



JULIANA CAMPOS HASHIMOTO

**CARACTERIZAÇÃO DE AMÊNDOAS DE CACAU PRODUZIDAS EM
DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS E APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA COMO ALTERNATIVA
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

JULIANA CAMPOS HASHIMOTO

**CARACTERIZAÇÃO DE AMÊNDOAS DE CACAU PRODUZIDAS EM
DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS E APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA COMO ALTERNATIVA
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE**

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutora em
Ciência de Alimentos.*

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone

Coorientadora: Profa. Dra. Priscilla Efraim

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA CAMPOS HASHIMOTO E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. JULIANA AZEVEDO LIMA PALLONE.

Orientadora

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

H273c Hashimoto, Juliana Campos, 1986-
Caracterização de amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e aplicação de espectroscopia no infravermelho próximo e quimiometria como alternativa para o controle de qualidade / Juliana Campos Hashimoto. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Juliana Azevedo Lima Pallone.

Coorientador: Priscilla Efraim.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Amêndoas de cacau. 2. Espectroscopia no infravermelho próximo. 3. Quimiometria. 4. Calibração multivariada. 5. Análise sensorial. I. Pallone, Juliana Azevedo Lima. II. Efraim, Priscilla. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of cocoa beans from different Brazilian states and application of Near-Infrared Spectroscopy and chemometrics as an alternative for the quality control

Palavras-chave em inglês:

Cocoa beans

Near-infrared spectroscopy

Chemometrics

Multivariate calibration

Sensory analysis

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Juliana Azevedo Lima Pallone [Orientador]

Adriana Barreto Alves

Aline de Oliveira Garcia

Maria Luiza Sant'Anna Tucci

Ronei Jesus Poppi

Data de defesa: 23-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone
(Orientadora)

Dra. Adriana Barreto Alves
(Membro Titular)
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Dra. Aline de Oliveira Garcia
(Membro Titular)
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dra. Maria Luiza Sant'Anna Tucci
(Membro Titular)
Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi
(Membro Titular)
Universidade Estadual de Campinas

Prof^ª. Dra. Alessandra Borin Nogueira
(Membro Suplente)
Pontifícia Universidade Católica de Campinas

Prof^ª. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Membro Suplente)
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
(Membro Suplente)
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo

RESUMO

O desenvolvimento da cacauicultura no Brasil apresenta vários desafios no que se refere ao reconhecimento da qualidade e padronização da produção. Dois aspectos relevantes relacionados a essas dificuldades foram abordados nesta pesquisa. O primeiro aspecto trata da falta de informação referente à composição química das amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e às características sensoriais dos produtos derivados. A este respeito, amostras de diferentes regiões produtoras (Bahia-BA, Pará-PA, Rondônia-RO e Costa do Marfim-CM) foram analisadas quanto a parâmetros físicos e químicos relevantes para a qualidade desta matéria prima, incluindo-se: número de amêndoas em 100 g, prova de corte, porcentagem de casca, pH, acidez, teores de umidade, lipídios, proteína, compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína. A avaliação física das amêndoas de cacau por meio da prova de corte permitiu concluir que todas as amostras apresentaram padrão comercial satisfatório, porém, evidenciou-se a falta de padronização na etapa de pré-processamento. Diferenças significativas em relação à umidade, acidez, compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína foram verificadas, as quais podem afetar diretamente a qualidade dos produtos derivados. A avaliação sensorial de chocolates elaborados a partir das amêndoas de origens distintas (BA, PA, RO, CM e Espírito Santo-ES) mostrou diferenças significativas entre as amostras, as quais foram percebidas tanto pelo painel sensorial treinado quanto pelo grupo de consumidores. As amostras de chocolates BA e CM mostraram diferenças importantes no perfil sensorial, enquanto as amostras RO e PA apresentaram similaridades e características intermediárias em relação às demais. Quanto à aceitação global, pequenas diferenças foram observadas, sendo que a amostra PA apresentou valor médio superior ao do chocolate BA, provavelmente devido à maior intensidade dos gostos ácido e amargo na amostra BA. O segundo aspecto abordado neste estudo trata da falta de métodos analíticos rápidos e objetivos para a avaliação da qualidade de amêndoas de cacau. Portanto, os dados das análises físico-químicas obtidos na primeira etapa da pesquisa foram utilizados para a construção de modelos de calibração multivariada por meio da correlação com os espectros de reflectância difusa medidos na região do infravermelho próximo ($10000-4000\text{ cm}^{-1}$). Nove modelos de regressão por Mínimos Quadrados Parciais foram desenvolvidos para a previsão de diversos parâmetros de

composição química (umidade, porcentagem de casca, pH, acidez, lipídios, proteínas, compostos fenólicos totais, concentração de teobromina e cafeína) pela análise direta das amostras moídas e peneiradas, sem preparo adicional e geração de resíduos. Com exceção da concentração de cafeína, todos os parâmetros foram previstos com erros relativos médios menores que 10,2%, os quais são aceitáveis quando comparados aos coeficientes de variação dos métodos de referência usualmente utilizados. Dessa forma, os resultados obtidos demonstraram que o emprego da Espectroscopia no Infravermelho Próximo, aliada a quimiometria, é viável e indicado para o controle de qualidade de amêndoas de cacau em diversas etapas da cadeia produtiva.

ABSTRACT

The development of cocoa culture in Brazil presents several challenges with respect to recognition of the quality and production standardization. Two important aspects related to these difficulties were addressed in this study. The first aspect is the lack of information on the chemical composition of cocoa beans produced in different Brazilian states and sensory characteristics of derivatives. In this regard, samples from different producing regions (Bahia-BA, Pará-PA, Rondônia-RO and the Ivory Coast-CM) were analyzed for physical and chemical parameters relevant to the overall quality of this raw material, which included: bean count, cut test, pH, acidity and shell, moisture, total lipid, protein, phenolic compounds, theobromine and caffeine contents. Physical evaluation of cocoa beans by means of the cut test showed that all samples presented satisfactory commercial standard, however, revealed a lack of standardization in the post-harvesting practices. Significant differences in moisture, acidity, total phenolic compounds, theobromine and caffeine were found, which can directly affect the quality of derivatives. The sensory evaluation of chocolates manufactured with cocoa beans from different origins (BA, PA, RO, CM and Espírito Santo-ES) showed significant differences between the samples, which were identified by both the trained sensory panel as the consumers. BA and CM chocolate samples showed important differences in the sensory profile, while the RO and PA samples presented similarities and intermediate characteristics in relation to the others. The overall acceptance presented little differences with the PA chocolate scored higher than the BA chocolate, probably due to the more intense acidic and bitter tastes in the BA sample. The second subject discussed in this study is the unavailability of rapid and objective analytical methods for assessing the quality of cocoa beans. For this, the physicochemical data acquired in the first stage of this research, were used for the construction of multivariate calibration models by correlation with diffuse reflectance spectra measured in the near infrared region ($10000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$). Nine Partial Least Squares regression models were developed allowing the prediction of various chemical parameters (moisture, pH, acidity, total lipids, protein, shell content, total phenolic compounds, concentration of theobromine and caffeine) through direct analysis of samples milled and sieved without any additional preparation. With the exception of caffeine concentration, all of the parameters were

predicted with relative errors smaller than an average of 10.2%, which is acceptable when compared to the coefficients of variation of the reference methods usually used. Thus, the results obtained demonstrate that the use of Near-Infrared Spectroscopy in conjunction with chemometrics is feasible and recommended for the quality control of cocoa beans in various stages of the production chain.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO I	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
Fatores que afetam a qualidade de amêndoas de cacau, métodos utilizados para a avaliação de lotes comerciais e possíveis aplicações da Espectroscopia no Infravermelho Próximo associada à quimiometria na cadeia produtiva de cacau e chocolate	7
RESUMO	9
1.1 Produção e consumo de amêndoas de cacau.....	9
1.2 Breve histórico da produção de cacau no Brasil.....	10
1.3 Fatores que afetam a composição química e a qualidade de amêndoas de cacau e produtos derivados	11
1.4 Classificação de amêndoas de cacau quanto à qualidade	14
1.5 Principais entraves à melhoria da qualidade dos lotes comerciais de amêndoas de cacau: aspectos econômicos.....	15
1.5.1 Aspectos gerais da cadeia produtiva	15
1.5.2 Formação de preço no mercado nacional e internacional	16
1.5.3 Regras de comercialização e classificação de lotes	18
1.6 Métodos para a avaliação da qualidade de amêndoas de cacau.....	19
1.6.1 Prova de corte.....	19
1.6.2 Análise sensorial	20
1.7 Aplicações da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) para a avaliação de parâmetros relacionados à qualidade e autenticidade de amêndoas de cacau	23
1.7.1 NIR e quimiometria.....	23
1.7.2 Aplicações de NIR e quimiometria para a avaliação de parâmetros de qualidade de cacau e derivados.....	30
1.8 Conclusões	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II.....	39

Caracterização física e química de amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e na Costa do Marfim.....	39
RESUMO	41
2.1 Introdução	42
2.2 Experimental.....	43
2.2.1 Amostras.....	43
2.2.2 Reagentes e padrões analíticos.....	44
2.2.3 Avaliação física das amêndoas de cacau.....	46
2.2.4 Análises físico-químicas das amêndoas de cacau	46
2.2.5 Análise dos dados.....	49
2.3 Resultados e Discussão.....	50
2.3.1 Prova de corte.....	50
2.3.2 Parâmetros de qualidade e de composição química.....	55
2.3.2.1 Comparação entre as amostras provenientes de diferentes estados brasileiros e da Costa do Marfim	55
2.3.3 Análise exploratória dos dados	62
2.4 Conclusões	64
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO III	67
Perfil sensorial e aceitabilidade de chocolates elaborados com amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e na Costa do Marfim.....	67
RESUMO	69
3.1 Introdução	70
3.2 Experimental.....	72
3.2.1 Amostras.....	72
3.2.2. Análises físico-químicas das amêndoas de cacau	73
3.2.3 Caracterização da manteiga de cacau.....	74
3.2.3.1 Extração.....	74
3.2.3.2 Composição de ácidos graxos	74
3.2.3.3 Composição triacilglicérica.....	75
3.2.3.4 Conteúdo de gordura sólida.....	75
3.2.4 Processamento das amêndoas de cacau e dos chocolates amargos.....	75

3.2.5 Análise sensorial	77
3.2.5.1 Perfil sensorial	77
3.2.5.2 Teste de aceitação	77
3.2.5.3 Tratamento estatístico dos resultados	78
3.3 Resultados	78
3.3.1 Composição química das amostras de amêndoas de cacau	78
3.3.2 Caracterização das amostras de manteiga de cacau	80
3.3.2.1 Composição de ácidos graxos (AG) e triacilgliceróis (TAG)	80
3.3.2.2 Perfil de conteúdo de gordura sólida	83
3.3.3 Perfil sensorial	85
3.3.4 Teste afetivo	88
3.3.4.1 Caracterização do grupo de consumidores	88
3.3.4.2 Teste de aceitação	90
3.4 Conclusões	92
REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO IV	97
Quality control of raw cocoa beans by Near-Infrared Spectroscopy combined with chemometrics	97
ABSTRACT	99
4.1 Introduction	100
4.2 Experimental	102
4.2.1 Samples	102
4.2.2 Physicochemical analysis of cocoa beans	103
4.2.3 Spectroscopic NIR measurements	104
4.2.4 Data analysis	104
4.3 Results and discussion	106
4.3.1 Characterization of cocoa bean samples	106
4.3.2 Partial Least Square Regression Modeling	107
4.4 Conclusion	116
REFERENCES	116
CONCLUSÃO GERAL	119

***D**edico esta conquista ao Éder, minha vida. Somente o amor é capaz de justificar o apoio, a dedicação e a compreensão infinitos e incondicionais que você ofereceu a mim durante os anos de realização deste trabalho.*

***D**edico também à minha família amada - Haruo, Sirlei e Natália - a base que me mantém forte e perseverante nesta longa jornada, repleta de sacrifícios e conquistas.*

***T**ambém não posso deixar de dedicar o trabalho ao amado Floko (ainda que ele não pretenda ler), o meu coelho companheiro, que alegrou todos os dias e madrugadas que eu dediquei a esta tese.*

AGRADECIMENTOS

A realização de uma tese envolve ideias, conhecimentos, comprometimento, recursos, infraestrutura e muito trabalho.

Durante esta trajetória, eu aprendi que, acima de tudo, uma tese é feita de pessoas.

Incontáveis pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Diversas formas de colaboração: formação acadêmica, informações, recursos, atividades de apoio técnico e administrativo, correções, ideias e sugestões. Em alguns casos, o auxílio vem de um jeitinho quase imperceptível, na forma de uma conversa ou um abraço.

Milhares de lembranças surgem num momento como este...

Exame de ingresso, aprovação, escolha de orientador, bolsa de pós-graduação, disciplinas, confraternizações, projeto de pesquisa, amigos, amêndoas de cacau, dificuldades, coorientadora, novas ideias, aprendizado, parcerias, ajuda - Érika, Jéssica e Mia, mais amêndoas de cacau (!), Doutorado-Sanduiche, novidades, desafios, angústias, trabalho, trabalho e trabalho!

A minha memória não me permitiria ser justa caso eu tentasse nomear todas as pessoas que participaram da realização desta tese. Mas, a todos que me ajudaram e tornaram esses últimos anos mais felizes, registro aqui os meus mais sinceros agradecimentos!

Muito obrigada!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

Figura 1. Análise de Componentes Principais dos parâmetros de qualidade de amêndoas de cacau de diferentes origens; (a) gráfico de escores (amostras) e (b) gráfico de pesos (variáveis). 63

CAPÍTULO III

Figura 1. Fluxograma do processamento das amêndoas de cacau para a obtenção dos chocolates. 76

Figura 2. Perfis do conteúdo de gordura sólida das amostras de manteiga de cacau. 85

Figura 3. Análise de Componentes Principais dos resultados da Análise Descritiva Quantitativa dos chocolates do tipo amargo de diferentes origens. (a) Gráfico de escores – amostras e (b) Gráfico de pesos dos descritores sensoriais. 87

Figura 4. Caracterização do grupo de 120 consumidores que participou do teste de aceitação sensorial dos cinco chocolates do tipo amargo. (a) quanto ao gênero e faixa etária; (b) quanto à frequência de consumo de chocolates (número de vezes por semana) e (c) em relação ao tipo de chocolate mais consumido. 89

Figura 5. Intenção de compra do grupo de 120 consumidores para os cinco chocolates do tipo amargo. 91

CAPÍTULO IV

Figure 1. NIR spectra (mean) of cocoa beans and cocoa nibs. 107

Figure 2. Variable Importance in Projection (VIP) scores graphs for caffeine and theobromine. 109

Figure 3. Concentration correlation plots between the PLS models (predicted) and reference results measured by conventional methods. 111

Figure 3 (cont.). Concentration correlation plots between the PLS models (predicted) and reference results measured by conventional methods. 112

Figure 3 (cont.). Concentration correlation plots between the PLS models (predicted) and reference results measured by conventional methods. 113

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição média do <i>nib</i> de cacau.....	12
Tabela 2. Tolerância de defeitos para amêndoas de cacau, expressa em porcentagem e respectiva classificação do produto em tipos.	20

CAPÍTULO II

Tabela 1. Tolerância de defeitos para amêndoas de cacau, expressa em porcentagem e respectiva classificação do produto.	51
Tabela 2. Valores médios percentuais de defeitos observados nas amostras de amêndoas de cacau avaliadas e classificação de acordo com o tipo.	51
Tabela 3. Caracterização física de amêndoas fermentadas e secas provenientes de diferentes estados brasileiros e da Costa do Marfim.	52
Tabela 4. Parâmetros de qualidade de amêndoas de cacau de diferentes origens.	56

CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição química das amêndoas de cacau utilizadas para o processamento dos chocolates do tipo amargo.....	79
Tabela 2. Composição de ácidos graxos das manteigas de cacau de diferentes origens.	82
Tabela 3. Composição de triacilgliceróis das manteigas de cacau de diferentes origens....	82
Tabela 4. Conteúdo de gordura sólida das manteigas de cacau a diferentes temperaturas. 84	
Tabela 5. Médias das notas dadas pela equipe sensorial para os cinco chocolates do tipo amargo produzidos com amêndoas de cacau de origens distintas.....	86
Tabela 6. Valores médios para cada atributo avaliado no teste de aceitação sensorial dos cinco chocolates do tipo amargo produzidos com amêndoas de cacau de origens distintas.90	

CAPÍTULO IV

Table 1. Descriptive statistics (mean and standard deviation) for the compositional parameters of cocoa bean samples.....	107
Table 2. Pre-treatments and selected variables for the construction of the PLS models. ...	108
Table 3. Performance parameters of the best PLS calibration models obtained.	110

INTRODUÇÃO GERAL

Historicamente, a cacauicultura tem sido uma atividade de grande importância econômica, ambiental e social no Brasil, principalmente em algumas regiões do país, onde representa uma das principais fontes de emprego e renda.

O Brasil, até a década de 1960, era o maior produtor e exportador mundial de cacau, cultura originária da região amazônica, que se aclimatou perfeitamente às condições climáticas do sul da Bahia, Pará e Rondônia. Após esse período, foi levado a algumas regiões da África e Ásia, sendo que a Costa do Marfim no oeste africano é atualmente o maior produtor mundial de cacau (RODRIGUES, 2006). No século XX, o Brasil destacou-se como um dos principais produtores mundiais de cacau, atingindo na década de 1980 o maior volume de produção e produtividade no contexto mundial da época (EFRAIM, 2009).

Entretanto, a economia regional, por força da monocultura, sempre foi atingida por crises cíclicas, decorrentes de variações climáticas, incidências de pragas e doenças. A partir da década de 90, devido a déficits hídricos nas regiões produtoras da Bahia e do Espírito Santo, bem como à disseminação da doença vassoura-de-bruxa nos cacauzeiros da região sul da Bahia, houve acentuada diminuição da produção e produtividade (MORORÓ, 2014).

Esta situação ocasionou forte impacto social e econômico e, ainda hoje, tem efeitos sobre a produtividade e qualidade das amêndoas de cacau produzidas no Brasil. Pode-se dizer que, a redução da produtividade, aliada ao aumento da demanda por produtos de cacau, tem refletido na queda de qualidade, já que o pré-processamento feito nas propriedades agrícolas tem sido pouco cuidadoso (falta de seleção de frutos para colheita, bem como fermentação e secagem realizadas inadequadamente e em tempos reduzidos). Além de afetar a qualidade, a menor produtividade desestimula os produtores e, em alguns casos, compromete a viabilidade econômica da cacauicultura.

Neste contexto, a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), órgão do Ministério da Agricultura, vem indicando o controle integrado da vassoura-de-bruxa, sendo que a seleção e a utilização de variedades resistentes à doença pelos

agricultores constituem um dos aspectos mais importantes do plano de recuperação da lavoura cacaueteira. Além da seleção de variedades de cacau, o controle integrado inclui melhoria das práticas agrícolas, utilização de agrotóxicos e controle biológico, além de transferência de informações aos agricultores para que os métodos de controle sejam adequadamente aplicados (CEPLAC, 2009).

Decorrente disso, a produção do Brasil apresenta lenta recuperação nos últimos anos, porém, a produção de cacau da Bahia, responsável por aproximadamente 65% da produção brasileira, ainda apresenta dificuldades, com safras não constantes, alternando-se entre altas e baixas produções. Em contrapartida, outros estados produtores como o Pará, Espírito Santo e Rondônia têm mantido seus níveis de produção e aumentado sua participação no mercado nacional de amêndoas de cacau (IBGE, 2012).

Considerando-se as grandes distâncias geográficas entre as regiões produtoras e as variações que podem ocorrer durante o pré-processamento, é plausível supor que as amêndoas de cacau provenientes de diferentes regiões apresentem diferenças quanto à composição química. As possíveis diferenças existentes entre as amêndoas em relação a componentes majoritários (teores de umidade, lipídios e proteína, por exemplo) e minoritários (compostos fenólicos, metilxantinas, ácidos orgânicos, dentre outros) podem ser determinantes para o desempenho tecnológico da matéria prima e para as características sensoriais dos produtos derivados.

No entanto, não foram encontrados na literatura estudos contendo dados a respeito da composição química de lotes comerciais de amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e características sensoriais dos produtos derivados. É importante destacar que o conhecimento sobre essas diferenças de composição química e de perfil sensorial são fundamentais para o aprimoramento da qualidade dos derivados de cacau, pois viabilizam a adaptação de processos tecnológicos com a finalidade de uniformizar os produtos ou até mesmo para a elaboração de chocolates com características diferenciadas que atendam ao nicho de mercado de chocolates de origem única.

Neste ponto, pode ser introduzido o segundo aspecto relevante abordado neste estudo, o qual se refere às dificuldades existentes para a avaliação da qualidade de amêndoas de cacau. Atualmente, não existem protocolos e critérios de aceitação

harmonizados para a avaliação de lotes comerciais ou para a classificação de amêndoas de cacau com base em critérios de qualidade.

O método mais usado e aceito internacionalmente é a prova de corte, geralmente realizada pelo comprador e que se baseia na contagem de defeitos presentes na amostra, o que geralmente ocasiona a redução da remuneração paga ao produtor. Como este sistema de avaliação fornece informações muito limitadas e não permite o reconhecimento de lotes com qualidade superior, não há incentivo aos produtores para melhorar a qualidade das amêndoas de cacau fornecidas, o que seria possível por meio da seleção de variedades e aprimoramento das práticas de pré-processamento. Além disso, um método objetivo de classificação por categorias de qualidade contribuiria para garantir identidade, reputação e valor ao cacau brasileiro, inclusive pelo registro de indicação geográfica de uma determinada região produtora. Portanto, evidencia-se a necessidade do emprego de novas técnicas analíticas e métodos que sejam aplicáveis em diversas etapas do processamento das amêndoas de cacau e chocolates.

Neste contexto, a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) associada à quimiometria apresenta-se como uma excelente alternativa, dada a possibilidade do desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, não destrutivos e que permitem obter e interpretar uma grande quantidade de informações sobre a amostra. Diversos exemplos de aplicações bem sucedidas são descritos na literatura para diversos analitos e matrizes, com finalidades que incluem aplicações quantitativas, detecção de adulterações e modelos de classificação de amostras de acordo com a origem geográfica ou até mesmo em função de variáveis do processo.

Considerando-se todas as informações apresentadas, um dos objetivos desta pesquisa foi caracterizar amostras de lotes comerciais de amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros (Bahia, Pará e Rondônia) e na Costa do Marfim. As amostras foram fornecidas por uma empresa processadora de cacau durante o período de um ano e, portanto, representam uma amostragem das amêndoas de cacau utilizadas no Brasil no dado período. Amostras da Costa do Marfim foram analisadas para efeito comparativo, por se tratar do principal país produtor e exportador desta *commodity*.

Na primeira etapa da pesquisa, 77 amostras foram analisadas em relação a diversos parâmetros de composição química e de qualidade, sendo: número de amêndoas em 100 g, prova de corte, porcentagem de casca, pH, acidez, teores de umidade, lipídios, proteína, compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína. Os dados gerados serão de grande importância para caracterizar as amêndoas de cacau produzidas no Brasil, as quais, historicamente, são representadas apenas pela composição química e características das amêndoas produzidas na Bahia.

Paralelamente às determinações físico-químicas, foram obtidos os espectros no infravermelho próximo das amostras, com o objetivo de aplicar NIR associada à quimiometria para a determinação dos parâmetros de composição química e de qualidade anteriormente analisados pelos métodos analíticos convencionais.

