior teor de compostos fenólicos em relação à fermentação convencional (ensaio A). Quanto aos compostos fenólicos totais, o ensaio D apresentou a maior retenção (62,70%) desde o início da fermentação ao término da secagem, enquanto que no ensaio A foram retidos 36,38% destes compostos. Em relação aos flavan-3-óis e procianidinas, observou-se maior

retenção, para monômeros, nos ensaios D (34,27%) e G (33,72%); para dímeros, nos ensaios D (21,83%) e G (21,78%); para trímeros, nos ensaios C (22,85%), D (22,37%) e F (22,38); para quadrâmeros, nos ensaios C (25,84%), D (24,77%) e F (27,21) e para pentâmeros, nos ensaios C (35,24%), D (34,45%) e F (34,16). Observou-se que a maior perda dos compostos fenólicos estudados ocorreu entre o término da fermentação e a secagem. Verificou-se que o residual de Cobre remanescente da adição feita durante a fermentação (ensaios D e E) nos *liquors* e nos chocolates produzidos foi de 0,23 e 0,36mg de cobre/100g de *liquor* (ensaios D e E respectivamente) e 0,025 e 0,036mg de cobre/100g de chocolate (ensaios D e E respectivamente), todos valores consideravelmente inferiores ao Limite Máximo Tolerado (LMT) definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), correspondente a 3,0mg de cobre/100g de amostra. Os chocolates produzidos a partir dos ensaios B, C, D e E mostraram aceitabilidade sensorial igual ou melhor ao convencional (A), enquanto que os produzidos a partir dos ensaios F e G apresentaram aceitabilidade mediana e incertezas com relação a intenção de compra.

SUMMARY

Cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) from the *Forastero* variety are very rich in phenolic compounds which represent 15-20% of the defatted dry weight. The principal compounds are (+)-catechin, (-)-epicatechin and 60% of procyanidins that belong to the flavonoid class. These compounds are currently been considered responsible for coronary heart disease prevention, lowering the serum cholesterol and helping the immunological system. During the fermentation, 70% of the total phenolic compounds are lost in important biochemical reactions accelerated by the reduction in pH, temperature increase (45-50°C) and action of some enzymes, present in the fruit or produced by the microorganism growing at this stage. These reactions contribute to a reduction in bitterness and astringency, improving the flavor of the chocolate. The objective of this work was to modify the fermentation stage of cocoa seeds to produce flavonoid-rich chocolates without prejudicing its flavor. This was done by the inactivation of enzymes probably responsible for flavonoid degradation, through the addition of chemical inhibitors (sodium bisulfite and cupric sulphate) during the fermentation stage. Seven experiments were carried out: Experiments A and G (conventional fermentations during 7 and 3 days respectively); experiments B, C and F (modified fermentations during 7 days, with the addition of 5mg, 10mg and 5mg of sodium bisulfite/100g of cocoa seeds with pulp after 48hs, 48hs and 120hs since the beginning of fermentation respectively) and experiments D and E (modified fermentations during 7 days, with the addition of 5mg and 10mg of cupric sulphate/100g of cocoa seeds with the pulp after 48hs and 120hs since the beginning of fermentation respectively). The results showed that all the treatments proposed maintained higher quantities of phenolic compounds as compared with the conventional experiment (A). Considering the total phenolics, experiment D showed the highest retention (62,70%) from the beginning of the fermentation up to the end of the drying stage, while in the experiment A, the retention was 36,38%. Considering the flavan-3-ols and procyanidins, a higher retention of monomers was observed in experiments D (34,27%) and G (33,72%); of dimers in experiments D (21,83%) and G (21,78%); of

trimers in experiments C (22,85%), D (22,37%) and F (22,38); of tetramers in experiments C (25,84%), D (24,77%) and F (27,21) and of pentamers in experiments C (35,24%), D (34,45%) and F (34,16). It was observed that the greatest loss of the phenolic compounds studied occurred between the end of fermentation and the beginning of the drying stage. It was shown that the copper residue in the liquor and chocolate remaining from the addition during fermentation (experiments D and E) was 0,23 and 0,36mg of copper/100g of liquor (experiments D and E respectively) and 0,025 e 0,036mg of copper /100g of chocolate (experiments D and E respectively). These values are below the Maximum Tolerated Limit (MTL) defined by ANVISA for this metal (3,0mg/100g). The chocolates B, C, D and E showed equal or better sensory acceptance as compared with conventional (A), and F and G chocolates which showed average sensory acceptance and uncertainty with respect to buying intention.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de chocolate atualmente é de aproximadamente 5 milhões de toneladas/ano (GIL, 2001), sendo o Brasil o quinto maior produtor mundial. O chocolate é um produto apreciado mundialmente por pessoas de todas as idades, principalmente pelo seu sabor inigualável. Acredita-se que pessoas não consumam chocolate em maiores quantidades temendo possíveis problemas à saúde que possa causar, considerando-se que, em geral, um chocolate é composto de 40 a 50% de açúcar e 25 a 45% de gordura, incluindo aquela presente no leite (no caso de chocolate ao leite) e a manteiga de cacau.

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que as doenças cardiovasculares (DCV) provocam cerca de 12 milhões de mortes por ano em todo mundo, causando a morte de uma pessoa a cada trinta e três segundos na América do Norte (LEONG & CHUAH, 2001). No Brasil, de acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, as DCV's causam 172 mil mortes/ano. É neste sentido que, em busca de uma vida mais saudável, as pessoas têm se preocupado mais com a prevenção ao invés da cura de doenças já instaladas. Dessa maneira, a alimentação vem sendo vista como uma excelente forma de auxiliar na redução do risco de contração de doenças, levando a um aumento considerável das pesquisas científicas relacionadas aos constituintes dos alimentos que causam ou não benefícios à saúde, ao desenvolvimento de novos produtos, denominados atualmente pelo mercado de “alimentos funcionais”, bem como de seu consumo em todo mundo.

Estudos clínicos feitos em humanos têm revelado que as sementes de cacau atuam benéficamente à saúde, principalmente em relação a doenças cardiovasculares (REIN, 2000; MAO, 2000; HAMMERSTONE, 1999; KONDO, 1996), devido a presença de altos teores de polifenóis, grupo de compostos que atuam como antioxidantes, antimicrobianos, ativadores do sistema imunológico entre outros. Hammerstone, *et al.* (1999) identificou e quantificou compostos fenólicos de sementes de cacau e chocolate, encontrando uma grande variedade

destes compostos, incluindo os mais complexos, raramente encontrados em quantidades tão elevadas em outros alimentos. Estudos preliminares feitos em humanos apresentados no Simpósio da Reunião Anual de Exposição da Inovação Científica da Associação Americana de Avanços da Ciência (*Annual Meeting of the American Association for the Advancement of Sciences – AAAS*) nos Estados Unidos, indicaram que o consumo de chocolates ricos em flavonóides proporciona benefícios à corrente sangüínea, associados com a saúde do coração. O processo de obtenção dos chocolates utilizados nestes estudos preliminares resultou em uma patente cuja detentora é a empresa Mars *Incorporated* (Kealey *et al.*, 1998). O método utilizado pela empresa envolve a mistura de sementes de cacau fermentadas por 2 a 3 dias (pouco fermentadas e com pouco desenvolvimento de sabor, porém, ricas em compostos fenólicos) com sementes fermentadas durante 6 a 7 dias e de alta qualidade (bem fermentadas e, portanto, com ótimo desenvolvimento de sabor, porém com baixo teor de compostos fenólicos).

A variedade de cacau *Forastero* é a mais utilizada mundialmente pela indústria de chocolates e confeitos. As sementes do cacau brasileiro desta variedade possuem elevada concentração de compostos fenólicos, comparadas com as sementes da mesma variedade de vários outros países produtores de cacau conforme apresenta a Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração em base seca dos polifenóis totais, catequina e epicatequina em *liquors* de cacau da variedade *Forastero* de diferentes países

Origem das sementes de cacau fermentadas da variedade <i>Forastero</i>	Polifenóis Totais (%)	Catequina (%)	Epicatequina (%)
Colômbia	11,40	0,43	1,22
Equador	9,20	0,49	1,02
Costa do Marfim	6,70	0,31	0,35
Brasil	13,00	0,41	1,68
Ghana	9,70	0,31	0,82

Fonte: Sanbongi *et al.*, 1998.

Sanbongi *et al.* (1998) ressalta ainda que sementes frescas de Ghana possuem teores de polifenóis totais, catequina e epicatequina de 19,90; 2,10 e 7,91%, o que sugere que há uma perda de aproximadamente 50% de polifenóis totais, 85% de catequinas e 90% de epicatequinas durante a fermentação das sementes de cacau. Segundo Brito (2000), o teor de fenóis totais diminui cerca de 70% na etapa de fermentação, sendo que a (-)-epicatequina sofre redução de 90% em sua concentração inicial. Isso tem ligação com a formação do sabor desejável do chocolate; ou seja, a degradação dos compostos fenólicos, seja por complexação com as proteínas, ou por modificação bioquímica é uma das responsáveis pelo desenvolvimento do sabor desejável do chocolate, sendo, portanto, precursora de sabor no pré-processamento do chocolate.

Considerando os atributos funcionais concedidos atualmente aos flavonóides e sem desconsiderar sua importância ao sabor dos produtos de chocolate, tornou-se relevante um estudo sobre uma forma alternativa de fermentação das sementes de cacau conservando maior quantidade de compostos fenólicos sem grandes prejuízos ao sabor, para a obtenção de chocolate rico em flavonóides.

Uma vez que as sementes de cacau da variedade *Forastero* provenientes do Brasil contêm teores de compostos fenólicos, inclusive da classe dos flavonóides, mais elevados em relação aos outros países produtores; que as sementes desta variedade exigem um tempo de fermentação de 5 a 7 dias para um melhor desenvolvimento de sabor e que os flavonóides são perdidos em grande quantidade ao término da fermentação (do quinto ao sétimo dias), pela atuação de enzimas; a proposta do presente trabalho foi utilizar inibidores químicos enzimáticos durante a etapa de fermentação do cacau procurando minimizar a degradação dos flavonóides sem, no entanto, impedir que as reações desejáveis ao desenvolvimento do sabor de chocolate ocorressem. Quando a fermentação das sementes de cacau da variedade *Forastero* é feita por apenas três dias, um grande teor de compostos fenólicos é mantido, principalmente por

não haver tempo suficiente para sua degradação. Por outro lado, o desenvolvimento de sabor é bastante prejudicado devido ao elevado amargor e adstringência. Por isso, trabalhou-se com diferentes ensaios de fermentação: fermentação convencional durante sete dias (a qual foi utilizada como padrão em termos de sabor); fermentação convencional durante três dias (a qual foi utilizada como padrão em retenção de compostos fenólicos); e cinco fermentações modificadas com duração de sete dias através da adição de substâncias químicas como o bissulfito de sódio e o sulfato cúprico em diferentes teores; possibilitando não apenas obter matérias-primas para a produção de chocolate com elevado teor de flavonóides como também com bom desenvolvimento de sabor e conseqüentemente, com boa aceitação pelo mercado consumidor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de processos alternativos de fermentação do cacau utilizando inibidores enzimáticos seletivos para a obtenção de matérias-primas para a produção de chocolate com maior retenção de flavonóides.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação da importância da influência das enzimas polifenoloxidase e glicosidases na fermentação do cacau;
- Quantificação relativa e absoluta da perda dos compostos fenólicos totais e flavonóides de interesse durante as etapas de fermentação e secagem;
- Obtenção de equilíbrio entre alta concentração de flavonóides e sabor agradável dos chocolates produzidos com as matérias-primas obtidas na fermentação modificada e nas etapas subsequentes.
- Produção de chocolates utilizando-se os *liquors* obtidos;
- Testes sensoriais de aceitabilidade que permitiram escolher o produto mais agradável sensorialmente e com alto teor de compostos fenólicos, em especial da classe dos flavonóides.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Situação mundial da cacauicultura

O cacau tem importância econômica no contexto internacional por ser um *commodity* de participação relevante no comércio mundial de produtos agrícolas tanto em importações quanto exportações. Observando-se a Tabela 2, constata-se que a produção mundial de amêndoas de cacau vem caindo. Em 2002 foram produzidas 2,83 milhões de toneladas em comparação com 3,16; 3,44 e 3,11 milhões de toneladas produzidas respectivamente em 1999, 2000 e 2001. O maior produtor, em 2002, foi a Costa do Marfim com um milhão de toneladas, seguido de Ghana, Indonésia, Nigéria e Brasil (GUYTON, 2003).

A África Ocidental detém cerca de 68% da produção mundial. A Costa do Marfim é a maior produtora da região e do mundo, detendo 35,3% em 2002. Entretanto, a situação atual deste país envolve uma grave crise política ocasionada por uma guerra civil e rebeliões armadas. Além disso, nas fazendas ao leste, as árvores estão envelhecidas, ocasionando diminuição em sua produtividade ano após ano. Outro fator que gera um decréscimo na produtividade é o ataque por fungos, caracterizado pela Podridão Parda, a qual tem contribuído com consideráveis perdas na produção. Em Ghana, espera-se um aumento na produção de 6,0% para 2002/03, em parte pelo programa desenvolvido pelo governo para controlar a disseminação da Podridão Parda e em parte pela diminuição do intercâmbio de cacau pelas fronteiras de Ghana com a Costa do Marfim. Nigéria e Camarões juntos produzem 16% do cacau da África Ocidental (GUYTON, 2003).

Nas regiões da Ásia e Oceania, a Indonésia é o maior produtor, detendo 80% da produção da região. As condições climáticas têm sido favoráveis ao norte do país, porém, a seca ao sul não vem auxiliando a produção. As plantações da região enfrentam uma doença causada por um lagarto (*Conopomorpha cramerella*) que se instala nas árvores, impedindo o desenvolvimento das

sementes de cacau. Com isso, espera-se declínio de 1% na produção. Na Malásia, espera-se aumento de 7% na produção (GUYTON, 2003).

A produção na América vem aumentando. Para o Equador, espera-se um aumento de 6%. O maior aumento na produção é previsto para o Brasil (16,5%), pelas condições climáticas favoráveis e pelos extensivos programas desenvolvidos para selecionar árvores resistentes às doenças fúngicas (GUYTON, 2003).

Tabela 2 – Distribuição percentual da produção mundial de cacau entre 1993 e 2002.

	PRODUÇÃO MUNDIAL DE CACAU (%)									
	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Costa do Marfim	30,0	30,3	37,5	38,0	37,1	36,6	41,3	40,6	38,6	35,3
Ghana	9,5	10,8	13,5	12,4	10,7	12,5	12,6	12,7	13,2	13,4
Indonésia	9,7	9,1	9,3	10,8	10,9	13,1	14,0	13,5	10,9	12,3
Nigéria	11,5	12,1	6,8	10,0	10,6	11,3	7,1	9,8	10,9	11,9
Brasil	12,8	12,4	10,0	8,2	9,2	8,6	7,0	5,6	6,0	6,1
Camarões	3,7	4,0	4,5	4,0	4,2	3,8	3,7	3,6	3,7	4,0
Equador	3,1	3,0	2,8	2,9	2,8	1,1	3,0	2,9	3,4	3,8
México	2,0	1,6	1,7	1,2	1,5	1,4	1,3	0,8	1,5	2,0
Malásia	7,5	6,7	4,4	3,7	3,5	2,8	2,7	2,9	3,2	1,8
Colômbia	2,2	1,9	1,9	1,5	1,7	1,6	1,6	1,3	1,5	1,7
República Dominicana	2,0	2,4	2,2	2,1	1,9	2,1	0,8	1,1	1,5	1,6
Mundial										
(milhões de toneladas)	2,67	2,67	2,99	3,24	3,02	3,28	3,16	3,44	3,11	2,83

Fonte: FAO, 2003.

3.1.1 Perspectivas para o cacau brasileiro

O cacau, além de ter sido de grande importância para a economia brasileira e para o Estado da Bahia principalmente na década de setenta, foi determinante para gerar riquezas de muitos outros países produtores. Neste período, cerca de 90% da produção brasileira era exportada (Bastos, 1987), sendo que desde 1997, a grande queda na produção tem obrigado o Brasil a importar sub-produtos de cacau para consumo da indústria de alimentos (ALVES, 2003).

O maior impedimento à produção brasileira de cacau vem sendo causado pelas doenças fúngicas. Entre elas, a vassoura-de-bruxa é a mais importante. A queda na produção nacional nos últimos anos pode ser explicada, em parte, pela introdução do patógeno causador da vassoura-de-bruxa do cacaueiro: *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer na Bahia em 1989 (PEREIRA *et al.*, 1990). A CEPLAC (Comissão Executiva para o Plano da Lavoura Cacaueira) tem recomendado, para a reabilitação de plantas suscetíveis à vassoura-de-bruxa, o uso de variedades cloniais resistentes por meio de enxertia (ROSA, 1998). O uso destas variedades é uma das estratégias adotadas pela CEPLAC para reverter, o mais rápido possível, o quadro de degradação em que se encontram as plantações nos pólos produtores de cacau na Bahia. Com isso, através de reprodução assexuada, é possível transmitir todo o potencial genético de uma planta (produtividade, qualidade de semente, tolerância à vassoura-de-bruxa) aos seus descendentes, aumentando a esperança de recuperação e de garantia do futuro da cultura cacaueira com a permanência da vasta e densa cobertura vegetal remanescente da Mata Atlântica, que serve de proteção a essa lavoura. Com a enxertia do cacaueiro há uma previsão da retomada da produção. Considerando-se a enorme demanda pelos sub-produtos de cacau e a queda mundial na produção acelerada pela crise política na região da Costa do Marfim, o Brasil se apresenta hoje como um país com grande perspectiva de aumento em sua produção.

3.2 O Cacau

3.2.1 Aspectos Gerais

O cacaueiro é uma planta nativa das matas equatoriais da região amazônica. Pertence à família *Esterculiaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma Cacao*. O nome da planta é de origem asteca: *cacahuatl* (cacau) ou *cacahuaquahuitl* (cacaueiro); o nome chocolate vem da bebida, *tchocoatl*, de origem maia, que já era consumida há mais de três mil anos (LAJUS, 1982). A Figura 1 apresenta os frutos verdes e maduros em um cacaueiro da variedade *Forastero*.



Figura 1 – Frutos verdes e maduros de cacau da variedade *Forastero*.
Fonte: COCOAPRO, 2002.

A partir das flores pequenas, avermelhadas, inodoras, unidas ao tronco, se originam as bagas ou frutos, que medem até 25cm de comprimento. Quando maduros, adquirem tonalidade alaranjada, amarela ou roxa (dependendo da variedade). Contêm cinquenta ou mais sementes envoltas por uma polpa mucilagínosa. O cacaueiro pode viver mais de cem anos, começando a frutificar com três, produzindo abundantemente a partir dos oito e mantendo produção satisfatória até os trinta anos. Regiões com temperaturas médias anuais entre 24

e 28°C possuem as melhores condições para o cultivo. Temperaturas inferiores a 12°C impedem ou reduzem a frutificação (LAJUS, 1982).

3.2.2 Valor Ecológico

Ao lado da indiscutível importância econômica, o cacau tem um grande valor ecológico. Cultivado racionalmente, em condições que se assemelham às do seu "habitat" natural, em florestas, com um sombreamento permanente de árvores de maior porte, o cacaueiro protege o solo dos efeitos da erosão e da lixiviação (carreamento de elementos nutritivos pelas águas). Suas plantações substituem a floresta original sem destruir o ambiente ecológico existente, preservando a heterogeneidade e com ela o micro-clima e a vida das espécies vegetais e animais das áreas cultivadas. Sob este aspecto o cacaueiro difere de outros cultivos brasileiros que por suas próprias características se transformaram em lavouras itinerantes, deixando, ao longo de sua passagem, vastas áreas de terras esgotadas e improdutivas. Na paisagem rural brasileira, há vários exemplos de cultivos que empobrecem e degradam o ambiente. O cacaueiro, embora mais exigente quanto às condições de clima e solo, restitui à terra grande parte daquilo que dela retira, mantém o equilíbrio ecológico e se constitui num cultivo perene, renovável e permanente. Este caráter de lavoura eminentemente estável confere ao cacau uma significativa importância ambiental (CEPLAC, 2003).

3.2.3 Variedades

Com base na origem botânica e na expansão geográfica da espécie, distinguem-se duas variedades de cacau cultivadas: *Criollo* e *Forastero*. Os frutos de cacau *Criollo* são caracterizados pela forma alongada, com ponta proeminente. Sua superfície externa é enrugada e possui cinco sulcos longitudinais profundos e cinco menos pronunciados. As sementes são ovais e se encontram relativamente soltas na polpa. Os cotilédones não contêm células pigmentadas, sendo, portanto, de coloração branca. São encontrados principalmente na Venezuela, América

Central, México, Java, Ceilão e Samoa (LAJUS, 1982; MATTIETTO, 2001; LOPES, 2000).

A variedade *Forastero* é caracterizada por frutos com forma mais arredondada, casca dura e superfície quase lisa. As sementes são achatadas, de forma quase triangular e se encontram firmemente alojadas à polpa. Os cotilédones têm coloração violeta por possuírem células pigmentadas (LAJUS, 1982). Em comparação ao cacau *Criollo*, cujo aroma é considerado suave e de excelente qualidade, o cacau da variedade *Forastero* tem um sabor mais ácido e característica adstringente. É encontrado em todos os países produtores de cacau do mundo. Possui frutos com cerca de 25cm de comprimento e 10cm de diâmetro. Cada fruto contém entre 30 e 50 sementes que são envolvidas por uma mucilagem denominada de polpa, com coloração branca a levemente rosada, sabor doce e ácido. Nos frutos maduros, a placenta se encontra solta entre as sementes. A Figura 2 mostra um corte transversal de um fruto de cacau da variedade *Forastero*.

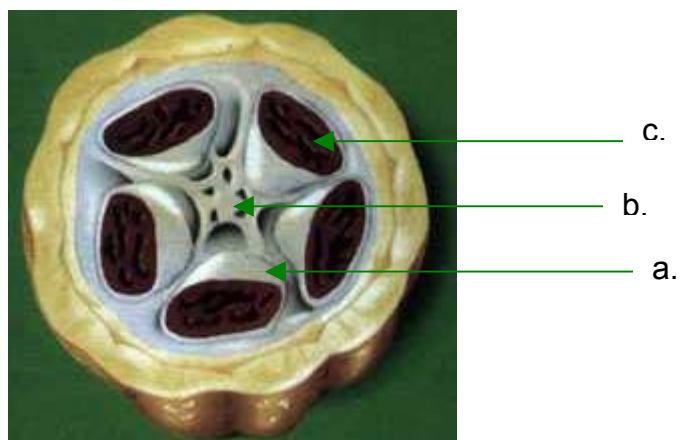


Figura 2 – Corte transversal de um fruto de cacau da variedade *Forastero*.

a: polpa mucilaginosa; b: placenta; c: cotilédono

Fonte: GRAPIUNAMENTE, 2002.

As formas híbridas entre as variedades *Forastero* e *Criollo* são denominadas Trinitário, que conservam características das duas variedades que as originaram: sabor frutal e suave da variedade *Criollo* e maior resistência a pragas da variedade *Forastero*. Os países produtores são essencialmente aqueles

que cultivam o tipo *Criollo*: Trinidad, Venezuela, Ceilão, Indonésia e República dos Camarões.

3.2.4 As sementes de cacau *Forastero*

Para melhor compreensão do que se passa no interior das sementes de cacau durante a fermentação e nas outras etapas subseqüentes, torna-se importante examinar sua constituição e histologia. As sementes têm forma de amêndoas, sendo por esta razão denominadas de amêndoas de cacau. Em geral, esta denominação é reservada às sementes que já perderam sua capacidade de germinação, o que ocorre durante a fermentação. A semente é composta de casca, membrana prateada ou endosperma, dois cotilédones e radícula. Possui, em geral, 2,5cm de comprimento em média (LAJUS, 1982).

Segundo Bradeau (1970), o tecido dos cotilédones é constituído por dois tipos de células: o primeiro apresenta pigmentos compostos de polifenóis (taninos, catequinas, antocianinas e proantocianidinas) e metilxantinas (teobrominas e cafeína); já o segundo são células de reserva, que contêm amido, gorduras, proteínas e enzimas. As células de armazenamento de polifenóis na amêndoa representam entre 11 e 13% do total e as de reserva representam aproximadamente 90%, ocupando maior volume nos tecidos (BECKETT, 1988). A Tabela 3 apresenta a composição das células de armazenamento dos polifenóis em relação ao tecido total.

A Figura 3 ilustra as diferentes partes da semente de cacau. As matérias-primas para a produção do chocolate (manteiga de cacau e *liquor*) são extraídas dos cotilédones, comercialmente chamados *nibs*. Antes da fermentação, apresentam coloração violácea e aspecto compacto; após a fermentação e secagem, devem apresentar coloração marrom, sulcos e serem friáveis.



Figura 3 – Corte longitudinal de semente de cacau;
a: casca; b: cotilédones; c: gérmen ou embrião.

Fonte: GRAPIUNAMENTE, 2002.

Tabela 3 - Composição das células de armazenamento dos polifenóis em relação ao tecido total de sementes de cacau da variedade *Forastero*.

Composto	(%)* de compostos na célula armazenadora	% de compostos nos cotilédones
Catequina	25,0	3,0
Proantocianidina	21,0	2,5
Proantocianidinas (olig.)	17,5	2,1
Antocianinas	3,0	0,4
Fenóis totais	66,5	8,0
Teobromina	14,0	1,7
Cafeína	0,5	0,1
Açúcares livres	1,6	
Polissacarídeos	3,0	
outros	14,4	

* Base seca

Fonte: BECKETT, 1988

3.3 Pré-processamento do cacau

3.3.1 Quebra dos frutos

Após a colheita, os frutos devem ser quebrados e deles retiradas as sementes com a polpa aderida, que serão submetidas à fermentação. O período 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.

3.3.2 Fermentação

A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de boa qualidade. Segundo Minifie (1989), a fermentação e a secagem das sementes de cacau são de vital importância, sendo que nenhum outro processamento posterior é capaz de corrigir falhas nesta etapa. No processo de fermentação, o sistema, a temperatura do ambiente e da massa, o pH e a acidez da polpa e do cotilédono, o tempo de processo, o revolvimento da massa bem como a microflora presente são fatores de grande importância (ROHAM & CONNEL, 1964; LOPEZ & QUESNEL, 1973). Os sistemas mais comuns para fermentação são: montes, caixas, cestos, sacos de lona, gavetas de madeira, etc.