A utilização desses métodos na primeira etapa da pesquisa permite afirmar que, em maioria, são métodos laboriosos, demorados e que geram um grande volume de resíduos sólidos e líquidos de difícil tratamento e descarte. Portanto, o emprego da tecnologia NIR para a previsão de parâmetros de qualidade de amêndoas de cacau contribui fortemente para o aprimoramento de produtos e processos, na medida em que viabiliza o monitoramento e o controle de qualidade de um maior número de amostras em todas as etapas do processo produtivo, com menor demanda de tempo e recursos.

Após a caracterização física e química das amostras, uma questão permanecia sem resposta: caso fossem verificadas diferenças relevantes na composição química das amêndoas de origens distintas, qual seria o impacto sobre as características sensoriais dos chocolates derivados?

Para responder a esta questão, uma amostra de amêndoas fermentadas e secas de cada origem geográfica (Bahia, Pará, Espírito Santo, Rondônia e Costa do Marfim) foi processada em planta piloto para a obtenção de chocolates do tipo amargo com 65% de cacau. Os chocolates foram avaliados por um painel sensorial treinado e por um grupo de consumidores, a fim de estabelecer o perfil sensorial de cada amostra e verificar como este perfil afetava a aceitação e intenção de compra dos consumidores. Para dar suporte à discussão de alguns atributos sensoriais, as amêndoas de cacau utilizadas para o processamento foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos e a composição das

manteigas de cacau contidas nas amêndoas de cada origem também foi determinada. Essas informações são de grande utilidade para a indústria de chocolates, pois o conhecimento sobre a matéria prima permite a adaptação dos processos tecnológicos para a obtenção de produtos de melhor qualidade, ou, ainda, a formulação de produtos com características diferenciadas.

REFERÊNCIAS

CEPLAC. COMISSÃO EXECUTIVA PARA O PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. Programa de Recuperação da Lavoura Cacaueira – 3ª e 4ª etapas. A crise da lavoura cacaueira, condicionantes, ação governamental, análise e recomendações. Abril, 2009. Disponível em <http://www.seagri.ba.gov.br/not_notatecnica20042009.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2012.

EFRAIM, P. Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo. 208 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da lavoura permanente 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 10 out. 2014.

MORORÓ, R.C. Agroindústria como alternativa de agregação de valores. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo18.htm>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

RODRIGUES, M.R.S. Descrição da cadeia produtiva do cacau no estado do Pará e a inserção do produto nos mercados nacional e internacional. 121 p. Dissertação (Mestrado em Economia). Universidade da Amazônia, Belém, 2006.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fatores que afetam a qualidade de amêndoas de cacau, métodos utilizados para a avaliação de lotes comerciais e possíveis aplicações da Espectroscopia no Infravermelho Próximo associada à quimiometria na cadeia produtiva de cacau e chocolate

RESUMO

A qualidade de amêndoas de cacau é influenciada por fatores genéticos e ambientais, pelo manejo das lavouras e também pelas práticas de pré-processamento. O objetivo desta revisão foi fornecer uma visão geral sobre os conceitos de qualidade aplicáveis às amêndoas de cacau, os fatores que a influenciam e os métodos atualmente utilizados para a avaliação e classificação de lotes comerciais, discutindo-se as suas principais limitações. Neste contexto, a Espectroscopia no Infravermelho Próximo associada à quimiometria foi apresentada como uma importante ferramenta analítica, aplicável a diversas etapas da produção de cacau e chocolate.

1.1 Produção e consumo de amêndoas de cacau

Amêndoas de cacau são as sementes fermentadas e secas do fruto do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) e destacam-se como uma importante *commodity* agrícola mundial, principalmente por ser a principal matéria-prima utilizada para a produção de chocolates.

Os frutos produzidos pelo cacauzeiro contêm a polpa e as sementes de cacau. Após abertura do fruto, a casca é removida e as sementes, envolvidas pela polpa mucilagínosa, são submetidas ao processo de fermentação. Nesta etapa, ocorre a formação de muitos compostos químicos precursores de sabor e aroma que definirão as características sensoriais dos chocolates produzidos a partir dessas amêndoas. Após a fermentação, as amêndoas fermentadas passam por um processo de secagem, resultando no produto comercializado no mercado mundial, designado como amêndoas de cacau fermentadas e secas (BECKETT, 2008).

A produção global de amêndoas de cacau em 2013 foi de 3,9 milhões de toneladas, sendo a África a maior região produtora (72%), seguida pela América (16%) e Ásia (12%). Já o processamento das amêndoas de cacau nas indústrias moageiras é realizado, em maior parte, por países importadores próximos dos principais centros de consumo na Europa e América do Norte, sendo que Holanda, Alemanha e Estados Unidos responderam por aproximadamente 33% do total em 2013 (ICCO, 2014).

No biênio 2010-2011, os principais mercados consumidores de amêndoas de cacau foram os Estados Unidos (20,4%), Alemanha (8,7%), França (6,1%), Reino Unido (6,1%), Rússia (5,3%) e Brasil (4,8%) (ICCO, 2012). Além disso, observa-se uma tendência crescente do consumo na última década, especialmente pelos países que compõem o BRIC (Brasil, Rússia, Índia e China), como resultado das altas taxas de crescimento econômico, atividades bem sucedidas de publicidade e baixos preços.

Neste contexto econômico, o Brasil mostra importante participação e potencial de crescimento para a cacauicultura, sendo o único país com a cadeia produtiva completa, ou seja, expressiva produção agrícola, capacidade produtiva para o processamento interno de todo o cacau produzido e elevada produção e consumo de chocolates.

1.2 Breve histórico da produção de cacau no Brasil

No século XX, o Brasil destacou-se como um dos principais produtores mundiais de cacau, atingindo na década de 1980 uma produção de 400 mil toneladas de amêndoas secas e produtividade de 750 Kg/ha, a maior no contexto mundial da época. A partir da década de 90, devido a déficits hídricos nas regiões produtoras da Bahia e do Espírito Santo, bem como à disseminação da doença vassoura-de-bruxa nos cacauzeiros da região sul da Bahia, houve acentuada queda na produção e produtividade brasileiras (EFRAIM, 2009). No período de 1985 a 2003, observou-se redução de aproximadamente 63% na produção de amêndoas de cacau do Brasil (FAO, 2015).

Neste contexto, a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), órgão do Ministério da Agricultura, vem indicando o controle integrado da vassoura-de-bruxa, sendo que a seleção de variedades resistentes à doença pelos agricultores constitui um dos aspectos mais importantes do plano de recuperação da lavoura cacaueira. Além da seleção de variedades de cacau, o controle integrado inclui melhoria das práticas agrícolas, utilização de agrotóxicos e controle biológico, além de transferência de informações aos agricultores para que os métodos de controle sejam adequadamente aplicados (CEPLAC, 2009). Decorrente disso, a produção da Bahia apresenta lenta recuperação nos últimos anos, sendo registrado um crescimento de 12% da quantidade produzida no período de 2004 a 2013 (IBGE 2004; 2013). Porém, a lavoura na Bahia, responsável por 63% da

produção brasileira, ainda apresenta dificuldades, com safras não constantes, alternando-se entre altas e baixas produções. Em contrapartida, outros estados produtores como Pará, Espírito Santo e Rondônia têm aumentado a sua produção.

Em 2011, de acordo com a ICCO (*International Cocoa Organization*), o Brasil foi o sexto maior produtor de cacau do mundo, atingindo uma produção de 248.524 toneladas, o equivalente a 5,7% da produção mundial (FAO, 2013). Em 2009, o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial de chocolates, sendo que no período de 2005 a 2010 ocorreu um aumento de 42% na produção brasileira, evidenciando o rápido crescimento desse mercado (ABICAB, 2010).

Como perspectiva futura, a expectativa é de que o Brasil atinja a autossuficiência em cacau e retome a sua posição de importante exportador até o ano de 2020, o que será viabilizado por meio da seleção de plantas com alta produtividade e resistentes à vassoura-de-bruxa, além do apoio aos produtores.

1.3 Fatores que afetam a composição química e a qualidade de amêndoas de cacau e produtos derivados

As amêndoas de cacau são basicamente compostas pelos cotilédones, os quais são protegidos por uma casca (ou testa). Os fragmentos resultantes da quebra dos cotilédones são denominados *nib*, que após os processos de torração, moagem e refino resultam na massa de cacau ou *liquor* de cacau, matéria prima utilizada diretamente na produção de chocolates. Pela prensagem do *liquor*, também são obtidos o cacau em pó e a manteiga de cacau.

Na Tabela 1 é apresentada a composição média do *nib*, por ser esta a fração mais valorizada da amêndoa de cacau e diretamente utilizada na produção de chocolates. Cabe ressaltar que esses valores são apenas referências, visto que podem variar amplamente de acordo com os diferentes cultivares, origem geográfica, graus de fermentação e secagem, condições de armazenamento, métodos analíticos utilizados, dentre outros.

Tabela 1. Composição média do *nib* de cacau.

Parâmetro	Média (%)	Faixa (%)
Umidade	3,7	2-5
Lipídios	53,5	48-57
Proteína	12,7	11-16
Amido	6,7	6-9
Fibra	2,5	2,1-3,2
Cinzas	2,9	2,6-4,2
Teobromina	1,30	0,8-1,4
Cafeína	0,22	0,1-0,7

Adaptado de Beckett (2009).

A composição química das amêndoas de cacau é influenciada por diversos fatores, incluindo a origem genética do material plantado, origem geográfica, safra e condições de pré-processamento, principalmente relacionadas à fermentação e à secagem (SALTINI, AKKERMAN & FROSCH, 2013). Esses fatores podem afetar de diferentes formas a composição química, aroma e coloração das amêndoas de cacau, as quais estão diretamente relacionadas ao desempenho tecnológico e qualidade dos produtos derivados.

A este respeito, Saltini, Akkerman e Frosch (2013) publicaram uma revisão bibliográfica sobre os diversos fatores que afetam a qualidade das amêndoas de cacau e diversas pesquisas evidenciam a relação existente entre estes fatores e os aspectos de qualidade de amêndoas de cacau e derivados.

Em 1991, estudos realizados pelo *American Cocoa Research Institute* (ACRI) demonstraram que alguns híbridos da Estação de Pesquisas de Cacau da Costa Rica apresentavam características de aroma e sabor inferiores em relação a outros materiais estudados (MATLIK, 1994 *apud* EFRAIM, 2009). Trabalhos conduzidos por Clapperton et al. (1993, 1994), na Malásia, demonstraram a influência de genótipos nas características sensoriais de *liquors* de cacau e chocolate. Resultados sensoriais encontrados para os diferentes genótipos cultivados no Brasil foram similares àqueles verificados na Malásia (FIGUEIRA et al., 1997).

Efraim (2009) estudou o desempenho tecnológico e caracterizou físico-química e sensorialmente os produtos obtidos a partir de nove materiais genéticos disponíveis comercialmente na Bahia e os comparou com o cacau comum da região. Constatou-se, por análise multivariada de atributos sensoriais, que uma equipe de consumidores foi capaz de

diferenciar genótipos com ascendência dos grupos de cacau Trinitário e *Criollo* de outros puramente *Forastero* Amazônicos.

Em estudos financiados pela ICCO, procurou-se identificar características que diferenciassem cacaos finos de cacaos comuns, buscando métodos, padrões e instrumentos de medida para essa finalidade. Neste sentido, Amores et al. (2007) avaliaram cacaos do Equador, Venezuela, Papua Nova Guiné e Trindade e Tobago em relação a parâmetros físicos, químicos e sensoriais. Entre os resultados, verificou-se que a razão entre os teores de teobromina e cafeína mostrou ser uma forma eficiente de diferenciação, sendo que materiais considerados comuns apresentaram maior valor da razão teobromina/cafeína que materiais considerados finos. A análise dos compostos voláteis também foi relevante, não apenas para a diferenciação dos materiais como também para avaliar o grau de fermentação. Por fim, a análise sensorial foi conclusiva na diferenciação dos materiais.

Estudos conduzidos por Sukha et al. (2008) demonstraram a contribuição genotípica para as características de sabor de amostras de *liquor* de cacau. Foram avaliados *liquors* de cacau de Gana (cacau considerado comum) e de Trindade (cacau considerado fino), abrangendo três períodos de produção agrícola. A avaliação sensorial permitiu delinear as diferenças quantitativas nos atributos de sabor entre os genótipos, bem como determinar a influência do ambiente e dos períodos de produção sobre os perfis de sabor.

Torres-Moreno et al. (2012) avaliaram o efeito de duas origens de cacau (Gana e Equador) e duas condições de processamento (tempos de torração e de conchagem) na aceitação de chocolates contendo 51% de cacau. A composição química das amêndoas de cacau e dos chocolates também foi avaliada em relação aos teores de umidade, cinzas, proteínas, carboidratos, fibras e lipídios. Como resultado do trabalho, constatou-se que os cacaos de Gana e do Equador apresentaram diferenças significativas na composição química. Constatou-se ainda, que o efeito do tempo de torração sobre a aceitação dos chocolates foi dependente do tempo de conchagem e foi diferente para cada uma das origens estudadas.

1.4 Classificação de amêndoas de cacau quanto à qualidade

No mercado internacional, os cacaos são classificados como comuns (*bulk*) ou finos (*flavor*). De forma geral, a maioria dos cacaos considerados finos pertence aos grupos genéticos *Criollo*, Trinitário ou tipo Nacional do Equador e cacaos comuns são originados de frutos do grupo *Forastero* Amazônico (SUKHA et al., 2008; BECKETT, 2009). Porém, a definição de cacau fino permanece controversa porque não existe um critério universalmente aceito que possa ser adotado para determinar se uma amostra de cacau de uma dada origem pode ou não ser classificado como cacau fino. Critérios relevantes que podem ser utilizados incluem: origem genética do material plantado, características morfológicas da planta, características químicas, aroma e sabor das amêndoas produzidas, coloração das amêndoas e *nibs*, grau de fermentação, secagem, acidez e presença de *off-flavours* (AMORES et al., 2007).

Cacaos finos representam menos de 5% da produção mundial de cacau e podem ser obtidos da Venezuela, Caribe, São Tomé e Príncipe, Madagascar, Papua Nova Guiné, Java (Indonésia) e Equador (cacau Arriba). Apresentam características especiais de aroma e sabor (florais, frutais, picantes, nozes, castanhas e caramelo) e são geralmente utilizados para a produção de chocolates amargos. Amêndoas de cacau do tipo fino ou especial são mais valorizadas no mercado, atingindo preços duas a três vezes maiores que o tipo comum (BECKETT, 2009).

O cacau brasileiro é considerado do tipo comum, assim como os cacaos de grandes produtores como Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Indonésia (ICCO, 2010). Esse tipo de cacau é utilizado pelas indústrias para a produção de derivados (massa de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó), além de chocolates convencionais, principalmente do tipo ao leite.

Do ponto de vista do mercado, para atender ao nicho de chocolates *gourmet* ou *premium*, as amêndoas de cacau devem apresentar alto padrão de qualidade, podendo ser obtidas a partir de cacaos finos ou de cacaos comuns submetidos a processamentos diferenciados. Ao mesmo tempo, as amêndoas de cacau destinadas à produção de chocolates em grande escala, principalmente do tipo ao leite, devem atingir uma qualidade mínima aceitável.

Portanto, alternativas devem ser encontradas para aumentar e padronizar a qualidade do cacau do tipo comum. No Brasil, programas de melhoramento genético para a geração de variedades que apresentem alta produtividade e que forneçam derivados de qualidade, assim como algumas ações relativas ao pré-processamento podem ser a chave para que o país atinja uma posição de produtor de amêndoas de cacau comum com qualidade superior.

1.5 Principais entraves à melhoria da qualidade dos lotes comerciais de amêndoas de cacau: aspectos econômicos

1.5.1 Aspectos gerais da cadeia produtiva

Nos últimos anos, o aumento da demanda mundial por produtos de cacau (demanda superior à oferta) e a falta de incentivos têm levado alguns produtores a realizar um pré-processamento pouco cuidadoso, caracterizado pela falta de seleção de frutos para colheita, bem como pela fermentação e secagem realizadas inadequadamente e em tempos reduzidos.

É importante pontuar que falhas nas etapas de pré-processamento não podem ser corrigidas em etapas posteriores do processamento e, portanto, a qualidade das amêndoas de cacau depende fortemente das etapas pré-processamento, as quais ocorrem ainda nas propriedades rurais. Além dos prejuízos na qualidade dos derivados, essas falhas constituem um entrave para a exportação das amêndoas de cacau, uma vez que alguns dos defeitos mais relevantes que causam a desvalorização e desclassificação do cacau são a ocorrência de mofo e a alta umidade.

A dependência existente entre a qualidade desta matéria prima e as condições de cultivo e pré-processamento pode ser vista como um desafio quando se analisa o cenário da produção mundial de amêndoas de cacau. A cadeia produtiva de cacau caracteriza-se por alguns aspectos principais, dentre os quais se destacam: 1) a grande distância geográfica e tecnológica entre os principais países produtores e os grandes centros processadores e 2) a pulverização da produção, a qual ocorre geralmente em pequenas propriedades, de forma não coordenada. Isso significa que o estágio inicial da produção não pode ser controlado

pelas agências regulatórias dos países responsáveis pelo processamento das amêndoas e pela produção de chocolates. A produção descentralizada ocorre em um grande número de pequenas propriedades, sendo combinada em lotes maiores e comercializada em lotes heterogêneos, resultantes das diversas práticas de cultivo e pré-processamento adotadas nas diferentes fazendas.

Uma das principais implicações dessa situação é a dificuldade no atendimento aos padrões de qualidade requeridos pelos mercados consumidores, localizados principalmente na Europa e nos EUA, os quais enfrentam problemas para assegurar a padronização e a rastreabilidade da matéria prima adquirida (SALTINI, AKKERMAN & FROSCHE, 2013).

Em parte, a falta de padronização e a redução da qualidade decorrem da discordância entre produtores e compradores na forma de avaliação do preço das amêndoas de cacau. De acordo com Rodrigues (2006), os baixos preços praticados em algumas regiões levam os produtores a realizar o beneficiamento de forma a manter maior umidade, o que resulta em maior massa e, por consequência, maior receita. Ainda, o preço baixo é considerado pelos produtores como a causa principal da baixa motivação para produzir cacau de qualidade superior, pois, de forma geral, a indústria processadora compra o produto indistintamente e faz um *blend* de cacau de cada região, com diferentes características, o que não estimula o aprimoramento das práticas agrícolas.

1.5.2 Formação de preço no mercado nacional e internacional

A formação dos preços no mercado interno segue o movimento das duas principais bolsas internacionais (Nova Iorque e Londres). Ressalvados os descontos diretos – aqueles relacionados com a transferência do produto de um ponto a outro – poucas são as outras influências próprias de mercado; é bem verdade, que os produtores como tomadores de preço sempre acreditam que poderiam ser mais bem remunerados; e os compradores (agentes de transnacionais) acreditam que oferecem o melhor preço. Entre as duas principais regiões produtoras (Bahia e Pará) existem diferenças de preços (frequentemente menores para o estado do Pará), atribuídas aos custos de transporte para a região de industrialização (RODRIGUES, 2006).

Ainda que o cacau seja uma *commodity* cujo preço é definido em bolsas de valores, existe o chamado prêmio, ou seja, um valor pago acima do preço de mercado internacional de cacau, determinado pelas indústrias processadoras de cacau, fundamentado em avaliações e parâmetros definidos internamente. Porém, o prêmio se aplica, principalmente, à compra de cacaos especiais, sendo que os valores pagos podem ser duas a três vezes mais altos em relação aos preços praticados nas bolsas internacionais (SILVA, 2013).

No mercado internacional, a formação de preços de amêndoas de cacau também é feita pelas bolsas de mercadorias, sendo as cotações feitas em maior proporção em preços futuros (entrega do produto em prazo combinado) e, também, em preço *spot* (contra entrega do produto), modalidade na qual se obtém cotações superiores ao preço no futuro.

Dessa forma, os preços são bastante suscetíveis às variações dos estoques mundiais de cacau, assim como eventos políticos e militares nos principais países produtores. Os produtores de cacau nos diversos países recebem diferentes proporções do preço mundial de cacau: Brasil e Malásia adotam sistema de livre comércio, enquanto Gana e Costa do Marfim têm esquemas de proteção e defesa interna de preço. Os preços pagos em países que adotam alguma forma estatal são inferiores aos preços praticados pelo regime de livre comércio (RODRIGUES, 2006).

Vários são os fatores determinantes na formação dos preços recebidos pelo produtor, sendo os principais: qualidade das amêndoas, normas de classificação, processo de comercialização e os preços internacionais. Porém, a qualidade tem declinado em face da prática adotada pelos compradores com base no estabelecimento de um preço uniforme independentemente da qualidade do produto. Assim, o processo de comercialização é ineficaz, sendo o grande beneficiário o comprador, que, na prática, tem as cotações internacionais como referência para fixação de preços.

Portanto, fica evidente que a qualidade do cacau e as normas de classificação utilizadas são importantes para a formação de preço das amêndoas de cacau no mercado nacional e internacional. Porém, esta etapa constitui um entrave na formação de um preço considerado justo por ambos, produtores e compradores, principalmente devido à inexistência de protocolos objetivos e harmonizados mundialmente para esta avaliação. A

seguir, são apresentadas algumas considerações sobre os métodos de avaliação de qualidade atualmente utilizados.

1.5.3 Regras de comercialização e classificação de lotes

No comércio mundial de cacau, ainda não existe uma estrutura única e internacionalmente aceita para a classificação de amêndoas de cacau. Assim, a maior parte das amêndoas de cacau é comercializada por meio de contratos padronizados por associações comerciais, as quais estabelecem seus próprios métodos de avaliação e critérios de aceitação.

Na Europa, a *Federation of Cocoa Commerce* (FCC) estabelece os padrões comerciais para as amêndoas de cacau, enquanto nos EUA, a *Food and Drugs Administration* (FDA), a *Cocoa Merchants Association of America, Inc.* (CMAA) e a *Intercontinental Exchange* (ICE) estabelecem as regras. Essas associações comerciais de cacau arbitram nas raras ocasiões em que os lotes de cacau ofertados não cumprem os termos do contrato, o que leva à redução no valor pago pelo comprador ou substituição do lote pelo produtor. Normalmente, os países produtores seguem normas e padrões internos, frequentemente baseados nas recomendações da *United Nations Food and Agricultural Organisation* (FAO) (BECKETT, 2009; LIMA et al., 2011).

Os critérios adotados pelas diferentes associações comerciais não são harmonizados e geralmente se referem ao percentual de defeitos no lote (presença de materiais estranhos, defeitos, *off-flavours*) e a parâmetros que afetam o rendimento como, por exemplo, os teores de casca, umidade e lipídios. De forma geral, os critérios de aceitação não são fixados, cabendo aos compradores e vendedores estabelecerem em contrato os valores aceitáveis e recomendados, bem como as penalidades decorrentes do não cumprimento das especificações (FCC, 2012). Em relação à legislação brasileira, na Instrução Normativa nº 38/2008 do Ministério da Agricultura, são fixados os valores percentuais de defeitos a serem considerados para a finalidade de tipificação de lotes de amêndoas de cacau (BRASIL, 2008).

1.6 Métodos para a avaliação da qualidade de amêndoas de cacau

Atualmente, os métodos para a avaliação da qualidade de cacau no Brasil consistem basicamente na prova de corte e, em alguns casos, na análise sensorial. As processadoras de cacau que adquirem as amêndoas para transformação em derivados como massa, manteiga e pó de cacau também avaliam parâmetros como: umidade, teor de lipídios (manteiga de cacau), acidez total e pH, determinados por métodos analíticos convencionais.

1.6.1 Prova de corte

A prova de corte é realizada geralmente pelo comprador, de acordo com o procedimento estabelecido pela FCC (FCC, 2012) e também pela Instrução Normativa nº 38 de 23 de junho de 2008 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2008). O teste consiste na classificação das amêndoas de cacau (Tipo 1, 2, 3 ou Fora de tipo) com base em critérios de umidade, aroma e quantidade de defeitos encontrados numa amostra, composta por pelo menos 300 amêndoas, obtidas por técnicas definidas de amostragem.

As amêndoas são cortadas longitudinalmente e uma das metades é colocada em uma tábua de classificação, onde são avaliadas por inspeção visual e contagem de defeitos. Como informação adicional sobre a qualidade da fermentação, também é possível realizar a contagem de acordo com a coloração (marrom, marrom-violáceo, violácea, branca e branco-violácea) e o grau de compartimentação dos cotilédones.

Apesar de ser internacionalmente aceito, este método é muito limitado para a avaliação de qualidade, pois é baseado na avaliação de defeitos, listados em ordem decrescente de gravidade: amêndoas mofadas, com aroma de fumaça, danificadas por insetos, ardósias, germinadas e achatadas (BRASIL, 2008). De acordo com a porcentagem dos defeitos observados na amostra, o lote pode ser classificado em tipos (Tabela 2). Já a recomendação da FCC é que sejam contadas separadamente as amêndoas mofadas ou danificadas por insetos e as amêndoas ardósias. Ainda, qualquer evidência da presença de amêndoas violáceas e/ou contaminação deve ser descrita (FCC, 2012).

Com base nesses critérios, a prova de corte não permite a identificação de amêndoas de qualidade superior ou de composição química diferenciada. Uma vez identificadas, essas

amêndoas de cacau poderiam ser utilizadas para a produção de derivados com melhores características tecnológicas e sensoriais, além de possibilitar um sistema de remuneração ao produtor de acordo com a qualidade.

Tabela 2. Tolerância de defeitos para amêndoas de cacau, expressa em porcentagem e respectiva classificação do produto em tipos.

Classificação	Defeitos					
	Mofadas	Fumaça	Danificadas por insetos	Ardósia	Germinadas	Achatadas
Tipo 1	0 a 4,0%	0 a 1,0%	0 a 4,0%	0 a 5,0%	0 a 5,0%	0 a 5,0%
Tipo 2	4,0% a 6,0%	1,0% a 4,0%	4,0% a 6,0%	5,0% a 10,0%	5,0% a 6,0%	5,0% a 6,0%
Tipo 3	6,0% a 12,0%	4,0% a 6,0%	6,0% a 8,0%	10,0% a 15,0%	6,0% a 7,0%	6,0% a 7,0%
Fora de Tipo	12,0% a 25,0%	> 6,0%	> 8,0%	>15,0%	> 7,0%	>7,0%

Fonte: BRASIL (2008).

1.6.2 Análise sensorial

A avaliação sensorial do aroma de amêndoas de cacau é comumente realizada durante a prova de corte, sendo possível detectar facilmente *off-flavours* como o aroma de fumaça ou o odor pútrido decorrente de sobrefermentação. O sabor pode ser avaliado diretamente no *nib* torrado e moído ou no *liquor* de cacau obtido a partir deste. Alternativamente, também podem ser utilizadas preparações à base de *liquor* de cacau, açúcar e/ou água, ou ainda, a forma mais palatável, chocolates amargos produzidos em pequena escala. Esses testes são geralmente realizados para amêndoas de cacau provenientes de países com características de qualidade inconsistentes ou com tendência à ocorrência de *off-flavours* (BECKETT, 2009).

No entanto, a aplicação para rotinas de controle de qualidade é restrita devido às dificuldades inerentes ao treinamento de equipe e condições de teste. A formação de uma equipe sensorial é uma etapa complexa e dispendiosa e são requeridos longos tempos de treinamento e experiência para que sejam obtidos resultados exatos e precisos. Além disso, as amostras de chocolates amargos e *liquors* ocasionam fadiga ao provador, devido a atributos intensos relacionados à adstringência, amargor e acidez, além de elevados teores de gordura, implicando em uma limitação do número de amostras que podem ser avaliadas por sessão.

Para fins de pesquisa e comparação entre materiais, a análise sensorial representa uma etapa indispensável, visto que permite caracterizar a amostra de acordo com a presença e intensidade de atributos sensoriais e, tratando-se do produto final, prever a aceitabilidade pelo consumidor.

Para o estudo do perfil sensorial de uma amostra pode ser utilizada a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ[®]), método pelo qual é possível avaliar a presença e intensidade de todos os atributos sensoriais presentes no produto, incluindo aspectos relacionados à aparência, aroma, sabor e textura. Este método é realizado por um painel sensorial constituído por julgadores aprovados em um processo composto por diversas etapas de seleção e treinamento (STONE & SIDEL, 2004).

Para avaliar a aceitação do produto pelo consumidor, é aplicado um método afetivo, que tem por objetivo avaliar o grau com que os consumidores gostam ou desgostam de um produto. No teste de aceitação, as amostras são avaliadas por 50 ou mais consumidores, utilizando-se uma escala hedônica, a qual pode conter cinco, sete ou nove pontos, variando gradativamente entre os termos “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”.

Diversos estudos mostram que a análise sensorial apresenta resultados satisfatórios para a avaliação da qualidade de cacau, incluindo-se a diferenciação entre amostras elaboradas com amêndoas de cacau de diferentes variedades, origens geográficas e condições de processamento.

Jinap et al. (1995) observaram diferenças significativas no perfil sensorial de chocolates elaborados a partir de amêndoas de cacau produzidas em oito países (Brasil, Indonésia, Gana, Nigéria, Camarões, Equador, República Dominicana e Malásia), os quais foram avaliados por uma equipe de assessores treinados. Quanto às amêndoas de cacau produzidas no Brasil, foram avaliadas amostras provenientes da Bahia e do Pará, observando-se diferenças sensoriais importantes, principalmente relacionadas aos descritores de gostos amargo e doce, sabor frutal e notas de queimado e defumado.

No trabalho desenvolvido por Sukha et al. (2008), uma equipe treinada foi capaz de distinguir *liquor* de cacau de Gana (considerado do tipo *bulk*) de clones locais de Trindade, pertencentes ao grupo Trinitário, o que evidencia a possibilidade de classificação de cacau tipo fino e cacau comum por meio da análise sensorial. Amores et al. (2007) demonstraram

que a avaliação sensorial de amostras de *liquor* por uma equipe treinada é uma importante ferramenta para a diferenciação entre cacau fino e cacau comum e, adicionalmente, para a identificação de cacaos finos de diferentes origens, os quais apresentaram perfis sensoriais variados.

Efraim (2009) avaliou o desempenho tecnológico e caracterizou sensorialmente os produtos obtidos a partir de nove materiais genéticos, disponíveis e estabelecidos comercialmente na Bahia e os comparou com o cacau comum da região. Os resultados indicaram que tanto o painel sensorial treinado quanto o grupo de consumidores foram capazes de diferenciar genótipos com ascendência dos grupos de cacau Trinitário e *Criollo* (tradicionalmente considerados de melhor qualidade) de outros puramente *Forastero* Amazônicos.

Torres-Moreno et al. (2012) avaliaram o efeito de duas origens de cacau (Gana e Equador) e duas condições de processamento (tempos de torração e de conchagem) sobre a aceitação de chocolates contendo 51% de cacau. Como resultado, verificou-se que a aceitação sensorial das amostras pelo grupo de consumidores foi influenciada pela origem geográfica e pelas condições de processamento, sendo que o efeito do tempo de torração sobre a aceitação dos chocolates foi dependente do tempo de conchagem e diferente para cada uma das origens estudadas.

Silva (2013) caracterizou amostras de 23 variedades de cacau, obtidas de duas safras, pela avaliação sensorial de chocolates do tipo amargo com 65% de cacau. Tanto a equipe treinada quanto o grupo de consumidores identificaram diferenças significativas entre as amostras, sendo que a Análise Descritiva Quantitativa permitiu caracterizar as amostras de chocolate quanto ao sabor e os resultados obtidos foram confirmados por meio de teste de aceitação com consumidores.

Com base nos trabalhos citados, é possível verificar que a análise sensorial é uma etapa indispensável no processo de avaliação de diferentes variedades, origens ou processos relacionados à produção de chocolates. Os métodos descritivos são fundamentais para estabelecer os perfis sensoriais dos materiais estudados, que associados aos resultados dos testes de aceitação, permitem inferir quais são os atributos sensoriais que direcionam a aceitação ou a rejeição de um determinado produto.

Do ponto de vista do mercado de chocolates, a análise descritiva favorece a definição de padrões de qualidade e autenticidade (perfis específicos de sabor) para chocolates de origem única e monovarietais. Já os testes de aceitação pelos consumidores são importantes para as decisões sobre o investimento na produção de chocolates de origem ou monovarietais, visto que o sucesso deste nicho de mercado depende da diferenciação entre os produtos pelo consumidor.

1.7 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e quimiometria

NIR (*Near-Infrared Spectroscopy*) é um tipo de espectroscopia vibracional que emprega fótons com a energia correspondente aos comprimentos de onda na faixa de 750 a 2500 nm (números de onda: 13300 a 4000 cm^{-1}) (PASQUINI, 2003). As interações desta radiação eletromagnética com moléculas orgânicas permite obter um espectro que contém informação qualitativa e quantitativa sobre os constituintes da amostra.

O espectro na região do infravermelho próximo é caracterizado por bandas largas e sobrepostas, as quais surgem das combinações e sobretons provenientes das vibrações fundamentais encontradas na região do infravermelho médio. As bandas de absorção NIR são tipicamente mais fracas que as bandas fundamentais do infravermelho médio, aproximadamente um fator de 10 a 100 vezes. Várias estruturas podem apresentar sobretons correspondentes aos seus modos vibracionais fundamentais (estiramento e deformação). Para a região espectral NIR, os sobretons de ligação X-H, onde X pode ser N, C e O são de grande interesse, porque os primeiros sobretons de outros tipos de vibração (C-O, por exemplo) ocorrem ainda na região do infravermelho médio e, portanto, apresentam apenas o segundo sobreton na região NIR. As bandas de combinação observadas na região NIR envolvem estiramentos das ligações C-H, O-H e N-H, além de um ou mais modos de deformação, o que aumenta a complexidade do espectro de NIR. Pelo fato de não apresentar bandas características para cada grupo funcional, o espectro de NIR não pode ser interpretado pela atribuição de bandas da mesma forma que é feita para o espectro de infravermelho médio, tornando-se necessário o uso da quimiometria (SKOOG, 2009; SOUSA, 2005).

Para amostras sólidas, pode-se obter o espectro de NIR pela medida direta na amostra inteira ou moída, pelo uso de equipamento com acessório para reflectância difusa. A reflectância difusa é obtida pela penetração da radiação infravermelha na superfície da amostra, a qual interage com as partículas sólidas antes de ser refletida de volta para a superfície. Quando a radiação entra em contato com as partículas da amostra, as quais possuem diâmetro muito maior que o comprimento de onda, a radiação se propaga em todas as direções, resultando em um fenômeno denominado “scattering” (MENGSHI et al., 2009). Nas medidas de reflectância difusa, tanto o espalhamento quanto a absorção da radiação pelas partículas sólidas contribuem para a mudança da intensidade do sinal (PASQUINI, 2003). O espalhamento se deve à superfície rugosa (não uniforme) da amostra e, portanto, a reflectância difusa permite o desenvolvimento de métodos rápidos e relativamente simples para a análise de materiais sólidos ou em pó (SUBRAMANIAN & RODRIGUEZ-SAONA, 2009).

As determinações analíticas no infravermelho próximo são baseadas em relações matemáticas estabelecidas entre o espectro inteiro da amostra e concentrações medidas por métodos de referência. Essa relação matemática é obtida pela aplicação da quimiometria, que consiste no uso de ferramentas estatísticas, matemáticas e gráficas para resolver sistemas químicos, utilizada tanto no planejamento e otimização de experimentos quanto na análise multivariada de resultados (BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2010).

Previamente ao desenvolvimento dos modelos quimiométricos, os dados precisam ser pré-processados para suprimir as contribuições da parte do sinal analítico que não está relacionada com a propriedade de interesse, como ruídos ou deslocamentos da linha de base. Em alguns casos, os dados a serem modelados estão expressos em unidades de medida diferentes, o que precisa ser corrigido na etapa de pré-processamento, uma vez que muitas técnicas assumem que a magnitude de uma medida é proporcional a sua importância e que o nível de ruído é similar em todas as variáveis (RINNAN et al., 2009; WISE et al., 2006). Dada a importância desta etapa, alguns métodos de pré-processamento aplicáveis aos espectros ou às variáveis são apresentados a seguir.

Centrar os dados na média consiste em fazer com que, para cada variável, os valores tenham média zero. Para isso, o valor médio calculado para cada variável, é subtraído de

cada um dos valores individuais que compõem a coluna, o que resulta na mudança do sistema de coordenadas para o centro dos dados. O autoescalamento dos dados é aplicado quando as variáveis apresentam unidades diferentes, permitindo que todas as variáveis tenham contribuição equivalente para o desenvolvimento do modelo. O método consiste em centrar os dados na média e, em seguida, dividir os dados de cada coluna (variável) pelo desvio padrão calculado para a respectiva coluna. Dessa forma, as variáveis autoescaladas são centradas no zero e apresentam unidade de desvio padrão (MARETTO, 2011; RINNAN et al., 2009).

Os pré-tratamentos aplicáveis aos espectros incluem a aplicação de derivadas, a correção do espalhamento multiplicativo (MSC, *Multiplicative Scattering Correction*) e a transformação padrão normal de variação (SNV, *Standard Normal Variate*). A aplicação da primeira ou segunda derivada sobre os dados espectrais originais é um procedimento que pode destacar ombros espectrais, bem como minimizar o efeito de inclinações da linha de base dos espectros. O algoritmo Savitzky-Golay é a escolha mais usual para esta finalidade e envolve o alisamento dos dados pelo ajuste de uma expressão polinomial aos pontos contidos dentro de uma janela móvel selecionada para a aplicação da derivada. MSC é usada para minimizar os efeitos aditivos e multiplicativos de espalhamento decorrentes principalmente da não homogeneidade do tamanho de partículas da amostra. Esse método tenta remover o efeito do espalhamento pela linearização de cada espectro por um espectro ideal (usualmente, o espectro médio do conjunto de calibração), por meio de uma regressão linear para o cálculo dos coeficientes angular e linear do gráfico entre o espectro ideal e o espectro a ser corrigido. O espectro corrigido é calculado pela subtração de cada ponto do espectro pelo valor do coeficiente linear e pela divisão deste valor pelo coeficiente angular. De forma análoga à MSC, SNV é aplicada para reduzir os efeitos do espalhamento e do tamanho de partícula da amostra. Diferentemente da MSC, a SNV não emprega um espectro médio para fazer a correção dos espectros. A correção é realizada pela normalização de cada espectro para o seu próprio desvio padrão. Os tratamentos MSC e SNV fornecem resultados similares, com a diferença que a resposta da aplicação de MSC é dependente do conjunto de amostras usado para a correção (“set-dependent”), enquanto a resposta de SNV não apresenta esta dependência (“set-independent”) (MARETTO, 2011; RINNAN et al., 2009; ROMÍA & BERNARDEZ, 2009; WISE et al., 2006).

Métodos quimiométricos podem ser aplicados com diferentes finalidades, incluindo a análise exploratória de dados, a calibração multivariada para a predição quantitativa de propriedades da amostra e também a classificação de amostras de acordo com critérios de agrupamento (origem geográfica, tipo de processamento ou grau de maturação, por exemplo).

Análises exploratórias podem ser realizadas utilizando a Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*) e a Análise de Agrupamentos Hierárquica (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*). Ambos os métodos são classificados como exploratórios ou não supervisionados, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração (CORREIA & FERREIRA, 2007).

A PCA é uma ferramenta quimiométrica que permite extrair, de um determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. Este conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz (dados bidimensionais), onde as linhas podem ser amostras e as colunas variáveis. Neste sentido, com a PCA é possível efetuar uma simplificação, redução da dimensão original dos dados, modelamento, detecção de amostras anômalas (*outliers*), seleção de variáveis importantes em determinado sistema, classificação e previsão (MATOS et al., 2003).

A PCA é um método de compressão de variáveis que reduz o conjunto de dados da matriz \mathbf{X} ($K \times N$) a um número muito menor de variáveis A , obtidas por meio de combinações lineares das variáveis originais, as quais são denominadas Componentes Principais (PCs). O modelo matemático correspondente é obtido pela decomposição da matriz de dados originais ou pré-processados \mathbf{X} ($K \times N$) em duas matrizes, sendo que \mathbf{T} ($N \times A$) é a matriz de escores, \mathbf{P} ($K \times A$) é a matriz de pesos e \mathbf{E} ($K \times N$) é a matriz de resíduos do modelo (Eq. 1).

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 1}$$

A matriz de escores \mathbf{T} é formada pelos vetores que representam as coordenadas de cada amostra em cada uma das PCs, enquanto a matriz de pesos \mathbf{P} contém a informação do quanto cada variável original contribuiu na formação de cada PC. As PCs são completamente não correlacionadas e ortogonais entre si, de forma que a primeira PC é definida pela direção que descreve a máxima variância dos dados originais. A segunda PC

tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à primeira, e as PCs subsequentes são ortogonais às anteriores e orientadas de tal maneira que descrevam sempre a máxima variância restante. Assim, é possível descrever quase toda a informação contida nos dados originais utilizando poucas PCs, o que permite representar as amostras usando um espaço cuja dimensão A é bem reduzida se comparada à dimensão do espaço que descreve os dados originais.

À medida que mais PCs são adicionadas ao modelo, o produto \mathbf{TP}^T fornece uma melhor aproximação da matriz original \mathbf{X} , a qual seria exatamente construída pelo cálculo de K vetores de escores e K vetores de pesos. No entanto, \mathbf{X} pode ser bem representada por um número de vetores A menor que K , desde que a informação relevante esteja contida nas primeiras A componentes e que as outras descrevam somente variações relacionadas ao ruído (Eq. 2).

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_A\mathbf{p}_A^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 2}$$

Em outras palavras, o número de vetores de pesos deve corresponder ao número de fontes da variação sistemática presente nos dados. Na prática, a escolha do número de PCs deve ser feita de forma a obter a máxima explicação da variância nos dados originais, porém, sem a ocorrência de sobreajuste (“overfitting”) (CORREIA & FERREIRA, 2007; ROMÍA & BERNÀRDEZ, 2009).

A HCA busca agrupar as amostras em classes, por meio do cálculo da distância euclidiana entre as amostras (Eq. 3), baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes diferentes. A representação gráfica obtida é chamada de dendrograma, um gráfico bidimensional organizado com as amostras no eixo y e o índice de similaridade no eixo x (Eq. 4) (CORREIA & FERREIRA, 2007; MORGANO, 2005).

$$\text{Distância euclidiana } (d_{ab}) = \sqrt{\sum_{j=1}^m (x_{aj} - x_{bj})^2} \quad \text{Eq. 3}$$

onde d_{ab} representa a distância euclidiana entre duas amostras quaisquer (a e b) em um espaço de m variáveis e x_{aj} é a j -ésima coordenada da amostra a .

$$\text{Índice de similaridade } (S_{ab}) = 1,0 - \frac{d_{ab}}{d_{max}} \quad \text{Eq. 4}$$

sendo d_{\max} a maior distância calculada entre as amostras.

Em relação à calibração multivariada, diversos métodos matemáticos podem ser empregados, sendo o mais utilizado a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, *Partial Least Squares*). Esse método é aplicável de forma satisfatória em muitos casos, onde uma relação linear entre os espectros e a propriedade de interesse pode ser estabelecida. Para o desenvolvimento do modelo de calibração empregando PLS não é necessário conhecer todos os compostos presentes na amostra, visto que este método apresenta a vantagem de primeira ordem, ou seja, a capacidade de prever o vetor de respostas \mathbf{y} (ou matriz \mathbf{Y}) na presença de interferentes previstos na etapa de calibração. (BORIN et al., 2006; SABIN, 2013)

No método PLS, as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas em matrizes de escores e pesos de acordo com as equações 5 e 6 (ROMÍA & BERNÀRDEZ, 2009; SABIN, 2013).

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 5}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \quad \text{Eq. 6}$$

onde: \mathbf{X} é a matriz de observações (objetos), \mathbf{Y} é a matriz de variáveis dependentes (propriedades de interesse); \mathbf{T} e \mathbf{U} correspondem aos escores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; \mathbf{P}^T e \mathbf{Q}^T são os pesos de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. \mathbf{E} e \mathbf{F} são as matrizes de erros de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente.

A regressão por PLS permite reduzir as dimensões das variáveis originais \mathbf{X} e \mathbf{Y} mantendo elevada a variância explicada em um número reduzido de variáveis latentes. Ao mesmo tempo, maximiza a relação das matrizes \mathbf{T} e \mathbf{U} de escores através de uma matriz \mathbf{B} de coeficientes de regressão (SABIN, 2013). Assim, se o espectro de uma determinada amostra é representado pelo vetor x_i , as concentrações dos analitos y podem ser calculadas usando a equação 7 (ROMÍA & BERNÀRDEZ, 2009).

$$\hat{y}_i = x_i^T \hat{\mathbf{B}} \quad \text{Eq. 7}$$

Além das finalidades já apresentadas, os métodos quimiométricos podem também ser empregados para a classificação de amostras, que consiste na aplicação de métodos quantitativos para a modelagem de respostas qualitativas. Em outras palavras, métodos de classificação encontram relações matemáticas entre um conjunto de variáveis descritivas

(medições químicas, por exemplo) e uma variável qualitativa (origem geográfica, categorias de qualidade, entre outras) (SUN, 2009). Geralmente, são empregados métodos supervisionados de reconhecimento de padrões, principalmente a “regra dos vizinhos mais próximos” (KNN, *k-Nearest Neighbor*) e o SIMCA, acrônimo correspondente a diversas expressões em inglês, entre elas *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

A classificação pelo método KNN é baseada na comparação da distância euclidiana entre as amostras. Em uma primeira etapa, são calculadas as distâncias entre os pares de amostras do conjunto de treinamento (conjunto de amostras com classes conhecidas). Na segunda etapa, a amostra de classe desconhecida é prevista como pertencente a uma determinada classe com base na distância em relação às K amostras mais próximas pertencentes ao conjunto de treinamento (FERREIRA, 2002).

O método SIMCA é baseado na construção de modelos de componentes principais, um para cada classe, para as amostras do conjunto de treinamento. O número ideal de PCs é determinado para cada classe por meio de validação cruzada e são definidas regiões de fronteira (hipercaixa) para cada modelo de PCA. A classificação é feita pela comparação da variância residual da amostra teste com a variância residual média das amostras que compõem uma determinada classe, sendo comum a aplicação de teste estatístico baseado na distribuição F. Assim, a amostra pode ser classificada como pertencente a uma classe, mais de uma classe (quando o modelo não apresenta poder discriminativo suficiente) ou até mesmo em nenhuma das classes (quando a amostra é atípica em relação ao conjunto de treinamento) (FERREIRA, 2002; LAVINE & DAVIDSON, 2006).

Os métodos analíticos baseados na aplicação de NIR e quimiometria apresentam vantagens porque são: rápidos (um minuto ou menos por amostra), não destrutivos, não invasivos, adequados para monitoramento de processos, aplicáveis para a análise de quaisquer moléculas contendo ligações C-H, N-H, S-H ou O-H e exigem pouco ou nenhum preparo de amostra (PASQUINI, 2003). Outras vantagens incluem a possibilidade de calibração de vários componentes de forma simultânea, baixo custo, não utilização de reagentes e solventes e, portanto, sem geração de resíduos. Além disso, quando bem

desenvolvidos, os modelos de calibração fornecem resultados com alta precisão e repetitividade (SIMAS, 2005).