O desenvolvimento dos microrganismos que participam desta etapa é propiciado pela polpa mucilagínosa que envolve as sementes de cacau, que em geral é caracterizada por conter cerca de 80 a 90% de água, 10-13% de açúcares, sendo 1/3 sacarose e 2/3 monoses e pH variando entre 3,5-3,6. (FORSYTH & QUESNEL, 1963). Esse meio, associado ao baixo teor de oxigênio disponível devido a compactação da massa no interior dos montes ou cochos de fermentação, é excelente para o desenvolvimento de leveduras, as quais multiplicam-se rapidamente e são responsáveis pela fermentação alcoólica inicial (ROELOFSEN, 1958). A polpa dos frutos de cacau sadios é isenta de microrganismos, contaminando-se imediatamente durante a quebra dos frutos

pelas mãos dos operadores e depois pela exposição ao ambiente (LAJUS, 1982). A atividade microbiana provoca aumento da temperatura da massa, que contribui para o término do poder germinativo da semente. Tem-se então condições propícias às reações bioquímicas, que culminam com a síntese dos precursores de sabor e aroma.

A microflora, que pode naturalmente variar de acordo com as condições existentes e com a atividade microbiana, desenvolve-se na seguinte seqüência: leveduras, bactérias produtoras de ácido láctico, bactérias produtoras de ácido acético e bactérias esporulantes.

Para sementes da variedade *Forastero*, a etapa de fermentação tem duração de 5 a 7 dias. Segundo Forsyth & Quesnel (1958), há duas fases definidas e distintas de reações que ocorrem no interior do cotilédone durante a fermentação:

Fase I (Hidrólise Anaeróbica): Inicia-se no momento em que os frutos são partidos e pode durar até 48 horas. No primeiro dia, a polpa aderida começa a se tornar líquida, sendo então drenada, e a temperatura aumenta gradativamente. Nestas condições anaeróbicas, microrganismos produzem álcool etílico, e em seguida, ácido acético, responsáveis em conjunto pela morte do gérmen e conseqüente perda da capacidade de germinação. É a partir deste momento que as sementes podem ser chamadas de amêndoas de cacau (LAJUS, 1982). Este processo contribui para modificações estruturais, como a remoção da compartimentação celular das enzimas e de seus substratos (proteínas, compostos fenólicos, entre outros) (WOLLGAST & ANKLAN, 2000). Segundo Brito (2000), líquidos celulares se movem através das paredes, se espalhando por todo o grão de cacau. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50° C. Nessa fase, há uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor da semente. A difusão dos ácidos para o interior do cotilédone contribui para reações enzimáticas, propiciando ainda proteção contra bactérias

putrefativas, evitando prejuízos ao sabor devido à produção de ácidos graxos voláteis C3 a C5 (QUESNEL, 1968; HARDY, 1961).

Fase II (Condensação Oxidativa): Fase posterior à hidrólise anaeróbica e que freqüentemente se sobrepõe a esta. Ressalta-se a oxidação dos polifenóis que formam ou não complexos com as proteínas e peptídeos levando a redução da adstringência e do amargor. A oxidação observada nesta fase continua na etapa de secagem até que a umidade atinja um ponto mínimo no qual cessa a atividade da polifenoloxidase. (FORSYTH & QUESNEL, 1963).

A produção de ácidos durante a etapa de fermentação está relacionada com a aeração da massa de sementes (QUESNEL, 1968). Foram observadas reduções na acidez através do aumento na freqüência de revolvimentos (LOPEZ & MCDONAL, 1982; SCHAWN *et al.*, 1990). Os ésteres do ácido acético, retidos no interior das amêndoas depois de secas, são responsáveis pelo sabor frutal de alguns produtos de cacau. Quando em excesso, concedem um sabor ácido desagradável que deprecia o produto (LOPEZ & MCDONAL, 1982). Jinap & Dimick (1990) estudaram as amêndoas de cacau fermentadas, secas e torradas quanto ao pH, acidez titulável, ácidos voláteis e não voláteis. Amêndoas provenientes do Extremo Oriente se mostraram significativamente mais ácidas que as da América Central e oeste da África, não apresentando diferença significativa em relação às da América do Sul. Amêndoas com alta acidez foram caracterizadas pela alta concentração de ácido acético e láctico. Os resultados indicaram que elevados teores de ácido acético estavam relacionados com elevados valores de pH e acidez titulável.

A Figura 4 ilustra as reações observadas por Beckett (1988) em sementes de cacau durante sua fermentação e o fluxograma apresentado na Figura 5 as descreve.

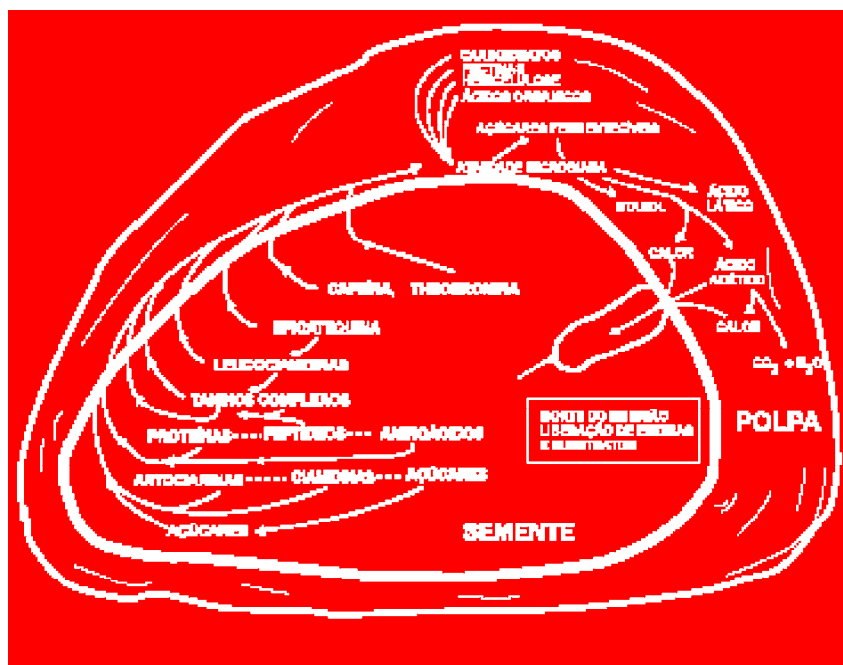


Figura 4 – Reações observadas na semente de cacau durante a fermentação, após a morte do gérmen.

Fonte: BECKETT, 1988

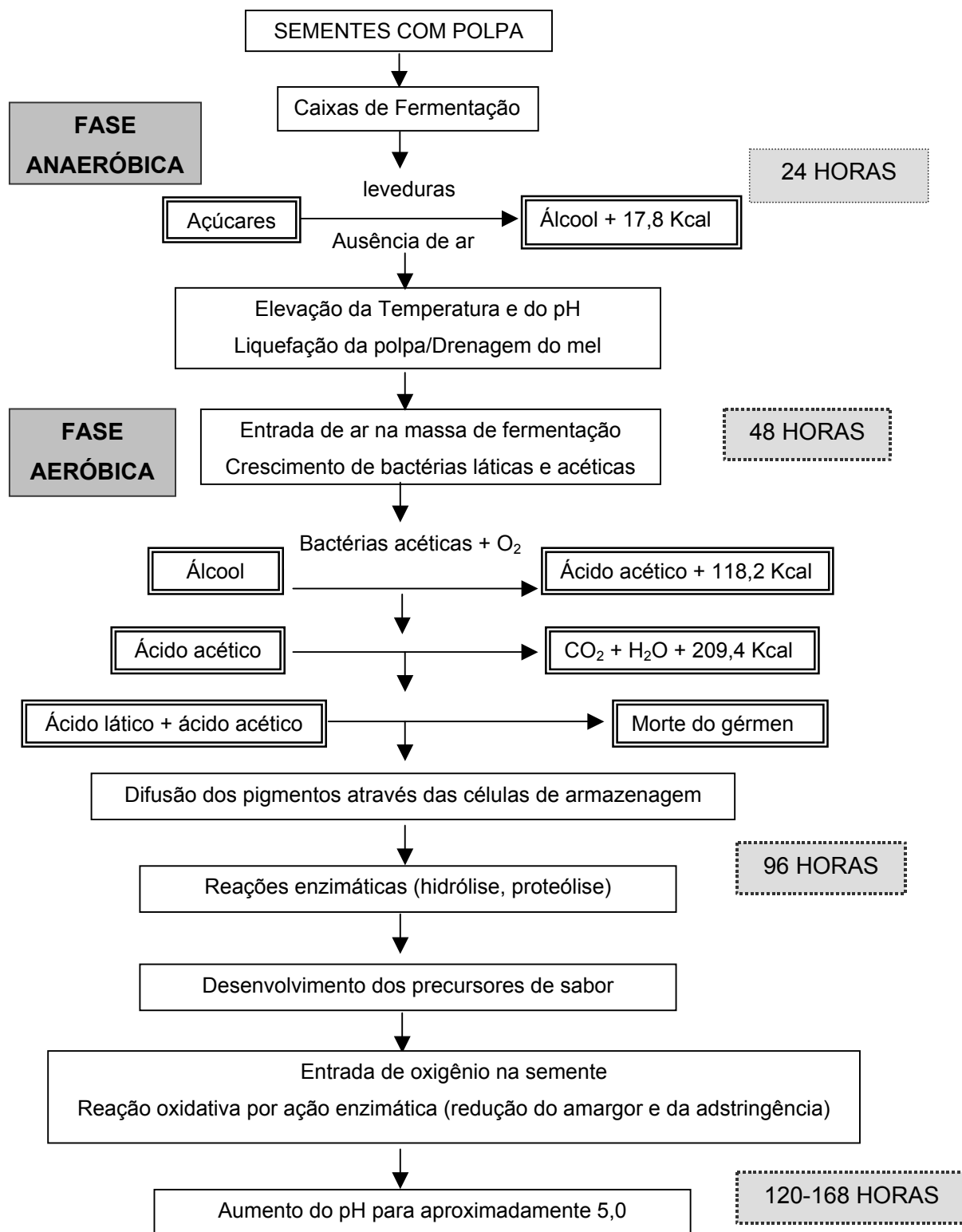


Figura 5 - Reações observadas durante a fermentação do cacau (LOPEZ, 1974 *apud* VASCONCELOS, 1999).

3.3.3 Secagem

Esta etapa deve ser iniciada imediatamente após a fermentação. Não deve ser lenta ou mal conduzida para que não possibilite o desenvolvimento de fungos que, quando presentes, conferem sabor desagradável ao produto final. Segundo Crespo (1985), apenas 3% de amêndoas contaminadas já proporcionam sabor desagradável ao *liquor* de cacau, impossível de ser eliminado em processos posteriores. Por outro lado, a secagem não deve ser efetuada de forma demasiadamente rápida através do emprego de temperaturas elevadas, para evitar problemas com a gordura (manteiga de cacau) e com o desenvolvimento do sabor do chocolate. Muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam nesta etapa. Segundo Lopez & Quesnel (1973) e Rohan & Stewart (1967), a taxa de umidade das amêndoas deve ser reduzida de 40-50% para 6-8%.

3.3.4 Torração

A torração é fundamental na obtenção das características de qualidade do chocolate. Em condições ótimas, há o desenvolvimento máximo do potencial aromático da amêndoa (Zamalloa, 1994). Segundo Pezoa-Garcia (1989) e Mermet *et al.* (1992) *apud* Brito (2000), as condições de torração dependem de vários fatores: origem e tipo de amêndoa, período de colheita, tratamentos anteriores à torração, umidade, tamanho das amêndoas e dos *nibs*. É uma operação térmica caracterizada pelos seguintes fenômenos:

- perda do teor de água;
- diminuição dos ácidos voláteis indesejáveis (principalmente acético);
- inativação de enzimas que podem degradar a manteiga de cacau;
- desenvolvimento de aromas desejáveis através da Reação de Maillard partindo dos precursores formados na etapa de fermentação;
- desenvolvimento da coloração típica do chocolate.

3.4 Processamento do Chocolate

O chocolate pode ser definido como uma suspensão de partículas sólidas (açúcar, sólidos de cacau e sólidos de leite) em uma fase gordurosa contínua, que também contribui para o aroma, sabor, cor, além de promover forma ao produto final. Deve fundir rápido e completamente em temperatura próxima à do corpo humano, caso contrário, poderá promover um pobre desprendimento de aroma/sabor e, provavelmente, um residual ceroso (VISSOTO *et al.*, 1999). No Brasil, segundo a antiga legislação (CNNPA, 1978), a denominação chocolate só poderia ser empregada para aqueles produtos os quais se tenha utilizado, para compor a fase gordurosa, apenas manteiga de cacau e/ou gordura de leite, sem adição de outras gorduras vegetais alternativas, devendo conter 32% de sólidos de cacau. Segundo a Resolução - RDC nº 227, de 28 de agosto de 2003 da ANVISA, o chocolate passa a ser denominado como o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao*): massa de cacau, cacau em pó e manteiga de cacau com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% de sólidos totais de cacau (ANVISA, 2003). Com essa nova resolução, torna-se possível produzir chocolates utilizando-se gorduras vegetais alternativas além da manteiga de cacau, o que permitirá reduzir os custos de produção.

As matérias-primas básicas para a produção de chocolate são o *liquor* (obtido pelo refino da massa de cacau), a manteiga de cacau e o açúcar, podendo-se ou não adicionar leite e derivados lácteos. O processo tradicional de produção de chocolate envolve as seguintes etapas:

3.4.1 Mistura dos ingredientes

A etapa de mistura consiste na homogeneização dos ingredientes em pó (açúcar, leite em pó) com os ingredientes líquidos e semi-líquidos (manteiga de cacau e *liquor* de cacau fundidos), por tempo suficiente para se transformarem em uma massa plástica adequada para o refino. Essa etapa é feita, em geral, em

tachos encamisados a 40°C, para garantir que a manteiga de cacau permaneça fundida.

3.4.2 Refino

A etapa de refino é de grande importância no processamento do chocolate, pois reduz o tamanho das partículas dos ingredientes tornando-os imperceptíveis na boca durante a degustação do produto final. O teor de gordura influencia esta etapa, sendo que massas muito secas (com menores teores de gordura) são refinadas mais rapidamente, porém, apresentam tamanho de partículas mais elevado que o ideal. Por outro lado, um teor elevado de gordura faz com que a massa fique muito fluida, deslizando lentamente nos cilindros de refino. Dessa forma, permanece maior tempo nos cilindros, provocando diminuição excessiva do tamanho de partículas. Segundo Beckett (1988), a maioria das partículas da massa refinada deve ter até 40µm, mas na prática, tamanhos maiores que 25µm proporcionam arenosidade na boca ao degustar o chocolate, e por outro lado, tamanhos inferiores a 20µm podem causar problemas tecnológicos, uma vez que levam ao aumento da viscosidade e do limite de escoamento, dificultando os processos posteriores (LUCCAS, 2001).

3.4.3 Conchagem

Esta etapa tem como principais objetivos a volatilização de compostos indesejáveis formados durante a fermentação das sementes de cacau (ácidos como o acético), a diminuição da umidade proveniente dos ingredientes e, por outro lado, a formação de aromas desejáveis por reações como a de Maillard. A conchagem também é importante para a homogeneização dos ingredientes. Desta forma, são necessários, nesta etapa, o cisalhamento da massa, agitação e aquecimento entre 50 e 70°C, dependendo do tipo de chocolate desejado (ao leite, branco ou amargo). Quanto maior o tempo de conchagem, maior é a formação do sabor desejável do chocolate. Por isso, no método tradicional, esta etapa pode

levar de 8 a 96 horas, dependendo do tipo de produto que se deseja e do equipamento que se dispõe (BECKETT, 1988).

Para caracterização física, química e reológica de chocolates, são determinadas suas propriedades de escoamento, teor de gordura, distribuição do tamanho de partículas e teor de umidade (BECKETT, 1988).

3.5 Compostos Fenólicos

3.5.1 Polifenóis

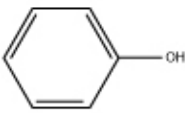
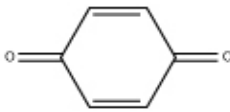
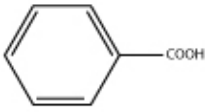
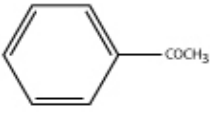
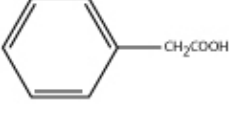
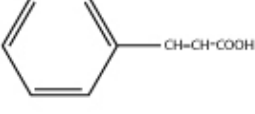
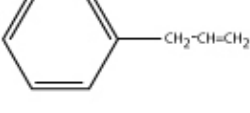
Os polifenóis ou compostos fenólicos são uma classe de compostos que ocorrem em frutas, vegetais, *nuts*, sementes, flores, bebidas e alguns alimentos industrializados, como componente de um ingrediente natural que foi adicionado. Constituem um dos mais numerosos e largamente distribuídos grupos de substâncias do reino das plantas, com mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas (BRAVO, 1998).

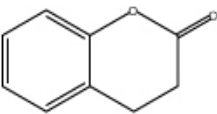
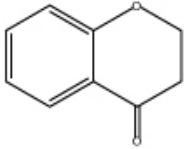
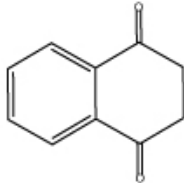
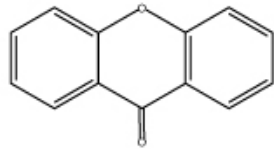
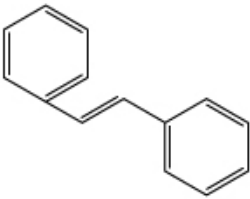
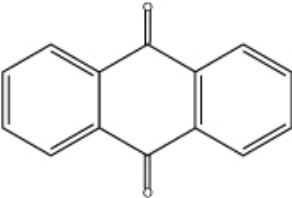
São produtos do metabolismo secundário de plantas, surgindo biogeneticamente de dois principais caminhos primários de síntese: caminho do chiquimato e do acetato (BRAVO, 1998). Ambos o ácido acético e o ácido chiquímico são derivados do metabolismo da glicose (FORMICA & REGELSON, 1995; SCHWARZE, 1958 in WOLLGAST & ANKLAN, 2000). O ácido acético, em sua forma ativa acetil co-A, ou depois no caminho como malonil co-A, representa o ponto inicial da síntese de ácidos graxos em um caminho primário e é apenas ponto inicial em um caminho secundário para a síntese do anel A dos flavonóides. O chiquimato representa o caminho primário para a produção de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina). Sua degradação leva ao caminho do fenilpropanóide, considerado secundário. Este caminho é aparentemente essencial à sobrevivência de plantas terrestres, provendo aos seus constituintes, como a lignina, importante papel mecânico e estrutural. Dessa maneira, os

compostos derivados do caminho do fenilpropanóide têm papéis distintos na fisiologia das plantas.

Os polifenóis podem ser divididos em pelo menos 10 diferentes classes de compostos, dependendo de sua estrutura básica. A Tabela 4 ilustra a estrutura química básica dos principais compostos polifenólicos.

Tabela 4 - Principais classes de compostos fenólicos.

Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Fenóis simples	C_6	
Benzoquinonas	C_6	
Ácidos fenólicos	$C_6 - C_1$	
Acetofenonas	$C_6 - C_2$	
Ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$	
Ácidos hidroxicinâmicos	$C_6 - C_3$	
Fenilpropanonas	$C_6 - C_3$	

Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Coumarinas, isocoumarinas	$C_6 - C_3$	
Cromonos	$C_6 - C_3$	
Naftoquinonas	$C_6 - C_4$	
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$	
Stilbenos	$C_6 - C_2 - C_6$	
Antraquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$	
Flavonóides	$C_6 - C_3 - C_6$	
Lignanas, neolignanas	$(C_6 - C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$	

Fonte: BRAVO (1998).

O grupo simples dos flavonóides, considerado o mais importante, pode ser dividido em 13 classes com mais de 5000 compostos descritos. A Tabela 5 ilustra separadamente as classes de flavonóides encontradas. Sua estrutura comum é aquela das difenilpropanonas ($C_6-C_3-C_6$) e consiste de dois anéis aromáticos ligados através de 3 carbonos que normalmente formam um heterociclo oxigenado (Porter, 1993), conforme ilustra a Figura 6.

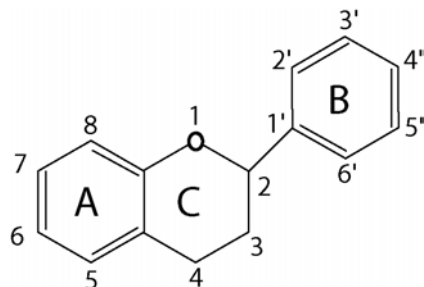
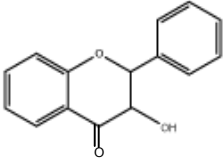
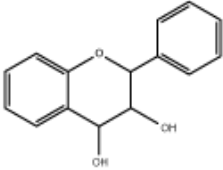
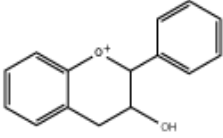
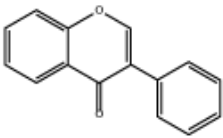
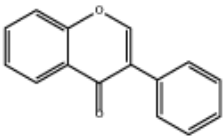
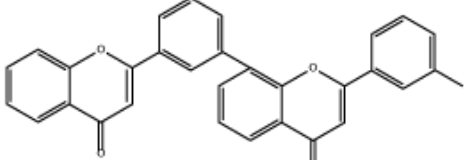
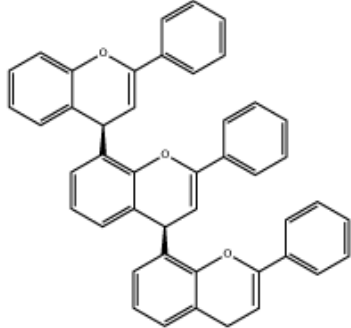


Figura 6 - Estrutura básica e sistema numérico de flavonóides
Fonte: PORTER (1993).

Tabela 5 - Classificação dos flavonóides encontrados em alimentos.

Flavonóide	Estrutura Básica
Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonas	
Flavonóis	
Flavanonas	

Flavonóide	Estrutura Básica
Dihidroflavonóis	
Flavandiol ou leucoantocianidina	
Antocianidinas	
Isoflavonóides	 
Biflavonóides	
Proantocianidinas ou taninos condensados	

Fonte: BRAVO (1998).

O anel A do flavonóide (Figura 6) é biossintetizado pela condensação de 3 mols de malonil co-A derivado do metabolismo da glicose. Os anéis B e C são derivados do mecanismo da glicose pelo caminho do chiquimato e do fenilpropanóide, respectivamente para o acréscimo de ácidos do C-9 (ácido cinâmico, hidrocínâmico e cumárico). Como derivados do co-A, esses ácidos do C-9 se condensam com produtos do C-6 do malonato para formar uma chalcona C-15. O subsequente fechamento do anel e a hidratação originam os diversos flavonóides (WOLLGAST & ANKLAN, 2000). Podemos observar resumidamente na Figura 7 a representação da biossíntese dos flavonóides de acordo com FORMICA & REGELSON (1995).

Juntamente com os derivados dos fenilpropanóides e os ácidos hidrocínâmicos, os flavonóis e em menor extensão as flavonas são encontrados em quase todas as plantas. As flavanonas e as flavonas são geralmente encontradas juntas (por exemplo em frutas cítricas) e são unidas por enzimas específicas (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

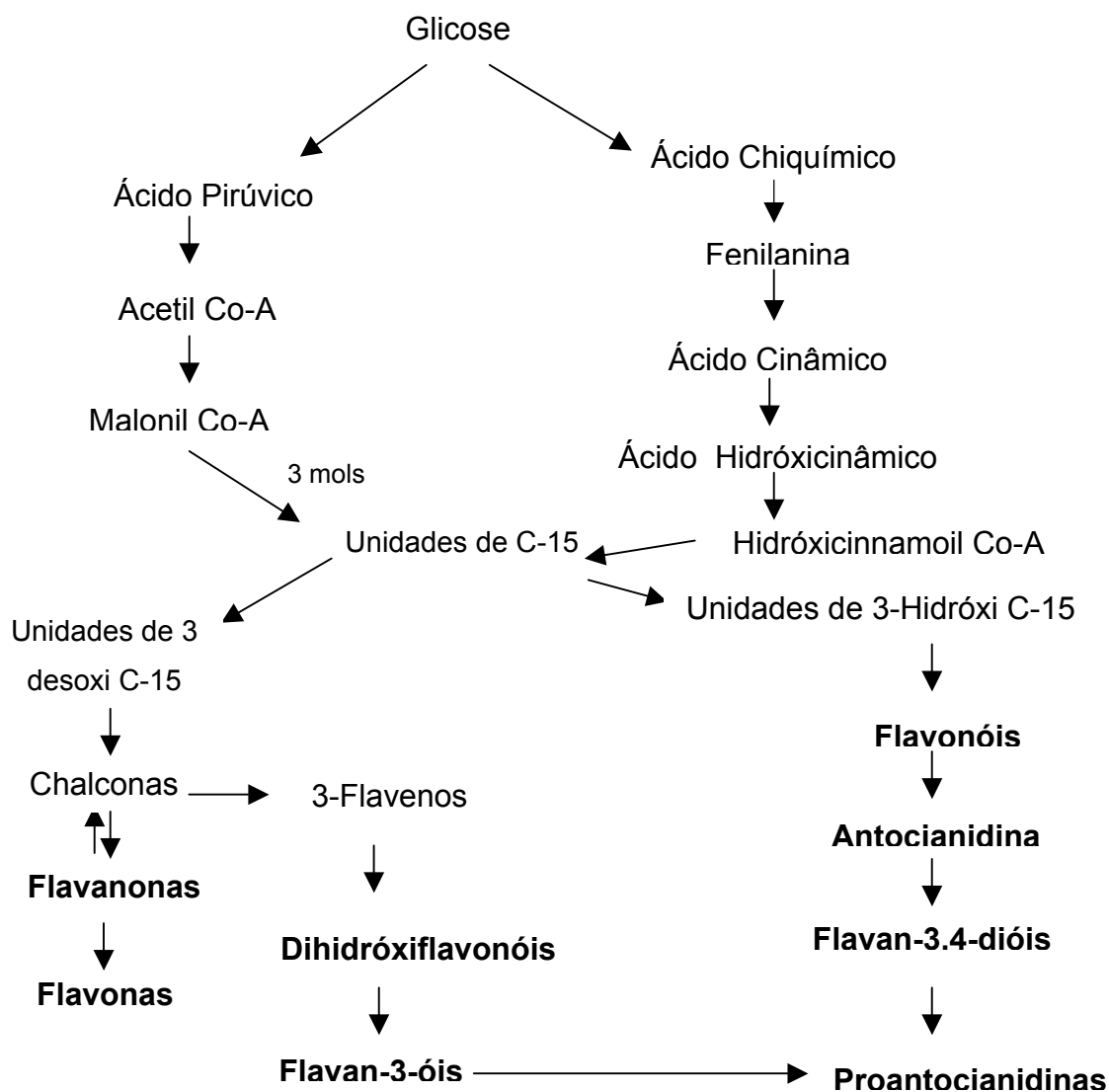


Figura 7 - Esquema da biossíntese e interconexão entre flavonóides.