Dessa forma, a quimiometria tem sido empregada para análises quantitativas no infravermelho de diferentes propriedades dos alimentos, tais como: teor de umidade, proteínas, cinzas, açúcares, lipídios, cafeína, taninos, entre outras, em diferentes matrizes. Diversas aplicações na área de alimentos são discutidas por Sun et al. (2009) e incluem: detecção de adulterantes em leite e produtos cárneos, determinação da composição centesimal de cereais, controle de qualidade de óleos e gorduras, leite, ovos, frutas, sucos e bebidas como vinho e cerveja, entre outras.

1.7.2 Aplicações de NIR e quimiometria para a avaliação de parâmetros de qualidade de cacau e derivados.

A viabilidade do emprego de NIR associada a ferramentas quimiométricas foi demonstrada para diversas aplicações relevantes para a cadeia produtiva de cacau e chocolate, incluindo-se a previsão de parâmetros de composição química e qualidade sensorial (DAVIES et al., 1991; COSTA FILHO, 2009; VESELA et al., 2007; HUE et al., 2014), a avaliação de adulterações (TEYE et al., 2014), o monitoramento de etapas do processo (SVENSTRUP, HEIMDAL & NØRGAARD, 2005; ACULEY et al., 2010) e a discriminação de amostras em relação à origem geográfica (TEYE et al., 2013).

No trabalho de Davies et al. (1991), foram analisadas por NIR 144 amostras nos diferentes estágios de processamento, incluindo as amêndoas fermentadas e secas, amêndoas torradas, *liquor* de cacau e chocolates de cada amostra. Os chocolates foram avaliados sensorialmente por uma equipe treinada quanto à intensidade de seis atributos de aroma e 23 atributos de sabor. O objetivo do trabalho foi desenvolver um modelo matemático para a previsão da qualidade sensorial do chocolate a partir dos espectros NIR das amêndoas de cacau. Os autores obtiveram sucesso no desenvolvimento de um modelo preditivo capaz de diferenciar amostras de baixa qualidade de amostras de qualidade aceitável. O modelo permitiu identificar 64% de amostras de baixa qualidade, com rejeição de 20% de amostras de qualidade aceitável, o que foi considerado promissor frente à incerteza inerente aos dados de análise sensorial. Cabe citar que o estudo incluiu amostras

de origens geográficas distintas, com diferentes intensidades de fermentação (amêndoas sobrefermentadas e sub-fermentadas), além de amostras de amêndoas obtidas de frutos imaturos, o que aumenta a variabilidade do conjunto de amostras e favorece a distinção de grupos tanto pela equipe sensorial quanto pelos métodos quimiométricos aplicados aos espectros NIR.

Quanto à calibração multivariada, Costa Filho (2009) desenvolveu um modelo de calibração multivariada para a determinação de sacarose em massa de chocolate, tendo como diferencial a inclusão de massas de chocolate de três tipos (amargo, branco e ao leite) em um único modelo de calibração. A calibração foi desenvolvida utilizando-se PLS e Regressão Linear Múltipla (MLR, do inglês *Multiple Linear Regression*), com seleção de variáveis empregando-se os coeficientes de regressão do modelo PLS e algoritmo genético. Os modelos apresentaram altos coeficientes de correlação e baixos erros de previsão, indicando que a aplicação de NIR é indicada para este controle nas fábricas de chocolates. Veselá et al. (2007) mostraram que a aplicação de NIR associada à quimiometria é adequada para a determinação de lipídios, nitrogênio total e umidade em amostras de cacau em pó. Em trabalho recente, Hue et al. (2014) demonstraram a possibilidade de determinação de nitrogênio amoniacal em amostras de amêndoas de cacau por NIR, por meio do desenvolvimento de um modelo por regressão PLS utilizando-se 154 amostras na calibração e 30 amostras para a validação externa. A calibração foi realizada para a faixa de 25-441 mg kg⁻¹ de nitrogênio amoniacal e obteve-se um erro de previsão de 20 mg kg⁻¹ e coeficiente de determinação (R²) igual a 0,95. É interessante notar que os autores empregaram 13 variáveis latentes na construção do modelo PLS e propõem a hipótese de que a calibração foi obtida de forma indireta, ou seja, pela existência de uma relação quantitativa e robusta entre a degradação de componentes majoritários durante a fermentação das sementes de cacau e a formação de nitrogênio amoniacal. A hipótese é bastante razoável, visto que a concentração média de nitrogênio amoniacal nas amostras analisadas foi de aproximadamente 0,02%, abaixo do limite de detecção de 0,1%, geralmente atribuído a NIR para aplicações quantitativas (PASQUINI, 2003). A relevância deste estudo consiste na relação existente entre o teor de nitrogênio amoniacal e o grau de fermentação de amêndoas de cacau. Portanto, um método rápido para a determinação deste parâmetro é crucial para o aprimoramento dos procedimentos de avaliação de lotes

comerciais de amêndoas de cacau, com a possibilidade de substituição da prova de corte, desde que seja possível estabelecer critérios de aceitação aplicáveis a todos os países produtores.

Em relação à análise de adulteração, Teye et al. (2014) desenvolveram modelos quimiométricos para a detecção e quantificação de amêndoas de cacau não fermentadas indevidamente misturadas às fermentadas. Modelos empregando Máquinas de Vetores de Suporte (SVM, *Support Vector Machines*) e PLS foram desenvolvidos para discriminação entre amêndoas fermentadas, não fermentadas e adulteradas (5 a 40% m/m) e para quantificar o nível de adulteração com amêndoas não fermentadas. Os resultados para o modelo de classificação (100% de identificação correta para os conjuntos de calibração e previsão) e para o modelo PLS (erro de previsão=1,68% e coeficiente de correlação=0,98) indicaram que os métodos desenvolvidos são apropriados para o monitoramento deste tipo de adulteração.

Uma aplicação bastante original relacionada à determinação do grau de pré-cristalização ou temperagem em chocolates foi desenvolvida por Svenstrup, Heimdal & Nørgaard (2005). Pela aplicação da Análise de Componentes Principais, verificou-se que os espectros NIR permitiram a discriminação entre cinco níveis de temperagem para os chocolates avaliados. PLS-DA (do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) aplicada aos espectros NIR e utilizando os três principais níveis de temperagem (sobre-temperado, bem-temperado e super-temperado) como variável dependente permitiu a perfeita separação entre os grupos.

Aculey et al. (2010) descreveram a aplicação de NIR e quimiometria para a avaliação do grau de fermentação de amêndoas de cacau, submetidas a diferentes tempos de fermentação (0, 24, 48, 72, 96, 120 h). A PCA dos espectros NIR mostraram uma tendência de separação das amostras com base no tempo de fermentação, particularmente a distinção do grupo com 0 a 24 h de fermentação em relação aos demais. Apesar dos resultados positivos, é importante considerar que os experimentos foram desenvolvidos a partir de um único lote de sementes de cacau, o qual foi fermentado em condições controladas e a partir deste foram retiradas as subamostras a diferentes tempos de fermentação. Para constatar a viabilidade da aplicação de NIR para a determinação do grau de fermentação de amêndoas

de cacau, seria recomendável a avaliação de um grande número de lotes comerciais de forma a incluir maior variabilidade relacionada à origem geográfica, composição química da matriz, métodos de pré-processamento, características genóticas, dentre outros.

Tendo em vista aspectos de rastreabilidade e autenticidade de amêndoas de cacau, é de grande utilidade o desenvolvimento de ferramentas que permitam diferenciar as amostras de acordo com o país ou região de produção. Neste sentido, Teye et al. (2013) desenvolveram modelos multivariados de classificação empregando 194 amostras de amêndoas de cacau produzidas em sete diferentes regiões de Gana. PCA foi utilizada para verificar as tendências de agrupamento e quatro métodos de classificação foram comparados: LDA (*Linear discriminant analysis*), KNN, BPANN (*Back propagation artificial neural network*) e SVM. Em ordem decrescente de desempenho, os resultados foram melhores com o emprego de SVM, BPANN, LDA e KNN, sendo que SVM apresentou 100% de identificação correta para os conjuntos de treinamento e de previsão, enquanto a aplicação de KNN resultou em 75,01% e 72,31% para o conjunto de treinamento e de previsão, respectivamente.

1.8 Conclusões

A abordagem utilizada nesta revisão pretende ampliar a interpretação sobre a qualidade de amêndoas de cacau, inserindo este conceito no contexto da cadeia produtiva de cacau e chocolate, a qual apresenta grandes disparidades entre os centros produtores e consumidores, as quais impõem dificuldades de padronização e atendimento de especificações.

Como um dos entraves à melhoria da qualidade de amêndoas de cacau comerciais, destacou-se a falta de métodos objetivos e harmonizados para a classificação de lotes, os quais permitiriam a identificação de amêndoas de cacau com qualidade superior e, portanto, tornariam viável um sistema de remuneração de acordo com a qualidade.

Evidenciada a necessidade de uso de novas ferramentas para o monitoramento e avaliação da qualidade de amêndoas de cacau, a aplicação da Espectroscopia no Infravermelho Próximo associada à quimiometria foi apresentada como uma alternativa promissora, com a possibilidade de desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, não

destrutivos e que permitem obter e interpretar uma grande quantidade de informações sobre a amostra. Exemplos de aplicações descritos na literatura foram apresentados, demonstrando assim a viabilidade da aplicação desta técnica para o monitoramento de processos, avaliação de parâmetros de composição química e como ferramenta auxiliar para a rastreabilidade e controle de autenticidade de cacau e derivados.

REFERÊNCIAS

ABICAB. Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, cacau, amendoim, balas e derivados. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/associado-chocolate-e-cacau/estatisticas/>>. Acesso em: 13 mai. 2010.

ACULEY, P. C. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 75 n. 6, p. 300-307, 2010.

AMORES, F. et al. **Project to determine the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine and bulk cocoa. Project Report - August 2007.** Disponível em: <http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/50-projects.html>. Acesso em: 22 nov. 2014.

BARROS NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos - Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria.** 4. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2010. 413 p.

BECKETT, S. T. **The science of chocolate.** 2 ed. Cambridge: RSC. 2008. 240 p.

BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use.** 4 ed. United Kingdom: Blackwell Publishing. 2009. 732 p.

BORIN et al. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, p. 25–32, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa n° 38, de 23 de junho de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>. Acesso em: 25 nov. 2014.

CEPLAC. Comissão Executiva para o Plano da Lavoura Cacaueira. Programa de Recuperação da Lavoura Cacaueira – 3ª e 4ª etapas. A crise da lavoura cacaueira, condicionantes, ação governamental, análise e recomendações. Abril, 2009. Disponível em <http://www.seagri.ba.gov.br/not_notatecnica20042009.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2014.

- CLAPPERTON, J.F. et al. **Genetic Variation of Cocoa Flavour**. Proceedings of 11th International Cocoa Research Conference, Yamoussoukro, Côte D'Ivoire, p. 749-754, 1993.
- CLAPPERTON, J.F. et al. The contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour. **Tropical Agriculture**, v. 71, p. 303-308, 1994.
- CORREIA, P.R.M; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.
- COSTA FILHO, P. A. Rapid determination of sucrose in chocolate mass using Near-Infrared Spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, p. 206-211, 2009.
- DAVIES, A. M. C., et al. Prediction of chocolate quality from near-infrared spectroscopic measurements of the raw cocoa beans. **Vibrational Spectroscopy**, v. 2, p. 161-172, 1991.
- EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 208 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations**. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 28 jan. 2015.
- FCC. Federation of Cocoa Commerce Ltd**. FCC Quality Rules (March 2012). 30 p. Disponível em: <<http://www.issamercocoabeans.com/wp-content/uploads/2014/02/FCC-Quality-Rules-March-2012.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2014.
- FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n.6, p. 742-753, 2002.
- FIGUEIRA, A., et al. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma Cacao* L. from Brazil and Malaysia develop equivalent cocoa flavour. **Tropical Agriculture**, v. 74, p. 132-139, 1997.
- HUE, C.; GUNATA, Z.; Bergounhou, A.; ASSEMAT, S.; BOULANGER, R.; SAUVAGE, F.X.; DAVRIEUX, F. Near infrared spectroscopy as a new tool to determine cocoa fermentation levels through ammonia nitrogen quantification. **Food Chemistry**, v. 148, p. 240-245, 2014.
- IBGE (2004). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes. 2004. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2004_v31_br.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2015.

IBGE (2013). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes. 2013. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2013_v40_br.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2015.

ICCO (2010). International Cocoa Organization. International Cocoa Agreement 2010. Disponível em: <http://www.icco.org/about/agreement.aspx>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

ICCO (2012). International Cocoa Organization. The world cocoa economy: past and present, 26 de julho de 2012. Disponível em: <http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/45-statistics-other-statistics.html>. Acesso em: 10 out. 2014.

ICCO (2014). International Cocoa Organization. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, **Cocoa year 2013/14**, v. XL, n. 2, 2014. Disponível em: <http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html>. Acesso em: 10 out. 2014.

JINAP, S.; DIMICK, P.S.; HOLLENDER, R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. **Food Control**, v. 6, n. 2, p. 105-110, 1995.

LAVINE, B.K.; DAVIDSON, C.E. Classification and Pattern Recognition. In: GEMPERLINE, P. (Ed.). **Practical Guide To Chemometrics**. 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. p.339-374.

LIMA, L.J.R. et al. *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51:8, p. 731-761, 2011.

MARETTO, D.A. **Aplicação de máquinas de vetores de suporte para desenvolvimento de modelos de classificação e calibração multivariada em espectroscopia no infravermelho**. 113 p. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

MATOS, G.D. et al. Análise exploratória em Química Analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, n. 6, p. 38-50, 2003.

MENGSHI, L. et al. Infrared (IR) Spectroscopy - Near-Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy: Sampling techniques of IR methods. In: SUN, Da-wen (Ed.). **Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Elsevier/ Academic, 2009. p. 136-137.

MORGANO, M. A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. 110 p. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n.2, p. 198-219, 2003.

RINNAN et al. Data Pre-processing. In: SUN, Da-wen (Ed.). **Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Elsevier/ Academic, 2009. p. 29-48.

RODRIGUES, M.R.S. **Descrição da cadeia produtiva do cacau no estado do Pará e a inserção do produto nos mercados nacional e internacional**. 121 p. Dissertação (Mestre em Economia). Universidade da Amazônia, Belém, 2006.

ROMÍA, M.B.; BERNARDEZ, M.A. Multivariate calibration for quantitative analysis. In: SUN, Da-wen (Ed.). **Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Elsevier/ Academic, 2009. p. 51-80.

SABIN, G.P. **Estratégias quimiométricas aplicadas ao estudo de imagens químicas: novas possibilidades para caracterização de produtos e processos farmacêuticos**. 97 p. Tese (Doutor em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCHE, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, p. 167-187, 2013.

SILVA, A. R. A. **Caracterização de amêndoas e chocolate de diferentes variedades de cacau visando a melhoria da qualidade tecnológica**. 118 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SIMAS, R. C. **Determinação de proteínas e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia no infravermelho próximo**. 128 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Tradução de Célio Pasquini et al. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1055 p.

SOUSA, E.R. **Determinação de parâmetros de qualidade da gasolina e estudo de contaminantes utilizando espectros do infravermelho próximo na fase vapor**. 120 p. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

STONE, H. & SIDEL, J. L. **Sensorial Evaluation Practices**. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 337p.

SUBRAMANIAN, A.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: Sampling techniques. In: SUN, Da-wen (Ed.). **Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Elsevier/academic, 2009. Cap. 7. p. 168-171.

SUKHA, D.A., et al. The use of an optimized organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. **European Journal of Food Technology**, v. 226, n. 3, p. 405-413, 2008.

SUN, D. (ed.). **Infrared spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Elsevier/Academic, 2009. 424 p.

SVENSTRUP, G.; HEIMDAL, H.; NØRGAARD, L. Rapid instrumental methods and chemometrics for the determination of pre-crystallization in chocolate. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 953-962, 2005.

TEYE, E. et al. Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p.183–189, 2013.

TEYE, E. et al. Feasibility study on the use of Fourier transform near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate and quantify adulteration in cocoa beans. **Food Research International**, v. 55. p. 288–293, 2014.

TORRES-MORENO, M. et al. Dark chocolate acceptability: influence of cocoa origin and processing conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 404-411, jan. 2012.

VESELÁ, A. et al. Infrared spectroscopy and outer product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. **Analytica Chimica Acta**, v. 601, p. 77-86, 2007.

CAPÍTULO II

Caracterização física e química de amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e na Costa do Marfim

Este manuscrito está em fase de preparação e será submetido ao periódico “Journal of Food Composition and Analysis”.

RESUMO

Amêndoas de cacau fermentadas e secas produzidas em diferentes estados brasileiros (Bahia, Pará e Rondônia) e na Costa do Marfim foram avaliadas em relação às características físicas e parâmetros de qualidade (pH, acidez, teores de umidade, proteína, lipídios, açúcares, teobromina, cafeína e compostos fenólicos totais). Em relação à avaliação física, as amostras apresentaram adequado padrão comercial, porém, os resultados da prova de corte evidenciaram a falta de padronização no pré-processamento das sementes. Diferenças importantes de composição foram observadas entre as amostras das diversas regiões produtoras, principalmente quanto à concentração de componentes minoritários, os quais estão diretamente relacionados à qualidade sensorial dos produtos derivados. De acordo com as comparações de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), de forma geral, as amêndoas de cacau produzidas na Bahia diferenciaram-se em relação às produzidas na Costa do Marfim, enquanto as amêndoas produzidas no Pará e em Rondônia apresentaram características similares e intermediárias em relação às anteriormente citadas. O agrupamento das amostras em função das variações de composição química também foi mostrado pela Análise de Componentes Principais, sendo que a acidez e as concentrações de compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína foram os parâmetros com maior contribuição para a diferenciação das amostras.

2.1 Introdução

A cacauicultura é uma atividade agrícola de grande importância econômica, ambiental e social para as regiões de clima tropical, quente e úmido. De acordo com a *International Cocoa Organization* (ICCO), a produção global de amêndoas de cacau em 2013 foi de 3,9 milhões de toneladas, sendo a África a maior região produtora (72%), seguida pela América (16%) e Ásia (12%) (ICCO, 2014).

O Brasil possui destaque no que se refere à produção de cacau e potencial de desenvolvimento para a cacauicultura, sendo o único país com a cadeia produtiva completa, ou seja, expressiva produção agrícola, capacidade produtiva para o processamento interno de todo o cacau produzido e elevada produção e consumo de chocolates.

Atualmente, a produção brasileira ainda está concentrada na Bahia (63%), seguida pelo Pará (27%), Rondônia (6%), Espírito Santo (2%) e Amazonas (2%) (IBGE, 2012). Porém, a lavoura na Bahia, como consequência da crise enfrentada na década de 80, ainda apresenta safras não constantes, alternando-se entre altas e baixas produções. Em contrapartida, outros estados produtores como o Pará, Espírito Santo e Rondônia têm mantido sua produção.

Tendo em vista o aumento da demanda mundial por produtos de cacau e o potencial de expansão da cacauicultura no Brasil, fica evidente a tendência de aumento da participação desses estados na produção brasileira. Neste contexto, torna-se muito importante a caracterização química, sensorial e a avaliação geral da qualidade do cacau produzido nas diferentes regiões do país, uma vez que o desempenho no processamento e a qualidade dos produtos derivados são dependentes dessas características.

Porém, historicamente, o estado da Bahia é o principal produtor de cacau no Brasil, de forma que os dados sobre a composição química do cacau brasileiro disponíveis na literatura frequentemente referem-se ao cacau produzido neste estado. Como consequência, as informações referentes ao cacau produzido em outras regiões do Brasil são bastante limitadas. Uma consideração deve ser feita em relação aos trabalhos de Ribeiro et al. (2012a, 2012b) que caracterizaram amostras de manteigas de cacau produzidas a partir de amêndoas produzidas na Bahia, Amazonas e Espírito Santo, quanto à composição química,

conteúdo de gordura sólida, consistência, microestrutura, comportamento polimórfico e características de cristalização.

No entanto, não foram encontrados trabalhos publicados sobre a composição química de lotes de amêndoas de cacau comerciais produzidas em diferentes estados brasileiros. As principais referências bibliográficas, em geral, citam a composição média das amêndoas de cacau com base em publicações anteriores ao ano de 1990 e não há uma distinção sobre as origens geográficas das amêndoas analisadas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi fornecer um panorama geral sobre a qualidade e composição química das amêndoas de cacau produzidas no Brasil (e na Costa do Marfim, como parâmetro comparativo), discutindo-se as principais diferenças relacionadas às regiões produtoras. Para isso, 77 amostras de amêndoas de cacau fermentadas e secas foram analisadas pela prova de corte e também quanto à composição química, incluindo diversos parâmetros associados à qualidade e rendimento desta matéria prima (pH, acidez, teores de umidade, casca, lipídios, proteínas, açúcares, compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína).

2.2 Experimental

2.2.1 Amostras

Foram analisadas 77 amostras de amêndoas de cacau fermentadas e secas provenientes de três estados brasileiros (Bahia, Pará e Rondônia) e da Costa do Marfim. Pará (PA) e Rondônia (RO) são localizados na região Norte do Brasil e o estado da Bahia (BA) situa-se na região Nordeste. A Costa do Marfim (CM) localiza-se no oeste africano e atualmente é o maior produtor mundial de cacau. Portanto, amostras produzidas na Costa do Marfim foram analisadas para efeito de comparação, por representarem as características das amêndoas de cacau *bulk* mais disponíveis no mercado mundial.

A maior parte das amostras foi proveniente dos estados Bahia (30) e Pará (29) e, em menor número, da Costa do Marfim (11) e Rondônia (7). Todas as amostras foram obtidas por meio de parceria estabelecida com uma agroindústria processadora de cacau e foram

recebidas no período de julho de 2011 a julho de 2012. Imediatamente após o recebimento, as amostras foram armazenadas em embalagens metalizadas de polietileno e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento das análises.

As amostras recebidas (aproximadamente 1 kg) foram submetidas à subamostragem por quarteamento e uma alíquota de 300 amêndoas foi utilizada para as análises físicas e para a prova de corte. Após a realização da prova de corte, as amêndoas de cacau (cotilédone e casca) foram moídas em moinho modelo A11 Basic (IKA, Staufen, Alemanha) e destinadas às outras análises.

Determinações de umidade, pH, acidez e teor de lipídios foram realizadas nas amêndoas de cacau moídas (cotilédones e casca). Para a análise dos demais parâmetros de composição química foi utilizada apenas a parte interna das amêndoas de cacau (cotilédone). Assim, as amêndoas foram quebradas em moinho de facas tipo Rietz (ICMA, Campinas, Brasil) e os fragmentos foram separados de acordo com sua granulometria em peneira vibratória Granutest (Telastem, São Paulo, Brasil) com aberturas de 6,35; 4,76 e 2,38 mm. A separação da testa (casca que envolve as amêndoas) e dos *nibs* (pequenos fragmentos de cotilédones resultantes da quebra) foi realizada empregando-se um equipamento separador de casca específico para amêndoas de cacau Cocoa Winnower (Capco, Ipswich, Reino Unido). As amostras de *nibs* foram moídas, armazenadas em embalagens metalizadas de polietileno e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento das análises.

2.2.2 Reagentes e padrões analíticos

Os padrões analíticos utilizados (pureza superior a 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Metanol (grau HPLC, Mallinckrodt, EUA) e acetonitrila (grau HPLC, JT Baker, EUA) foram utilizados nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para o preparo de fase móvel e de soluções-padrão, foi utilizada água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Os demais reagentes e solventes utilizados nas análises foram da marca Synth (Labsynth, Brasil).