Fonte: FORMICA & REGELSON (1995).

Os flavonóides ocorrem casualmente em plantas como agliconas, apesar de serem mais comumente encontrados como derivados de glicosídeos (BRAVO, 1998). O sítio preferido de glicosilação é na posição 3 e menos freqüentemente na posição 7. Diferenças individuais em cada grupo dos flavonóides é resultado da variação no número e arranjo dos grupos hidroxila sendo que ocorrem mais freqüentemente as dihidroxilações nas posições 3' e 4' (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Os flavonóides, em especial os flavan-3-óis catequinas, epicatequinas,

gallocatequinas e epigallocatequinas são os constituintes monoméricos dos taninos condensados, apesar de serem muito comuns como monômeros livres (BRAVO, 1998; KEALEY *et al.*, 1998). As catequinas e epicatequinas são isômeros derivados de flavonas, em que o anel benzênico e as hidroxilas estão em posição *trans* na catequina e *cis* na epicatequina.

Os taninos são compostos com peso molecular desde intermediário até elevado. São moléculas altamente hidroxiladas e podem formar complexos com elevada insolubilidade juntamente com carboidratos e proteínas. A formação destes complexos confere adstringência aos alimentos ricos em taninos, percebida ao serem consumidos, devido a sua precipitação com proteínas da saliva (WOLLGAST & ANKLAN, 2000).

Os taninos de plantas podem ser divididos em dois principais grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis. Os hidrolisáveis consistem do ácido gálico e de seus produtos diméricos de condensação. São facilmente hidrolisados com ácidos, álcalis, água quente e ação enzimática, levando à formação de álcool polihídrico e ácido fenilcarbóxico (BRAVO, 1998). Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de alto peso molecular que têm como precursoras unidades monoméricas de flavan-3-óis (catequina, epicatequina) em união com flavan-3,4-dióis ou leucoantocianidinas.

Para a formação das proantocianidinas, ocorre condensação oxidativa entre o C-4 do heterociclo e os C-6 e C-8 das unidades adjacentes. Desta maneira, as proantocianidinas podem ocorrer na forma de polímeros com grau de polimerização variável, podendo conter 50 ou mais unidades. A auto-oxidação ou a polimerização enzimática de unidades de flavan-3-óis ou flavan-3,4-dióis têm sido sugeridas como processos que levam à formação de taninos condensados (BRAVO, 1998; KEALEY *et al.*, 1998). As ligações intra-flavonóides são sensíveis à ácidos e levam à formação de antocianidinas durante a hidrólise ácida em soluções alcoólicas (ácido clorídrico-butanol). Essa reação é utilizada para

determinação de proantocianidinas. Caso as sub-unidades sejam compostas apenas por catequina e epicatequina, o produto resultante da reação de hidrólise será cianidina. Tais proantocianidinas são então chamadas especificamente de procianidinas (WOLLGAST & ANKLAM, 2000). Segundo Bravo (1998), quando aquecidas com ácido mineral, produzem um precipitado amorfo vermelho altamente insolúvel denominado flobafeno ou vermelho de tanino.

As proantocianidinas oligoméricas são solúveis em diferentes solventes aquosos e orgânicos como acetona e metanol. Por outro lado, os taninos condensados de alto peso molecular são insolúveis nesses tipos de compostos e formam complexos com proteínas ou com a parede celular polissacarídica. Essa insolubilidade é responsável por erros significativos na quantificação dos polifenóis presentes em plantas, pois os fenólicos são geralmente analisados em extratos, sendo sempre omitida a quantificação dos taninos insolúveis ou não extraíveis (PORTER, 1993; BRAVO, 1998).

3.5.2 Polifenóis do cacau

Os polifenóis do cacau, conforme descrito no item 2.2.4 são armazenados nas células de pigmentos dos cotilédones das sementes. A quantidade total de polifenóis solúveis presentes em farinha desengordurada de sementes frescas de cacau corresponde a 15 a 20%. Em sementes fermentadas, esse valor cai para 5% (BRITO, 2000; KEALEY *et al.*, 1998).

Os principais compostos identificados nas sementes de cacau *Forastero*, segundo Sanbongi *et al.* (1998); Kim & Keeney (1984); Porter (1991); Kealey *et al.* (1998) são apresentados a seguir:

catequinas

(-)-epicatequina

(+)-catequina

(+)-gallocatequina

(-)-epigallocatequina

procianidinas

procianidina B1 = epicatequina-(4 β →8)-catequina

procianidina B2 = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina

procianidina B3 = catequina-(4 α →8)-catequina

procianidina B4 = catequina-(4 α →8)-epicatequina

procianidina B5 = epicatequina-(4 β →6)-epicatequina

procianidina C1 = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)- epicatequina

procianidina D = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)
epicatequina

oligômeros elevados e polímeros homólogos a epicatequina com 2 a 18 unidades monoméricas

antocianinas

3- β -D-galactosidil-cianidina

3- α -L-arabinosidil-cianidina

flavonóis glicosídicos

quercetina-3-O- α -D-arabinosídeo

quercetina-3-O- β -D-glucopuranosídeo

outros

clovamida

dideoxiclovamida

Segundo Hansen *et al.* (1998), esses compostos seriam hidrolisados pela β -galactosidase e pela α -arabinosidase, que apresentam pronunciada estabilidade no decorrer da etapa de fermentação.

Durante a fermentação, com a morte do embrião, os compostos fenólicos sofrem difusão, entrando em contato com as enzimas polifenoloxidase e glicosidases presentes nas demais células (FORSYTH, 1958). Os polifenóis se

combinam com as proteínas por complexação reversível por meio de pontes de hidrogênio e da oxidação irreversível dos polifenóis a quinonas, que por sua vez sofrem condensação covalente com os grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras. Ao longo da fermentação, o teor de antocianinas decresce chegando a 7% do valor inicial, sendo que a maior parte dessa destruição ocorre entre o primeiro e o terceiro dias (BRITO, 2000; CROSS *et al.*, 1982). Ainda durante esta etapa, o teor de fenóis totais diminui cerca de 70%, sendo que a degradação da (-)-epicatequina, principal substrato da polifenoloxidase existente, provoca diminuição de 90% em sua concentração. A redução do teor de polifenóis durante a secagem é atribuída ao escurecimento enzimático causado pela polifenoloxidase, seguido de escurecimento não-enzimático decorrente da polimerização das quinonas resultantes e da acumulação de compostos insolúveis (BRITO, 2000).

De acordo com Forsyth & Quesnel (1958), a polifenoloxidase não teria condições adequadas para atuar durante a fermentação por causa da diminuição do pH e do aumento da temperatura, mas durante a secagem, com valores mais altos de pH e da concentração de oxigênio, teria condições apropriadas para oxidar os compostos fenólicos. Porém, tem-se constatado que a diminuição dos compostos fenólicos não pode ser interpretada devido apenas a um processo de oxidação enzimática, pois no quinto dia de fermentação, a atividade residual da polifenoloxidase é reduzida a 5-13% da inicial (HANSEN *et al.*, 1998; REEVES *et al.*, 1988). Além disso, reações entre compostos de diferentes compartimentos solúveis em água podem ser impedidas pela fusão de vacúolos de lipídeo, que dessa forma, impediriam o contato entre os diferentes compostos (BIEHL, 1982).

A Tabela 6 mostra a quantidade de procianidinas de sementes de cacau ao longo da etapa de fermentação.

Tabela 6 - Quantidades de flavan-3-ol e procianidinas ($\mu\text{g/g}$) em amêndoas de cacau desengorduradas ao longo da fermentação.

Flavan-3-ol e Procianidinas	Horas de Fermentação				
	0	24	48	96	120
Monômeros	21.929	21.088	20.887	9.552	8.581
Dímeros	10.072	9.762	9.892	5.780	4.665
Trímeros	10.196	9.119	9.474	5.062	4.070
Tetrâmeros	7.788	7.064	7.337	3.360	2.557
Pentâmeros	5.311	4.744	4.906	2.140	1.628
Hexâmeros	3.242	2906	2929	1160	888
Heptâmeros	1.311	1.364	1.334	464	326
Octâmeros	626	608	692	254	166
Nonâmeros	422	361	412	138	123
Decâmeros	146	176	302	traços	Traços
Undecâmeros	Traços	Traços	Traços	n.d	n.d
Total	60.753	57.252	58.165	27.910	22.974

n.d: Não detectado

Fonte: KEALEY *et al.* (1998)

Os polifenóis das sementes de cacau ficam armazenados nas células de pigmento dos cotilédones juntamente com a cafeína, a teobromina, os ácidos graxos saturados e os monoinsaturados. Porém, quando ingeridos no cacau, esses constituintes adquirem, muitas vezes, atividade biológica diferente daquela dos compostos isolados. Dessa maneira, a manteiga de cacau não provoca aumento na concentração total do colesterol sérico, apesar de este efeito ser esperado por ser uma gordura rica em ácidos graxos saturados (MAO *et al.*, 2000). Dependendo da quantidade de antocianina presente nas células de pigmento, chamadas de células armazenadoras de polifenóis, as mesmas serão brancas ou rosadas.

3.6 Enzimas presentes no cacau

A Tabela 7 relaciona as principais enzimas que catalisam reações que ocorrem durante a fermentação das sementes de cacau, seu principal substrato e suas condições ideais de atuação.

Tabela 7. Caracterização das principais enzimas ativas durante a fermentação de sementes de cacau

Enzima	Localização	Substrato	Produto	pH	T (°C)
Invertases	semente testa	Sacarose	Glicose frutose	4,0-5,25	37
Glicosidases	semente	Glicosídeos	Cianidina	3,8-4,5	45
β -galactosidase	cotilédone	3- β -galactosidilcianidina 3- α -arabinosidilcianidina	Açúcares		
Proteinases	semente cotilédone	Proteínas	Peptídeos Aminoácidos	4,7	55
PFO	semente cotilédone	Polifenóis (epicatequina)	O-quinona O-diquinona	6,0	31,5- 34,5

Fonte: LOPEZ, 1986; *apud* BECKETT, 1988.

A alteração não microbiana mais evidente observada em frutas e vegetais é o escurecimento causado por oxidação enzimática. O escurecimento enzimático é resultado da transformação em etapas de um monofenol a um difenol e deste a uma quinona. O grupo carbonílico reage então de forma não enzimática com outros constituintes dos alimentos, e de forma particular com compostos de grupos amino, para formarem produtos de cor escura. O escurecimento é evidente na maioria dos frutos descascados e acontece rapidamente depois da ruptura das células, sendo desejável em produtos como cacau, frutas secas e chá (MATTIETTO, 2001).

A presença e a atividade da polifenoloxidase (PFO) durante a fermentação e secagem das amêndoas de cacau são fatores responsáveis pelo desenvolvimento dos precursores de sabor. Esta enzima inicia sua atividade na

fase oxidativa da fermentação, continuando na secagem. Sua atuação é um dos fatores pouco compreendidos no processamento das sementes de cacau, mas potencialmente um dos mais significativos no que se refere à qualidade do sabor das mesmas (HANSEN *et al.*, 1998).

O papel da PFO na produção do sabor característico do chocolate ainda não é bem compreendido, contudo, uma baixa atividade da enzima ou condições que levem à redução dessa atividade têm sido apontados como fatores que levam à queda na produção de precursores do sabor do chocolate. A importância dessa enzima é freqüentemente mencionada de forma implícita na redução da adstringência do cacau (HOLDEN, 1958 *apud* REEVES, *et al.*, 1988).

A atividade enzimática da PFO apresenta acentuado decréscimo após os dois primeiros dias de fermentação, até praticamente zero (VILLENEUVE *et al.*, 1985). Esta inativação enzimática ocorre devido à geração de calor durante a fermentação e também pelo aumento das concentrações de ácido acético, etanol e pela presença de polifenóis.

Outras enzimas que vêm sendo estudadas além da PFO são as glicosidases e proteases (LOPEZ & DIMICK, 1991 *apud* BRITO, 2000). Essas enzimas também são encontradas naturalmente nas sementes de cacau; porém, não são ativas quando as sementes estão no interior dos frutos, ou seja, quando os mesmos ainda não foram partidos, devido às compartimentações celulares que impedem seu contato com o substrato. Durante as etapas de fermentação e secagem, as enzimas podem ou não ser ativadas, dependendo das condições do meio, que são bastante adversas por causa da elevação de temperatura, modificações na acidez e no pH e presença de oxigênio.

As glicosidases são responsáveis pela hidrólise das antocianidinas, levando à perda da coloração violeta dos cotilédones (SOARES, 2001). A temperatura e o pH ótimos para a atividade destas enzimas são 44°C e 4,0–4,5 respectivamente (FORSYTH & QUESNEL, 1958). Ainda na etapa de fermentação, as

antocianidinas livres são oxidadas, pela atuação da PFO, a quinonas, que posteriormente ainda se complexam com aminoácidos e proteína ou sofrem polimerização juntamente com outros flavonóides formando taninos.

As proteases não têm relação direta com a degradação de compostos fenólicos nas etapas de pré-processamento. Essas enzimas estão relacionadas com a quebra das proteínas vacuolares a peptídeos, que seriam disponibilizados para a posterior complexação com polifenóis formando compostos insolúveis.

A inativação enzimática durante a fermentação é causada pelo calor gerado e pelas elevadas concentrações de ácido acético e etanol. A fermentação e conseqüentemente a morte das sementes facilitam a atuação da enzima, principalmente pelo acesso ao substrato (HANSEN *et al.*, 1998).

A quantificação e a comparação das atividades enzimáticas no cacau são complexas, considerando-se as variações causadas pelas diferenças genotípicas, geográficas, métodos de fermentação e de secagem empregados, diferenças nos frutos, entre outros (HANSEN *et al.*, 1998).

3.7 Efeitos à saúde do cacau e do chocolate

Pesquisas recentes vêm demonstrando potenciais efeitos benéficos à saúde providos pela complexa mistura de flavonóides encontrada nas sementes do cacau. Estes compostos atuam em nosso organismo como antioxidantes, podendo prevenir a oxidação do colesterol de baixa densidade (LDL), um dos principais fatores etiológicos que levam às doenças coronárias. Também atuam na prevenção de cânceres, que estão diretamente relacionados com a carcinogênese genotóxica devida ao DNA reativo e aos agentes mutagênicos e não genotóxicos que atuam através de mecanismos promovidos epigeneticamente (WEISBURGER & WILLIAMS, 2000).

Por outro lado, as sementes de cacau e conseqüentemente o chocolate, possuem substâncias que têm sido estudadas por possíveis efeitos maléficos à

saúde, relacionados ao hábito de consumo, dores de cabeça entre outros. A seguir alguns dos possíveis efeitos benéficos e maléficos do cacau e do chocolate são discutidos brevemente.

3.7.1 Efeito antioxidante dos polifenóis do cacau

As espécies reativas do oxigênio (ERO's) têm papel importante em muitos processos biológicos. São geradas durante reações de transferência de elétrons em células aeróbicas especialmente pelo seu transporte nas cadeias mitocondriais. Incluem o radical hidróxido ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Quando produzidos excessivamente e não destruídos pelo sistema antioxidante de defesa do organismo, podem reagir facilmente com DNA, proteínas e lipídeos, provocando doenças como câncer, arteriosclerose, injúria da mucosa gástrica e envelhecimento.

A atividade antioxidante do cacau foi mensurada em vários estudos. Sanbongi *et al.* (1998) avaliou o efeito *in vitro* de extrato rico em flavonóides extraído de *liquor* de cacau com solução alcoólica 80%. Os resultados indicaram que não somente a catequina e a epicatequina mostraram efeito antioxidante, mas também a quercetina, quercetina 3-glicosídeo, quercetina 3-arabinosídeo e a dideoxiclovamida. Wang (2000) administrou chocolate contendo 5,3mg/g de procianidinas das quais 1,3mg/g correspondiam a epicatequina, o qual apresentou efeito antioxidante em seres humanos.

Segundo Mao (2000), as procianidinas do cacau possuem boa estabilidade da atividade antioxidante *in vitro*, sendo altamente efetivas na prevenção da formação de dienos conjugados, tanto na fase de indução (atuando como antioxidante preventivo), como na fase de propagação (atuando como antioxidante de quebra de cadeias) da peroxidação de lipídeos. São capazes, ainda, de retardar o ataque de lipídeos durante a fase de quebra das reações de prooxidação, inibindo totalmente a formação de produtos de degradação. Esses

efeitos são observados mesmo em concentrações sub-micromoleculares. Desta forma, as procianidinas do cacau podem atuar como inibidoras de inflamações agudas.

Segundo Arts (1999), um chocolate amargo comercial contém 53,5mg/100g de catequina; um ao leite contém 15,9mg/100g e uma infusão de chá preto contém 13,9mg/100g. O autor conclui, portanto, que o chocolate representa uma boa fonte de antioxidantes.

3.7.2 Inibição da ativação e função das plaquetas

As plaquetas do sangue têm importante papel nas doenças da artéria coronária (WHITE, 1994; OSTERUD, 1997; REIN *et al.*, 2000). Elas são encontradas nos sítios de novas lesões arterioscleróticas e quando ativadas, secretam potentes fatores mitogênicos que levam à proliferação do músculo liso e progressão das lesões arterioscleróticas (RIEN *et al.*, 2000). O aumento da atividade das plaquetas e sua agregação espontânea estão associados ao alto risco de ocorrência de doenças coronárias.

Estudos demonstraram que o risco de doenças cardiovasculares diminui quando são administradas doses terapêuticas de ácido acetilsalicílico e suplementos antioxidantes. O tratamento com ácido acetilsalicílico pode provocar a diminuição significativa na incidência de eventos coronários, minimizando o risco de infarto do miocárdio e de derrame cerebral (HANNEKENS, 1994; LEKSTRON & BELL, 1991). Em um estudo feito com uma bebida à base de cacau contendo açúcar, água e 897mg de epicatequina e procianidinas oligoméricas por 100g de amostra, a qual foi administrada a seres humanos, Rein *et al.* (2000) comprovou que esses flavonóides produzem efeito semelhante ao da aspirina no sangue, podendo também contribuir com a diminuição do risco de trombose e diminuição transitória da reatividade das plaquetas, minimizando o risco de formação de coágulos.

3.7.3 Manteiga de cacau: a principal gordura do chocolate

Os ácidos graxos predominantemente encontrados no chocolate são os saturados, entre os quais destacam-se o esteárico (C18:0) e o palmítico (C16:0) e os monoinsaturados, destacando-se o oléico (C18:1) (LUCCAS, 2001). Estudos feitos em humanos revelaram que o consumo de chocolate ao leite não afetou de forma negativa os lipídeos e as lipoproteínas do plasma sanguíneo, mesmo contendo alto teor de ácidos graxos saturados. Este comportamento se deve à elevada proporção do ácido esteárico presente na manteiga de cacau e no chocolate em relação aos outros ácidos graxos (DOUGHERTY *et al.*, 1994). Segundo Yu *et al.* (1995), os ácidos graxos saturados láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) aumentam significativamente os níveis de colesterol total e LDL de homens e mulheres. Por outro lado, o ácido esteárico mostrou característica distinta em relação aos outros ácidos graxos de cadeia longa, não provocando aumento. Em um estudo realizado com dietas experimentais, demonstrou-se que o consumo de 280g/dia de chocolate ao leite (quantia considerada alta), não elevou a concentração do colesterol de baixa densidade (LDL) e nem do colesterol total no plasma sanguíneo (KRIS-ETHERTON, 1997).

3.7.4 Possíveis efeitos negativos do cacau e do chocolate à saúde

O hábito, a necessidade ou desejo por certos alimentos, em especial doces, não apenas satisfazem necessidades fisiológicas, como estão relacionados a um efeito de gratificação psicológica (SHUMANN *et al.*, 1987). Dentre os hábitos por doces, o por chocolate parece ser o mais comum e profundo (ROZIN, *et al.*, 1991). Um estudo mostra que a metade das necessidades/desejos de pessoas por alimentos é por chocolate (WEINGARTEN e ELSTON, 1991).

Dentre as explicações farmacológicas que justificam o hábito de consumo de chocolate, valoriza-se o efeito estimulante causado pela presença de substâncias como a cafeína, teobromina e feniletilaminas (LIEBOWITZ & KLEIN, 1979). Segundo SCHUMANN *et al.* (1987), o hábito por chocolate pode estar relacionado com sentimentos de depressão, culpa e ansiedade, como também

impaciência, frustração, descontentamento com o corpo e desordens alimentares (MACDIARMID *et al.*, 1995). Cramer (2000) caracteriza o hábito por chocolate como a inability de resistência de seu consumo, devendo se mostrar perceptível e excessivo (ROZIN *et al.*, 1991).

O chocolate contém vários compostos ativos biologicamente (metilxantinas, aminas biogênicas, ácidos graxos semelhantes aos canabinóides encontrados no cérebro) que são potenciais causadores de sensações fisiológicas e comportamentais anormais. Dessa maneira, a necessidade por chocolate está relacionada a uma combinação entre o sabor, a composição nutricional, os constituintes ativos biologicamente e as situações emocionais/hormonais pelas quais as pessoas estão sujeitas.

São encontradas no chocolate aminas biogênicas endógenas, como a tiramina e a feniletilamina (HURST *et al.*, 1982). A última, encontrada no chocolate em doses substanciais (0,4 a 6,6µg/g), é um neuromodulador das sinapses cerebrais além de ser estrutural e farmacologicamente similar à classe das catecolaminas e anfetaminas (MICHENER & ROZIN, 1982; SABELI & JAVAID, 1995). Em situações normais, esta amina se distribui heterogeneamente pelo Sistema Nervoso Central (SNC), e em doses fisiológicas, atua potencializando neurotransmissores (PATERSON & BOULTON, 1990). A feniletilamina é produzida pelos tecidos cerebrais, sendo rapidamente metabolizada por enzimas como a monoamina β-oxidase e o aldeído dehidrogenase a ácido fenilacético, principal metabólito da feniletilamina no cérebro. Estudos vêm demonstrando que este composto é farmacologicamente ativo e que atua como estimulante e modulador do humor, sendo que sua diminuição pode contribuir com os sintomas de depressão (SABELI & JAVAID, 1995). Tanto a feniletilamina quanto seu metabólito (ácido fenilacético) aparecem em concentrações reduzidas em tecidos e fluidos biológicos de pessoas deprimidas. A administração de feniletilamina de maneira a repor esse déficit pode amenizar alguns tipos de depressão (PATERSON *et al.*, 1990).

Pesquisas demonstram que o hábito ao consumo de chocolate pode estar associado aos mecanismos de regulação dos níveis de feniletilamina no cérebro. Por outro lado, certos queijos e carnes possuem doses mais elevadas deste tipo de composto e não causam a sensação de desejo/necessidade que o chocolate causa (MICHENER & ROZIN, 1982). Além disso, a feniletilamina é rapidamente metabolizada no corpo (em 5 a 10 minutos). Com isso, quando consumida, não entra efetivamente no sistema circulatório (BRUINSMA & TAREN, 1999). Pesquisas mostraram que a ingestão de 200g de chocolate ao leite contendo 1g de feniletilamina não afetou consideravelmente as concentrações desta substância e de seus metabólitos na urina.

As metilxantinas são substâncias básicas, ou seja, possuem pKa baixo (correspondente a 0,5), sendo altamente solúveis em lipídeos e, conseqüentemente, facilmente absorvidas pelo estômago e pelas paredes do intestino. Neligh *et al.* (1992), sugeriu que, no cérebro, as metilxantinas competem com a adenosina, que é um neuromodulador pré-sináptico, bloqueando esse receptor e conseqüentemente eliminando sua ação inibitória, causando efeito estimulante. A cafeína catalisa o restante da epinefrina e de outras catecolaminas das glândulas adrenais, contribuindo para o efeito estimulante (MAKIN, 1997). A teobromina apresenta um efeito menos estimulante que a cafeína. Estudos demonstraram que a teobromina, administrada pura, não causa necessidade/hábito. Segundo Rozin *et al.* (1991), um chocolate ao leite possui 11mg de cafeína/100g de amostra e 197mg de teobromina/100g de amostra, sendo que um copo de café (150ml) contém entre 80 e 100mg de cafeína.

A andamida, substância conhecida por proporcionar alegria e êxtase, é uma lipoproteína cerebral endógena que se liga e ativa receptores de canabinóides no cérebro, estimulando os efeitos psicoativos de drogas canabinóides, como a elevada sensibilidade e a euforia. A andamida é produzida e liberada pelos neurônios cerebrais, sendo catabolizada pela atividade enzimática, o que sugere que funciona como neuromodulador endógeno de canabinóides (DI MARZO, *et al.*,

1994). O cacau e o chocolate contêm N-aciletanolaminas (N-oleoiletanolaminas e N-linoleiletanolaminas), que são química e farmacologicamente parecidas com a andamida. Essa substância é capaz de interferir na habilidade do cérebro hidrolisar andamida, estendendo a sensação de bem-estar (DI TOMASO *et al.*, 1996). Esses lipídeos podem imitar as ligações canabinódicas diretamente (ativando os receptores canabinódicos), ou indiretamente (aumentando os níveis de andamida). Elevados níveis de andamida podem interagir com outras substâncias ativas biologicamente do chocolate (caféina e teobromonina, por exemplo), induzindo a uma notável sensação de bem-estar ao consumir esse alimento. Não foram detectadas N-aciletanolaminas em chocolate branco, o qual não contém também outras substâncias ativas biologicamente (metilxantinas, canabinóides). O hábito de consumo de chocolate branco é 50% menos intenso que por chocolate amargo ou ao leite.

O consumo de chocolate por mulheres também é muitas vezes influenciado pelas flutuações hormonais pelas quais estão sujeitas. O desejo por chocolate tende a ser maior quando os níveis de estrogênio são menores e os de progesterona mais elevados, estado observado no período pré-menstrual. A razão estrogênio/progesterona modula direta e indiretamente o consumo alimentar de mulheres. A progesterona induz o corpo ao armazenamento de gordura, levando ao aumento do desejo por alimentos ricos neste nutriente. Por outro lado, o estrogênio promove a lipólise inibindo o consumo de gordura, além de influenciar o Sistema Nervoso Central (SNC) para o controle do apetite. Estudos sugerem ainda que os níveis de serotonina no plasma são baixos no período pré-menstrual. Isso pode estar associado com desordens como depressão, vício, obsessão e compulsão. A ingestão de carboidratos vem sendo proposta por aumentar seletivamente a produção de triptofano e serotonina no cérebro, o que seria mais uma causa do desejo/necessidade de chocolate observado em mulheres no período pré-menstrual (BRUINSMA & TAREN, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Frutos de cacau

Para o estudo, foram utilizados frutos de cacau da variedade *Forastero*, obtidos por polinização aberta, colhidos maduros em 12 de novembro de 2002 e partidos 48 horas após a colheita. Foram provenientes de uma fazenda cacaueira localizada no município de Teixeira de Freitas – BA. Cabe ressaltar que os cacauzeiros que originaram os frutos utilizados nesse estudo sofreram tratamento químico com sulfato cúprico como defensivo agrícola na lavoura. A substância foi adicionada na proporção de 2,5% em relação ao adubo utilizado. Desta forma, as determinações químicas feitas nos cotilédones indicaram teores de 1,7mg de cobre /100g de cotilédones.

4.1.2 Inibidores Enzimáticos

Foram utilizadas as substâncias químicas bissulfito de sódio e sulfato de cobre, conhecidas como excelentes inibidoras respectivamente das atividades da PFO e da alfa-arabinosidase e beta-galactosidase (ZOLLNER, 1993).

4.1.3 Equipamentos

- Balança semi-analítica METTLER – modelo P1210;
- Moinho IKA – UNIVERSAL M20 Janke & Sunsel GmbH. Cokg;
- Bloco digestor de proteína – TECHNICON – modelo BD-40;
- Destilador para análise de proteína – TECNAL – modelo TE-036;
- Estufa com circulação forçada de ar – FANEM – modelo 320/sc 300;
- Extrator de gordura – Tipo SOXHLET FANEM – modelo 170-1;
- Potenciômetro MICRONAL – modelo B-374;
- Mufla ENGRO – modelo 355-L;
- Espectrômetro BECKMAN – modelo DU-70;
- Espectrômetro Q-Trap Linear de Íon Trap LC/MS/MS – AB Sciex Instruments;
- Rotaevaporador BUCHI modelo 42;

- Torrador rotativo elétrico de laboratório, Probat-Werke, com sensor de temperatura de alta precisão;
- Agitador de tubos com rotação vertical de 360° Phoenix – Modelo MS22;
- Refratômetro ABBE PZO, modelo RL 1;
- Congelador de placas Frigostrella do Brasil, modelo PM 5;
- Liofilizador Edwards, modelo RV 12;
- Outros materiais e aparelhos comuns de laboratório.

4.1.4 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau P.A ou grau cromatográfico.

4. 2 Métodos

Os frutos obtidos foram processados de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 8.

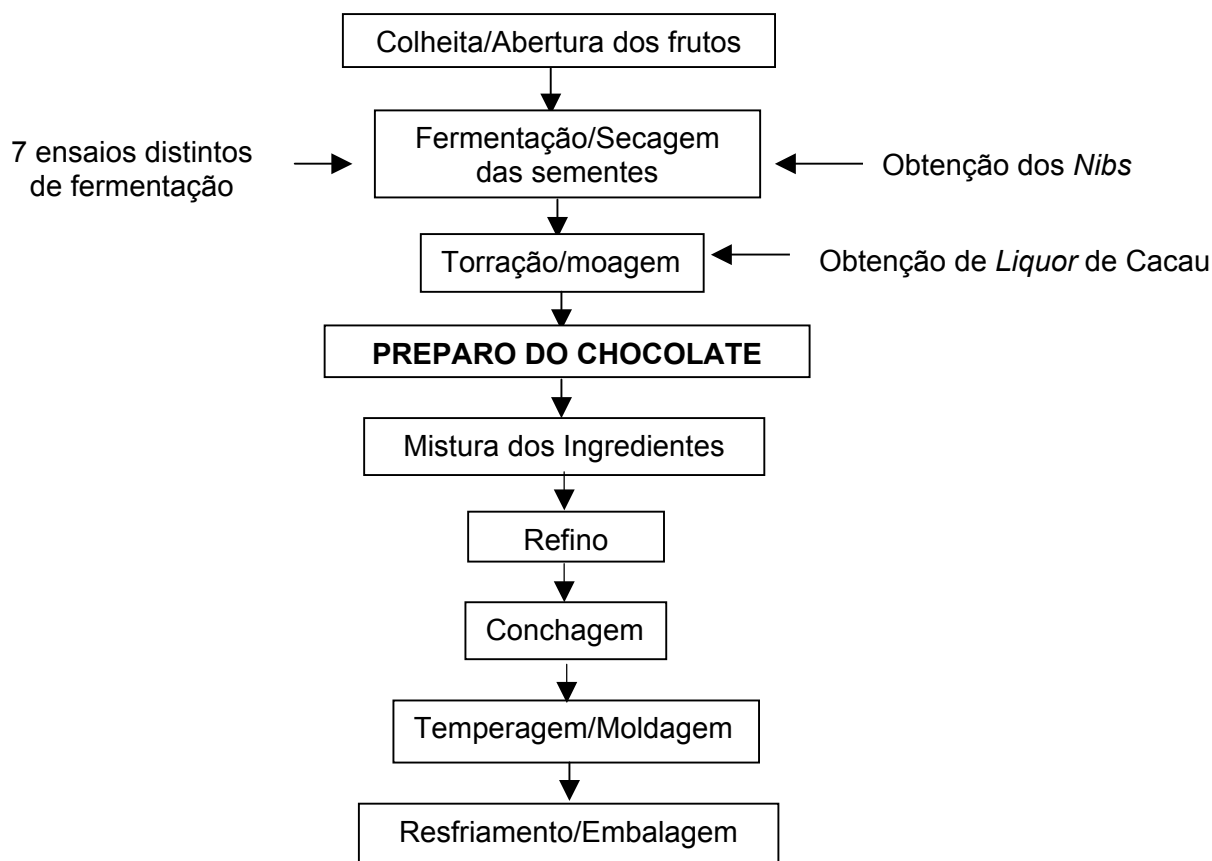


Figura 8 – Fluxograma de pré-processamento e processamento dos chocolates a partir de frutos de cacau.

A etapa de fermentação foi realizada em sala climatizada com aquecedores e ventiladores elétricos e recipientes contendo água para obter temperatura média de 33°C e uma umidade relativa ao redor de 65%, condições similares às das regiões onde se cultiva e fermenta o cacau. As etapas de fermentação, secagem, obtenção dos *nibs* e torração foram realizadas na planta-piloto geral do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Os chocolates foram produzidos na planta-piloto de chocolates do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Chocolates, Balas, Confeitos e Panificação – CEREAL CHOCOTEC do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas – ITAL.

4.2.1 Caracterização física dos frutos e sementes

Foram feitas determinações individuais da massa total do fruto, da casca, das sementes com polpa e sem polpa, da placenta; número de sementes por fruto, tamanho: comprimento, largura e espessura das sementes em 50 frutos representando o lote total.

4.2.2 Fermentação e tratamento dos ensaios

Foram realizados 7 ensaios de fermentação/secagem das amêndoas de cacau em duplicata, da seguinte maneira:

Ensaio A: Fermentação Convencional com duração de 7 dias;

Ensaio B: Fermentação modificada com adição de 5mg de bissulfito de sódio /100g no primeiro revolvimento após 48 horas do início;

Ensaio C: Fermentação modificada com adição de 10mg de bissulfito de sódio /100g no primeiro revolvimento após 48 horas do início;

Ensaio D: Fermentação modificada com adição de 5mg de sulfato de cobre /100g no primeiro revolvimento após 48 horas do início;

Ensaio E: Fermentação modificada com adição de 10mg de sulfato de cobre /100g no primeiro revolvimento após 48 horas do início;

Ensaio F: Fermentação modificada com adição de 5mg de bissulfito de sódio / 100g no quarto revolvimento após 120 horas do início;

Ensaio G: Fermentação Convencional com duração de 3 dias.

Os ensaios foram realizados conforme as Figuras 9 e 10 (SOARES, 2001).



Figura 10 - Vista da sala climatizada na qual foram realizados os ensaios de fermentação



Figura 9 - Caixa de fermentação

Foram retiradas amostras das sementes frescas e de cada ensaio, durante a fermentação (após 72 e 168 horas), e após a etapa de secagem para quantificação dos fenólicos totais (Amerine & Ough, s.d); das procianidinas totais (Porter, 1989) e caracterização dos compostos fenólicos do grupo dos flavan-3-óis por espectrometria de massas com ionização por *eletrospray*.

Foram controlados os seguintes parâmetros durante a fermentação:

- porcentagem de sólidos solúveis da polpa mucilagínosa (°Brix);
- temperatura da massa de sementes no centro das caixas de fermentação;
- pH da massa das sementes de cacau através do método 13.010, da AOAC – OICC (1984).

4.2.3 Secagem

Ao término da etapa de fermentação, as sementes foram secas em estufa FANEM com circulação de ar em temperatura entre 35 e 40°C até que atingissem umidade máxima de 6,5%. Optou-se por secagem artificial ao invés da convencional (ao sol), pois segundo Brito (2000), enzimas como a polifenoloxidase ainda estariam presentes nas sementes nesta etapa, e a secagem ao sol (mais longa que em estufa), favoreceria sua atuação na destruição de compostos fenólicos. Esta etapa teve duração de três dias. Em processos naturais, feitas comumente nas fazendas cacaueiras ao sol, esta etapa tem duração de sete a dez dias.

4.2.4 Caracterização física das amêndoas fermentadas e secas

Após a etapa de secagem, as amêndoas foram submetidas às seguintes determinações:

- a. Massa de 100 amêndoas (colhidas ao acaso);
- b. Número de amêndoas em 100 gramas (colhidas ao acaso);
- c. Densidade aparente

As amêndoas foram colocadas em proveta de dois litros, a qual foi colocada em aparelho vibratório Reotest por 3 minutos para diminuir os espaços entre as amêndoas de cacau. A massa foi pesada e a relação entre a massa por unidade de volume foi considerada como sendo a densidade aparente;

d. Composição em fração das amêndoas: uma amostra de 100 amêndoas foi pesada e descascada manualmente, separando-se a testa, o gérmen e os cotilédones. Tais frações foram pesadas e expressas em porcentagem.

- e. Prova de Corte (*Cut Test*)

Foram avaliadas, nas amêndoas fermentadas e secas, a coloração dos cotilédones, expressando-se o resultado em porcentagem de amêndoas marrons, violetas com partes marrons e violetas e o grau de fermentação através da

verificação de sulcos nos cotilédones, expressando-se o resultado em porcentagem de amêndoas bem, parcialmente e mal fermentadas (ICCO, 2003).

4.2.5 Preparo dos *nibs*

As amêndoas fermentadas e secas dos diferentes experimentos foram quebradas em pequenos fragmentos (*nibs*) em moinho de facas tipo Rietz. Posteriormente separou-se a testa, o gérmen e os cotilédones, por diferença de densidade, com auxílio de uma coluna de ar e por peneiragem.

4.2.6 Características físico-químicas dos *nibs*

As características físico-químicas dos *nibs* foram determinadas através dos seguintes métodos:

- a. Teor de umidade – método 31.1.02 da AOAC (1997);
- b. pH – método 31.1.07 da AOAC (1997);
- c. Acidez titulável total – método 13.010, da AOAC – OICC (1984);
- d. Teor de proteína - método 31.1.08 da AOAC (1997);
- e. Teor de gordura - método 31.4.02 da AOAC (1997) adaptado. As amostras foram deixadas em refluxo por vinte horas ao invés de quatro conforme sugere o método oficial da AOAC e utilizou-se água refrigerada a 8°C para condensar o solvente (éter de petróleo) com maior rapidez e eficiência;
- f. Teor de cinzas- método 31.1.04 da AOAC (1997);
- g. Teor de fibras- Determinado utilizando-se o método 45.4.07 da AOAC (1997).
- h. Ácidos orgânicos

Foram quantificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H NMR . As amostras foram extraídas conforme Vasconcelos (1999). Os *nibs* de cacau foram moídos em moinho IKA – UNIVERSAL com resfriamento, não permitindo a perda de ácidos voláteis. Foram pesadas 2,0g de sementes fermentadas e secas em balança analítica em tubos de rosca aos quais adicionou-se 10ml de água nanopure. Os tubos foram tampados e agitados em agitador tipo Vortex por 3 minutos. As amostras foram filtradas em papel Whatman nº1 e

posteriormente em filtro millipore de $0,45\mu$. A aquisição dos espectros foi feita em espectrômetro Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7\text{ T}$), operando a 499,885 MHz para ^1H e pressurização do sinal intenso de água. As amostras foram preparadas com 500 μl de cada extrato aquoso obtido a partir das amêndoas de cacau e 100 μl de água deionizada contendo 2.5 mMol.L^{-1} de d_4 -trimetilsililpropionato de sódio, utilizado como um padrão de referência interna e de concentração. Foi possível identificar e quantificar nas amostras especialmente os ácidos acético e láctico, além de outros compostos como 2,3-butanodiol e alanina, de menor interesse neste caso. Foram adicionados padrões dos compostos monitorados.

4.2.7 Determinação dos compostos fenólicos

a. Determinação de fenóis totais

As determinações foram feitas de acordo com Amerine & Ough (s.d) com algumas modificações. Para a extração, foram pesados 100,0 mg de amostra desengordurada em tubos de centrífuga, aos quais acrescentou-se 5ml de solução de acetona 70%. Os tubos vedados foram agitados por 20 minutos a 4°C e centrifugados a 4200g. Em balões volumétricos, foram adicionados os seguintes reagentes na ordem indicada: 60ml de água destilada; 0,5ml do sobrenadante obtido na extração da amostra; 5ml do reagente Folin-Cicoteau e 15ml de uma solução com 20% de carbonato de sódio, 1,2% de tartarato de sódio e 800ml de água. O tartarato de sódio foi utilizado como catalisador da reação colorimétrica. Controlou-se o tempo para que a última solução (carbonato de sódio) fosse adicionada entre 30 segundos e 8 minutos desde a adição do reagente de Folin-Cicoteau. Os balões foram deixados durante 30 minutos em temperatura ambiente antes da leitura, que foi feita em um espectrômetro Beckmann, modelo DU70 a 765nm. A curva padrão foi feita utilizando-se ácido tânico da marca Sigma.

b. Determinação de proantocianidinas

As determinações foram feitas de acordo com Porter (1989). Para a extração, foram pesadas 200,0mg de amostra desengordurada em tubos de centrifuga, aos quais acrescentou-se 4ml de solução de acetona 50%. Os tubos vedados foram agitados por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 4200g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em balões volumétricos de 25ml. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes, quando se adicionou metanol até completar o volume para 25ml.

Ao extrato (1ml), adicionou-se 6ml do reagente butanol (95 n butanol: 5 HCl concentrado – v/v) e 0,2ml do reagente FAS (solução 2% de sulfato férrico de amônio dodecahidratado em HCl 2M. As leituras foram feitas em um espectrômetro Beckmann, modelo DU70 a 450nm. A curva padrão foi feita utilizando-se taninos de uva.

c. Determinação dos flavan-3-óis (unidades monoméricas) e procianidinas (unidades poliméricas)

A identificação e quantificação relativa dos compostos fenólicos do grupo dos flavan-3-óis, foi feita em unidades monoméricas (catequinas e epicatequinas principalmente), e poliméricas (dímeros, trímeros, quatrâmeros e pentâmeros) no laboratório “Thomson de Espectrometria de Massas” do Instituto de Química da UNICAMP.

A extração dos compostos foi feita de acordo com aquela citada por Hammerstone *et al.* (1999) para as sementes de cacau. As sementes foram congeladas logo após terem sido retiradas (durante a fermentação e ao término das etapas de fermentação e secagem). Foram então descascadas e moídas em moedor de laboratório com adição de nitrogênio gasoso para evitar a oxidação dos compostos de interesse.

As amostras moídas foram desengorduradas com hexano na proporção de 1:5 (amostra:solvente) por cinco vezes. Posteriormente, foram extraídas com soluções 70% acetona (três vezes) e 70% metanol (duas vezes), na proporção de 1:5 (amostra:solvente). Em cada aplicação de solvente, a amostra foi agitada por 5 minutos e o sobrenadante filtrado em papel Whatman nº1 e recolhido em balões próprios do rotaevaporador. Todo sobrenadante recolhido foi submetido à evaporação em rotaevaporador em temperatura de 60°C à vácuo para retirada dos solventes orgânicos (acetona e metanol) evitando a degradação dos flavonóides. Dessa forma, foi obtido o extrato aquoso com os compostos de interesse.

A identificação e quantificação relativa dos compostos de interesse foram feitas em um espectrômetro de massas com ionização por *eletrospray*. As condições de trabalho foram baseadas naquelas que Wollgast *et al.* (2001) utilizou no espectrômetro de massas. Uma vez que não se usou uma coluna e um detector próprios para cromatografia líquida de alta eficiência, não foram obtidas áreas quantificáveis como resposta. Porém, uma vez que as análises foram efetuadas em um mesmo dia e nas mesmas condições, pôde-se obter uma quantificação relativa dos compostos de interesse, permitindo a comparação da intensidade dos mesmos entre si.

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas Q-Trap equipado com interface de ionização por *eletrospray*. Utilizou-se o modo negativo do equipamento em voltagem de 4,2kV, fragmentador de voltagem a 100V, pressão de nebulização de 25psig e temperaturas do gás da cortina (nitrogênio) de 150°C. Os dados foram coletados em um HP ChemStation com monitoramento seletivo de íons (SIM). O espectro foi escaneado em um raio de m/z de 250 a 1500. Permitiu-se a aquisição de vários espectros de massa completos dos compostos analisados, permitindo sua identificação com elevada margem de segurança. O tempo de aquisição dos espectros foi de 2,0 minutos.

O solvente utilizado foi metanol:água (v/v, 1:1). Foram injetados 50µl do extrato contendo os compostos de interesse em 1,0ml de solvente, que foram bombeados através de sistema por bombeamento peristáltico a uma vazão de 20µl /min.

4.2.8 Preparo dos chocolates

a. Obtenção do *liquor* de cacau

Após a quebra (item 4.2.5) e retirada das cascas e gérmenes, os *nibs* de cacau foram submetidos à torração em torrador elétrico PROBAT. Utilizou-se o binômio tempo/temperatura ideais obtidos por Fadini (1998), que foram 150°C/38 minutos.

Os *nibs* torrados foram então moídos em moinho estriado e posteriormente em moinho com três cilindros resfriados (Drais Werke GmbH – Mannheim Waldo) para a obtenção de uma granulometria média de 40µm. Os *liquors* obtidos foram submetidos a um tratamento térmico para promover a volatilização de aromas indesejáveis como o ácido acético originado na etapa de fermentação e também para iniciar a formação de aromas desejáveis que continuou na etapa de conchagem propriamente dita dos chocolates. Os *liquors* foram tratados termicamente por três horas a 60°C em mini concha longitudinal da marca FRIWESSA.

b. Produção dos chocolates

Conforme o fluxograma apresentado na Figura 8 (fluxograma geral), a mistura dos ingredientes foi realizada em misturador planetário marca KITCHEN AID, modelo K5SS, com capacidade para cinco litros. Foram inicialmente misturados os ingredientes em pó e posteriormente o *liquor* de cacau e parte da manteiga de cacau da formulação (25%). Os ingredientes foram misturados por 5-7 minutos.

A massa de consistência plástica obtida foi refinada em um único estágio em refinador DRAISWERK GMBH com três cilindros horizontais encamisados, resfriados internamente com água a 4°C. A distância entre os cilindros foi ajustada de forma que o tamanho de partícula da massa após o refino fosse de 20 a 25µm.

A massa refinada foi conchada em uma mini concha longitudinal da marca FRIWESSA, tipo PPC, com capacidade para 1 Kg em lotes de 700g de amostra por ensaio. As amostras foram conchadas por 12 horas a 60°C. Por se tratar de uma concha longitudinal de modelo antigo, não foi possível realizar a etapa de conchagem seca da massa, a qual tem fundamental importância para eliminação mais rápida de umidade e voláteis indesejáveis. Com isso, o restante de manteiga de cacau não adicionada na etapa de mistura dos ingredientes foi adicionada ao início da conchagem, juntamente com a lecitina de soja. Esse último ingrediente, em muitos casos, atrapalha a evaporação da umidade indesejada da massa durante a conchagem, devendo, em geral, ser adicionado ao final desta etapa. Uma vez que o equipamento utilizado não permite iniciar a conchagem sem a adição de um emulsificante como a lecitina de soja, monitorou-se a umidade dos chocolates obtidos ao término desta etapa, garantindo-se que todos se encontraram com menos de 1,5% de umidade (limite máximo aceito pela legislação).



Figura 11 – Concha longitudinal utilizada para pré-tratamento dos *liquors* obtidos e conchagem dos chocolates.

Após a conchagem, as amostras foram temperadas em temperadeira de laboratório, marca APMC, modelo D 45134, com capacidade para 1Kg, conforme Luccas (2001). As amostras foram inicialmente derretidas em estufa com circulação forçada de ar a 45°C, colocadas na temperadeira e, ao atingirem 40°C, foram mantidas sob movimentação constante no equipamento por 10 minutos, de maneira a promover a completa estabilização da temperatura da amostra.

As amostras temperadas foram resfriadas em geladeira convencional, em temperaturas de 5 a 7°C. O tempo de resfriamento foi de, em média, 20 minutos. Retiradas da geladeira, as amostras foram desmoldadas e embaladas em papel alumínio individualmente em sala climatizada a 20-23°C. As barras de chocolate foram armazenadas em câmara a 20°C por sete dias permitindo a formação dos cristais β estáveis.

c. Caracterização físico-química dos chocolates

c.1 Viscosidade Plástica de Casson

As propriedades reológicas foram determinadas em reômetro programável, marca Brookfield, modelo RVDVIII, e seguindo o método de análises *VISCOSITÉ* (1973) com adaptador de pequenas amostras para acondicionar o chocolate fundido. O *spindle* utilizado foi do tipo cilíndrico (especificação: S15). Um banho

termostático, da marca Brookfield, foi acoplado ao adaptador de pequenas amostras com o objetivo de manter a temperatura do produto constante e igual a 40°C, durante os experimentos.

Conforme descrito por VISSOTTO *et al.* (1999), as amostras foram inicialmente colocadas em recipientes de vidro com tampa, e fundidas em estufa a 40°C, sendo posteriormente acondicionadas no adaptador de pequenas amostras do reômetro. Seguiu-se o programa de rotação apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Programa desenvolvido para o Reômetro Brookfield modelo RVDVIII.

Tempo	Rotação (rpm)
3 min	5
3 min	50
3 s	100
6 s	50
15 s	20
30 s	10
60 s	50
30 s	10
15 s	20
6 s	50
3 s	100

O primeiro passo do programa desenvolvido (3min a 5rpm) teve por finalidade proporcionar uma maior uniformização da temperatura da amostra. Já o segundo passo (3min a 50rpm) teve como finalidade o pré-cisalhamento da amostra.

Com os resultados obtidos foram construídas curvas correlacionando a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento e os parâmetros de Casson calculados através de ajuste por regressão linear (Figura 12). Foram feitas três determinações para cada amostra analisada.

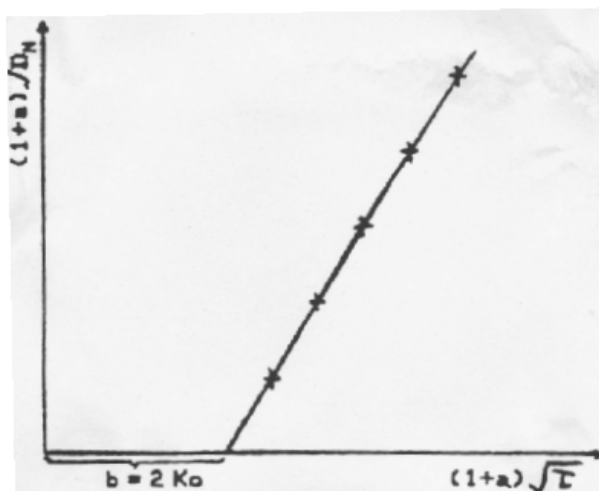


Figura 12 – Reograma de Casson

Fonte: Beckett (1988)

c.2 Teor de Umidade

Pequenas porções de chocolate foram derretidas em estufa a 45°C. Entre 0,05 e 0,1g do chocolate foram pesados em balança analítica e dissolvidos em solução de clorofórmio:metanol na proporção de 1:1 e a umidade foi medida por titulação em equipamento Karl Fischer (TitroLine Alpha/Schott-Geräte GmbH TM 125) (HELRICH, 1990).

c.3 Tamanho das partículas da massa de cacau

Determinado através da metodologia utilizada por Luccas (2001). Utilizou-se um micrômetro digital da marca Mytutoio, com escala de 0 a 250mm, calibrado sempre antes de cada medida. Foram tomadas porções de massa na saída do refinador de três regiões (direita, esquerda e centro). Cada porção foi diluída em óleo mineral puro da marca Nujol na proporção aproximada de 1:1 até adquirir consistência homogênea. Para cada porção foram realizadas 10 repetições, totalizando 30 medidas por amostra.

d. Definição da formulação do chocolate

Foi feita uma análise sensorial prévia para a escolha de uma entre duas formulações apresentadas aos provadores. A preferida (Tabela 9) foi utilizada para a produção dos chocolates.

Tabela 9 – Formulação utilizada na produção dos chocolates a partir dos *liquors* obtidos em cada ensaio.