2.2.2.1 Preparo das soluções de padrões

Para a determinação de compostos fenólicos totais, foi preparada uma solução-estoque de ácido tânico $5,0 \text{ g L}^{-1}$ pela dissolução de $0,25 \text{ g}$ de ácido tânico em 5 mL de etanol, sendo o volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 50 mL . Para a construção da curva analítica, foram preparadas as soluções de trabalho em sete níveis de concentração equidistantes ($0,1- 0,7 \text{ g L}^{-1}$) pela diluição de volumes adequados da solução-estoque em água ultrapura.

Os padrões de teobromina e cafeína foram preparados utilizando-se como solvente uma solução de ácido acético $0,3\%$ e metanol na proporção $85:15 \text{ (v/v)}$. Soluções-estoque individuais na concentração de 200 mg L^{-1} foram preparadas pela dissolução (auxiliada por banho ultrassônico no caso da teobromina) de $0,0200 \text{ g}$ de padrão em 100 mL de solvente. Para a construção da curva analítica, foram preparadas as soluções de trabalho em sete níveis de concentração equidistantes (cafeína: $3-21 \text{ mg L}^{-1}$ e teobromina: $15-105 \text{ mg L}^{-1}$) pela diluição de volumes adequados das soluções-estoque utilizando como solvente uma solução de ácido acético $0,3\%$ e metanol na proporção $85:15 \text{ (v/v)}$.

Soluções-padrão de frutose, glicose e sacarose 10 g L^{-1} foram preparadas pela dissolução de $1,0 \text{ g}$ de cada padrão analítico em 100 mL de água ultrapura, com o auxílio de banho ultrassônico. Para a construção da curva analítica, foram preparadas as soluções de trabalho em cinco níveis de concentração ($0,2-10 \text{ g L}^{-1}$) pela diluição de volumes adequados das soluções-estoque em água ultrapura.

As soluções-padrão de açúcares foram preparadas e injetadas sempre no mesmo dia. As demais soluções-estoque foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em freezer (-18°C) por até 15 dias. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente e armazenadas sob refrigeração (4°C) quando não estavam em uso. A cada novo lote de análises, os valores de absorvância ou áreas obtidos para as soluções recém-diluídas foram comparados aos valores anteriormente medidos, a fim de controlar a qualidade das soluções-estoque utilizadas.

2.2.3 Avaliação física das amêndoas de cacau

As amêndoas de cacau fermentadas e secas foram avaliadas em relação à massa individual e número de amêndoas em 100 g, empregando-se uma balança semi-analítica modelo BG 2000 (Gehaka, São Paulo, Brasil). O teor de casca foi determinado por ensaio gravimétrico, após o descascamento e pesagem das frações na etapa de obtenção dos *nibs*.

A prova de corte foi realizada com base nas recomendações da *Federation of Cocoa Commerce* (FCC, 2012). Uma subamostra de 300 amêndoas de cacau foi retirada da amostra original, independentemente do tamanho, formato ou aparência, as quais foram cortadas longitudinalmente com uma tesoura de poda. Uma das metades de cada amêndoa cortada foi colocada na tábua de classificação e, por inspeção visual, realizou-se a contagem de acordo com a coloração: marrom, marrom-violáceo, violácea, branca e branco-violácea. Nesta etapa, também foi realizada a contagem de amêndoas de acordo com o grau de compartimentação dos cotilédones: boa, parcial, ruim ou sem compartimentação.

Adicionalmente, tendo por base a Instrução Normativa nº 38 de 23 de junho de 2008 (BRASIL, 2008), as amêndoas foram observadas e contadas em relação à presença de defeitos, sendo em ordem decrescente de gravidade: mofadas, com aroma de fumaça, danificadas por insetos, ardósias, germinadas e achatadas. Quando uma amêndoa apresentou mais de um tipo de defeito, apenas o defeito considerado mais grave foi contado. Os resultados foram expressos como porcentagem de amêndoas que apresentaram o defeito em relação ao número de amêndoas avaliadas.

2.2.4 Análises físico-químicas das amêndoas de cacau

Métodos de referência da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) foram empregados para a determinação de umidade, pH, acidez e teor de lipídios. O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa com circulação de ar, modelo 520 (Fanem, Guarulhos, Brasil) a 100°C até peso constante (método 931.04). O pH e a acidez titulável foram medidos em suspensão aquosa da amostra (10 g de amostra em 90 mL de água), utilizando-se um medidor de pH digital modelo TEC-5 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) de acordo com os procedimentos para a determinação de pH (método 970.21) e titulação

potenciométrica (método 942.15). O teor de lipídios totais foi determinado pela extração com éter de petróleo em extrator de lipídios Soxhlet, modelo TE-188 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) durante quatro horas após a hidrólise ácida da amostra (método 963.15). A determinação de proteína foi realizada pelo método microKjeldahl, o qual inclui as mesmas etapas e princípios do método Kjeldahl convencional descrito na AOAC (método 970.22), porém emprega menores quantidades de amostra e reagentes. O teor de proteína foi calculado a partir da concentração de nitrogênio total aplicando-se o fator de conversão de 6,25 (HORWITZ, 2006).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com Efraim et al. (2006). Neste procedimento, 200 mg de amostra foram desengordurados com hexano (2 x 10 mL) e após a total evaporação do solvente, foi realizada a extração com solução de acetona 70% (v/v) em mesa agitadora orbital modelo TE241 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 1600xg em centrífuga modelo Excelsa II 206-BL (Fanem, Guarulhos, Brasil) por 5 minutos. Na etapa de reação, em um balão de 100 mL foram adicionados 60 mL de água destilada, 0,5 mL de extrato da amostra, 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 15 mL de solução de carbonato de sódio (20%) e tartarato de sódio (1,2%). O volume do balão foi completado a 100 mL com água destilada, seguido de agitação e repouso por 30 minutos ao abrigo da luz. Após este tempo de reação, a absorbância a 765 nm foi medida usando uma leitora de microplacas Novostar (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). A quantificação foi feita com base em uma curva de ácido tânico e, portanto, os resultados foram expressos como gramas equivalentes de ácido tânico por 100 g de amostra.

Teobromina e cafeína foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD) de acordo com o procedimento descrito por Risner et al. (2008) com algumas modificações. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido modular Shimadzu LC-10 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, EUA) composto por uma bomba LC-10AT VP, forno de coluna CTO-10AS VP, detector de arranjo de diodos SPD-M20A VP e uma interface SCL-10A, operado via software Class VP Workstation versão 6.14. A 30 mg de amostra foram adicionados 5 mL da solução de extração composta por solução aquosa de ácido acético

0,3% e metanol na proporção 85:15 (v/v). Os tubos foram agitados em vortex multi-tubos modelo VX-200 (Labnet International, Woodbridge, USA) durante 15 minutos e centrifugados a 1600xg em centrífuga modelo Excelsa II 206-BL (Fanem, Guarulhos, Brasil) por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de filtros de seringa com membranas de PTFE de 0,45 µm de abertura de poro (Millipore, São Paulo, Brasil) e 20 µL de extrato foram injetados manualmente através de injetor Rheodyne modelo 7725i com loop de 20 µL. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna Symmetry C₁₈ (4,6 mm x 75 mm x 3,5 µm) (Waters, Milford, USA) à temperatura de 30°C, com eluição isocrática da fase móvel composta de solução aquosa de ácido acético 0,3% e metanol na proporção 80:20 (v/v) a 1,0 mL min.⁻¹. As áreas dos picos dos cromatogramas foram calculadas a 273 nm e os dois analitos foram quantificados pelo método de padronização externa usando soluções-padrão de concentrações conhecidas de teobromina e cafeína.

Os açúcares (frutose, glicose e sacarose) foram quantificados empregando-se CLAE com detector de índice de refração (RID) com base no procedimento descrito por Bugner e Feinberg (1992), com algumas modificações. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido (YL Instrument Co., Ltd.) composto por um degaseificador modelo YL9101, bomba modelo YL9110, forno de coluna modelo YL9131, detector modelo YL9170 e sistema de aquisição de dados YL Clarity.

Uma alíquota de 2,0 g de amostra foi desengordurada (duas extrações com 10 mL de éter de petróleo a frio) e submetida à extração com 10 mL de água Milli-Q em mesa agitadora orbital modelo TE241 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) por duas horas. A clarificação do extrato foi realizada com soluções de ferrocianeto de potássio 0,25 mol L⁻¹ (0,5 mL) e acetato de zinco 1,0 mol L⁻¹ (0,5 mL), com agitação em vortex durante 30 segundos após cada adição. O material foi centrifugado a 1600xg em centrífuga modelo Excelsa II 206-BL (Fanem, Guarulhos, Brasil) por 3 minutos para facilitar a separação sólido-líquido. O sobrenadante foi filtrado em filtro de papel Whatman n.1 e, numa segunda etapa, através de filtros de seringa com membranas de PVDF de 0,22 µm de abertura de poro (Millipore, São Paulo, Brasil). O extrato obtido foi injetado manualmente através de injetor Rheodyne modelo 7725i com loop de 20 µL. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna Luna NH₂ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex, EUA), com eluição isocrática de fase móvel composta por acetonitrila e água na proporção 82:18 (v/v) a 1,5 mL min.⁻¹. As

temperaturas do forno de coluna e do detector foram ajustadas a 40°C. Os analitos foram quantificados por padronização externa usando soluções-padrão de concentrações conhecidas.

As análises de umidade, pH, acidez, teor de lipídios e compostos fenólicos totais foram feitas em triplicata. A determinação de proteína e as análises cromatográficas foram realizadas em duplicata.

2.2.5 Análise dos dados

As médias calculadas para cada parâmetro analisado e para cada um dos grupos de amostras (Bahia, Pará, Rondônia e Costa do Marfim) foram comparadas usando a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey, considerando-se 95% de nível de confiança. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 7.0 (Stat Soft, Tulsa, EUA, 2004).

Adicionalmente, uma análise exploratória dos dados aplicando a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi realizada para visualizar possíveis correlações entre as variáveis e agrupamentos entre as amostras. A matriz de dados consistiu de 77 amostras e 14 variáveis independentes, contendo todos os resultados de umidade, porcentagem de casca, pH, acidez, lipídios, proteína, compostos fenólicos totais, teobromina, cafeína, razão teobromina/cafeína, glicose, frutose, açúcares redutores e sacarose. Os dados foram autoescalados para cada variável e a PCA realizada empregando-se o programa PLS toolbox 5.8 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, EUA, 2010) para Matlab 7.8 (The Math Works, Inc., Natick, EUA, 2009).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Prova de corte

No comércio mundial de cacau, ainda não existe uma estrutura única e internacionalmente aceita para a classificação de amêndoas de cacau. Na prática, alguns critérios padronizados são seguidos, os quais são estabelecidos pela *Federation of Cocoa Commerce Ltd* (FCC) e pela *Cocoa Merchants Association of America, Inc.* (CMAA) (LIMA et al., 2011).

Quanto às regras aplicadas ao comércio, atualmente, a FCC considera como um lote bem fermentado (“well fermented”) aquele que contenha não mais que 5% de amêndoas ardósias e 5% de amêndoas defeituosas (que apresentem mofo interno ou estejam danificadas por insetos) e um lote adequadamente fermentado (“fair fermented”) aquele que contenha não mais que 10% de amêndoas ardósias e 10% de amêndoas defeituosas, sendo estes valores obtidos por contagem durante a prova de corte. Adicionalmente, um documento denominado “FCC Quality Rules”, estabelece procedimentos para a avaliação da qualidade em relação à presença de materiais estranhos, defeitos, *off-flavours*, umidade, entre outros. De forma geral, os critérios de aceitação não são fixados, cabendo aos compradores e vendedores estabelecerem em contrato os valores aceitáveis e recomendados, bem como as penalidades decorrentes do não cumprimento das especificações (FCC, 2012).

Em relação à legislação brasileira, na Instrução Normativa nº 38/2008/MAPA são fixados os valores percentuais de defeitos a serem considerados para a finalidade de tipificação de lotes de amêndoas de cacau (Tabela 1), principalmente no caso de importações de amêndoas de outros países para o Brasil. Por apresentar uma definição mais objetiva dos critérios de classificação, esta foi a referência adotada para a discussão dos resultados obtidos (Tabela 2).

Tabela 1. Tolerância de defeitos para amêndoas de cacau, expressa em porcentagem e respectiva classificação do produto.

Classificação	Defeitos					
	Mofadas	Fumaça	Danificadas por insetos	Ardósia	Germinadas	Achatadas
Tipo 1	0 a 4,0%	0 a 1,0%	0 a 4,0%	0 a 5,0%	0 a 5,0%	0 a 5,0%
Tipo 2	4,0% a 6,0%	1,0% a 4,0%	4,0% a 6,0%	5,0% a 10,0%	5,0% a 6,0%	5,0% a 6,0%
Tipo 3	6,0% a 12,0%	4,0% a 6,0%	6,0% a 8,0%	10,0% a 15,0%	6,0% a 7,0%	6,0% a 7,0%
Fora de Tipo	12,0% a 25,0%	> 6,0%	> 8,0%	>15,0%	> 7,0%	>7,0%

Fonte: BRASIL (2008).

Tabela 2. Valores médios percentuais de defeitos observados nas amostras de amêndoas de cacau avaliadas e classificação de acordo com o tipo.

Atributo/Origem	Bahia	Pará	Rondônia	Costa do Marfim
Defeitos (%) [*]	12 (5) ^b	13 (5) ^b	12 (2) ^b	19 (2) ^a
Tipo 1 ^{**}	30 (100%)	26 (90%)	7 (100%)	10 (91%)
Tipo 2 ^{**}	0	2 (7%)	0	1 (9%)
Tipo 3 ^{**}	0	0	0	0
Fora de tipo ^{**}	0	1 (3%)	0	0

Médias com letras em comum, em uma mesma linha, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

^{*} A porcentagem de defeitos representa a somatória de amêndoas achatadas, duplas, germinadas, ardósias, quebradas, com mofo interno e com infestação por insetos. Os valores entre parênteses correspondem à estimativa do desvio padrão.

^{**} Número de amostras enquadradas no determinado tipo (porcentagem em relação ao total de amostras analisadas para cada origem).

A maior parte das amostras foi enquadrada no Tipo 1, sendo que apenas três amostras provenientes do Pará e uma amostra da Costa do Marfim foram classificadas como Tipo 2 ou fora de tipo por apresentarem amêndoas danificadas por insetos acima dos limites preconizados (Tabela 2). Quanto ao total de defeitos (somatória de amêndoas achatadas, duplas, germinadas, ardósias, quebradas, com mofo interno e com infestação por insetos, expressa em porcentagem), as amostras provenientes da Costa do Marfim apresentaram, na média, valor significativamente maior que as demais origens, principalmente devido à presença de amêndoas achatadas e quebradas. Tanto as ocorrências de infestação por insetos quanto amêndoas quebradas estão relacionadas às condições de transporte, manuseio e armazenamento, sendo que os casos observados foram pontuais e com baixa incidência. No caso da infestação, outro fator que pode ter influência é a presença de amêndoas de cacau germinadas, o que não foi o caso em nenhum dos lotes avaliados.

Além da contagem de defeitos, outras análises físicas são importantes para caracterizar um lote de amêndoas de cacau. Na Tabela 3, são apresentados os resultados de massa individual e número de amêndoas em 100 g de amostra. Apesar de não haver valores estabelecidos para a classificação de amêndoas de acordo com a coloração e grau de compartimentação, esses parâmetros foram avaliados e expressos como valores médios. Esses dados são importantes indicativos da qualidade da fermentação das sementes durante o pré-processamento nas fazendas. Como exemplo, amêndoas marrons e bem compartimentadas indicam que a fermentação foi bem conduzida, enquanto o excesso de amêndoas violáceas ou ardósias sugere tempo insuficiente de fermentação ou falta de homogeneidade no lote.

Tabela 3. Caracterização física de amêndoas fermentadas e secas provenientes de diferentes estados brasileiros e da Costa do Marfim.

Atributo/Origem	Bahia	Pará	Rondônia	Costa do Marfim
	Média (sd) Mín-Máx.	Média (sd) Mín-Máx.	Média (sd) Mín-Máx.	Média (sd) Mín-Máx.
Massa individual (g)	1,1 (0,1) ^a 0,7-1,3	1,1 (0,1) ^a 0,9-1,2	1,0 (0,1) ^a 0,9-1,1	1,01 (0,04) ^a 0,96-1,08
Nº de amêndoas/ 100g	96 (11) ^a 80-136	96 (10) ^a 82-114	97 (8) ^a 88-112	99 (4) ^a 92-104
Coloração (%) *				
Marrom	8 (12) ^a 0-41	12 (16) ^a 0-48	12 (8) ^a 2-22	7 (6) ^a 0-16
Marrom-violáceo	27 (10) ^c 8-49	35 (13) ^{bc} 13-70	41 (14) ^{ab} 31-72	50 (11) ^a 29-66
Branco-violácea	1 (1) ^a 0-6	2 (2) ^a 0-8	2 (1) ^a 0-4	2 (2) ^a 0-4
Violácea	60 (18) ^a 7-89	49 (23) ^{ab} 0-87	43 (16) ^{ab} 15-66	41 (16) ^b 25-68
Branca	4 (3) ^a 0-12	2 (1) ^{bc} 0-5	3 (2) ^{ab} 1-5	0,6 (0,8) ^c 0,0-2,9
Compartimentação (%) *				
Boa	35 (9) ^a 23-55	37 (8) ^a 23-60	39 (11) ^a 27-56	32 (7) ^a 22-42
Parcial	38 (4) ^b 30-48	39 (7) ^b 26-51	37 (7) ^{ab} 27-46	45 (6) ^a 34-57
Ruim ou sem	27 (10) ^a 10-41	24 (8) ^a 8-41	24 (6) ^a 15-31	23 (3) ^a 18-28

Médias com letras em comum, em uma mesma linha, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

sd: estimativa do desvio padrão

* Valores normalizados em relação ao número de amêndoas sem defeitos.

Em relação à massa individual, o peso mínimo de uma amêndoa deve ser de 1,0 g (CUBERO et al., 1993), portanto, considerando-se os valores médios calculados, as amostras analisadas atendem esta especificação e não houve diferença significativa entre as diferentes origens. Porém, é importante notar que este requisito não é atendido por todas as amostras, uma vez que os valores mínimos medidos são inferiores a 1,0 g e, portanto, o valor médio calculado para cada origem inclui amostras compostas por amêndoas de massa inferior à especificada.

A avaliação do número de amêndoas em 100 g (“bean count”) é uma medida indireta do tamanho da amêndoa de cacau. De acordo com a FCC, para a safra principal, é recomendável que este valor seja igual ou menor que 100 amêndoas em 100 g de amostra (FCC, 2012). Neste caso, os valores médios calculados para as amostras atendem a esta especificação e não houve diferença significativa entre as origens. É importante citar que este é um parâmetro relevante na avaliação do lote comercial, sendo que valores entre 101 e 120 amêndoas por 100 g ocasionam a redução do preço pago ao produtor, enquanto valores acima de 120 amêndoas por 100 g requerem uma substituição do lote ou penalidade maior na remuneração.

Quanto à coloração, não houve diferença significativa entre as amostras em relação ao número de amêndoas marrons. As amostras da Bahia apresentaram uma proporção de amêndoas violáceas significativamente maior que as amostras da Costa do Marfim, sendo que este resultado não foi corroborado pelos resultados de compartimentação, para os quais não foi observada diferença significativa entre as amostras quanto à porcentagem de amêndoas bem ou mal compartimentadas. Uma hipótese é que durante o tempo de armazenamento e transporte das amêndoas da Costa do Marfim tenham ocorrido alterações químicas que resultaram em mudança da coloração, como por exemplo, reações de degradação dos compostos fenólicos.

Além disso, de acordo com Lima et al. (2011), a coloração marrom não está sempre relacionada a amêndoas bem fermentadas, mas também pode estar associada a outras reações químicas, inclusive reações de putrefação. Por outro lado, deve-se ressaltar que a totalidade de amêndoas com coloração marrom e intensa compartimentação em um lote é um indicativo de sobrefermentação, que ocasiona a perda de qualidade sensorial devido à

perda de compostos precursores e formação de compostos químicos indesejáveis (EFRAIM, 2009).

Adicionalmente, a coloração está relacionada a outros parâmetros como, por exemplo, a variedade genética e o teor de compostos fenólicos das amêndoas de cacau. A colheita de frutos imaturos também pode influenciar negativamente a coloração, independentemente de as etapas de fermentação e secagem terem sido bem conduzidas.

Os resultados mostrados na Tabela 3 ressaltam a dificuldade da aplicação dos critérios de coloração e grau de compartimentação para a classificação das amêndoas de cacau. Por tratar da avaliação de alíquotas de 300 unidades por inspeção visual a olho nu, este teste exige alto nível de treinamento e prática do analista para que se obtenha precisão e uniformidade de resultados. As elevadas porcentagens de amêndoas em situações intermediárias (cor marrom-violáceo e compartimentação parcial) dificultam a concordância entre os resultados obtidos por diferentes analistas, tornando praticamente inviável o estabelecimento de critérios objetivos de aceitação.

Muito provavelmente, a observação mais importante a ser feita sobre os resultados da Tabela 3, é a ampla variabilidade intragrupo dos valores obtidos, o que diminui a relevância do valor médio dos parâmetros como indicativo da qualidade da fermentação das amêndoas de cacau provenientes de uma determinada origem. Este é mais um fator que praticamente impossibilita o estabelecimento de critérios de aceitação objetivos para a prova de corte. Cabe ressaltar que, muitas vezes, o menor tempo de fermentação - e consequentemente a maior ocorrência de amêndoas violáceas e ardósias - decorre justamente do aumento da demanda, o que dificulta a rejeição de lotes com base neste critério.

Neste contexto, a combinação da prova de corte com outros métodos analíticos permite uma melhor caracterização dos lotes comerciais de cacau e é indicada para que se alcance um sistema de remuneração mais justo aos produtores.

Vários outros parâmetros já foram sugeridos como índices de fermentação, incluindo a quantificação de alguns compostos voláteis específicos, a razão entre açúcares redutores e açúcares totais, a razão entre algumas frações de polifenóis, assim como a razão entre nitrogênio solúvel e nitrogênio total (LIMA et al., 2011). Porém, apesar de estes

parâmetros terem sido propostos em trabalhos publicados, em sua maioria, nas décadas de 1970 e 1980, ainda não foram estabelecidos métodos ou especificações para que fossem utilizados na classificação de lotes comerciais de amêndoas de cacau.

Recentemente, Hue et al. (2014) mostraram que há uma correlação positiva entre o teor de nitrogênio amoniacal (NH_3) e o grau de fermentação de amêndoas de cacau e propuseram um método rápido para a determinação de NH_3 por espectroscopia no infravermelho próximo. Porém, assim como para os parâmetros anteriormente citados, existe uma dificuldade para estabelecer faixas de especificação, visto que o teor de NH_3 varia de acordo com a origem geográfica e com o genótipo. Assim, o uso desses parâmetros ainda fica restrito ao conhecimento e experiência dos compradores, os quais utilizam seus próprios critérios de aceitação de acordo com a origem do lote.

2.3.2 Parâmetros de qualidade e de composição química

2.3.2.1 Comparação entre as amostras provenientes de diferentes estados brasileiros e da Costa do Marfim

As médias dos atributos analisados foram calculadas para cada origem e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados (Tabela 4) mostraram diferenças significativas entre as amostras em relação a umidade, pH, acidez, compostos fenólicos totais, cafeína, teobromina e sacarose. Já os valores médios de teor de casca, lipídios e proteína apresentaram pouca variação, não sendo observadas diferenças significativas entre as médias das amostras.

O teor de casca médio das amostras de diferentes origens variou de 13 a 14%, sendo a faixa típica de 10 a 16% de acordo com Beckett (2009). Neste trabalho, as cascas das amêndoas de cacau foram removidas utilizando-se equipamentos em escala piloto. Nas condições aplicadas, pode-se dizer que as amêndoas de diferentes origens apresentaram a mesma dificuldade para a remoção da casca, o que é muito relevante para a indústria, uma vez que a perda de pequenas partículas de *nib* junto à casca constitui perda de rendimento de processo.

Tabela 4. Parâmetros de qualidade de amêndoas de cacau de diferentes origens.

Atributo/Origem	Bahia	Pará	Rondônia	Costa do Marfim
	Média (sd) Mín-Máx.	Média (sd) Mín-Máx.	Média (sd) Mín-Máx.	Média (sd) Mín-Máx.
Casca (%)	14 (1) ^a 11-17	13 (2) ^a 10-17	13,8 (0,5) ^a 12,9-14,4	14 (1) ^a 12-16
Umidade (%)	8 (1) ^a 6-10	7,9 (0,6) ^{ab} 7,0-9,9	7,1 (0,6) ^{bc} 6,0-7,7	7,0 (0,3) ^c 6,5-7,5
pH	5,1 (0,3) ^b 4,4-5,7	5,4 (0,2) ^a 5,0-5,9	5,2 (0,2) ^{ab} 4,9-5,5	5,5 (0,2) ^a 5,2-5,8
Acidez, expressa em ácido acético (%)	1,4 (0,3) ^a 0,7-2,2	1,1 (0,2) ^b 0,7-1,4	1,3 (0,2) ^{ab} 1,1-1,6	1,0 (0,2) ^b 0,8-1,3
Lipídios* (%)	56 (1) ^a 54-59	55 (2) ^a 50-59	55,0 (0,8) ^a 53,5-56,3	56 (1) ^a 54-58
Proteína (%)	14,8 (0,5) ^a 13,8-15,8	15,1 (0,5) ^a 14,5-16,0	14,8 (0,3) ^a 14,4-15,3	15,0 (0,3) ^a 14,6-15,6
Fenólicos totais, expresso em ácido tânico (%)	7 (1) ^a 4-8	5,3 (0,9) ^b 3,8-6,9	6,1 (0,6) ^{ab} 5,3-7,0	3,8 (0,4) ^c 3,2-4,5
Teobromina (%)	1,2 (0,1) ^a 0,9-1,6	1,1 (0,1) ^{ab} 0,9-1,3	1,2 (0,1) ^{ab} 1,0-1,3	1,06 (0,06) ^b 0,95-1,16
Cafeína (%)	0,18 (0,03) ^a 0,09-0,28	0,13 (0,02) ^b 0,10-0,16	0,13 (0,01) ^{bc} 0,12-0,15	0,10 (0,01) ^c 0,08-0,13
Teobromina/cafeína	7 (1) ^c 5-11	9 (1) ^b 7-12	9,0 (0,9) ^{ab} 7,9-10,1	10 (1) ^a 9-13
Frutose (%)	0,5 (0,1) ^a 0,3-0,8	0,5 (0,1) ^a 0,2-0,7	0,49 (0,05) ^a 0,43-0,55	0,6 (0,1) ^a 0,4-0,9
Glicose (%)	0,3 (0,1) ^a 0,2-0,9	0,3 (0,1) ^a 0,1-0,6	0,41 (0,03) ^a 0,37-0,45	0,4 (0,1) ^a 0,2-0,7
Açúcares redutores (frutose + glicose) (%)	0,8 (0,2) ^a 0,5-1,7	0,8 (0,2) ^a 0,4-1,3	0,90 (0,05) ^a 0,85-0,98	1,0 (0,3) ^a 0,6-1,5
Sacarose (%)	0,3 (0,2) ^{ab} nd-0,8	0,4 (0,2) ^{ab} nd-0,8	0,5 (0,1) ^a 0,3-0,6	0,2 (0,1) ^b nd-0,5

Médias com letras em comum, em uma mesma linha, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

sd: estimativa do desvio padrão calculada para o grupo de amostras (expressa a variabilidade intragrupo).

Valores expressos em base seca (exceto para umidade, pH e teor de casca).

*Teor de lipídios expresso em base seca e calculado sobre a massa de *nib*, isto é, descontando-se a massa correspondente à umidade e à porcentagem de casca.

nd: abaixo do limite de detecção do método.

Os valores médios para o teor de lipídios (expressos em base seca e calculados sobre a massa de *nib*) apresentaram pequena variação (55% a 56%), estando dentro da faixa reportada por Beckett (2009), que menciona o teor médio de lipídios no *nib* igual a 53,5% e faixa de 48% a 57%. O teor de lipídios no *nib* é determinante para o rendimento do processo de obtenção de manteiga de cacau, uma das principais matérias-primas para a indústria de chocolates.

O teor médio de proteína das amostras analisadas variou de 14,8% a 15,1% em base seca, o que está compreendido na faixa de valores esperada, de 11% a 16% (BECKETT, 2009). Porém, isso não significa necessariamente que não existam diferenças nos teores de proteínas entre as amostras, visto que o método microKjeldahl utilizado quantifica indiretamente o teor de proteína pela determinação do teor de nitrogênio total. A análise do perfil de proteínas e aminoácidos, bem como a sua quantificação, poderia indicar importantes diferenças em relação a esses componentes, os quais estão envolvidos nas reações de formação dos precursores de sabor durante o processamento de cacau e chocolate. De toda forma, o teor de nitrogênio total - frequentemente expresso como proteína após a aplicação do fator de conversão de 6,25 - é um importante parâmetro de composição centesimal das amêndoas de cacau.

As amostras da Bahia apresentaram o maior valor médio de umidade (8%), que diferiu significativamente das médias obtidas para as amostras provenientes de Rondônia e da Costa do Marfim, iguais a 7,1% e 7,0% respectivamente. As amostras provenientes do Pará apresentaram umidade média de 7,9% e não apresentaram diferença significativa em relação às amostras da Bahia e de Rondônia. Após a secagem, é recomendável que as amêndoas de cacau atinjam umidade inferior a 8,0% e atividade de água inferior a 0,7, o que assegura estabilidade físico-química e microbiológica durante o armazenamento, inibindo inclusive o desenvolvimento de fungos produtores de toxinas (EFRAIM, 2009). De acordo com a Instrução Normativa nº 38/2008 do Ministério da Agricultura, a umidade deve ser obrigatoriamente determinada, mas não é considerada para efeito de enquadramento do produto em tipo. Para fins de comercialização, estabelece-se o percentual máximo de 8,0% para os Tipos 1 e 2 e 9,0% para o Tipo 3 e Fora de Tipo (BRASIL, 2008). Portanto, tratando-se de umidade, as amostras analisadas atendem às recomendações para os Tipos 1 e 2.

Em relação aos parâmetros acidez e pH, as amostras da Bahia se diferenciaram daquelas provenientes do Pará e da Costa do Marfim, apresentando menores valores de pH e maior acidez. As amostras de Rondônia não apresentaram diferença significativa em relação às demais amostras. Diversos fatores provocam variações na acidez de amêndoas de cacau, tais como variedade, maturação do fruto, época de colheita, região de plantio e, principalmente, a condução do processo fermentativo (COHEN & JACKIX, 2005). A maior acidez também pode estar relacionada ao processo de secagem, sendo que quanto mais rápida a secagem – como geralmente ocorre em secadores nos quais as temperaturas alcançadas são superiores a 40°C – maior é a acidez final das amêndoas de cacau devido à dificuldade de eliminação do ácido acético.

O cacau brasileiro (principalmente representado pela Bahia) apresenta maior acidez que o cacau proveniente do oeste da África devido aos métodos de fermentação e secagem utilizados (BECKETT, 2009). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com esta informação, visto que as amostras provenientes da Bahia apresentaram o menor valor de pH (média de 5,1) e maior acidez (1,4%), ao passo que as amostras da Costa do Marfim apresentaram maior valor de pH (média de 5,5) e menor acidez (1,0%).

De acordo com Cohen & Jackix (2005), para amêndoas de cacau fermentadas e secas, a faixa de acidez desejada pelas indústrias situa-se entre 12 e 15 meq NaOH/100 g (equivalente a 0,8 a 1,0 % de ácido acético). As amostras da Costa do Marfim, Pará e Rondônia apresentaram acidez de 1,0%, 1,1% e 1,3%, respectivamente e não diferiram significativamente entre si. Portanto, pode-se afirmar que apenas as amostras provenientes da Bahia apresentaram acidez média acima do valor recomendado. Em relação à produção de derivados, de acordo com Efraim (2009), amêndoas de cacau que adquirem acidez elevada durante a fermentação levam a produtos sem o aroma característico de chocolate. Isso ocorre porque a temperatura e a acidez são os fatores que determinam a velocidade das reações químicas de formação dos compostos precursores de sabor e aroma que ocorrem durante a fermentação (BECKETT, 2009).

Na Tabela 4, verifica-se que as amostras da Costa do Marfim apresentaram o menor teor de compostos fenólicos totais (média de 3,9%), enquanto as amostras da Bahia e de

Rondônia apresentaram as maiores médias para este parâmetro (7,0% e 6,2%, respectivamente).

As sementes de cacau não fermentadas possuem de 6% a 8 % de seu peso seco em compostos fenólicos, sendo que ocorre uma redução aproximada de 70% durante a etapa de fermentação e que continua durante a secagem, principalmente devido ao escurecimento enzimático causado pela enzima polifenoloxidase (EFRAIM, 2009). Diferenças nas etapas de fermentação e secagem podem afetar o teor de compostos fenólicos das amêndoas de cacau, principalmente relacionadas à temperatura e umidade (KYI et al., 2005) e ao tempo de fermentação (EFRAIM et al., 2010).

A maior concentração de compostos fenólicos totais nas amostras da Bahia, associada à maior porcentagem de amêndoas violáceas observada na prova de corte, sugere que essas amostras foram fermentadas por um tempo mais curto que as demais. Uma possível explicação é que, atualmente no Brasil, a baixa produtividade da maior região agrícola cacauera (região sul da Bahia) e a elevada demanda por amêndoas fermentadas e secas pelas indústrias processadoras vem provocando a redução do tempo de fermentação de 6 a 7 dias para 2 a 3 dias. Esta prática ocasiona não apenas a queda na qualidade dos produtos de cacau, como também problemas tecnológicos para o seu processamento pelas indústrias.

Os polifenóis exercem influência negativa no sabor de derivados de cacau, conferindo amargor e adstringência em produtos com elevados teores desses compostos. Assim, a diminuição do teor de compostos fenólicos totais durante as etapas de fermentação e secagem está relacionada à formação do sabor desejável do chocolate. Por outro lado, descobertas mais recentes sobre os efeitos benéficos desses compostos à saúde humana têm provocado interesse em mantê-los durante o processamento dos produtos obtidos do cacau, sem prejuízo do sabor (EFRAIM, 2009; EFRAIM et al., 2010).

Cafeína e teobromina são os principais compostos do grupo das metilxantinas encontrados em cacau e chocolate, os quais contêm relativamente baixa concentração de cafeína, mas uma concentração aproximadamente dez vezes maior de teobromina (BECKETT, 2009). Há grande interesse na quantificação dessas metilxantinas devido à

relação existente entre a razão das concentrações de teobromina e cafeína e a qualidade de amêndoas de cacau (AMORES et al., 2007).

As concentrações de teobromina variaram pouco entre as amostras de diferentes origens, na faixa de 1,06% a 1,20%. Ainda assim, observa-se que as amostras da Bahia apresentaram a concentração média de teobromina significativamente maior que as amostras da Costa do Marfim. Quanto à concentração de cafeína, as médias variaram de 0,10% a 0,18%, sendo que as amostras provenientes da Bahia apresentaram média significativamente maior que as médias das demais origens. De acordo com Beckett (2009) a composição média do *nib* de cacau inclui 1,30% de teobromina (faixa de 0,8% a 1,4%) e 0,22% de cafeína (faixa de 0,1% a 0,7%), portanto os resultados medidos são próximos aos valores médios comumente encontrados para amêndoas de cacau.

Amores et al. (2007) demonstraram que a razão teobromina/cafeína permite diferenciar amostras de cacau fino e cacau comum, tanto para as amêndoas quanto para os *liquors*, sendo que este valor permanece constante para o mesmo genótipo ou origem, ainda que aplicados diferentes tempos de fermentação. Para todas as amostras de cacaos finos provenientes de quatro países (Equador, Trindade e Tobago, Papua Nova Guiné e Venezuela) foram medidos valores de teobromina/cafeína na faixa de 2-6, enquanto amostras de Gana e da Costa do Marfim situaram-se fora desta faixa. Porém, a razão teobromina/cafeína não foi capaz de diferenciar amêndoas de boa e má qualidade, uma vez que este parâmetro precisaria ser associado à análise sensorial para possibilitar uma avaliação abrangente sobre a origem e a qualidade das amostras.

As médias para a razão entre a concentração de teobromina e cafeína variaram de 7 (Bahia) a 10 (Costa do Marfim) e mostraram diferenças significativas entre as amostras da Bahia, Pará e Costa do Marfim. Conforme esperado, os valores médios determinados neste trabalho situaram-se fora do intervalo de 2-6 comumente obtidos para amostras de cacaos finos. Porém, para dez amostras provenientes da Bahia estes valores situaram-se entre 5 e 6, o que pode estar relacionado à implementação, nas décadas de 1970 e 1980, de híbridos e clones com características fenotípicas de Trinitários na região sul da Bahia, como parte de programas de renovação de cacauzeiros decadentes (SANTOS, 2010). De certa forma, este

resultado reflete o fato de que a plantação brasileira não pode mais ser caracterizada como formada exclusivamente de cacau do tipo *Forastero*.

Quanto aos açúcares, não houve diferença significativa em relação à concentração de frutose e glicose, mesmo quando esses valores foram somados e chamados então de “açúcares redutores”. Quanto à concentração de sacarose, as amostras de Rondônia apresentaram um valor médio significativamente maior (0,5%) que as amostras da Costa do Marfim, as quais apresentaram o menor valor médio (0,2%). A importância da avaliação da concentração de açúcares redutores em amêndoas de cacau se deve ao fato deste parâmetro estar relacionado com o grau de fermentação e com a formação de precursores de sabor. Sementes de cacau possuem 5-9% (base seca) de amido e 2-4% (base seca) de açúcares simples. No início da fermentação, o açúcar com maior concentração é a sacarose, a qual é hidrolisada pela invertase com a liberação de glicose e frutose, que vão sendo consumidas durante a fermentação. Assim, o teor de sacarose em amêndoas de cacau bem fermentadas é próximo de zero, enquanto as concentrações de frutose e glicose remanescentes são de até 0,6%. Os açúcares redutores participam da reação de Maillard durante a torração e, portanto, são considerados precursores de sabor (BECKETT, 2009).

Um ponto interessante a ser observado são as diferenças existentes entre as amêndoas de cacau produzidas na Bahia e na Costa do Marfim, sendo que as amostras da Bahia apresentaram maiores médias de umidade, acidez, teores de compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína. Essas diferenças de composição química podem estar relacionadas aos processos de fermentação utilizados nessas duas regiões produtoras.

No Brasil, predominantemente, é utilizada a fermentação em caixas, além do fato de a secagem artificial ser uma prática comum. Neste tipo de fermentação, uma a duas toneladas de sementes de cacau são colocadas em grandes caixas de madeira, projetadas para permitir o escoamento da polpa liquefeita e também a entrada de ar. O período de fermentação pode variar de 5 a 7 dias. Neste caso, as amêndoas de cacau são revolvidas ou transferidas de caixas todos os dias, o que promove a aeração e o desenvolvimento de bactérias que necessitam de oxigênio – *Acetobacter*, por exemplo – propiciando maior produção de ácido acético. Isto significa que as amêndoas fermentadas em caixas, comumente, apresentam gosto ácido mais intenso do que as mesmas amêndoas fermentadas

em montes. A secagem artificial também contribui para o aumento da acidez, visto que, se o processo é feito mais rapidamente ou sob temperatura acima da recomendada, as cascas tornam-se duras e resistentes à eliminação de ácidos orgânicos voláteis (BECKETT, 2009).

Em países do oeste africano como a Costa do Marfim, onde a produção é feita em maior parte por pequenos produtores, a prática mais comum é a fermentação em montes e a secagem natural. Neste caso, 25-2500 kg de amêndoas de cacau são colocadas em montes cobertos por folhas de bananeira, sendo que quantidades intermediárias são preferíveis. Após 2 a 3 dias, as amêndoas são misturadas e o processo é finalizado geralmente após 5 dias, sendo que o ponto final é determinado pela experiência do agricultor. Este sistema tradicional e de baixa tecnologia é conhecido por promover a melhor fermentação das sementes de cacau (BECKETT, 2009). Provavelmente, esta fermentação em pequenos lotes ocorre de forma mais completa, levando à maior redução no teor de compostos fenólicos, metilxantinas e sacarose.

As diferenças observadas, principalmente em relação à acidez, teores de compostos fenólicos, teobromina e cafeína, podem ter forte impacto no processo de formação de sabor, afetando diretamente a qualidade sensorial de produtos derivados.

2.3.3 Análise exploratória dos dados

A Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*) é uma ferramenta quimiométrica que permite efetuar uma simplificação, redução da dimensão original dos dados, modelamento, detecção de amostras anômalas (*outliers*), seleção de variáveis importantes em determinado sistema, classificação e previsão. Neste sentido, a PCA foi aplicada aos dados organizados em uma matriz **X** composta por 77 linhas (amostras) e 14 colunas (variáveis). Na PCA, a dimensão dos dados originais é diminuída para um menor conjunto de dimensões chamadas de Componentes Principais (PC). A partir das PC são gerados dois novos conjuntos de dados chamados de escores e pesos, que trazem informações sobre as amostras e as variáveis, respectivamente (MATOS et al., 2003).

A Figura 1(a) representa o gráfico de escores, ou seja, as amostras plotadas no plano das componentes principais (PCs). As diferentes origens (Bahia, Pará, Costa do Marfim e

Rondônia) são representadas por diferentes cores e cada ponto no gráfico representa uma amostra. A Figura 1(b) mostra o gráfico de pesos, isto é, a importância relativa de cada variável em cada PC. Três PC foram suficientes para explicar 57% da variância dos dados, sendo que a quarta PC não forneceu informação adicional para a interpretação dos resultados.

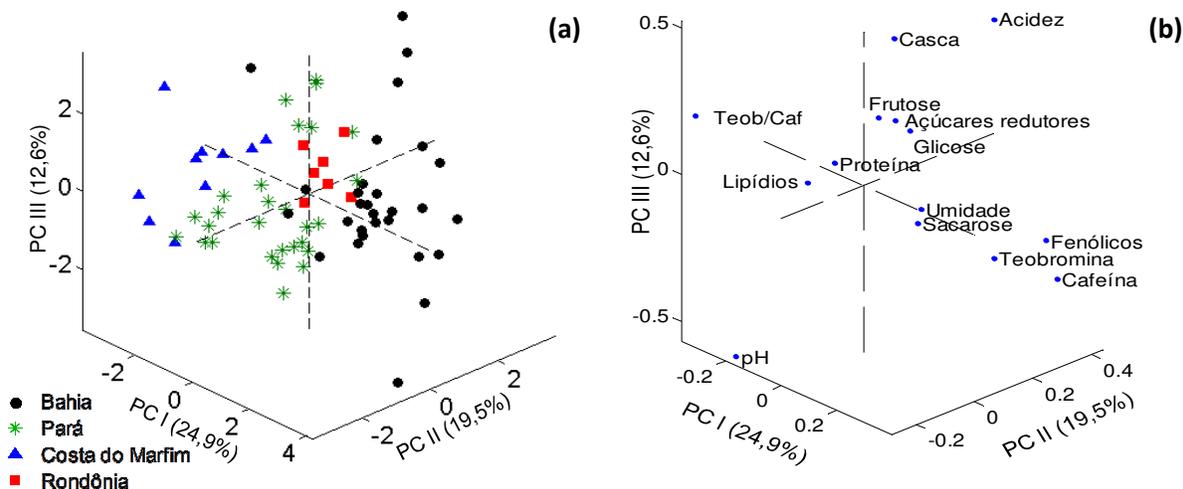


Figura 1. Análise de Componentes Principais dos parâmetros de qualidade de amêndoas de cacau de diferentes origens; (a) gráfico de escores (amostras) e (b) gráfico de pesos (variáveis).

No gráfico de escores é possível observar que as amostras da Bahia diferenciaram-se das amostras provenientes da Costa do Marfim, principalmente pelos maiores valores de acidez, umidade, compostos fenólicos, sacarose, teobromina e cafeína. As amostras da Costa do Marfim caracterizaram-se por valores mais altos de pH e razão de teobromina/cafeína. As amostras de Rondônia e do Pará apresentaram similaridades e características intermediárias em relação às amostras da Bahia e da Costa do Marfim. Conforme visto também pelo teste de Tukey, os parâmetros teor de casca, proteína, lipídios totais, glicose e açúcares redutores não contribuíram para a diferenciação entre as amostras, o que pode ser confirmado pela proximidade desses parâmetros ao valor zero de cada eixo.

2.4 Conclusões

A avaliação física das amêndoas de cacau pela prova de corte permitiu concluir que, independentemente da origem geográfica, as amostras apresentaram padrão comercial satisfatório. No entanto, evidenciou-se a falta de padronização na etapa de pré-processamento, demonstrada pela alta variabilidade intragrupo em relação à coloração e grau de compartimentação das amostras analisadas. Estes resultados decorrem parcialmente da existência de diferenças regionais na realização da fermentação e secagem das sementes de cacau. Porém, pode-se dizer que os resultados obtidos refletem principalmente a suscetibilidade da qualidade das amêndoas de cacau produzidas em relação às variações da demanda, uma vez que um aumento desta ocasiona redução dos tempos de fermentação e variações nos métodos de secagem das sementes.

A caracterização química das amêndoas de cacau permitiu estabelecer diferenças importantes em relação à umidade, acidez, compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína entre as amostras produzidas em diferentes estados brasileiros. As variações observadas podem afetar diretamente a qualidade dos produtos derivados e devem ser consideradas na formulação de *blends de liquor* de cacau, assim como de produtos com características especiais.

Considerando-se a comparação estabelecida entre as amêndoas de cacau produzidas no Brasil e na Costa do Marfim, foram observadas diferenças significativas para a maioria dos parâmetros analisados, sendo que apenas os teores de casca, lipídios, proteínas, glicose e açúcares redutores não diferiram entre as amostras. Isso demonstra que há poucas variações em relação a componentes majoritários, como o teor de casca, lipídios e proteínas, os quais estão associados ao rendimento de processo. Em contrapartida, as variações dos componentes minoritários foram significativas, estando diretamente relacionadas à qualidade sensorial dos chocolates produzidos a partir dessas amêndoas.

De forma geral, a avaliação de um grande número de amostras de amêndoas de cacau de diferentes estados brasileiros e da Costa do Marfim forneceu informações atualmente não disponíveis na literatura e que serão muito úteis para caracterizar e acompanhar as mudanças da cacauicultura brasileira, a qual está inserida em um contexto de expansão e aumento de participação no mercado mundial.

REFERÊNCIAS

AMORES, F. et al. **Project to determine the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine and bulk cocoa. Project Report** - August 2007. Disponível em: <http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/50-projects.html>. Acesso em: 22 nov. 2014.

BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. United Kingdom: Blackwell Publishing. 2009. 732 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 38, de 23 de junho de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacao. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

BURGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of mono - and disaccharides in foods by interlaboratory study: quantitation of bias components for liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 443-464, 1992.

COHEN, K.O.; JACKIX, M.N.H. Estudo do *liquor* de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

CUBERO, E.M. et al. Efecto del genótipo sobre el proceso de fermentacion de cacao. **Proceedings of 11th International Cocoa Research Conference**, Yamoussoukro, Côte D'Ivoire, p. 729-740, 1993.