Ingredientes	% de adição
Açúcar	56,08
Manteiga de cacau	16,42
<i>Liquor</i> de cacau	25,00
Leite em pó integral	8,00
Leite em pó desnatado	6,00
Lecitina de soja	0,50
Aroma de Baunilha	0,10
Sal	0,06

(teor de gordura total: manteiga de cacau+*liquor*+leite integral=31%)

4.2.9 Análise Sensorial

A análise sensorial consistiu de um teste de aceitabilidade com as amostras obtidas dos 7 ensaios. Foram convidados 30 provadores, com idade entre 18 e 57 anos.

As amostras foram avaliadas de forma monádica seqüencial segundo um delineamento de blocos completos casualizados, sendo apresentadas com códigos de três números aleatórios. O teste foi conduzido em cabines individuais com iluminação de lâmpadas vermelhas. Por ser o chocolate um produto com elevado teor de gordura, as amostras foram apresentadas em 2 turnos, com 4

amostras cada. Os dados relativos às escalas utilizadas foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias.

As amostras foram avaliadas quanto ao aroma, sabor e impressão global por meio de escalas hedônicas de nove pontos (9 = gostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei e 1=desgostei muitíssimo). Além disso, os consumidores avaliaram o dulçor e o amargor residual através de uma escala de 5 pontos (5 = intensidade maior que ideal, 3 = intensidade ideal e 1 = intensidade menor que a ideal); e indicaram a intenção de compra do produto por meio de escala de 5 pontos (1=certamente compraria, 3=talvez sim talvez não e 5 certamente não compraria).

A ficha de avaliação utilizada para cada amostra se encontra na Figura 13.

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE CHOCOLATE

Nome: _____ data: ____/____/____ e-mail: _____

Amostra no. _____

Por favor, utilize a numeração indicada para responder às perguntas 1, 3 e 5.

- 9. gostei extremamente
- 8. gostei muito
- 7. gostei moderadamente
- 6. gostei ligeiramente
- 5. nem gostei/nem desgostei
- 4. desgostei ligeiramente
- 3. desgostei moderadamente
- 2. desgostei muito
- 1. desgostei extremamente

1. a Você está recebendo uma amostra codificada de CHOCOLATE MEIO AMARGO. Por favor, avalie inicialmente o AROMA da amostra indicando o quanto você gostou ou desgostou do AROMA.

b. Comente o que você mais gostou e menos gostou no AROMA da amostra

2. a Prove novamente o chocolate, avaliando agora somente seu SABOR. Indique o quanto você gostou ou desgostou do SABOR da amostra utilizando a escala abaixo.

b. Comente o que você mais gostou e menos gostou no SABOR da amostra

3.a Agora, indique o quanto você gostou ou desgostou DE UM MODO GERAL da amostra.

b. Comente o que você mais gostou e menos gostou DE UM MODO GERAL da amostra.

4. Prove novamente um pedaço de chocolate e indique o quão ideal se encontra o DULÇOR e o AMARGOR RESIDUAL da amostra.

O DULÇOR ESTÁ:

- ☐ extremamente maior que o ideal
- ☐ muito maior que o ideal
- ☐ moderadamente maior que o ideal
- ☐ ligeiramente maior que o ideal
- ☐ intensidade ideal
- ☐ ligeiramente menor que o ideal
- ☐ moderadamente menor que o ideal
- ☐ muito menor que o ideal
- ☐ extremamente menor que o ideal

O AMARGOR RESIDUAL ESTÁ:

- ☐ extremamente maior que o ideal
- ☐ muito maior que o ideal
- ☐ moderadamente maior que o ideal
- ☐ ligeiramente maior que o ideal
- ☐ intensidade ideal
- ☐ ligeiramente menor que o ideal
- ☐ moderadamente menor que o ideal
- ☐ muito menor que o ideal
- ☐ extremamente menor que o ideal

5. Se encontrasse esse chocolate a venda você:

- 5. certamente compraria
- 4. possivelmente compraria
- 3. talvez comprasse/talvez não comprasse
- 2. possivelmente não compraria
- 1. certamente não compraria

Por favor, justifique sua opção.

Figura 13 – Ficha de avaliação sensorial utilizada no estudo.

4.2.10 Determinação do teor de cobre remanescente

Por se tratar de uma substância química não volátil e bastante tóxica quando ingerida em grandes quantias, o teor de cobre remanescente dos *nibs* de cacau e também dos chocolates obtidos nos ensaios D e E foi quantificado segundo a metodologia de Horwitz (2000). Para comparação, avaliou-se também o teor residual deste metal na amostra A (amêndoas fermentadas e secas e chocolate) a qual não foi adicionada de sulfato cúprico durante este estudo.

Quanto ao bissulfito de sódio, não foram feitas determinações químicas para quantificá-lo nas amostras produzidas, por se tratar de uma substância química com limite máximo tolerável pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) maior (5mg/100g de amostra) que o sulfato cúprico (3mg/100g de amostra), porém, foram feitos cálculos teóricos em que se considerou que todo o bissulfito de sódio acrescido a massa de fermentação se difundiu para o cotilédone. Sabe-se que esta possibilidade é remota, uma vez que grande parte da substância escoa juntamente com o mel proveniente da liquefação da polpa através dos orifícios das caixas de fermentação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização física dos frutos e sementes

Foram recebidos 385Kg de material, correspondentes a 800 frutos de cacau da variedade *Forastero* que proporcionaram rendimento de 66,5Kg de sementes com polpa aderida.

A fermentação das sementes com toda a polpa aderida foi realizada em 14 caixas de isopor com 4,3kg de massa em cada caixa, conforme Soares (2001).

5.1.1 Frutos

Os resultados da caracterização de 50 frutos (lote representativo do total) feita ao início do experimento, logo após o recebimento, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Caracterização dos frutos de cacau *in natura* da variedade *Forastero*.

	Média	Desvio Padrão
Frutos		
Massa Total(g)	469,05	139,62
Massa Casca (g)	368,03	114,99
Massa Placenta (g)	36,27	12,22
Massa de sementes com polpa (g)	92,64	34,73
Massa de sementes sem polpa (g)	74,37	31,71
Sementes		
Quantidade por fruto	36,27	12,22
Largura (cm)	16,21	2,065
Comprimento (cm)	26,79	3,672

5.1.2 Sementes

Os valores de comprimento, largura, espessura e massa média das sementes após a etapa de secagem são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Dimensões e massa média das sementes de cacau *in natura*

	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Espessura (cm)	Massa por semente (g)
Máximo	3,40	1,92	0,90	1,34
Mínimo	2,00	1,13	0,36	0,83
Média	2,62	1,47	0,67	1,03
D.P	1,34	0,32	0,15	0,15

5.2 Parâmetros avaliados durante a fermentação e secagem das sementes de cacau

5.2.1 Sólidos solúveis

Os valores de sólidos solúveis da polpa mucilagínosa em cada caixa de fermentação, medidos ao início, 24 e 48 horas após o início da fermentação são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores obtidos para sólidos solúveis da polpa aderida às sementes de cacau durante a etapa de fermentação.

Ensaio	°Brix (a 25°)		
	Horas de Processamento		
	0	24	48
A	24	22,0	19,5
B	24	22,2	18,3
C	24	22,0	19,3
D	24	22,3	19,4
E	24	22,1	18,9
F	24	22,2	19,0
G	24	22,0	19,1

*Nota: Após 48 horas, a medida não foi realizada por ausência de polpa hidrolisada líquida

Os resultados apresentados na Tabela 12 indicam que os valores obtidos estão bem próximos uns aos outros, o que era esperado, levando-se em consideração que as condições de fermentação foram as mesmas até 48 horas de fermentação, quando então foram adicionados os inibidores enzimáticos em determinados ensaios.

5.2.2 Temperatura do ambiente e da massa de fermentação

A Tabela 13 mostra o controle de temperatura e umidade da sala climatizada em que foram realizados os diferentes ensaios de fermentação. As condições de temperatura e umidade foram programadas para serem próximas àquelas observadas em regiões produtoras de cacau no Estado da Bahia.

Tabela 13 – Controle de temperatura e umidade da sala climatizada utilizada para a fermentação de sementes de cacau em diferentes tempos.

	Período (horas)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Temperatura (°C)	35,0	30,5	33,5	33,0	33,5	33,0	33,0	33,0
Umidade relativa (%)	70	85	75	75	75	75	75	75

Na Figura 14 são apresentadas as curvas representativas da variação de temperatura da massa de sementes de cacau nas diferentes caixas de fermentação pra cada experimento.

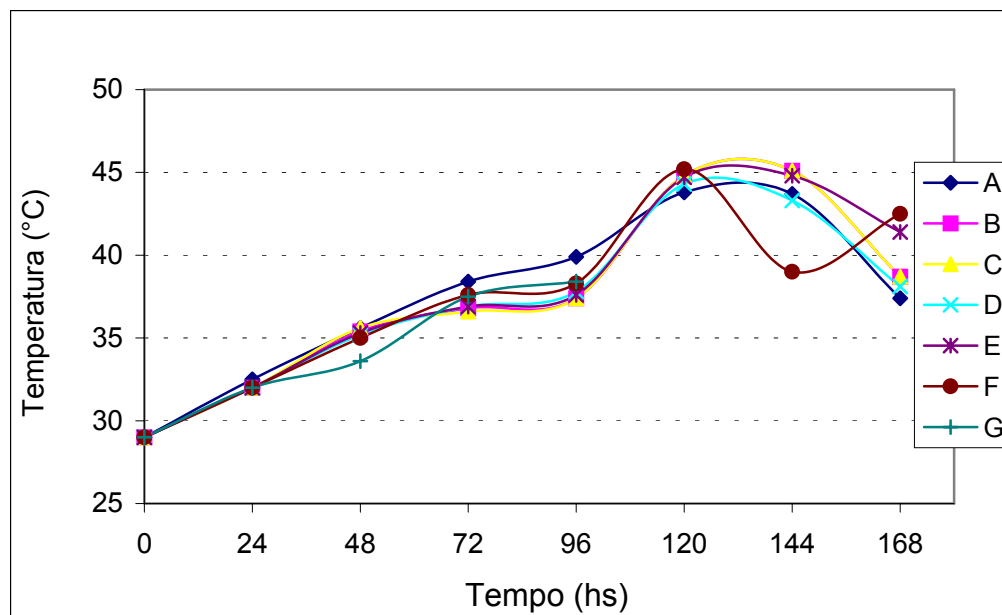


Figura 14 – Variação da temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação para os diferentes ensaios: A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

Na Figura 14 observa-se que a evolução da temperatura da massa de sementes dos diferentes ensaios foi bastante similar. Cabe destacar que o ensaio A (fermentação convencional por 168 horas) apresentou temperatura superior aos demais ensaios entre 48 e 72 horas. A adição dos inibidores após 48 horas de fermentação possivelmente refletiu em uma inibição momentânea de algumas das reações observadas nesta etapa. Da mesma forma, o ensaio F (adição de 5mg de bissulfito de sódio /100g de massa de sementes após 120 horas de fermentação) apresentou queda pronunciada de temperatura após 124 horas de fermentação até 144 horas, quando então a temperatura voltou a se elevar.

5.2.3 Controle do pH da massa de sementes de cacau durante a fermentação

O acompanhamento do pH no interior das caixas de fermentação juntamente com a temperatura da massa em fermentação permitiram avaliar o progresso desta etapa. Segundo Mattietto (2001), valores de pH da polpa próximos de 3,6 são favoráveis ao desenvolvimento de leveduras, condição que foi observada na matéria-prima inicial de todos os ensaios. Desta forma, permitiu-se o desenvolvimento de leveduras, que converteram açúcares em etanol anaerobicamente. Possivelmente houve a metabolização do ácido cítrico pelas leveduras o que pode ter sido responsável pelo aumento de pH observado após 48 horas de fermentação, momento em que a massa em fermentação foi revolvida, permitindo sua oxigenação e favorecendo o desenvolvimento de bactérias lácticas (DRUMMOND, 1998). Na Figura 14, observa-se que próximo ao quinto dia de fermentação (120 horas), atingiu-se temperaturas próximas de 45°C, representando uma diminuição do substrato para as bactérias lácticas (açúcar) e das condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias acéticas, que convertem etanol em ácido acético e água em presença de oxigênio. Esta é uma reação exotérmica, que gera energia, aumentando a temperatura (DRUMMOND, 1998). A Figura 15 mostra o controle de pH da massa de fermentação nas caixas correspondentes aos diferentes ensaios.

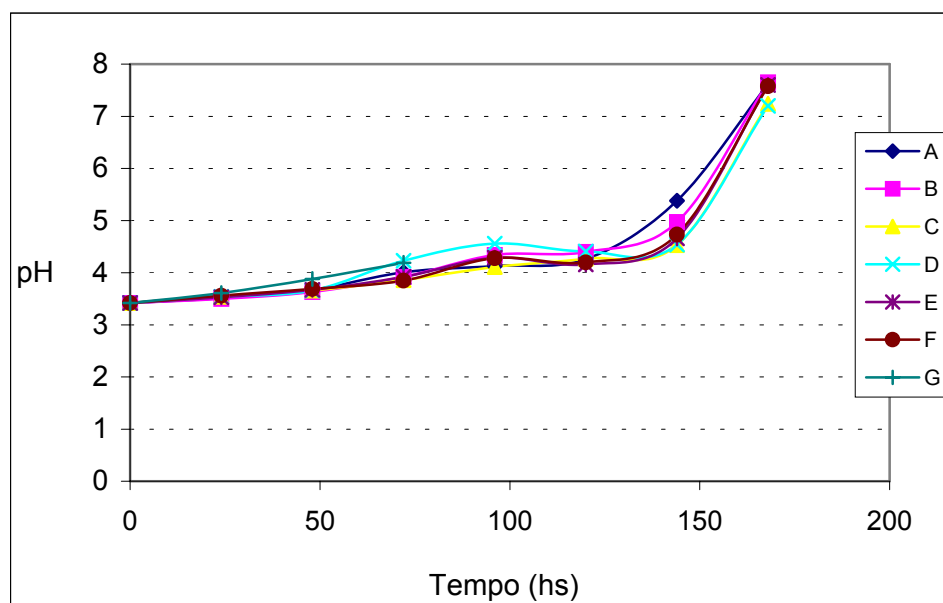


Figura 15– Controle de pH da polpa nas caixas de fermentação dos diferentes ensaios: A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

Os valores de pH dos diferentes ensaios mostraram-se bastante próximos entre si. As substâncias químicas adicionadas como inibidores não afetaram significativamente o pH da massa de fermentação.

5.3 Caracterização física das amêndoas fermentadas e secas

Na Tabela 14 são apresentados os valores de umidade, densidade aparente, massa média de amêndoas e número de amêndoas em 100g.

Tabela 14– Caracterização física das amêndoas fermentadas e secas dos diferentes ensaios

Ensaio	Umidade (%)	Densidade aparente (g/cc)	Massa média/ amêndoa (g)	Nº amêndoas/ 100g
A	5,29 ^b	0,93 ^a	1,02 ^a	95 ^b
B	5,21 ^b	0,90 ^a	1,14 ^a	79 ^d
C	4,95 ^b	0,88 ^a	0,95 ^b	101 ^a
D	5,20 ^b	0,89 ^a	1,05 ^a	93 ^b
E	4,76 ^b	0,92 ^a	1,12 ^a	84 ^c
F	5,33 ^b	0,90 ^a	1,16 ^a	78 ^d
G	5,84 ^a	0,93 ^a	1,12 ^a	93 ^b
M.D.S	0,86	0,26	0,16	2,12

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

Os valores de umidade foram próximos para todos os ensaios e compreendidos na faixa de 4,76 a 5,84, estando abaixo do limite de 8,0% estabelecido pelas especificações de padronização recomendadas pela ICCO (2003).

A densidade aparente e a massa média das amêndoas não apresentaram diferença significativa para os diferentes ensaios. O número de amêndoas em 100g variou para todos os ensaios, apresentando diferença significativa ao nível de 5% para a maioria dos mesmos. Por mais que os frutos utilizados tenham sido de mesma variedade e origem, a Tabela 11 evidenciou diferenças no tamanho das sementes, o que pode estar relacionado aos resultados encontrados para o número de amêndoas em 100g.

Na Tabela 15 é apresentada a composição em frações das amêndoas de cacau dos diferentes ensaios.

Tabela 15 - Composição em frações das amêndoas de cacau dos diferentes ensaios.

Composição em Frações			
Ensaio	Cotilédone (%)	Testa (%)	Gérmen (%)
A	83,49 ^{a,b}	15,66 ^a	0,85 ^a
B	84,00 ^{a,b}	15,14 ^a	0,86 ^a
C	82,77 ^{a,b}	16,42 ^a	0,81 ^a
D	83,42 ^{a,b}	15,76 ^a	0,82 ^a
E	82,63 ^{a,b}	16,44 ^a	0,84 ^a
F	83,75 ^{a,b}	15,40 ^a	0,85 ^a
G	84,47 ^a	14,70 ^a	0,83 ^a
M.D.S	1,76	1,77	0,053

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

De acordo com os valores apresentados nas Tabelas 14 e 15, as amêndoas obtidas nos diferentes ensaios mostraram-se características (SOARES, 2001; MATTIETTO, 2001; ZAMALLOA, 1994; VASCONCELOS, 1999).

5.4 Classificação das amêndoas fermentadas e secas

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos na prova de corte das amêndoas fermentadas e secas. A análise dos resultados permite uma primeira observação sobre presença de compostos fenólicos nos diferentes ensaios. O ensaio convencional (ensaio A) apresentou maior proporção de amêndoas marrons e

bem-fermentadas em relação aos demais. Conforme o esperado, o ensaio G (fermentação convencional por 3 dias) apresentou amêndoas violáceas e mal-fermentadas em elevada quantia. Quanto aos aspectos de qualidade das amêndoas (ardósias, germinadas, mofadas e achatadas), todas as amostras analisadas estavam de acordo com as especificações da ICCO (2003), sendo classificadas como tipo superior-Tipo I. As amêndoas analisadas de todos os ensaios apresentaram ausência de odores estranhos, mofo, amêndoas ardósias ou germinadas. Em relação ao desenvolvimento de aroma, as amêndoas analisadas de todos os ensaios apresentaram característica de produtos bem fermentados com exceção das amostras do ensaio G, que apresentaram pouco desenvolvimento de aroma e sabor.

Tabela 16 – Resultados da prova de corte efetuada nas amêndoas fermentadas e secas.

	Ensaio (%)							M.D.S
	A	B	C	D	E	F	G	
COLORAÇÃO								
Marrom	21 ^b	8,7 ^d	14,7 ^c	22 ^b	16,7 ^c	26 ^a	0 ^e	4,12
Violeta com partes marrons	45,7 ^a	47,3 ^a	33,7 ^c	39,7 ^{a,b}	44,3 ^a	38,6 ^b	30,7 ^b	3,90
Violeta	33,3 ^d	44,0 ^c	51,7 ^b	43,3 ^c	39,0 ^a	35,3 ^d	69,3 ^a	6,00
Danificadas/ Mofadas por insetos	0	0	0	0	0	0	0	-
Ardósias/germinadas	0	0	0	0	0	0	0	-
Achatadas e/ou outros defeitos	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	-
FERMENTAÇÃO								
Bem fermentadas	66,0 ^a	57,7 ^a	31,7 ^c	30,0 ^c	29,0 ^c	41,3 ^b	27,0 ^c	4,19
Parcialm. Fermentadas	24,0 ^c	31,0 ^c	49,3 ^b	58,3 ^a	59,0 ^a	48,7 ^b	50,0 ^b	6,06
Mal fermentadas	10,0 ^b	11,3 ^b	19,0 ^a	11,7 ^b	12,0 ^b	10,0 ^b	24,3 ^a	5,40

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de uma mesma linha, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

5.5 Características físico-químicas dos *nibs* de cacau

5.5.1 Acidez Titulável, pH e ácidos orgânicos

Tabela 17 – Valores de acidez titulável, pH e ácidos orgânicos das amêndoas fermentadas e secas de cacau.

Ensaio	pH	Acidez Titulável (m eq.
		NaOH/100g
A	5,20 ^{a,b}	11,93 ^d
B	5,24 ^c	12,13 ^c
C	5,37 ^{b,c}	13,48 ^a
D	5,27 ^c	12,67 ^b
E	5,13 ^c	11,73 ^e
F	5,13 ^c	11,94 ^d
G	5,89 ^a	8,72 ^f
Semente fresca	5,78 ^a	8,93 ^g
M.D.S	0,30	0.0403

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Os valores de pH e acidez titulável da semente fresca liofilizada e do ensaio G (fermentação por três dias) apresentados na Tabela 17 mostraram valores mais próximos entre si em relação aos outros ensaios, indicando que parte das reações bioquímicas esperadas para auxiliar no desenvolvimento do sabor não ocorreram neste ensaio. Segundo Dias (1998) in Soares (2001), a acidez do cacau não é própria da semente, mas adquirida durante a fermentação quando os tecidos dos cotilédones absorvem ácidos e outras substâncias produzidas por microrganismos envolvidos no processo. Segundo Jinap & Dimik (1990), as sementes frescas e do ensaio G são consideradas de pH elevado. As amêndoas obtidas nos ensaios A, B, C e D são classificadas na faixa de pH médio e as amêndoas E e F, na faixa de

pH baixo. A acidez titulável pode ter variado para todos os ensaios pela influência dos inibidores enzimáticos e no tempo de fermentação.

Na Figura 16 encontra-se o espectro típico obtido por Ressonância Magnética Nuclear para determinação dos ácidos orgânicos presentes nas sementes fermentadas e secas dos diferentes ensaios.

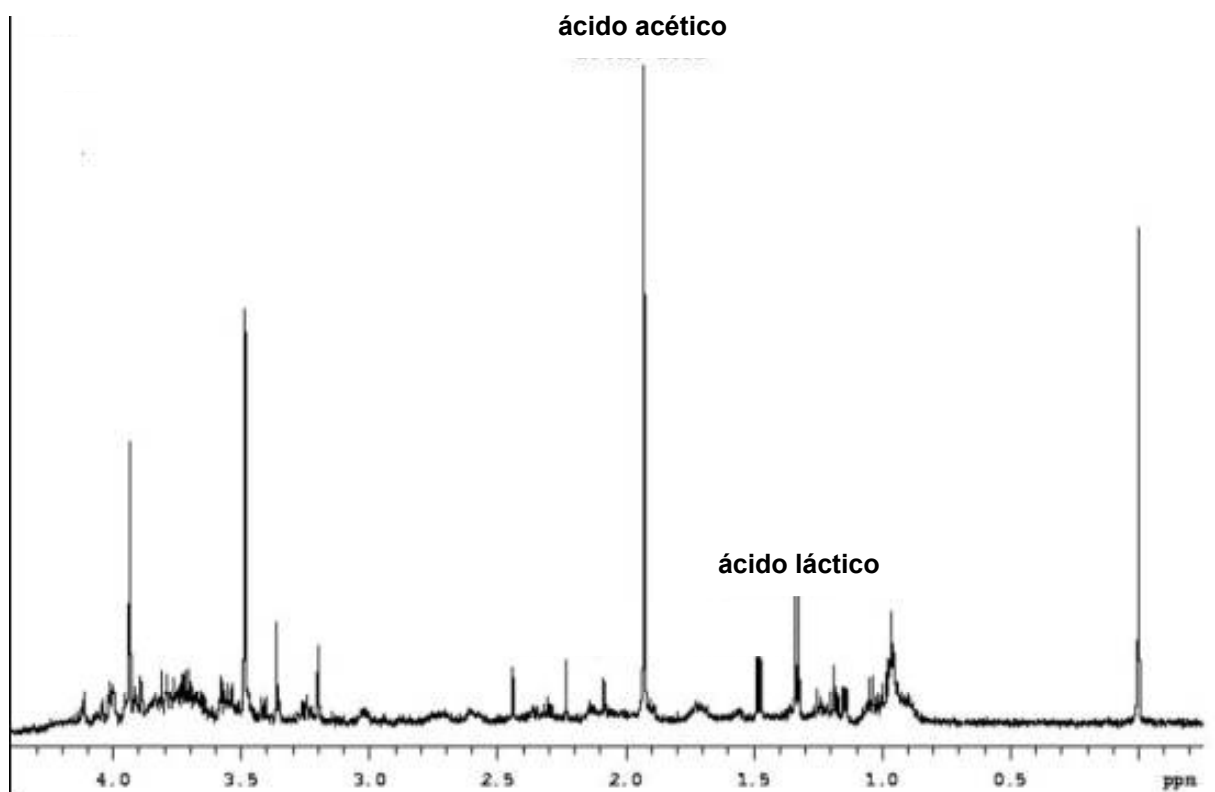


Figura 16 - Espectro típico obtido por Ressonância Magnética Nuclear para determinação dos ácidos orgânicos presentes nas sementes fermentadas e secas dos diferentes ensaios

Na Figura 17 são mostradas as concentrações dos principais ácidos orgânicos determinados por ressonância magnética nuclear. A adição dos inibidores enzimáticos provocou efeitos distintos na concentração dos ácidos orgânicos das amêndoas. Aparentemente, a adição de 10mg/100g de bissulfito de sódio no segundo dia de fermentação (ensaio C) levou a obtenção de amêndoas de cacau com elevado teor de ácido láctico, correspondente a pelo menos o dobro obtido nos outros ensaios. Os teores de ácido láctico foram semelhantes para todos os outros ensaios. Os maiores teores de ácido acético foram observados para os ensaios F e G e os menores foram obtidos nos ensaios B, D e E.

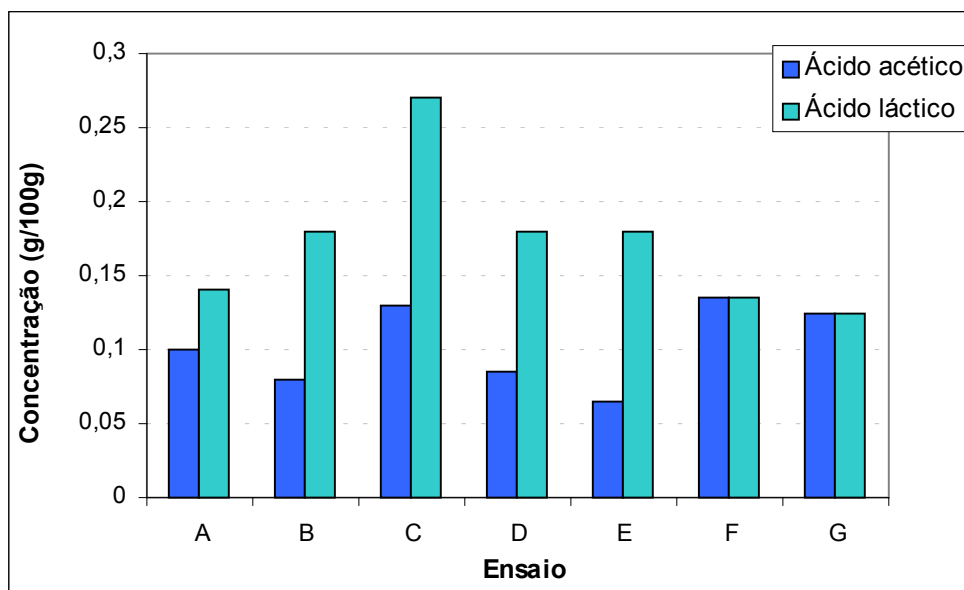


Figura 17. Concentração dos principais ácidos orgânicos monitorados para os diferentes ensaios após fermentação e secagem das sementes.