EFRAIM, P. et al. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacau de diferentes genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n.4, p. 229-236, 2006.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 208 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

EFRAIM, P. et al. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.142-150, 2010.

EIGENVECTOR Research Inc. **PLS Toolbox 5.8**. Manson, EUA, 2010.

FCC. Federation of Cocoa Commerce Ltd. FCC Quality Rules (March 2012). 30 p. Disponível em: <<http://www.issamercocoabeans.com/wp-content/uploads/2014/02/FCC-Quality-Rules-March-2012.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2014.

HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18 ed. Maryland : AOAC, 2006.

HUE, C. et al. Near infrared spectroscopy as a new tool to determine cocoa fermentation levels through ammonia nitrogen quantification. **Food Chemistry**, v. 148, p. 240–245, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da lavoura permanente 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 10 out. 2014.

ICCO. International Cocoa Organization. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Cocoa year 2013/14, v. XL, n. 2, 2014. Disponível em: <http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html>. Acesso em: 10 out. 2014.

KYI, T. M. et al. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 40, n. 3, p. 323-331, 2005.

LIMA, L.J.R. et al. *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51:8, p. 731-761, 2011.

MATOS, G.D. et al. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, n. 6, p. 38-50, 2003.

RIBEIRO, A.P.B. et al. Physico-chemical properties of Brazilian cocoa butter and industrial blends. Part I - Chemical composition, solid fat content and consistency. **Grasas y aceites**, v. 63 (1), p. 79-88, 2012a.

RIBEIRO, A.P.B. et al. Physico-chemical properties of Brazilian cocoa butter and industrial blends. Part II - Microstructure, polymorphic behavior and crystallization characteristics. **Grasas y aceites**, v. 63 (1), p. 89-99, 2012b.

RISNER, C.H. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (-)-epicatechin in Standard Reference Material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans and Cocoa Butter”, **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 892-899, 2008.

SANTOS, A. M. Cacau fino: oportunidade para a cacauicultura brasileira. **Jornal do Cacau**, Informativo do MAPA/CEPLAC para as regiões produtoras de cacau da Bahia. Bahia, n. 2, p. 3, nov/dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/paginas/jornaldocacau/cartilhas/jornaldocacau02.pdf>>. Acesso em: 02 mai. 2014.

STATSOFT, Inc. **Statistica 7.0** (data analysis software system). Tulsa, EUA, 2004.

THE MATH WORKS INC. **Matlab 7.8**. Natick, EUA, 2009.

CAPÍTULO III

Perfil sensorial e aceitabilidade de chocolates elaborados com amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e na Costa do Marfim

Este manuscrito está em fase de preparação e será submetido ao periódico “Food Quality and Preference”.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o perfil sensorial e a aceitabilidade de chocolates elaborados com amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros (Bahia-BA, Pará-PA, Rondônia-RO e Espírito Santo-ES) e na Costa do Marfim (CM). Os chocolates foram elaborados em planta piloto a partir de amêndoas fermentadas e secas, as quais também foram caracterizadas quanto a parâmetros físico-químicos e composição das manteigas de cacau. A análise descritiva apontou diferenças ($p \leq 0,05$) entre os chocolates para nove dos treze atributos avaliados, sendo que as amostras BA e ES apresentaram perfis sensoriais similares e muito diferentes da amostra CM. Já as amostras PA e RO apresentaram similaridades e características intermediárias em relação às demais amostras. Por meio da avaliação sensorial com consumidores (teste de aceitabilidade), foi possível diferenciar os chocolates de acordo com a origem das amêndoas de cacau, com maior aceitabilidade para os chocolates PA e RO, caracterizados por menores intensidades de gostos ácido e amargo. As análises físico-químicas e a caracterização das manteigas de cacau corroboraram os resultados obtidos na avaliação sensorial, ressaltando a relação existente entre a composição química das amêndoas de cacau e as características sensoriais dos produtos derivados, principalmente em relação à intensidade de acidez, amargor, sensação adstringente e atributos de textura. De forma geral, os resultados mostram diferenças relevantes entre os chocolates em função da origem geográfica das amêndoas, as quais foram percebidas tanto pelo painel treinado quanto pelos consumidores. O conhecimento sobre essas diferenças sensoriais pode ser utilizado para a adaptação de processos tecnológicos com a finalidade de uniformizar os produtos ou até mesmo para a elaboração de chocolates com características diferenciadas que atendam ao nicho de mercado de chocolates de origem única.

3.1 Introdução

As características sensoriais representam um dos fatores mais importantes para direcionar a aceitação e a preferência do consumidor. Portanto, é muito relevante determinar os fatores que afetam os atributos sensoriais de um produto, especialmente quando se trata de alimentos e bebidas (MELO; BOLINI & EFRAIM, 2009).

Para o estudo do perfil sensorial de uma amostra pode ser utilizada a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ[®]), método por meio do qual é possível avaliar a presença e intensidade de todos os atributos sensoriais presentes no produto, incluindo aspectos relacionados à aparência, aroma, sabor e textura. Este método é realizado por um painel sensorial constituído por julgadores aprovados em um processo composto por diversas etapas de seleção e treinamento (STONE & SIDEL, 2004). Já no teste de aceitação do produto pelo consumidor, as amostras são avaliadas por no mínimo 50 consumidores, com o uso de uma escala hedônica, a qual pode conter cinco, sete ou nove pontos, variando gradativamente entre os termos “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”. Quanto à forma de apresentação da amostra, a avaliação sensorial de amêndoas de cacau pode ser feita diretamente no *nib* torrado e moído ou no *liquor* de cacau obtido a partir deste. Alternativamente, também podem ser utilizadas preparações à base de *liquor* de cacau, açúcar e/ou água, ou ainda, a forma mais palatável, chocolates amargos produzidos em pequena escala (BECKETT, 2009).

O perfil sensorial de chocolates depende em grande parte da composição química das amêndoas de cacau utilizadas como matéria prima, sendo que os compostos precursores e os responsáveis pelo aroma e sabor são formados desde o pré-processamento das sementes até o processamento do chocolate, principalmente nas etapas de fermentação, torração e conchagem (AFOAKWA et al., 2008).

Fatores relacionados aos diferentes cultivares de cacau, formas de cultivo e colheita, fermentação, secagem, safras e origens geográficas já tiveram a sua influência demonstrada sobre parâmetros de composição química de amêndoas de cacau. Especificamente sobre o efeito da origem geográfica, foram observadas variações importantes do teor de aminoácidos livres, açúcares, polifenóis e lipídios em amêndoas de cacau (SALTINI, AKKERMAN & FROSCH, 2013). O impacto dessas variações sobre as características sensoriais dos chocolates fica evidente quando se considera a importância dos aminoácidos

livres e açúcares como precursores de sabor e a contribuição dos polifenóis e lipídios para os atributos de sensação adstringente e de textura de chocolates, respectivamente.

Arlorio et al. (2008) encontraram diferenças significativas no teor de compostos fenólicos totais de amêndoas de cacau produzidas em Gana e na Costa do Marfim quando comparadas àquelas produzidas no Equador (Arriba). Counet et al. (2004) analisaram amostras de *liquor* de cacau de oito diferentes origens e variedades (Costa do Marfim e Gana – *Forastero*; Nova Guiné, Java, Venezuela e Madagascar – *Criollo*; Equador – nacional; e Trindade – Trinitário) quanto ao teor de procianidinas e potencial de aroma (medida como a soma das áreas dos picos cromatográficos dos compostos voláteis). As variedades de cacau consideradas diferenciadas (cacau fino do grupo *Criollo* ou Nacional do Equador), comumente submetidas a processos de fermentação mais curtos, apresentaram maior teor de procianidinas. Já as amostras do grupo *Criollo* produzidas em Nova Guiné e *Forastero* apresentaram maior potencial de aroma. Rohsius, Matissek & Lieberei (2006) avaliaram 108 amostras de lotes comerciais de amêndoas de cacau fermentadas e secas quanto ao teor de aminoácidos livres, e foi observada uma ampla variação (5–25 mg g⁻¹, base seca e desengordurada) para as amostras de 20 origens geográficas distintas.

Diante do exposto, verifica-se que a origem geográfica é um fator que influencia na composição química das amêndoas de cacau e, portanto, pode-se inferir que afeta também o perfil sensorial dos chocolates derivados. Neste sentido, Jinap et al. (1995) observaram diferenças significativas no perfil sensorial de chocolates elaborados a partir de amêndoas de cacau produzidas em oito países (Brasil, Indonésia, Gana, Nigéria, Camarões, Equador, República Dominicana e Malásia), os quais foram avaliados por uma equipe sensorial de assessores treinados.

A respeito das variações de características químicas e sensoriais de acordo com a origem geográfica, é importante destacar que estas ocorrem não apenas entre países, mas também entre regiões produtoras dentro de um mesmo país. Em grande parte, esta heterogeneidade decorre das diferentes práticas de cultivo e pré-processamento, as quais podem variar, inclusive, entre fazendas de uma mesma região (JINAP et al., 1995; SALTINI, AKKERMAN & FROSCHE, 2013). Outro fator que gera variação é a diversidade genética existente em alguns países como o Brasil, sendo que os diferentes genótipos de cacau podem levar à ampla variabilidade da composição química, por exemplo,

relacionadas às características da manteiga de cacau (LAMBERT et al., 1996 *apud* EFRAIM, 2009).

No Brasil, a produção de cacau concentra-se na Bahia (em média, 65% da produção nacional), mas outros estados como Pará, Rondônia e Espírito Santo têm aumentado a sua produção. De nosso conhecimento, não existem trabalhos publicados descrevendo possíveis diferenças sensoriais existentes entre chocolates formulados a partir de amêndoas de cacau produzidas nestes estados brasileiros.

O trabalho mais próximo desta proposta foi realizado por Jinap et al. (1995), no qual foram avaliadas amostras de chocolates produzidas com amêndoas de cacau provenientes da Bahia e do Pará. Como resultado, foram observadas diferenças sensoriais importantes, principalmente relacionadas aos descritores de gostos amargo e doce, sabor frutal e notas de queimado e defumado. Porém, deve-se ponderar que, nas últimas duas décadas, ocorreram mudanças importantes nas características dos cacauais brasileiros e nos métodos de produção, de forma que resultados como esses precisam ser atualizados e complementados.

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar chocolates do tipo amargo elaborados a partir de amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros (Bahia, Pará, Rondônia e Espírito Santo) e na Costa do Marfim por meio de Análise Descritiva Quantitativa e teste de aceitação. As amostras provenientes da Costa do Marfim foram avaliadas para fins comparativos, por se tratar do maior produtor mundial de amêndoas de cacau, as quais representam as características do cacau *bulk* comercializado atualmente no mercado mundial. Adicionalmente, foram analisados alguns parâmetros físico-químicos das amêndoas e a composição das manteigas de cacau, os quais têm relação com os atributos sensoriais.

3.2 Experimental

3.2.1 Amostras

Para o processamento dos chocolates, foram utilizadas cinco amostras de aproximadamente 3 kg de amêndoas fermentadas e secas provenientes da Bahia (BA), Pará (PA), Rondônia (RO), Espírito Santo (ES) e da Costa do Marfim (CM), obtidas por meio de

parceria estabelecida com uma agroindústria processadora de cacau. Estas cinco amostras de amêndoas de cacau foram processadas em planta piloto para a obtenção dos chocolates do tipo amargo (65% de cacau) que foram submetidos à análise sensorial. As amostras de chocolates foram identificadas de acordo com a origem geográfica das amêndoas de cacau, sendo então denominadas como BA, PA, RO, ES e CM.

3.2.2. Análises físico-químicas das amêndoas de cacau

Determinações de umidade, pH e acidez foram realizadas nas amêndoas de cacau moídas (cotilédones e casca). O teor de lipídios foi determinado nas amostras de *liquor* de cacau obtidas pelo processamento das amêndoas. Para a análise dos demais parâmetros de composição química foi utilizada apenas a parte interna das amêndoas de cacau (cotilédone). Assim, as amêndoas foram quebradas em moinho de facas tipo Rietz (ICMA, Campinas, Brasil) e os fragmentos foram separados de acordo com sua granulometria em peneira vibratória Granutest (Telastem, São Paulo, Brasil) com aberturas de 6,35; 4,76 e 2,38 mm. A separação da testa (casca que envolve as amêndoas) e dos *nibs* (pequenos fragmentos de cotilédones resultantes da quebra) foi realizada empregando-se um equipamento separador de casca específico para amêndoas de cacau Cocoa Winnower (Capco, Ipswich, Reino Unido).

Métodos de referência da *Association of Official Analytical Chemists* (HORWITZ, 2006) foram empregados para a determinação do teor de umidade, pH, acidez total e teor de lipídios. A umidade foi determinada por secagem em estufa com circulação de ar, modelo 520 (Fanem, Guarulhos, Brasil) a 100°C até peso constante (método 931.04). O pH e a acidez titulável foram medidos em suspensão aquosa da amostra (10 g de amostra em 90 mL de água), utilizando-se um medidor de pH digital modelo TEC-5 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) de acordo com os procedimentos para a determinação de pH (método 970.21) e titulação potenciométrica (método 942.15). O teor de lipídios totais no *liquor* de cacau foi determinado pela extração com éter de petróleo em extrator de lipídios Soxhlet, modelo TE-188 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) durante quatro horas após a hidrólise ácida da amostra (método 963.15). A determinação de proteína foi realizada pelo método microKjeldahl, o qual inclui as mesmas etapas e princípios do método Kjeldahl convencional descrito na

AOAC (método 970.22), porém emprega menores quantidades de amostra e reagentes. O teor de proteína foi calculado a partir da concentração de nitrogênio total aplicando-se o fator de conversão de 6,25 (HORWITZ, 2006). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com Efraim et al. (2006), empregando uma curva de ácido tânico. Teobromina e cafeína foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD) de acordo com o procedimento descrito por Risner et al. (2008) com pequenas modificações. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.2.3 Caracterização da manteiga de cacau

3.2.3.1 Extração

Para a obtenção das amostras de manteiga de cacau, realizou-se a extração a frio dos lipídios com éter de petróleo a partir dos cotilédones moídos das amêndoas de cacau, mantendo-se uma razão 5:1 entre solvente e amostra. Após as etapas de agitação e centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o solvente foi removido por destilação simples. Os lipídios extraídos foram mantidos em estufa a 60°C por 2 horas para a remoção do éter de petróleo residual. Todas as análises das manteigas de cacau foram feitas em duplicata.

3.2.3.2 Composição de ácidos graxos

A composição de ácidos graxos foi determinada em cromatógrafo a gás modelo 6850 com detector de ionização de chama (Agilent, Palo Alto, EUA) dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. A separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com o método AOCS Ce 1f-96 (AOCS, 2009), em coluna Agilent DB-23 (50% cianopropil-metilpolisiloxano) com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. A identificação dos compostos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos. A quantificação foi realizada pela conversão das porcentagens das áreas dos picos em porcentagem de massa.

3.2.3.3 Composição triacilglicerólica

A composição de triacilgliceróis foi determinada de acordo com o método AOCS Ce 5-86 (AOCS, 2009) usando um cromatógrafo a gás modelo 6850 (Agilent, Wilmington, EUA), com coluna capilar DB-17 HT (50% fenil-metilpolisiloxano), com 15 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme, nas condições operacionais descritas por Efraim et al. (2013).

3.2.3.4 Conteúdo de gordura sólida

As curvas de conteúdo de gordura sólida a diferentes temperaturas foram construídas empregando-se o método AOCS Cd 16b-93 (AOCS, 2009), utilizando-se um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Minispec pc120 (Burker Spectrospin, Alemanha). As gorduras foram previamente submetidas ao tratamento térmico em série: aquecimento por 15 minutos a 100°C; 5 minutos a 60°C; 90 minutos a 0°C; 40 horas a 26°C; e 90 minutos a 0°C. As leituras foram realizadas a 10, 20, 25, 30, 35 e 40°C.

3.2.4 *Processamento das amêndoas de cacau e dos chocolates amargos*

As amêndoas fermentadas e secas foram processadas em planta piloto para a obtenção dos *liquors* de cacau que foram utilizados na formulação de chocolates amargos de acordo com a Figura 1. A primeira etapa consistiu na torração das amêndoas a 120°C durante 70 minutos em torrador de tambor rotativo com capacidade para 5 kg (JAF Inox, Tambaú, Brasil), seguida pela quebra em fragmentos (*nibs*) em moinho de martelos e pela separação de casca e gérmen dos cotilédones por diferença de tamanho e densidade em um equipamento descascador (JAF Inox, Tambaú, Brasil). Os *nibs* obtidos foram triturados em liquidificador doméstico e a massa resultante foi refinada em moinho de três cilindros horizontais (Draiswerke GmbH, Mannheim, Alemanha), resfriados internamente com água fria, para a obtenção de *liquor* com granulometria inferior a 25 µm, controlada com micrômetro digital com escala de 0-25 mm (Mitutoyo, Suzano, Brasil). A formulação dos chocolates amargos foi composta por 65% de *liquor* de cacau, 35% de sacarose e 0,4% de lecitina de soja (calculada sobre a massa após o refino). Os *liquors* de cada amostra foram misturados ao açúcar em um misturador planetário marca Kitchen Aid, modelo K5SS, com

capacidade para 5 litros (Whirlpool, São Paulo, Brasil). A mistura foi novamente refinada e conchada a 60°C em misturador encamisado (Brabender Technologie, Duisburg, Alemanha) durante 12 horas. A temperagem foi realizada em temperadeira (American Chocolate Mould Co., Bohemia, EUA) utilizando-se o método de temperagem em três etapas de acordo com Efraim (2009). As amostras foram moldadas em formas de policarbonato e resfriadas em geladeira até que fosse observada a contração da barra de chocolate e desprendimento do molde. Após desmoldagem, os chocolates foram embalados individualmente em papel alumínio, acondicionados em embalagens metalizadas e armazenados em câmara a 20°C.

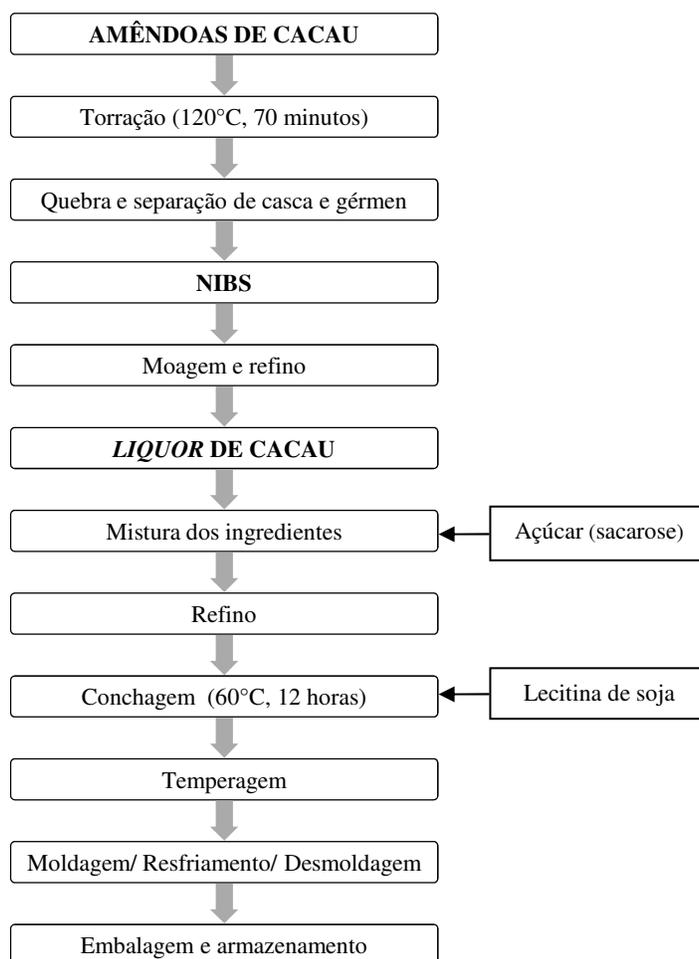


Figura 1. Fluxograma do processamento das amêndoas de cacau para a obtenção dos chocolates.

3.2.5 *Análise sensorial*

3.2.5.1 Perfil sensorial

As amostras foram avaliadas por uma equipe composta por nove julgadores, os quais foram selecionados e treinados como parte da pesquisa desenvolvida por Silva (2013) no Departamento de Tecnologia de Alimentos (FEA/UNICAMP). Como resultado desta etapa, foi selecionada uma equipe com boa capacidade de discriminação das amostras, reprodutibilidade adequada e resultados consensuais com os demais membros da equipe. Essa equipe selecionou os treze atributos para compor a ficha de avaliação sensorial das amostras, sendo: gostos ácido, amargo e doce; sabores de café, caramelo/mel, frutal, chocolate/cacau e floral; sensação adstringente; aromas de caramelo, chocolate/cacau; dureza e derretimento.

O levantamento do perfil sensorial das cinco amostras de chocolates do tipo amargo foi realizado utilizando-se delineamento de blocos completos balanceados conforme sugerido por Macfie et al. (1989). Nove assessores treinados avaliaram as amostras em três repetições em relação aos treze atributos usando uma escala de 9 cm não estruturada, ancorada nos extremos com termos referentes à intensidade (“pouco/nenhum” a “muito”). As amostras foram apresentadas de forma monádica em copos descartáveis de 50 mL codificados aleatoriamente com três dígitos. As análises foram conduzidas em cabines com temperatura controlada (aproximadamente 23°C), iluminadas com luz branca. Os provadores receberam a lista de definição dos termos descritivos e dos materiais de referência das intensidades mínima e máxima dos atributos avaliados para auxiliar no momento da análise. Foram oferecidos água e biscoito tipo água e sal para a limpeza dos receptores gustativos entre uma amostra e outra.

3.2.5.2 Teste de aceitação

O teste de aceitação foi realizado com 120 consumidores de chocolate, por meio de delineamento de blocos completos balanceados, empregando-se ficha com escala hedônica estruturada de nove pontos. Os atributos aroma e sabor, derretimento do chocolate na boca,

amargor, acidez, dureza ou força necessária para a quebra do chocolate e impressão global foram avaliados por meio de uma escala de 9 pontos ancorados pelos termos: 9 “gostei muitíssimo”, 8 “gostei muito”, 7 “gostei moderadamente”, 6 “gostei ligeiramente”, 5 “nem gostei, nem desgostei”, 4 “desgostei ligeiramente”, 3 “desgostei moderadamente”, 2 “desgostei muito” e 1 “desgostei muitíssimo”. A intenção de compra também foi avaliada, utilizando uma escala de 5 pontos: 1 “certamente compraria”, 2 “provavelmente compraria”, 3 “tenho dúvidas se compraria”, 4 “provavelmente não compraria” e 5 “certamente não compraria”. Na ficha de avaliação, incluiu-se também um questionário para a caracterização do grupo de consumidores quanto à faixa etária e frequência de consumo de chocolate.

3.2.5.3 Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados da ADQ[®] e do teste de aceitação foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação de médias utilizando-se o pacote *Statistical Analysis System* – SAS versão 9.2 (SAS[®] Institute, Cary, EUA, 2009). Para a Análise de Componentes Principais (PCA), os dados foram centrados na média para cada variável e a PCA realizada empregando-se o programa PLS toolbox 5.8 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, EUA, 2010) para Matlab 7.8 (The Math Works, Inc., Natick, EUA, 2009).