5.5.2 Composição Química das amêndoas de cacau

Na Tabela 18 são apresentados os valores obtidos nas determinações de lipídeos, proteínas e cinzas da semente *in natura* e das amêndoas dos diferentes ensaios.

Tabela 18 - Composição química das amêndoas fermentadas e secas e da semente fresca liofilizada.

Ensaio	Lipídeos	Proteínas	Fibras		Cinzas
			Solúveis	Insolúveis	
A	50,43 ^a	15,45 ^b	3,73	1,14	2,40 ^b
B	49,64 ^{a,b}	17,52 ^a	-	-	2,42 ^b
C	49,75 ^{a,b}	16,13 ^a	-	-	2,40 ^b
D	49,49 ^{a,b}	15,89 ^b	3,93	1,58	2,30 ^b
E	48,23 ^b	15,21 ^b	-	-	2,39 ^b
F	50,05 ^{a,b}	15,67 ^b	-	-	2,44 ^b
G	50,47 ^a	15,33 ^b	-	-	3,18 ^a
Semente fresca	49,36 ^{a,b}	14,45 ^c	-	-	3,36 ^a
M.D.S	1,62	1,32	-	-	0,051

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Os teores observados para lipídeos, proteínas e cinzas mostraram-se coerentes com os dados observados em trabalhos anteriores (SOARES, 2001; ZAMALLOA, 1994). De uma forma geral, a análise estatística dos resultados obtidos para o teor de lipídeos, proteínas e cinzas apresentou poucas diferenças significativas a 5% de significância entre os diferentes ensaios.

Cabe ressaltar que a metodologia utilizada para determinação das proteínas (micro Kjeidal) avalia o teor de compostos nitrogenados e não das proteínas em si. Isso explica porquê o resultado obtido para a semente fresca foi

menor que o observado após a fermentação e secagem das sementes dos diferentes ensaios, uma vez que durante a fermentação, diversas reações bioquímicas levam a perdas protéicas pela atuação de enzimas ou complexação com compostos fenólicos (HANSEN *et al.*, 1998; BRITO, 2000; SOARES, 2001). Em geral, foram observadas poucas diferenças significativas quanto ao teor de compostos nitrogenados, o que não significa que também tenham sido poucas as diferenças nos teores de proteínas dos diferentes ensaios.

A determinação de fibras solúveis e insolúveis foi feita apenas para os ensaios A e D (ensaio convencional com fermentação de sete dias e ensaio com adição de 0,05% de sulfato de cobre no terceiro dia de fermentação). A escolha destes ensaios foi feita em função de o primeiro ter sido o padrão, e o segundo, por ter mantido em quantidade superior os compostos fenólicos de interesse e por apresentar boa aceitação sensorial.

Em relação ao teor de lipídeos, a amostra E se mostrou diferente das demais, apresentando menor teor de gordura. Uma vez que a secagem das sementes foi feita de forma artificial, apesar de se ter sido utilizada uma estufa com circulação de ar, sabe-se que a transferência de calor em seu interior não é igual em todas as regiões. Dessa forma, é possível que, para as amêndoas que receberam mais calor, tenha ocorrido quebra nas células armazenadoras de gordura, e parte desta pode ter sido difundida para a casca.

Quanto ao teor de cinzas, as sementes frescas apresentaram o maior valor, seguido das amêndoas do ensaio G. Os demais ensaios apresentaram valores mais próximos entre si. A diminuição no teor de cinzas durante a etapa de fermentação ocorre pela solubilização de alguns minerais durante a liquefação da polpa. Os resultados observados para as amêndoas dos ensaios modificados foram bem próximos ao observado para o ensaio A (fermentação convencional por 7 dias).

5.5.3 Compostos Fenólicos Totais das sementes frescas, durante a fermentação e ao término da secagem

Na Tabela 19 estão apresentados os valores obtidos na determinação de compostos fenólicos totais da semente fresca liofilizada, após o terceiro e o sétimo dias de fermentação e após a secagem das amêndoas de cacau, bem como a porcentagem de perda destes compostos em relação a semente liofilizada.

Tabela 19 – Teor de fenólicos totais de sementes frescas, durante a fermentação e ao término da secagem dos diferentes ensaios

Ensaio	Semente Fresca (mg/g)	3º dia fermentação (mg/g)	7º dia fermentação (mg/g)	Secagem (mg/g)	% perda total
A	238,45	154,44 ^c	98,13 ^c	86,75 ^d	63,62
B	238,45	167,63 ^b	146,36 ^a	141,92 ^{a,b}	40,48
C	238,45	196,35 ^a	145,01 ^a	139,47 ^b	41,51
D	238,45	171,95 ^b	146,24 ^a	149,49 ^a	37,30
E	238,45	172,96 ^b	148,70 ^a	127,68 ^c	46,45
F	238,45	151,87 ^c	128,36 ^b	125,89 ^c	47,20
G	238,45	142,30 ^d	-	124,96 ^c	45,60
M.D.S	-	5,99	13,02	9,39	

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de mesma coluna, com mesma letra, não diferem entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

A Tabela 19 permite observar que a perda dos compostos fenólicos totais (desde a semente fresca ao término da etapa de secagem) do ensaio A (ensaio convencional por sete dias) foi de 63,62%. O ensaio D (fermentação com adição de 5mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes após 48hs) teve a maior retenção destes compostos (26,32% maior que o ensaio A e 8,3% maior que o ensaio G (fermentação convencional por 3 dias). Até o sétimo dia de fermentação, a perda de compostos fenólicos totais das amêndoas fermentadas com inibidores enzimáticos dos ensaios B (fermentação modificada com adição de 5mg de bissulfito de sódio /100g de massa de sementes após 48hs), C (idem a B com adição de 10mg/100g), D, E (idem a D com adição de 10mg/100g) e F (fermentação modificada com adição de 5mg de bissulfito de sódio /100g de massa de sementes após 120hs) foi de em média 37%, enquanto que para as amêndoas fermentadas por sete dias (ensaio A) foi de 58%. De uma forma geral, ao término da etapa de secagem, todos os ensaios apresentaram perda de 37 a 47% de compostos fenólicos totais, sendo que para o ensaio A observou-se perda de 63,62%. Desta maneira, todos os tratamentos propostos mantiveram maior teor de compostos fenólicos em relação a fermentação convencional. Deve-se ressaltar que a adição de 5 ou 10mg de bissulfito de sódio/100g amostra (ensaios B e C) proporcionou resultados muito próximos no teor destes compostos e que a adição de 5mg de sulfato cúprico /100g de amostra (ensaio D) manteve mais polifenólicos que 10mg/100g (ensaio E). Na seção 5.7 (análise sensorial), será possível notar que a baixa porcentagem de perda de compostos fenólicos nos ensaios em que foram realizadas tentativas de inibição enzimática não afetou significativamente o sabor dos chocolates produzidos, que foram considerados de melhor aceitação que aqueles produzidos a partir do ensaio G.

5.5.4 Proantocianidinas totais das sementes frescas, durante a fermentação e ao término da secagem

Os valores obtidos para proantocianidinas totais são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Concentração das proantocianidinas totais das amêndoas de cacau durante a fermentação e na etapa de secagem.

Ensaio	Semente Fresca (mg/g)	3º dia fermentação (mg/g)	7º dia fermentação (mg/g)	Secagem (mg/g)	% perda total
A	22,58	18,66 ^{d,e}	18,53 ^b	13,23 ^e	41,41
B	22,58	19,20 ^c	18,22 ^b	15,25 ^a	32,49
C	22,58	18,87 ^{c,d}	17,65 ^c	14,06 ^c	37,76
D	22,58	20,53 ^a	19,16 ^a	15,30 ^a	32,24
E	22,58	19,92 ^b	18,25 ^b	13,81 ^d	38,84
F	22,58	19,74 ^b	16,98 ^d	13,23 ^e	41,43
G	22,58	18,44 ^e	-	14,30 ^b	36,68
M.D.S	-	0,41	0,43	0,17	

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

A perda de proantocianidinas totais até o terceiro dia de fermentação variou de 9 (ensaio D) até 18% (ensaios A e G). Até o sétimo dia, as perdas variaram de 15 (ensaio D) a 24% (ensaio G), e ao término da etapa de secagem, se aproximaram, permanecendo em uma faixa entre 32 e 41%. Os ensaios B e D mantiveram maior teor de proantocianidinas em relação aos outros ensaios. Desta forma, a adição de 5mg de bissulfito de sódio (ensaio B) e de sulfato cúprico (ensaio D)/100g de amostra proporcionou resultados melhores na manutenção

das proantocianidinas totais em relação a adição de 10mg/100g (ensaios C e E respectivamente).

Algumas referências, como o trabalho de Soares (2001), indicam que, ao invés de perdas, ocorre aumento no teor de proantocianidinas totais desde o início da fermentação ao término da secagem. Deve-se ressaltar que, dependendo da metodologia de determinação destes compostos, pode-se estar avaliando o teor de taninos totais, levando-se em consideração, inclusive, aqueles que sofreram oxidação enzimática, reagiram com aminoácidos e proteínas ou se polimerizaram (taninos condensados) (KATTENBERG & KEMMINK, 1993).

5.5.5 Flavan-3-óis e procianidinas das sementes frescas, em diferentes dias de fermentação e ao término da secagem

O equipamento utilizado detectou, através das massas moleculares ionizadas, os monômeros (flavan-3-óis) e dímeros, trímeros, quadrâmeros e pentâmeros (procianidinas) presentes nos extratos das amostras de cada ensaio. Em trabalhos recentes, Wollgast (2001) e Hammerstone *et al.* (1999), utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas semelhante àquele utilizado neste trabalho (seção 4.2.7 c), identificaram as unidades poliméricas até decâmeros de amostras de cacau. A não utilização de um cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro não nos permitiu uma sensibilidade tão elevada, uma vez que os compostos não foram separados e ainda pela possibilidade de ter ocorrido uma supressão iônica dos mesmos. Também não possibilitou a quantificação absoluta dos compostos de interesse.

Na Figura 18 é possível observar um espectrograma típico obtido para esta determinação com os picos representados por 289; 577; 865; 1153,1 e 1440,3; correspondentes respectivamente à massa molecular (m) do composto químico (-)-epicatequina (290) ionizado negativamente, ou seja, adicionado de um elétron dividido pela carga elétrica (z). Dessa forma, 289, 577, 865, 1153,1 e 1440,3

representam respectivamente monômeros, dímeros, trímeros, quadrâmeros e pentâmeros dos flavonóides estudados.

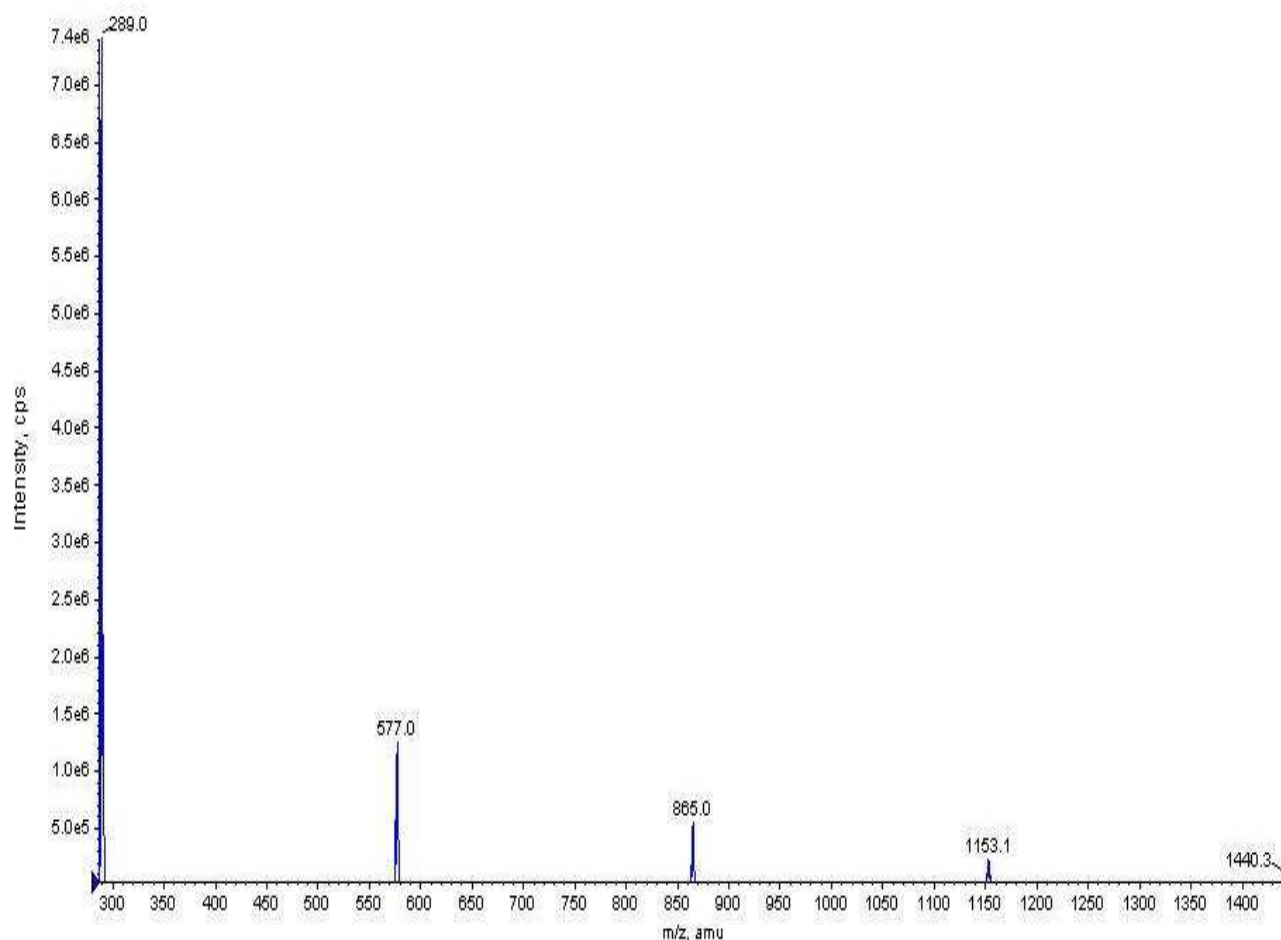
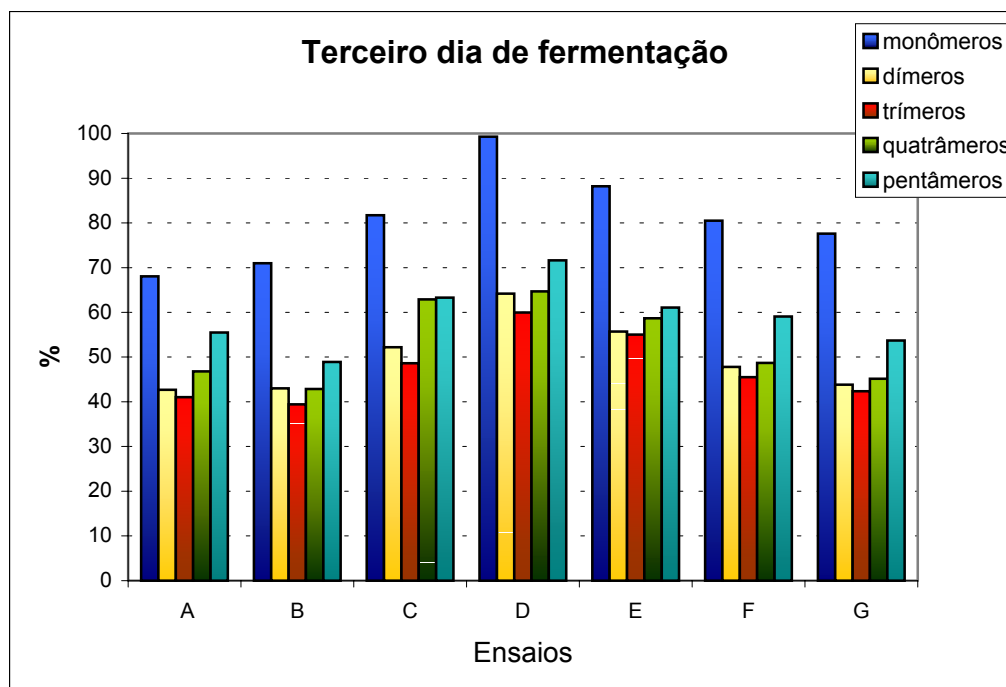
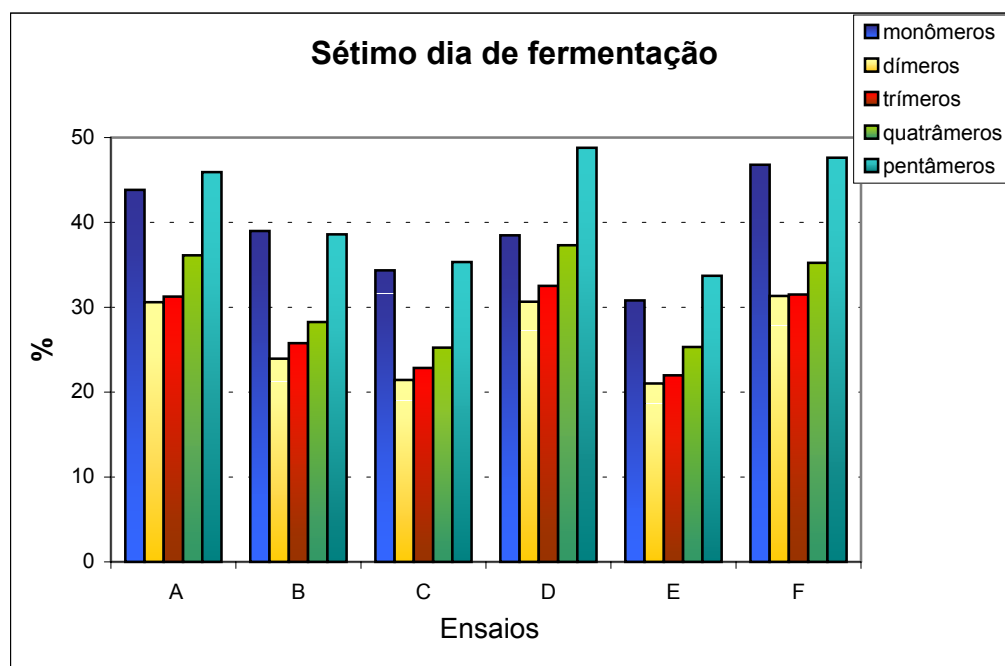


Figura 18 - Espectrograma típico obtido no espectrômetro de massas Q-Trap com os flavan-3-ol (unidade monomérica) e procianidinas (unidades poliméricas).

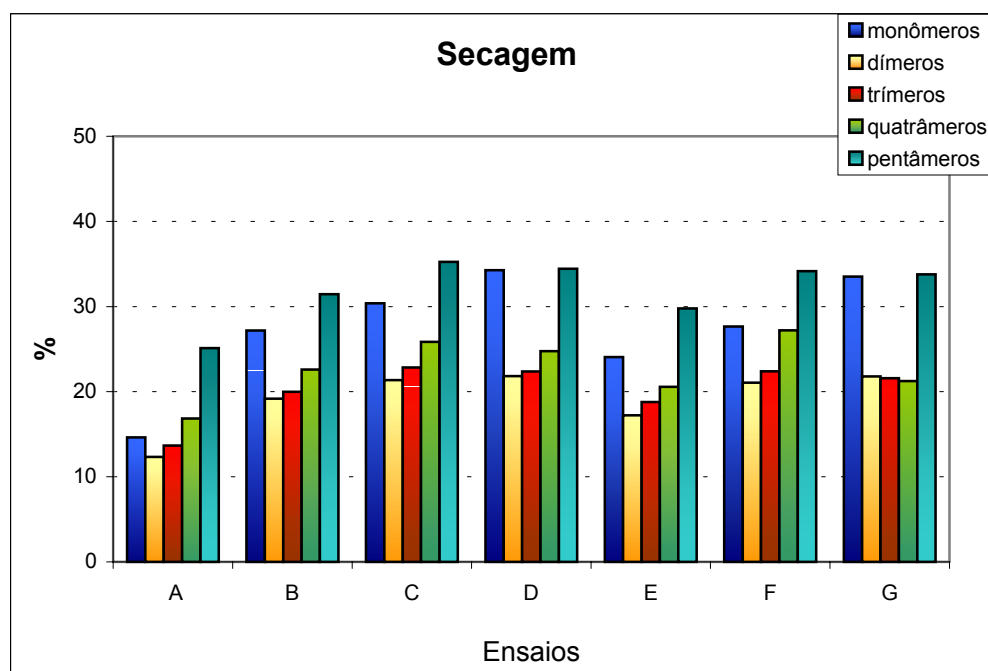
Para facilitar a comparação das intensidades observadas no equipamento utilizado na identificação e quantificação relativa dos flavan-3-óis em unidades monoméricas e poliméricas, os valores foram analisados em porcentagem. Desta forma, o valor observado para a semente fresca foi considerado com porcentagem máxima (100%) e os diferentes ensaios nos diferentes tempos de processo foram avaliados a partir deste. Na Figura 19 são apresentados os histogramas referentes aos diferentes dias de processo. Em **a** avaliou-se os teores de flavan-3-óis conservados até o terceiro dia de fermentação; em **b**, avaliou-se o mesmo dado para até o sétimo dia de fermentação; e da mesma forma, em **c** avaliou-se a conservação ao término da etapa de secagem.



(a)



(b)



(c)

Figura 19 – Histogramas referentes aos teores de flavan-3-óis (unidades monoméricas) e procianidinas (unidades poliméricas) mantidos nos diferentes dias de processo: a. até o terceiro dia de fermentação; b. até o sétimo dia de fermentação e c. ao término da etapa de secagem.

Na Tabela 21 apresenta-se a perda total de flavan-3-óis e procianidinas da semente fresca ao término da etapa de secagem. Nos anexos III e V são apresentadas as intensidades obtidas por espectrometria de massas dos flavonóides das sementes de cacau e o espectrograma típico obtido no espectrômetro de massas Q-Trap com os flavan-3-óis em unidades monomérica e poliméricas, respectivamente.

Para todos os polímeros, a perda observada para o ensaio A (fermentação convencional por 7 dias) foi maior em relação aos outros ensaios. Nota-se que a menor perda foi observada no ensaio D (fermentação modificada com adição de 5mg/100g de sulfato de cobre após 48hs), seguida do F (fermentação modificada com adição de 5mg de bissulfito de sódio /100g após 120hs) e do G (fermentação convencional por 3 dias). Torna-se importante ressaltar que, apesar de terem mantido consideravelmente o teor dos compostos de interesse, as amostras de chocolate produzidas com as matérias-primas obtidas nos ensaios F e G não foram bem aceitas sensorialmente, conforme se observa na seção 5.7.

Tabela 21 – Teor de perda total dos flavan-3-óis e procianidinas desde o início do processo (semente fresca) ao término da etapa de secagem.

Flavan-3-ol e Procianidinas	% PERDA TOTAL						
	A	B	C	D	E	F	G
Monômeros	85,36	72,83	69,64	65,73	75,93	72,36	66,48
Dímeros	87,68	80,83	78,66	78,17	82,79	78,96	78,22
Trímeros	86,34	80,00	77,15	77,63	81,22	77,62	78,43
Quatrâmeros	83,16	77,41	74,16	75,23	79,42	72,79	78,76
Pentâmeros	74,87	68,55	64,76	65,55	70,21	65,84	66,22

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

Nos histogramas apresentados na Figura 19, é possível notar que para o ensaio A, há uma perda maior de flavan-3-óis e procianidinas na secagem das amêndoas em relação a fermentação. Observando os resultados obtidos nos outros ensaios nota-se que os inibidores enzimáticos diminuíram a perda observada do sétimo dia de fermentação ao término da secagem.

Segundo Soares (2001), o aumento na difusão do oxigênio na massa das amêndoas durante a secagem promove uma oxidação máxima dos flavan-3-óis monoméricos e poliméricos. A atividade enzimática da PFO apresenta acentuado decréscimo após os dois primeiros dias de fermentação devido à geração de calor durante a fermentação e também pelo aumento nas concentrações de ácido acético, etanol e polifenóis. A enzima encontra novamente condições físicas para atuar na etapa de secagem (VILLENEUVE, 1985). Desta forma, a diminuição observada quanto à perda de flavan-3-óis e procianidinas na secagem sugere que os inibidores enzimáticos foram bem-sucedidos na diminuição da atividade desta e provavelmente de outras enzimas que degradam os compostos fenólicos de interesse.

De uma forma geral, a adição de 5 ou 10mg de bissulfito de sódio /100g (ensaios B e C respectivamente) proporcionou resultados muito próximos de teores de flavan-3-óis e procianidinas e a adição de 5mg de sulfato cúprico /100g (ensaio D) manteve mais flavan-3-óis e procianidinas que 10mg/100g (ensaio E), resultado também observado na determinação dos compostos fenólicos totais.

5.6 Caracterização dos chocolates produzidos a partir dos *liquors* obtidos dos diferentes ensaios de fermentação

Os valores medidos de umidade e tamanho de partículas dos chocolates produzidos com os *liquors* de cada ensaio se encontraram em uma faixa próxima, garantindo a não interferência destes parâmetros nos resultados das propriedades reológicas ou da avaliação sensorial. Os resultados são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Umidade e tamanho de partículas dos chocolates

Ensaio	Umidade* (%)	Tamanho de partículas** (μm)
A	0,94 $\pm$ 0,02	20,33 $\pm$ 1,24
B	0,98 $\pm$ 0,02	21,70 $\pm$ 2,54
C	1,02 $\pm$ 0,04	21,61 $\pm$ 2,03
D	0,87 $\pm$ 0,02	22,57 $\pm$ 2,78
E	0,94 $\pm$ 0,04	20,80 $\pm$ 1,98
F	0,87 $\pm$ 0,01	21,28 $\pm$ 2,12
G	1,01 $\pm$ 0,02	21,40 $\pm$ 1,75

* Médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão

** Médias de 10 repetições $\pm$ desvio padrão

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

Segundo CHEVALLEY (1994) a absorção de umidade, durante o processo de fabricação ou durante o armazenamento do chocolate, proporciona a formação de camadas de xarope na superfície das partículas dos açúcares, ocasionando um aumento do atrito entre estas partículas e levando a um aumento de sua viscosidade. Portanto, foi essencial garantir que os chocolates produzidos em planta-piloto mantivessem valores de umidade relativamente próximos entre si e

não absorvessem umidade durante seu armazenamento, garantindo que os resultados obtidos nas análises reológicas e sensoriais fossem consistentes.

Também foi fundamental manter o tamanho de partículas dentro de uma faixa de valores relativamente próximos visto que, segundo CHEVALLEY (1994), os valores de limite de escoamento de Casson aumentam consideravelmente quando o chocolate apresenta um tamanho de partícula baixo (menor que $14\mu\text{m}$), uma vez que, neste caso, ocorre um aumento do atrito entre as partículas e, portanto, um aumento do valor de limite de escoamento. Da mesma forma, ainda segundo Chevalley (1994), os valores de limite de escoamento de Casson diminuem quando o chocolate se apresenta arenoso (tamanho de partícula superior a $30\mu\text{m}$). Portanto, procurou-se neste trabalho, manter os valores de tamanho de partícula das amostras adequada e próxima entre si, compreendida entre 20 e $25\mu\text{m}$.

5.6.1 Propriedades reológicas dos chocolates produzidos a partir dos *liquors* obtidos dos diferentes ensaios de fermentação

Os parâmetros reológicos: viscosidade plástica de Casson (η_{ca}) e limite de escoamento de Casson (τ_{ca}) dos chocolates, assim como os coeficientes de correlação linear (R^2), se encontram na Tabela 23. Os coeficientes de correlação apresentaram variação na segunda casa decimal, demonstrando bom ajuste dos dados experimentais com o modelo de Casson.

Tabela 23 - Parâmetros reológicos e coeficientes de correlação médios dos chocolates produzidos a partir dos *liquors* dos diferentes ensaios

Ensaio	η_{ca}^* (Pa.s)	τ_{ca}^* (Pa)	R^2
A	5,28 ± 0,70	1,65 ± 0,23	0,9967
B	4,66 ± 0,62	1,86 ± 0,20	0,9952
C	4,88 ± 0,73	2,16 ± 0,23	0,9921
D	4,22 ± 0,68	2,30 ± 0,19	0,9928
E	4,47 ± 0,51	2,39 ± 0,21	0,9969
F	3,26 ± 0,71	3,06 ± 0,18	0,9951
G	4,1531 ± 0,71	3,5746 ± 0,21	0,9965

*Médias de 3 repetições ± desvio padrão

Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

Os chocolates apresentaram viscosidade plástica de Casson (η_{ca}) variando entre 3,26 e 5,28 Pa.s e limite de escoamento (τ_{ca}) variando entre 1,65 e 3,57Pa. Os valores obtidos para η_{ca} se encontram de acordo com a faixa de valores obtidos por Luccas (2001) (entre 2,65 e 5,26Pa.s) para chocolate amargo e de acordo com Vissotto *et al.* (1997), que obtiveram valores de η_{ca} de em média 5,56Pa.s e de τ_{ca} de em média 5,25Pa para coberturas de chocolate meio amargo regulares do mercado. Desta forma, os tratamentos químicos efetuados nos diferentes ensaios não provocaram modificações nas propriedades reológicas que comprometessem o produto final.

5.7 Análise Sensorial dos chocolates produzidos a partir dos *liquors* obtidos dos diferentes ensaios de fermentação

A seguir, são apresentados os resultados da análise sensorial realizada com os chocolates obtidos a partir dos *liquors* de cada ensaio. Os resultados médios obtidos no teste de aceitabilidade global, do aroma, do dulçor e do sabor, bem como da intenção de compra das amostras são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados médios obtidos no teste de aceitabilidade das amostras de chocolate produzidas a partir dos *liquors* dos diferentes ensaios

	Aceitabilidade global	Sabor	Aroma	Dulçor	Amargor residual	Intenção compra
Ensaio A	7,39a	7,32a	7,2a,b	0,18a	0a	4,04a,b,c
Ensaio B	7,07a,b	7,1a,b	6,96a,b,c	0,36a	0a,b	3,93a,b,c
Ensaio C	7,07 a,b	6,79a,b,c	7,14a,b	0,5a	-0,43	3,86a,b,c
Ensaio D	7,43a	7,5a	6,88a	0,54a	0,07a,b	4,11a
Ensaio E	7,57a	7,54a	7,57a	-0,07a	-0,14b	4,04a,b
Ensaio F	6,32b,c	6,15b,c	6,14c	0,39a	-0,14b	3,32 b,c
Ensaio G	6,18c	5,96c	6,43b,c	0,07a	0,64a	3,25c
MDS	0,8845	0,9222	0,9598	0,6025	0,7664	0,7452

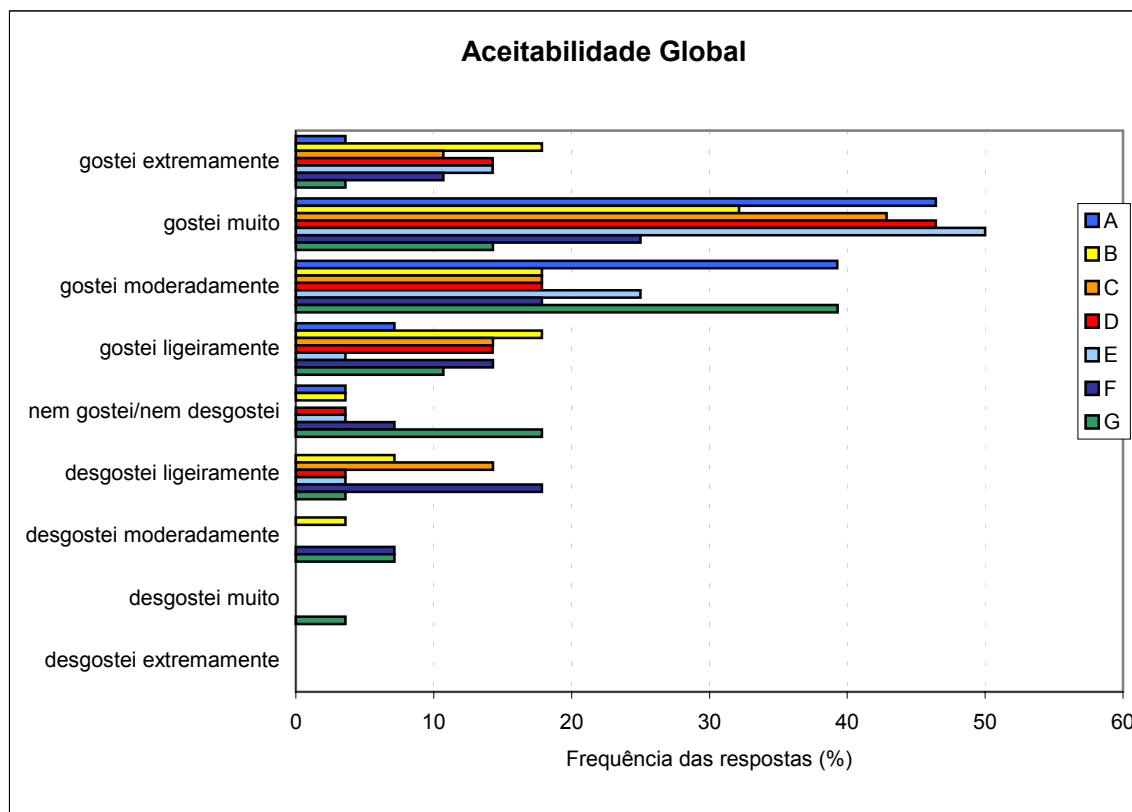
M.D.S: diferença mínima significativa ao nível de erro de 5% pelo Teste de Tukey.

Valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

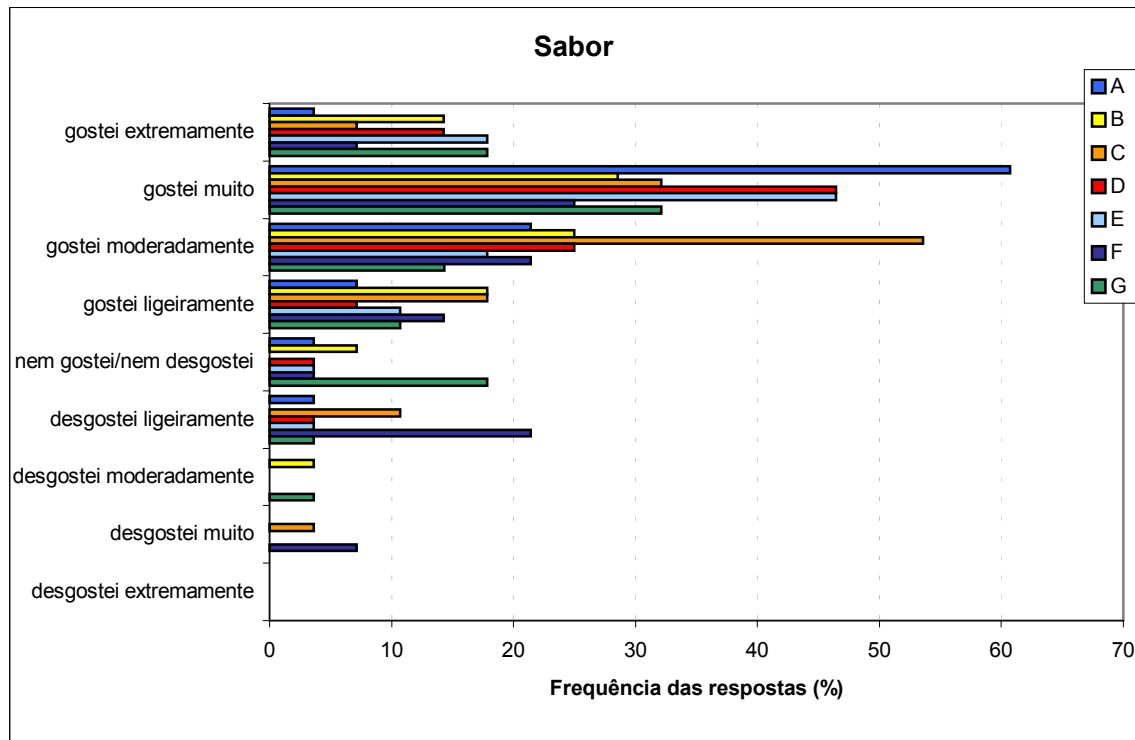
Na Tabela, A e G (fermentações convencionais com duração de 7 e 3 dias respectivamente); B, C e F (fermentações por 7 dias, modificadas com adição de 5mg, 10mg e 5mg de bissulfito de sódio/100g de massa de sementes com polpa após 48hs, 48hs e 120hs respectivamente e D e E (fermentações por 7 dias modificadas com adição de 5mg e 10mg de sulfato de cobre/100g de massa de sementes com polpa após 48 horas do início respectivamente).

Quanto à impressão global, sabor e aroma, verifica-se que as amostras de chocolate produzidas a partir do ensaio E tiveram melhores resultados, não diferindo estatisticamente entre si ao nível de 5% das amostras B, C e D. Todas essas amostras apresentaram médias correspondentes à “gostei muito”. Por outro lado, as amostras F e G obtiveram médias correspondentes à “gostei moderadamente” na escala utilizada para a avaliação da aceitabilidade global,

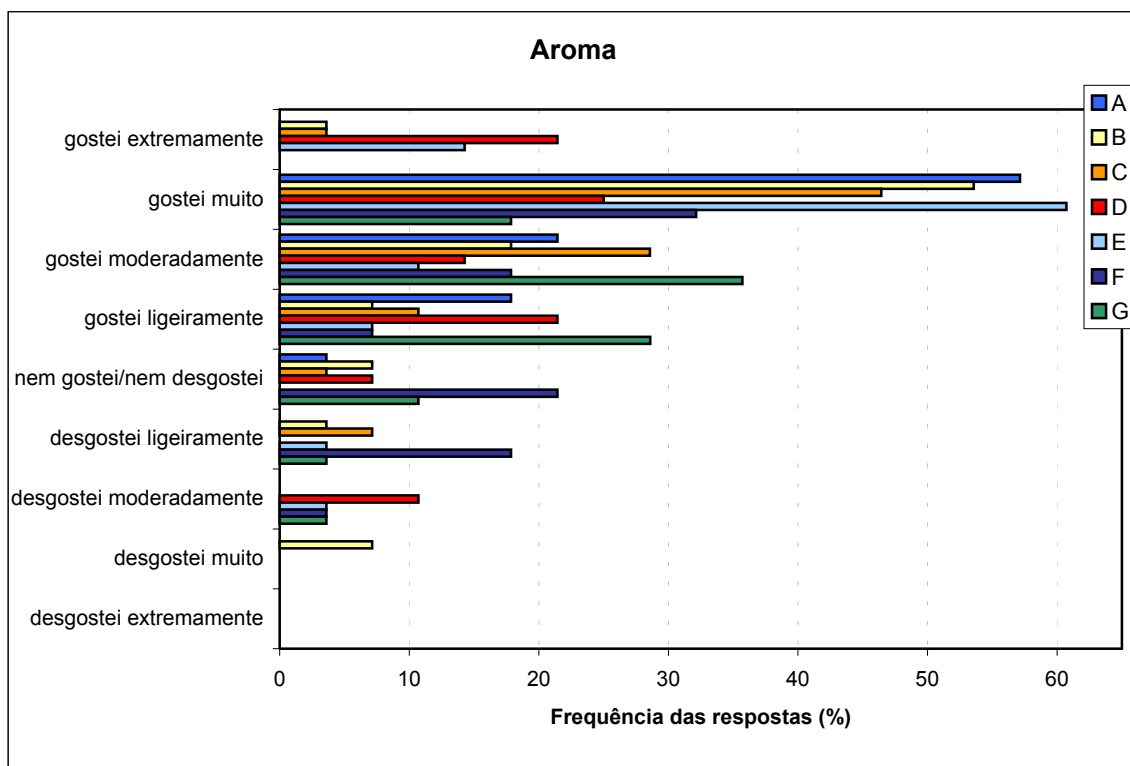
aroma e sabor. Quanto a intenção de compra, a amostra D teve maior preferência, não apresentando diferença estatística a 5% de significância das amostras B, C e E. As amostras A, B, C, D e E obtiveram médias correspondentes a “provavelmente compraria” na escala utilizada, enquanto que F e G obtiveram médias correspondentes a “talvez comprasse, talvez não”. Na Figura 20 é apresentada a distribuição em frequência dos valores atribuídos pelos consumidores aos produtos através da escala utilizada quanto à aceitabilidade global, sabor, aroma, dulçor e amargor.



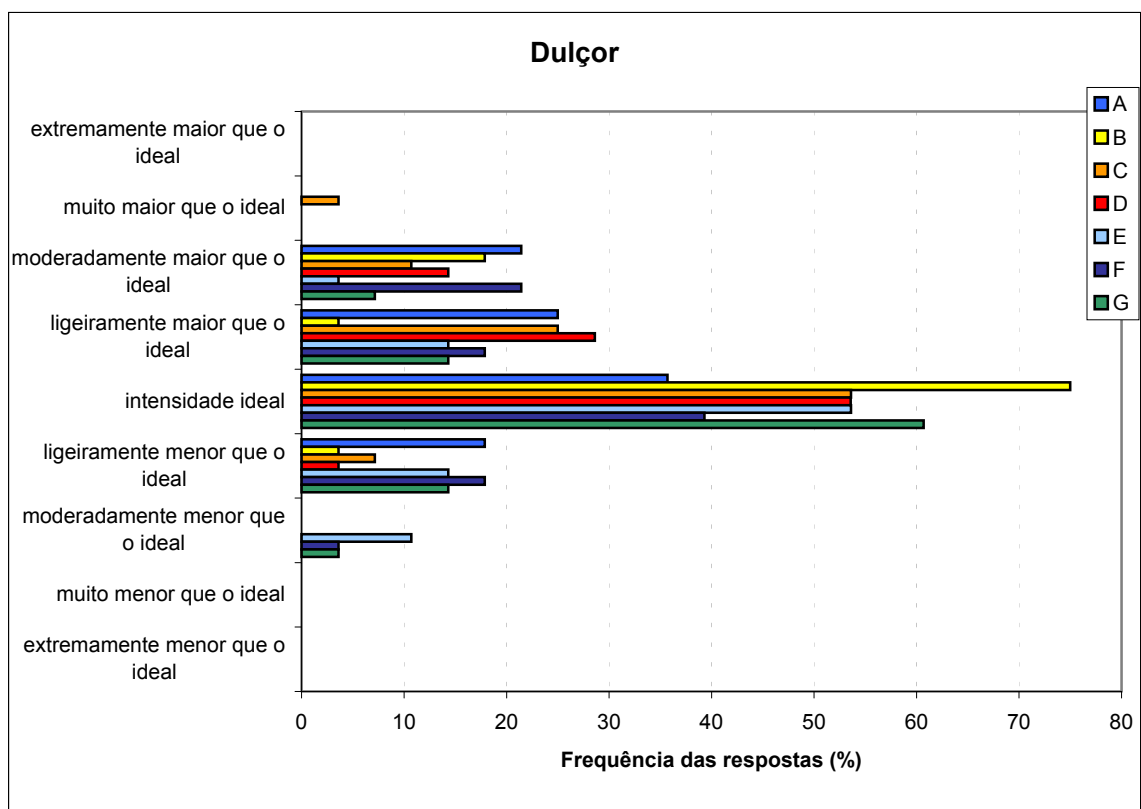
(a)



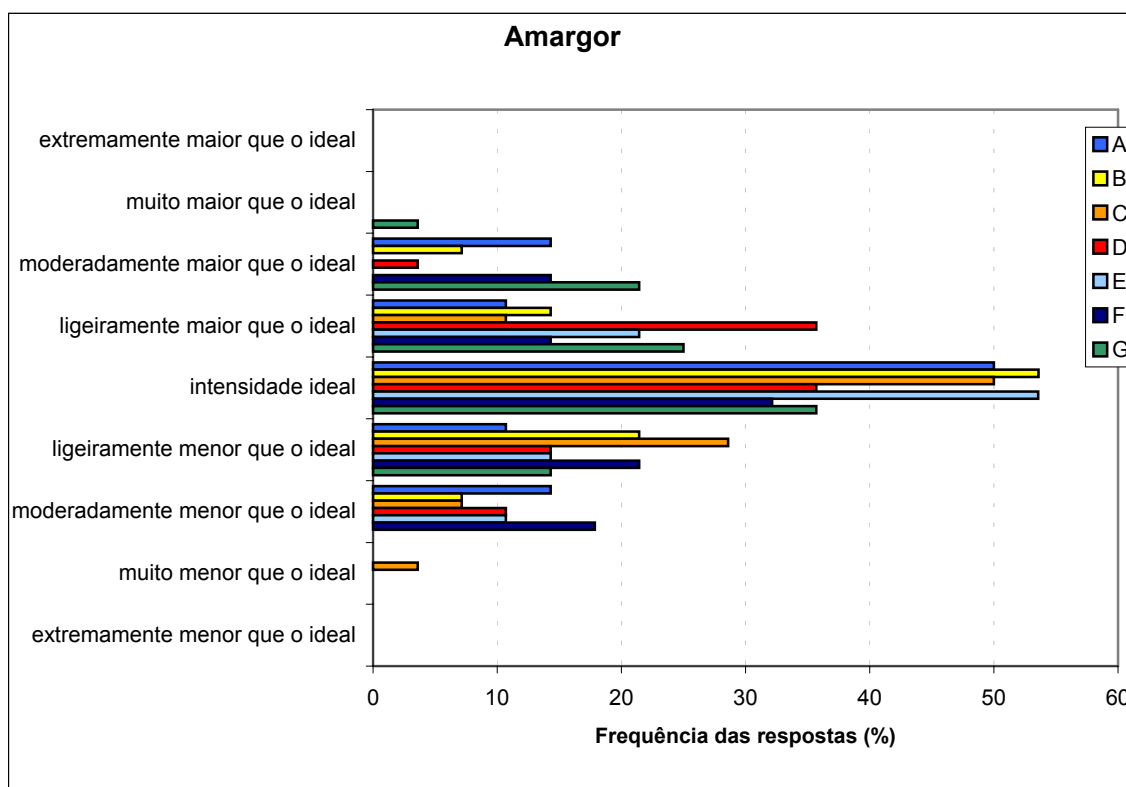
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 20 - Distribuição em frequência dos valores da escala atribuídos pelos consumidores às amostras de chocolate quanto à aceitabilidade global (a), do sabor (b), do aroma (c); dulçor (d) e amargor (e) .

Observa-se que, em geral, as amostras foram bem aceitas, obtendo elevadas percentagens de aceitação quanto aos aspectos avaliados, sendo as maiores porcentagens de rejeição observadas para as amostras F (fermentação modificada com adição de 5mg/100g de bissulfito de sódio após 120hs) e G (fermentação convencional por 3 dias).

Biehl *et al.*(1993); Puziah *et al.*(1998a) e Puziah *et al.*(1998b), demonstraram que sementes pouco fermentadas não desenvolvem o sabor do chocolate, mesmo sendo submetidas à torração, adquirindo características fracas de aroma e adstringentes e amargas em relação ao sabor, resultados observados principalmente para o ensaio G (somente três dias de fermentação).

5.8 Teores residuais Sulfato de Cobre

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Limite Máximo Tolerado (LMT) de Cobre em alimentos é de 3,0mg/100g.

O valor encontrado para as amêndoas do ensaio A, ao qual não se adicionou sulfato cúprico durante a fermentação, foi de 1,7mg/100g. Isso indica que esta substância química, que foi adicionada à lavoura cacaueteira na quantia de 2,5% do adubo, foi incorporada aos cotilédones das sementes durante o desenvolvimento dos frutos. As amêndoas as quais adicionaram-se 5,0 e 10,0mg/100g (amostras D e E respectivamente), apresentam valores de 2,06 e 1,93mg/100g respectivamente. Isso indica que o residual de cobre remanescente da adição feita durante a fermentação foi extremamente baixo, variando entre 0,23 e 0,36mg/100g. Este resultado já era esperado, levando-se em consideração que a substância química foi adicionada no início da fermentação a toda a massa, que inclui sementes frescas e polpa. Durante o processo fermentativo, as complexas reações bioquímicas produzidas liquefazem a polpa, permitindo seu escoamento quase total. Desta forma, grande parte do sulfato cúprico adicionado é eliminado junto à polpa escoada escoando pelos orifícios existentes nas caixas de fermentação.

Mesmo assim, a adição deste inibidor químico foi eficiente para permitir que os flavonóides das sementes fossem mantidos em maior quantidade que em uma fermentação convencional com duração de sete dias.

5.9 Atividade inibidora das substâncias químicas adicionadas

As substâncias químicas bissulfito de sódio e sulfato cúprico mostraram-se boas inibidoras das reações de degradação dos compostos fenólicos totais e dos flavan-3-óis em unidades monoméricas e poliméricas.

Considerando que os frutos e as sementes estudados já continham 1,7mg/100g de cobre proveniente da adubação feita com sulfato cúprico na lavoura cacaueira, procurou-se explicar como ocorreu a manutenção dos compostos fenólicos nos ensaios em que se adicionou, durante a fermentação, as substâncias químicas acima citadas. Conforme citado anteriormente, o teor residual de cobre proveniente da adição feita durante a fermentação (ensaios D e E) foi mínima. Uma explicação para o fenômeno observado se deve a forma como os minerais em questão atuaram nas sementes.

Segundo Malavolta (1974), quando adicionado à lavoura como adubo (calda bordalesa), o cobre provoca aumento na atividade fotossintética da planta. Em sua forma iônica, este micro-mineral é um ativador enzimático, sendo que a polifenoloxidase requer este elemento para a sua ação, conforme mostra a Figura 21.

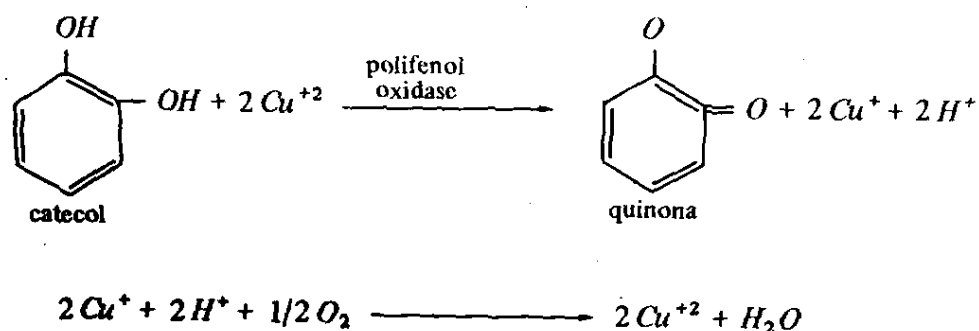


Figura 21 - Reação de degradação de composto fenólico pela atuação da enzima polifenoloxidase catalisada pelo cobre iônico.

Por outro lado, o composto sulfato de cobre ($CuSO_4$) é um conhecido inibidor das glicosidases (ZOLLNER, 1993). Deve-se ressaltar, portanto, que dependendo da forma em que se encontra (ionizado ou não), o cobre pode atuar de maneiras completamente opostas. Desta forma, sugere-se que esta substância quando adicionada durante a etapa de fermentação das sementes de cacau atuou de forma distinta de quando foi adicionada na lavoura juntamente com o adubo, sendo que no primeiro caso (não ionizado), apresentou atividade inibidora de enzimas que degradam os compostos fenólicos e no segundo (ionizado), atividade catalisadora.

6. CONCLUSÕES

- A adição dos inibidores enzimáticos durante a etapa de fermentação manteve os compostos fenólicos estudados em maior quantidade em relação ao ensaio convencional (fermentação durante 7 dias), comprovando que tanto a enzima polifenoloxidase quanto as glicosidases de fato participam da degradação dos compostos fenólicos estudados, não apenas na fermentação como também na secagem;
- A adição dos inibidores enzimáticos durante a etapa de fermentação não ocasionou modificações físico-químicas substanciais nos *liquors* obtidos para o preparo dos chocolates, que apresentaram características físicas (teor de umidade, viscosidade e limite de escoamento de Casson) inseridas em uma faixa aceitável, permitindo sua utilização industrial;
- Em termos globais, o chocolate produzido com o *liquor* obtido no ensaio D (fermentação modificada com adição de 5mg de sulfato de cobre /100g após 48hs) teve elevada aceitação e manteve elevado teor de compostos fenólicos.
- Por outro lado, o chocolate produzido a partir do ensaio G (fermentação convencional por 3 dias) teve pouco desenvolvimento de sabor, e conseqüentemente pouca aceitação sensorial.
- A adição de 5 e 10mg de sulfato cúprico/100g não ocasionou aumento no teor de cobre acima do permitido pela ANVISA às matérias-primas obtidas (*liquors* de cacau) e nem ao produto final (chocolate), viabilizando sua utilização para produção de matérias-primas para a produção de chocolate com elevado teor de compostos fenólicos de interesse.
- Em relação aos compostos fenólicos totais e flavan-3-óis (monoméricos e poliméricos), a adição de 5 ou 10mg de bissulfito de sódio/100g proporcionou resultados próximos na manutenção do teor de compostos com variação de 1,03% para fenólicos totais e de em média 3% para flavan-3-óis e

procianidinas e a adição de 5mg/100g de sulfato cúprico manteve 4,21% mais fenólicos totais e entre 3 e 10% mais flavan-3-óis e procianidinas que 10mg/100g.

- Quanto as proantocianidinas totais, os ensaios B e D mantiveram maior teor em relação aos outros ensaios. Desta forma, a adição de 5mg/100g de bissulfito de sódio e de sulfato cúprico proporcionou manutenção das proantocianidinas totais 5,27 e 6,66% maior em relação a adição de 10mg/100g respectivamente.
- A prova de corte feita com as amêndoas fermentadas e secas foi um bom indicativo inicial da ocorrência de reações físico-químicas para o desenvolvimento do sabor de chocolate, indicando que o ensaio G proporcionaria material com pouco desenvolvimento de sabor, por apresentar poucas sementes bem fermentadas e poucas com coloração marrom. Isso foi confirmado na análise sensorial.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de inibidores enzimáticos seletivos para minimizar a perda de compostos fenólicos na etapa de fermentação de sementes de cacau para a obtenção de matérias-primas ricas em compostos fenólicos, especialmente da classe dos flavonóides, mostrou-se efetiva no sistema de fermentação utilizado, ou seja, em escala piloto. Uma vez que o chocolate é um dos produtos mais apreciados mundialmente, e que o Brasil não apenas é o 5º maior produtor de chocolate como também de cacau do mundo, seria interessante que a proposta deste trabalho fosse aplicada em maior escala, utilizando-se uma massa de fermentação mais adequada no ambiente de produção das amêndoas de cacau, ou seja, nas fazendas cacaueiras, possibilitando, desta maneira, verificar a eficiência na retenção de compostos fenólicos observada em escala piloto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.A.M. **Epidemiologia da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (STAHEL) Singer) em cacaueiros enxertados em Uruçuca, BA.** Piracicaba, 2003. Dissertação - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária <disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/index.htm>> Acesso em: 15 de novembro de 2003.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Edited by W. Horwitz 13 ed. Washington, 850p. 1984.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Edited by W. Horwitz 16 ed. Washington, 850p. 1997 v.2.

ARTS, I.C.W; HOLLMAN, P.C.H; KROMHOUT, D. Chocolate as a source of tea flavanoids. **The Lancet**. London. V. 354, p. 488, 1999.

BASTOS, E. **Cacau: A riqueza agrícola da América.** São Paulo: Ícone, 1987. 130p.

BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate;** trad. de Mariano González Alonso. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 423 p.

BECKMAN INSTRUMENTS, INC Beckman 118, 119 CL Amino acid analyzer. **Instruction Manual.** Spinco Division. Palo Alto, 1977.

BIEHL, B., HEINRICHS, H., ZIEGELER-BERGHAUSEN, H., HAMMOOR, M. & SENYUK, V. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. **Angew. Botanical.** v. 67 p. 59-65,1993.

BIEHL, B. & PASSERN, D. Proteolysis during fermentation like incubation of cocoa seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33; n.12; p.1280-1290, 1982.

BRAUDEAU, J. El cacao: técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona. Ed. Blume, 1970. 297p.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutritional Review**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRITO, E.S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor.**

Campinas, 2000. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

BRUINSMA, K.K. & TAREN, D.L. Chocolate: Food or Drug? **Journal of the Americam Dietetic Association**, n. 99, p. 1249-1256, 1999.

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em < <http://www.ceplac.gov.br/>> Acesso em 20 de janeiro de 2003.

CHEVALLEY, J. **Chocolate Flow Properties**. In: Industrial Chocolate Manufacture and Use. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1994. 408p.

CNNPA - COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS. Resolução de 12 de Julho de 1978. **Legislação de Chocolate**. Ministério da Saúde, Brasil, 1978.

COCOAPRO - Disponível em < <http://www.cocoapro.com>> Acesso em 30 de julho de 2002.

CONCEX - COMISSÃO NACIONAL DO COMÉRCIO EXTERIOR (BRASIL), RESOLUÇÃO Nº 42, Rio de Janeiro. 1968. 9p.

CRESPO, S. Judging the quality of cocoa beans. *The Manufacturing Confectioner*, Chicago, v. 4; p. 59-64, 1985.

CROSS, E; VILLENEUVE, F.; VINCENT J. C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. **Café, Cacao Thé**, Paris, v.16; n. 2; p.109-113, 1982.

CRAMER, K. M. The Attitudes to Chocolate Scale. In J. Maltby, C.A. Lewis, & A. Hill (Eds.), **A Handbook of Psychological Tests**. Lampeter, Wales, UK: Edwin Mellen Press. p. 410-413. 2000.

CRAMER, K.M & HARTLEIB, M. The attitudes to chocolate questionnaire: a psychometric evaluation. **Personality and Individual Differences**. n. 31, p. 931-942, 2001.

CRESPO, S. Judging the quality of cocoa beans. **The Manufacturing Confectioner**, Chicago, v.4, p. 59-64, 1985.

DI MARZO, V.; FONTANA, A.; CADAS, H.; SCHINELLI, S.; CIMINO, G.; SCHWARTZ, J.C. & PIOMELLI, D., Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**, London, v. 372, p. 686–691, 1994.

DI TOMASO, E.; BELTRAMO, M. & PIOMELLI, D., Brain cannabinoids in chocolate. **Nature**, London, v. 382, p. 677-678, 1996.

DOUGHERTY, R.M; ALMAN, M.A; IACONO, J.M. Total and low-density lipoprotein cholesterol fractions and fecal fatty acid excretion of men consuming diets containing high concentrations of stearic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 60, p. 1043, 1994.

DRUMMOND, M.C.M. **Relação entre o grau de torração de cacau (*Theobroma cacao* L.), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**. Campinas, 1998, 127p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1998.

DRUZIAN, J.I.C SCAMPARINI, A. **Determinação de açúcares e ácidos orgânicos de polissacarídeos produzidos por diferentes espécies de Rhizobios**. II Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos – Processo e Ação para o ano 2000, p.32, out. 1997.

FADINI, A.L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração frente ao processo por microondas**. Campinas, 1998, 109p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1998.

FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Disponível em < <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture> > Acesso em 18 de Julho de 2003.

FERNÁNDEZ-BARBERI, S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) utilizando polifenoloxidase extraída da pinha (*Annona squamosa* L.) e tratamento térmico não convencional**. Campinas, 1999. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

FORMICA, J.V. & REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 33; n. 2; p. 1061-1080, 1995.

FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL, V.C. The mechanism of cacao curing. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**. New York, n. 25; p. 457-459, 1963.

FORSYTH, W.G.C; QUESNEL, V.C. Cacau glycosidase and colour changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, p. 505-509, 1958.

GIL J.C. Uso de soro de leite em pó na fabricação de chocolate. In: **Apostila “Seminário de inovações em tecnologia de fabricação de chocolates”**. ITAL - Campinas, 2001. 77p.

GRAPIUNAMENTE. Disponível em < www.grapiunamente.hpg.ig.com.br > Acesso em 10 de Janeiro de 2003.

GUYTON, B. Commodities – Cocoa Review. **2003 Issues, trends and performance of the chocolate and confectionery industries**, New York. 40p.

HAMMERSTONE, J.F.; LAZARUS, S.A.; MITCHELL, A.E.; RUCKER, R.; SCHIMITZ, H.H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47; n. 2; p. 490-496, 1999.

HANNEKENS, C.H. Platelet inhibitors and antioxidant vitamins in cardiovascular disease. **American Heart Journal**, Saint Louis, v. 128; p. 1333-1336, 1994.

HANSEN, C.E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London. v.77, p. 273-281, 1998.

HELRICH, K. (Ed.) **Official methods of analyses of the Association of Official Agricultural Chemists**: agricultural chemicals, contaminants, drugs. 15.ed. Arlington: AOAC, 1990. 2v.

HURST, W.J.; MARIN, R.A. & ZOUMAS, B.L. Biogenic amines in chocolate - A review. **Nutritional Report International**. v. 26, p. 1081–1086. 1982.

ICCO - International Cocoa Organization. Disponível em < <http://www.icco.org> >. Acesso em 15 de Novembro de 2003.

JINAP, S.; DIMICK, P.S. Acidic characteristics of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 55, n. 2, p. 547-550, 1990.

KATTERBERG, H. R. & KEMMINK, A. The flavor of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. In G. Charalambous (Ed.), **Food flavor, ingredients and composition**. p. 1-22, 1993. New York: Elsevier Science Public.

KEALEY, K.S., SNYDER, R.M., ROMACZYK, L.J., GEYER, H.M., MEYERS, M.E., WHITHCARE, E.J., HAMMERSTONE, J.F. & SCHMITZ, H.H. (1998). Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same medical uses. **Patent Corporation Treaty (PCT) WO 98/09533**, Mars Incorporated, USA.

KIM, H., & KEENEY, P.G. (-)Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p.1090-1092, 1984.

KONDO, K., HIRANO, R., MATSUMOTO, A., IGARASHI, O., & ITAKURA, H. Inhibition of LDL oxidation by cocoa. **The Lancet**, London, n. 348, p.1514, 1996.

KRIS-ETHERTON, P.M.; MUSTAD, V.A. Chocolate feeding studies: a novel approach for evaluating the plasma lipid effects of stearic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**. New York, n. 65, v.5, p.1577–1701, 1997.

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

LEKSTRON, J.A; BELL, W.R. Aspirin in the prevention of thrombosis. **Medicine**, London, v. 70, p. 161-178, 1991.

LEONG W. H.; CHUAH C. T. Tocomin palm tocotrienol complex – um novo e emergente fitoquímico: a vitamina do século XXI. **Food Ingredients**, São Paulo, n.15, p.18-22, nov./dez. 2001.

LIEBOWITZ, M.R. & KLEIN, D. Hysteroid dysphoria. **The Psychiatric Clinicas of North America**, Philadelphia, n.2, p. 555–575, 1979.

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

LOPEZ, A.S & MCDONALD, C.R. Preliminary test of a simple and inexpensive system for the mechanical aeration of box-type cacao fermentation. **Revista Theobroma**, Itabuna. v.13, n.3, p. 233-248, 1982.

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

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas a manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. Campinas, 2001. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

MACDIARMID, J.I. & HETHERINGTON, M.M. Mood modulation by food: an exploration of affect and cravings in "chocolate addicts". **British Journal of Clinical Psychology**, Leicester, n. 34, p. 129-138, 1995.

MAO, T.K., POWELL, J.W., KEEN, C.L., SHIMITZ, H.H, HAMMERSTONE, J.F., GERSHWIN, M.E. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences**, Elmsford, v. 66; n. 15; p.1377-1386, 2000.

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).** Campinas, 2001. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

MCKIM, W.A. **Drugs and Behavior: An Introduction to Behavioral Pharmacology**, Prentice Hall, New York. 1997.

MICHENER, W. & ROZIN, P., Pharmacological versus sensory factors in the satiation of chocolate craving. **Physiologic Behavior**, Elmsford, n. 56, p. 419–422, 1982.

MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology**. 3. ed. New York: An AVI Book published by Van Nostrand Reinhold, 1989. 904 p.

NEHLIG, A.; DAVAL, J.L. & DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Research Review**, Amsterdam, n.17, p.139–170, 1992

O.I.C.C - OFFICE INTERNATIONAL DU CACAO ET DU CHOCOLAT. **Analytical methods of the Office International du Cacao et du Chocolat**. 1984. P.8b.

OSTERUD, B. A global view on the role of monocytes and platelets in atherogenesis. **Thrombosis Research, An International Journal On Vascular Obstruction, Hemorrhage And Hemostasis**, Elmsford, v. 85; p. 1-22, 1997.

PATERSON, I.A.; JUORIO, A.V. & BOULTON, A.A. 2-phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, New York, v. 55, p. 1827–1837. 1990.

PEREIRA, J.L; RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M. de; ALMEIDA, L.C.C. The First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa region in Brasil. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 67; n. 2; p. 188-189, 1990.

PEZOA-GARCIA, N.H. **Contribution a l'a etude d'un capter por controller en continu procédé de torrefaction**. France, 170p., 1989. Tese de doutorado. Université de Technologie de Compiègne, 1989.

PICKENHAGEN, W.; DIETRICH, P.; KEIL, B.; POLONSKY, J.; NOUAILLE, F.; LEDERER, E. Identification of the bitter principle from cocoa. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 58, n. 4, p. 1078-1086, 1975.

PORTER, L.J. Flavans and proanthocyanidins In: HARBORNE, J.B. Ed. **The Flavonoids: Advances in research since 1986**. 3.ed. London: Chapman & Hall, 1993, cap. 2, p.23-55.

PORTER, L.J., MA, Z., & CHANG, G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, New York, v. 5, p. 1657-1663, 1991.

PORTER, L.J. **Methods in plant biochemistry**. Academic Press, 1989, v.1, cap.11, p. 389-419.

PUZIAH, H.; JINAP, S., SHARIFAH, K.S.M. & ASBI, A. Changes in free amino acids, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 78, p. 535-542, 1998a.

PUZIAH, H.; JINAP, S., SHARIFAH, K.S.M. & ASBI, A. Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London. v. 78, p. 543-550 1998b.

QUESNEL, V. C. Ats inducing the death of cacao seed during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, n.16, p. 441-447, 1965.

QUESNEL, V. C. Fractionation and properties of the polymeric leucocyanidin of the seeds of *Theobroma cacao*. **Phytochemistry**, New York, v. 29; n.3; p. 1583-1592, 1968.

REEVES, S.G.; MCDOWELL, I.; BEHN, K.; DENCH, J. Biochemical studies of cocoa bean o-diphenol O₂ oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chemistry**, Oxford, v.29, p.209-219, 1988.

REIN, D.; LOTITO, S.; HOLT, R.R.; KEEN, C.L; SCHMITZ, H.H; FRAGA, C.G. Epicatechin in human plasma: *In vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.130, p.2109–2114, 2000.

RICE-EVANS, C.A; MILLER, N.J & PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic-acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 20, n.7, p. 933-956, 1996.

ROELOFSEN, P.A. Fermentation drying and storage of cocoa beans. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 8; p. 226-229, 1958.

ROHAN, T.A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: production of reduction sugars during fermentation of cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 32, p. 399-402, 1967.

ROHAN, T.A & CONNEL, 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.

ROSA, I. S. **Enxertia do cacauero**. Ilhéus: CEPLAC/SUBES/CEPEC, 1998. 42p.

ROZIN, P.; LEVINE, E. & STOESS, C. Chocolate craving and liking. **Appetite**, London, n.17, p. 177–185, 1991.

SABELLI, H.C. & JAVAID, J.I. Phenylethylamine modulation of affect: therapeutic and diagnostic implications. **Journal of Neuropsychology**, Lissie, n. 7, p. 6–14, 1995.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S., & OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SCHAWNN, R.F.; LOPEZ, A.; SILVA, D.O. & VANETTI, M.C.D. Influência da frequência e intervalos de revolvimentos sobre a fermentação do cacau e qualidade do chocolate. *In*: Centro de Pesquisas do cacau. (Itabuna, Bahia, Brasil). **Informe Técnico**. P.22-31, 1990.

SCHUMAN, M., GITLIN, M. & FAIRBANKS, L. Sweets, chocolate, and atypical depressive traits. **Journal of Nervous and Mental Disease**. n. 175, p. 491–495, 1987.

SHAUGHNESSY, W.J. Cocoa beans – planting through fermentation – its effect on flavor. **Manufacturing Confectioner**, Chicago, n. 72, p. 51-58, 1992.

SOARES, M.S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através de ação enzimática durante a fermentação**. Campinas, 2001. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

TALBOT, G. Chocolate temper. *In*: BECKETT, S.T. Ed. **Industrial chocolate manufacture and use**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1994. cap. 11, p.156-166.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físico-químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum) em**

pesquisa para utilização em produto alternativo ao chocolate. Campinas, 1999. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

VILLENEUVE, F.; CROS, E.; MACHEIX, J.J. Effet de la fermentation sur lês activités peroxidasiques et polyphenoloxidasiques de la fève de cacao. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 33, n.2, p. 113-120, 1985.

VISCOSITÉ du Chocolat: Determinacion de La Limite d'é Coulement et de La Viscosité Plastique de Casson. **Revista Internacional de Chocolate**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 216-218, 1973.

VISSOTTO, F.Z.; LUCCAS, V.; BRAGAGNOLO, N.; TURATTI, J.M.; GRIMALDI, R.; FIGUEIREDO, M.S. Caracterização físico-química de chocolates comerciais elaborados com gorduras alternativas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 139-148, 1999.

VISSOTTO, F.Z. *et al.* Propriedades reológicas de chocolates comerciais tipo cobertura. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.27, n.1/2, p.129-137, jan./dez. 1997.

VOIGT, J.; BIEHL, B. HEINRICHS, H.; KAMARUDDIN, S.; MARSONER, G.C.; HUGI, A. In vitro formation of cocoa specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of aspartic endoprotease and carboxipeptidase. **Food Chemistry**, Oxford, n.49, p.173-80, 1994.

URBANSKI, J.J. Chocolate flavor/origins and descriptions. The effects of process and bean source. **Manufacturing Confectioner**, Chicago, n.72, p.69-82, 1992.

WANG, J.F.; SCHRAMM, D.D.; HOLT, R.R.; ENSUNSA, J.L.; FRAGA, C.G.; SCHMITZ, H.H; KEEN, C.L. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. **Journal of Nutrition**, n.130. p.2115S–2119S, 2000.

WATERHOUSE, A.L., SIRLEY, J.R., & DONOVAN, J.L. Antioxidants in chocolate. **The Lancet**, London, n. 348, p. 834, 1996.

WEINGARTEN, H.P. & ELSTON, D. The phenomenology of food cravings. **Appetite**, London, n.15, p. 231–246, 1991.

WEISBURGER, J.H, WILLIAMS, G.M. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicology Science**; v. 49, p. 231–246, 2000.

WHITE, J.G. Platelets and arteriosclerosis. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 9, 1994.

WOLLGAST, J., AGAZZI, M.E; ANKLAN, E. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 926; n. 1, p. 211-220, 2001.

WOLLGAST, J., ANKLAN, E. Review in polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, n. 33, p. 423-447, 2000.

YU, S.; DERR, J.; ETHEERTON, P.M. Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 61, p. 1029-1039, 1995.

ZAMALOA, 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**. Campinas, 1994. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ZOLLNER, H. **Handbook of enzyme inhibitors**. Weinheim; Basel, 1993. 2v. 606p.

ANEXO I - Controle do pH da massa de sementes de cacau durante a fermentação

		pH nas caixas de fermentação							
		Horas							
Caixa	Ensaio	0	24	48	72	96	120	144	168
C1	A	3,42	3,51	3,67	4,01	4,13	4,26	5,38	7,62
C2	A	3,42	3,50	3,63	3,92	4,34	4,40	4,97	7,65
C3	B	3,42	3,54	3,66	3,86	4,11	4,27	4,53	7,24
C4	B	3,42	3,54	3,66	4,23	4,56	4,41	4,54	7,20
C5	C	3,42	3,53	3,67	3,92	4,29	4,16	4,66	7,60
C6	C	3,42	3,56	3,69	3,85	4,28	4,20	4,73	7,58
C7	D	3,42	3,61	3,93	3,89	4,09	4,21	4,55	7,92
C8	D	3,42	3,62	3,68	3,93	4,24	4,46	4,77	7,89
C9	E	3,42	3,61	3,67	3,81	4,07	4,16	4,43	7,65
C10	E	3,42	3,57	3,64	3,85	4,03	4,17	4,97	7,60
C11	F	3,42	3,55	3,64	3,85	4,08	4,32	4,61	5,65
C12	F	3,42	3,58	3,83	3,85	3,91	4,22	5,02	5,87
C13	G	3,42	3,57	3,69	3,89	4,18	---	---	---
C14	G	3,42	3,52	3,64	3,87	4,20	---	---	---

Ensaio	pH							
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
A	3,42	3,51	3,67	4,01	4,13	4,26	5,38	7,62
B	3,42	3,50	3,63	3,92	4,34	4,40	4,97	7,65
C	3,42	3,54	3,66	3,86	4,11	4,27	4,53	7,24
D	3,42	3,54	3,66	4,23	4,56	4,41	4,54	7,20
E	3,42	3,53	3,67	3,92	4,29	4,16	4,66	7,60
F	3,42	3,56	3,69	3,85	4,28	4,20	4,73	7,58
G	3,42	3,55	3,68	3,88	4,19	-	-	-

ANEXO II - Controle da temperatura das caixas de fermentação e média obtida para cada ensaio

		Temperatura nas caixas de fermentação (°C)							
		Horas							
Caixa	Ensaio	0	24	48	72	96	120	144	168
C1	A	29	33	36	38,8	40,5	43,7	43,7	37,4
C2	A	29	32	35,1	37,9	39,2	43,8	43,6	37,4
C3	B	29	32	35,5	36,7	37,1	44,9	44,5	38,3
C4	B	29	32	35,3	36,8	37,9	44,5	45,2	39,2
C5	C	29	32	36,2	37	37,5	44,7	44,9	38,6
C6	C	29	32	35	36,2	37,3	44,9	45,2	38,8
C7	D	29	32	35,2	36,7	37,7	44,9	44,2	37,4
C8	D	29	32	35,2	37,1	37,9	43,7	42,4	38,8
C9	E	29	32	35,6	36,9	37,3	44,7	44,9	40,5
C10	E	29	32	35	36,9	37,9	44,6	44,7	42,2
C11	F	29	32	35	37,3	38,3	45,3	38,4	42,9
C12	F	29	32	35	37,8	38,2	45,1	39,6	42
C13	G	29	32	33,5	37,3	38,4	---	---	---
C14	G	29	32	35,7	37,7	38,4	---	---	---

Temperatura média (°C) para cada ensaio								
Ensaio	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
A	29	32,5	35,6	38,4	39,9	43,8	43,7	37,4
B	29	32	35,4	36,8	37,4	44,8	45,1	38,7
C	29	32	35,6	36,6	37,4	44,8	45,1	38,7
D	29	32	35,2	36,9	37,8	44,3	43,3	38,1
E	29	32	35,3	36,9	37,6	44,7	44,8	41,4
F	29	32	35	37,6	38,3	45,2	39	42,5
G	29	32	33,6	37,5	38,4	-	-	-

ANEXO III: Intensidades obtidas por espectrometria de massas dos flavonóides das sementes de cacau durante as etapas de fermentação e secagem

	A	B	Ensaio C	D	E	F	G
Monômeros							
Semente Fresca	61.927.983						
3° dia fermentação	42.147.472	43.954.869	50.599.589	61.483.968	54.628.422	49.864.352	48.058.400
7° dia fermentação	27.141.243	24.146.460	21.269.495	23.828.075	19.083.071	28.979.087	
Após Secagem	9.064.573	16.827.830,80	18.804.343	21.225.093	14.906.813	17.119.815	20.759.712
Dímeros							
Semente Fresca	9.331.054						
3° dia fermentação	3.982.388	4.012.074	4.871.409	5.991.982	5.201.045	4.459.149	4.088.032
7° dia fermentação	2.855.941	2.233.960	2.000.559	2.860.743	1.961.717	2.923.154	
Após Secagem	1.149.606	1.788.660	1.991.693	2.036.804	1.605.953	1.963.566	2.032.745
Trímeros							
Semente Fresca	3.350.962						
3° dia fermentação	1.374.916	1.321.018	1.629.018	2.010.001	1.843.870	1.523.969	1.418.456
7° dia fermentação	1.047.240	863.597	765.879	1.089.509	736.826	1.055.775	
Após Secagem	457.652	670.070	765.554	749.564	629.449	749.831	722.723
Quatrâmeros							
Semente Fresca	1.064.478						
3° dia fermentação	498.048,18	456.257,76	669.494,60	688.822,40	624.865,29	518.212,08	480.584
7° dia fermentação	384.508,60	300.902,04	268.682,52	397.169,28	269.542,54	375.005	
Após Secagem	179.221,76	240.516,68	275.014,95	263.622,78	219.078,09	289.619	226.094,99
Pentâmeros							
Semente Fresca	247.876,20						
3° dia fermentação	137.628,26	121.233	156.953	177.537,92	151.434,99	146.451,24	133.120
7° dia fermentação	113.841,50	95.657,13	87.564,48	120.940,96	83.543,64	118.053,25	
Após Secagem	62.279,04	77.949,08	87.357,69	85.396,02	73.852,35	84.681,52	83.733,61

ANEXO IV - Controle de temperatura e umidade do ambiente de fermentação em diferentes tempos.

	0 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96hs	120hs	144hs	168hs
Tb seco (°C)	35,0	30,5	33,5	33,0	33,5	33,0	33,0	33,0
Tb úmido (°C)	31,0	29,5	29,5	28,5	28,5	29,0	29,5	29,5
Umidade (%)	70	85	75	75	75	75	75	75