3.3 Resultados

3.3.1 Composição química das amostras de amêndoas de cacau

As variações na composição química das amêndoas de cacau influenciam nas características sensoriais dos produtos derivados e, portanto, na aceitação dos diferentes chocolates pelos consumidores. No chocolate, além dos compostos voláteis responsáveis pelo sabor e aroma, existe uma importante contribuição dos constituintes não voláteis. As diferentes sensações durante a degustação de um chocolate variam da típica sensação adstringente causada pelos compostos fenólicos do cacau ao leve gosto ácido devido aos

ácidos presentes nas amêndoas de cacau (principalmente os ácidos acético, láctico e cítrico) e do amargor devido à teobromina ao dulçor do açúcar. A agradável sensação tátil na boca (*mouth-feel*) é produzida pelo derretimento da manteiga de cacau e, adicionalmente, a distribuição de tamanho de partículas, a viscosidade e a dureza determinam a percepção sensorial final do chocolate (BECKETT, 2008). Dessa forma, a fim de elaborar produtos com perfil sensorial que resulte em elevada aceitação pelo consumidor ou que atenda às preferências de um determinado nicho de mercado, é fundamental o conhecimento da composição química da matéria prima que, associada aos processos tecnológicos adequados, resultará em produtos de melhor qualidade.

As amêndoas de cacau utilizadas para o processamento dos chocolates submetidos à avaliação sensorial foram previamente analisadas quanto ao pH, acidez e teores de umidade, lipídios (quantificados no *liquor* de cacau), proteína, compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química das amêndoas de cacau utilizadas para o processamento dos chocolates do tipo amargo.

Parâmetro/ Origem	BA	PA	RO	ES	CM
Umidade (%)	6,5 (0,1) ^a	6,2 (0,1) ^a	5,74 (0,03) ^b	6,3 (0,2) ^a	5,76 (0,05) ^b
pH	4,69 (0,05) ^d	5,42 (0,02) ^a	5,12 (0,01) ^{bc}	5,02 (0,04) ^c	5,16 (0,06) ^b
Acidez (%)*	1,51 (0,04) ^a	0,86 (0,04) ^d	1,03 (0,02) ^c	1,19 (0,03) ^b	1,05 (0,04) ^c
Lipídios (%)**	54,2 (0,9) ^b	56,7 (0,2) ^a	53,7 (0,8) ^b	53,1 (0,2) ^b	54 (1) ^b
Proteína (%)	14,6 (0,1) ^b	14,50 (0,07) ^b	14,63 (0,02) ^b	14,85 (0,08) ^b	15,6 (0,1) ^a
Fenólicos (%)	6,4 (0,2) ^a	4,8 (0,4) ^b	7,0 (0,1) ^a	6,6 (0,3) ^a	3,32 (0,03) ^c
Teobromina (%)	1,23 (0,04) ^a	1,07 (0,03) ^b	1,24 (0,01) ^a	1,27 (0,04) ^a	0,94 (0,02) ^c
Cafeína (%)	0,19 (0,01) ^a	0,11 (0,01) ^c	0,14 (0,01) ^b	0,18 (0,01) ^a	0,08 (0,01) ^d

Valores expressos como média (sd), sendo sd: estimativa do desvio padrão (n = 3).

Valores expressos em base seca (exceto para lipídios e pH).

Valores na mesma linha, com letras em comum, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey $\alpha=5\%$).

* Acidez expressa como porcentagem de ácido acético.

** Teor de lipídios determinado no *liquor* de cacau.

Para todos os parâmetros físico-químicos analisados, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. A maior diferenciação entre as amostras foi observada em relação a: pH, acidez, teores de compostos fenólicos, teobromina e cafeína. A amostra BA caracterizou-se pela maior acidez e menor valor de pH, enquanto a amostra PA apresentou menor acidez e maior valor de pH, sendo que ambas diferenciaram-se significativamente das demais. As amostras RO, ES e CM assumiram valores intermediários, sendo que a amostra ES apresentou média de acidez significativamente maior que as amostras PA, RO e CM. Quanto aos compostos fenólicos totais e teobromina, as amostras BA, RO e ES apresentaram concentrações significativamente mais altas que as amostras PA e CM. Em relação à cafeína, as amostras BA e ES apresentaram concentrações mais altas que as demais, sendo que a amostra CM apresentou o menor valor médio.

É importante ressaltar que os parâmetros de composição química foram determinados para uma amostra de cada região de produção, sendo estas as amostras utilizadas para a elaboração dos chocolates. Esses dados são úteis para dar suporte à discussão dos resultados da análise sensorial, a fim de sugerir relações entre a composição química e as percepções sensoriais da equipe treinada e dos consumidores. Apesar disso, é adequado pontuar que esses dados foram obtidos para uma amostra de cada região de produção e, portanto, não representam as características gerais de todas as amêndoas de cacau produzidas nestas regiões, as quais podem variar significativamente em função das safras e das condições de pré-processamento nas diferentes fazendas.

3.3.2 Caracterização das amostras de manteiga de cacau

3.3.2.1 Composição de ácidos graxos (AG) e triacilgliceróis (TAG)

Nas Tabelas 2 e 3 são mostrados os resultados de composição de ácidos graxos e de triacilgliceróis das amostras de manteiga de cacau extraídas das amêndoas de cacau de diferentes regiões de produção.

A composição de AG está próxima aos valores relatados na literatura, os quais indicam as seguintes faixas características para os ácidos palmítico, esteárico e oleico: 24-

27%, 34-36% e 32-35%, respectivamente (RIBEIRO et al., 2012). Esses ácidos graxos foram os predominantes na composição de todas as amostras, representando de 93,5% a 94,6% do total de ácidos graxos.

As diferenças mais importantes foram observadas para as amostras BA e ES, as quais apresentaram menor proporção de ácidos graxos saturados, principalmente pela menor porcentagem de ácido esteárico (C18:0). Em contrapartida, essas amostras apresentaram maiores proporções de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido oleico (C18:1). As amostras PA, RO e CM apresentaram a composição de AG bastante similar.

Dados disponíveis na literatura indicam que a manteiga de cacau produzida na América do Sul contém níveis de ácido oleico superiores às produzidas na África e na Ásia (RIBEIRO et al., 2012). Lipp et al. (2001) avaliaram a composição de manteigas de cacau provenientes de diversos países (Malásia, Indonésia, Papua Nova Guiné, São Tomé, Costa do Marfim, Nigéria, Gana, Equador e Brasil) e verificaram que as amostras da América do Sul apresentaram teores de ácido linoleico acima de 3%; da Ásia abaixo de 2,5% e as amostras da África situaram-se entre estes dois limites. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura, porém, é importante destacar que as amostras brasileiras avaliadas nas pesquisas usualmente são provenientes da Bahia. Comparando-se os resultados dos diferentes estados brasileiros, nota-se que existem diferenças relevantes, sendo que as amostras PA e RO apresentaram composição muito próxima à CM, com teores mais elevados de AG saturados e menores proporções de ácido oleico e linoleico.

De acordo com a Tabela 3, os TAG denominados POP (palmítico-oleico-palmítico), POS (palmítico-oleico-esteárico) e SOS (esteárico-oleico-esteárico) foram predominantes, na faixa de 77,3 a 85,6% do total, o que está de acordo com os valores relatados por Ribeiro et al. (2012), que indicam uma faixa de 80 a 85% para esses TAG simétricos do tipo saturado-insaturado-saturado.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos das manteigas de cacau de diferentes origens.

	Ácidos graxos	BA	PA	RO	ES	CM
Saturados	C14:0 mirístico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	C16:0 palmítico	25,9	26,8	25,3	25,3	26,0
	C17:0 margárico	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3
	C18:0 esteárico	32,0	34,9	36,8	32,9	35,9
	C20:0 araquídico	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1
	C22:0 behênico	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	C24:0 lignocérico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Total	59,8	63,6	64,0	60,1	63,8
Monoinsaturados	C16:1 palmitoleico	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4
	C18:1 oleico	35,6	32,6	32,3	35,6	32,7
	C20:1 gadoleico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Total	36,0	32,9	32,7	36,0	33,1
Poliinsaturados	C18:2 linoleico	3,7	3,0	3,0	3,5	2,8
	C18:3 linolênico	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
	Total	4,1	3,3	3,2	3,9	3,1

Tabela 3. Composição de triacilgliceróis das manteigas de cacau de diferentes origens.

		BA	PA	RO	ES	CM
Trisaturados	C48:0 PPP	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3
	C50:0 PPS	0,7	1,1	1,1	0,8	1,0
	C52:0 PSS	1,0	1,4	1,2	0,9	1,1
	C54:0 SSS	0,5	0,7	0,5	0,4	0,7
	Total	2,5	3,7	3,1	2,4	3,1
Monoinsaturados	C50:1 POP	21,6	20,6	22,4	20,9	20,7
	C52:1 POS	38,8	42,9	42,3	38,6	41,9
	C54:1 SOS	17,5	22,1	20,0	17,8	21,6
	C56:1 SOA	0,8	0,7	0,8	0,9	0,8
	Total	78,7	86,3	85,5	78,2	85,0
Diinsaturados	C50:2 PPL	2,3	1,4	1,8	2,2	1,6
	C52:2 POO	5,1	1,5	1,8	5,0	2,0
	C54:2 SOO	4,5	1,6	1,8	4,8	2,1
	C56:2 OOA	0,3	0,0	0,0	0,3	0,0
	Total	12,2	4,5	5,4	12,3	5,7
Triinsaturados	C52:3 POL	3,1	2,5	2,8	3,1	2,7
	C54:3 OOO	1,2	1,4	1,3	1,1	1,2
	Total	4,3	3,9	4,1	4,2	3,9
Tetrainsaturados	C52:4 POLn	0,6	0,3	0,3	0,5	0,2
	C54:4 OOL	0,4	0,0	0,0	0,5	0,3
	Total	1,0	0,3	0,3	1,0	0,5
Pentainsaturados	C54:5 OLL	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2
	Total	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2

Os triacilgliceróis são formados pelos seguintes ácidos graxos: P, ácido palmítico (saturado); O, ácido oleico (monoinsaturado); S, ácido esteárico (saturado); L, ácido linoléico (diinsaturado); Ln, ácido linolênico (tri-insaturado) e A, ácido araquídico (saturado).

De acordo com Lipp and Anklam (1998) *apud* Ribeiro (2012), maiores porcentagens de TAG diinsaturados como, por exemplo, POO (palmítico-oleico-oleico) e SOO (esteárico-oleico-oleico) caracterizam uma manteiga de cacau mais macia. As amostras BA e ES apresentaram esses TAG em teores muito maiores que as demais amostras, o que pode ter sido fundamental para diferenciar o comportamento de solidificação dessas amostras a diferentes temperaturas. Já as amostras PA, RO e CM apresentam teores mais elevados de TAG trisaturados e monoinsaturados quando comparadas às amostras BA e ES. Essas diferenças de composição afetam o desempenho tecnológico, a estabilidade dos produtos e também impactam na percepção sensorial. Os resultados do perfil sensorial, os quais serão discutidos posteriormente, mostram que a equipe treinada diferenciou as amostras de forma coerente com a composição de TAG utilizando os atributos derretimento e dureza. Já os consumidores atribuíram melhores notas às amostras mais macias (BA e ES), com melhor derretimento.

3.3.2.2 Perfil de conteúdo de gordura sólida

Quanto aos perfis de conteúdo de gordura sólida a diferentes temperaturas (curvas de SFC, do inglês *Solid Fat Content*), as amostras apresentaram comportamento compatível com o que foi observado em relação à composição de AG e TAG (Tabela 4).

Para todas as temperaturas avaliadas, as amostras BA e ES apresentaram menor porcentagem de sólidos, indicando que essas manteigas de cacau são menos duras que as demais. A 25°C, as amostras BA e ES apresentaram valores de SFC iguais a 53,4% e 54,9%, respectivamente, muito próximos aos valores relatados por Ribeiro et al. (2012), iguais a 53,7% e 52,3%. Já as amostras PA, RO e CM apresentaram SFC entre 66,8% e 69,2% nesta temperatura.

Geralmente, a manteiga de cacau produzida no Brasil é considerada mais macia que as produzidas em outros países, sendo necessária a produção de *blends* para que se obtenha uma matéria prima com maiores valores de SFC, adequada para o uso em regiões de clima tropical (RIBEIRO et al., 2012). Porém, os resultados desta pesquisa mostram que as manteigas de cacau PA e RO apresentaram valores de SFC similares ao da amostra CM e superiores aos das amostras BA e ES para todas as temperaturas avaliadas (Figura 2).

Portanto, é muito provável que a formulação de *blends* compostos pelas manteigas de cacau BA e PA, por exemplo, resulte em uma matéria prima com características tecnológicas adequadas para a fabricação de chocolates. Este aspecto é muito interessante para a indústria nacional, visto que os estados Bahia e Pará são os dois maiores produtores de amêndoas de cacau no Brasil, responsáveis por 63% e 27% da produção total, respectivamente (IBGE, 2012).

Para a produção de chocolates, especialmente em regiões de clima tropical, é desejável que a manteiga de cacau seja dura e quebradiça à temperatura ambiente (SFC maior que 50% a 25°C) e apresente boas propriedades de derretimento na boca. Um dos parâmetros utilizados pela indústria para avaliar a qualidade da manteiga de cacau em relação às características de derretimento é denominado ΔS , calculado como a diferença entre os valores de SFC a 25°C e 35°C. Altos valores de ΔS significam adequado derretimento da manteiga de cacau na temperatura do corpo humano. Outro requisito é que a manteiga de cacau não apresente SFC acima de 35°C, o que seria facilmente detectado como uma sensação residual cerosa na avaliação sensorial (RIBEIRO et al., 2012; LUCAS, 2001). De acordo com os requisitos apresentados, todas as amostras apresentaram as características desejáveis para a formulação de chocolates, isto é, SFC maior que 50% a 25°C, altos valores de ΔS e ausência de sólidos acima de 35°C (Tabela 4 e Figura 2).

Tabela 4. Conteúdo de gordura sólida das manteigas de cacau a diferentes temperaturas.

Conteúdo de gordura sólida - SFC (%) e ΔS (%)					
Temperatura (°C)	BA	PA	RO	ES	CM
10	75,2	87,0	87,5	75,8	85,6
20	64,3	79,7	78,2	64,2	75,5
25	53,4	69,2	68,9	54,9	66,8
30	27,7	41,7	42,5	28,0	40,7
35	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2
40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ΔS	53,3	69,2	68,7	54,8	66,6

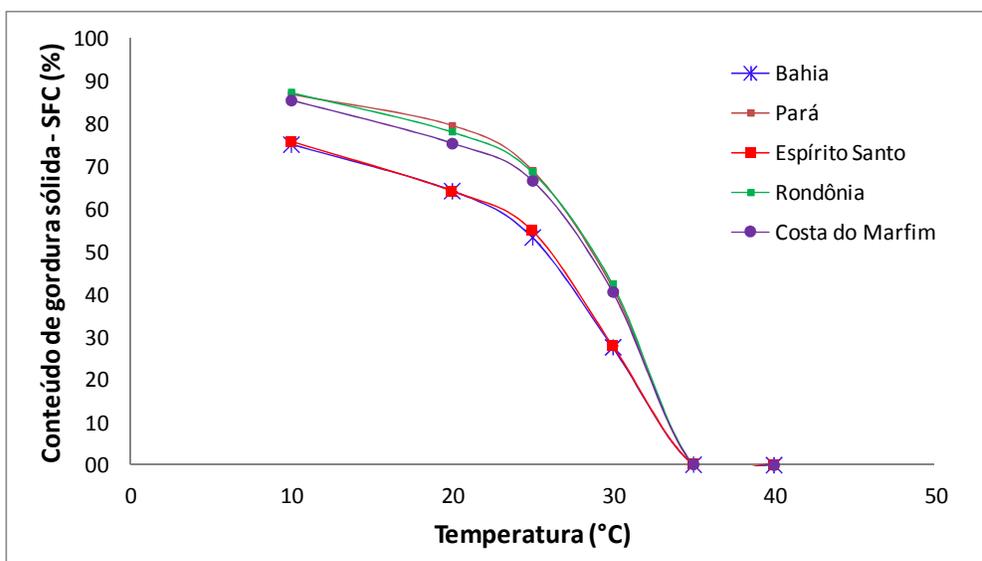


Figura 2. Perfis do conteúdo de gordura sólida das amostras de manteiga de cacau.

3.3.3 Perfil sensorial

Na Tabela 5, pode-se verificar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras quanto ao aroma de chocolate e sabores de café, de chocolate e floral. Para os outros nove atributos avaliados, foram observadas diferenças significativas entre as amostras.

Em concordância com os resultados das análises físico-químicas de pH e acidez, a equipe de assessores treinados avaliou a amostra BA – a qual não diferiu significativamente da amostra ES - com maior intensidade de gosto ácido quando comparada às amostras PA, RO e CM. Um comportamento similar pode ser observado quanto ao gosto amargo e à adstringência, atributos para os quais as amostras BA e ES apresentaram maior intensidade que as demais. As análises químicas indicam que estas diferenças podem estar relacionadas a altas concentrações de compostos fenólicos, teobromina e cafeína nas amostras BA e ES, os quais influenciam no amargor e na adstringência dos chocolates.

A amostra CM apresentou maior nota para o atributo sabor de caramelo e diferença significativa em relação às amostras BA, RO e ES quanto ao gosto doce, além de maior intensidade de sabor frutal quando comparada às amostras BA, PA e ES.

Tabela 5. Médias das notas dadas pela equipe sensorial para os cinco chocolates do tipo amargo produzidos com amêndoas de cacau de origens distintas.

Amostra/ atributo	BA	PA	RO	ES	CM	MDS
Gosto ácido	5,49 ^a	4,30 ^{bc}	4,67 ^b	4,83 ^{ab}	3,84 ^c	0,69
Gosto amargo	6,33 ^a	5,20 ^b	5,42 ^b	5,99 ^a	4,93 ^b	0,51
Sabor de café	0,45 ^a	0,55 ^a	0,46 ^a	0,48 ^a	0,47 ^a	0,43
Sabor de caramelo	0,68 ^b	0,91 ^b	0,72 ^b	0,77 ^b	1,61 ^a	0,58
Gosto doce	3,15 ^c	4,15 ^{ab}	3,46 ^{bc}	3,23 ^c	4,49 ^a	0,70
Adstringência	4,50 ^a	3,57 ^b	3,58 ^b	4,35 ^a	3,11 ^b	0,74
Sabor frutal	0,48 ^b	0,52 ^b	0,56 ^{ab}	0,38 ^b	1,12 ^a	0,59
Sabor de chocolate	5,92 ^a	5,86 ^a	5,78 ^a	5,81 ^a	5,65 ^a	0,53
Sabor floral	0,41 ^a	0,26 ^a	0,14 ^a	0,35 ^a	0,28 ^a	0,32
Aroma de caramelo	0,70 ^{ab}	0,85 ^{ab}	0,64 ^{ab}	0,48 ^b	1,26 ^a	0,76
Aroma de chocolate	5,20 ^a	5,14 ^a	5,12 ^a	5,11 ^a	4,98 ^a	0,69
Dureza	5,20 ^d	6,30 ^{bc}	7,09 ^a	5,83 ^{cd}	6,68 ^{ab}	0,70
Derretimento	6,75 ^{ab}	6,12 ^b	6,29 ^{ab}	6,88 ^a	6,60 ^{ab}	0,64

MDS: Mínima Diferença Significativa ao nível de erro de 5% pelo teste de Tukey.

Valores na mesma linha, com letras em comum, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey $\alpha=5\%$).

Para facilitar a visualização dos agrupamentos das amostras de acordo com suas similaridades e diferenças, realizou-se a Análise de Componentes Principais com os dados de perfil sensorial gerados pela equipe de assessores treinados. A Figura 3(a) apresenta o gráfico de escores no qual são mostradas as amostras de chocolates de cada origem, sendo cada uma delas representada por três pontos correspondentes às três repetições realizadas pela equipe treinada durante a avaliação das amostras. A Figura 3(b) mostra o gráfico de *loadings* no qual cada descritor sensorial está associado a um vetor, cuja decomposição fornece o peso do descritor para a composição de cada eixo das componentes principais (PC). Assim, maiores valores de *loadings* indicam maior contribuição para a diferenciação entre as amostras ao longo da respectiva PC.

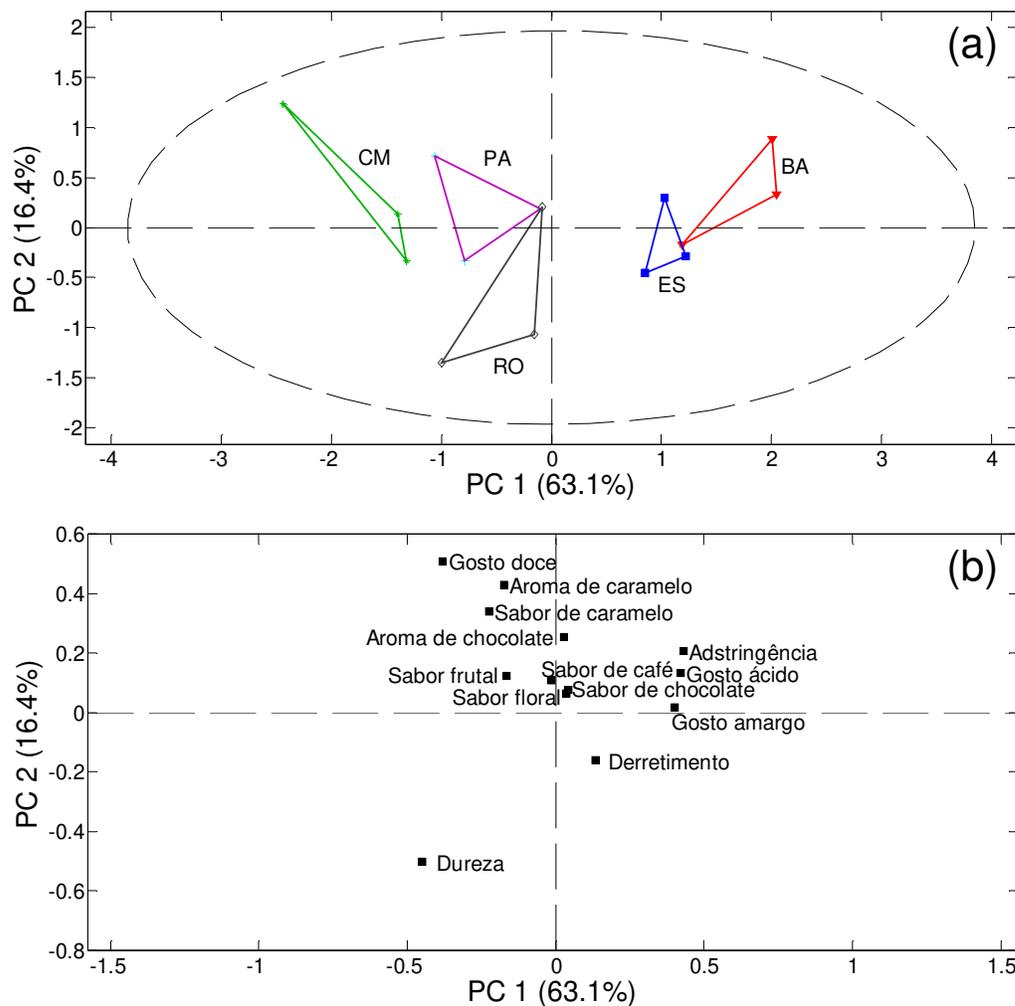


Figura 3. Análise de Componentes Principais dos resultados da Análise Descritiva Quantitativa dos chocolates do tipo amargo de diferentes origens. (a) Gráfico de escores – amostras e (b) Gráfico de pesos dos descritores sensoriais.

A PCA teve 79,5% da variância explicada nas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2). Conforme a Figura 3(a), os chocolates BA e CM apresentaram consideráveis diferenças no perfil sensorial, enquanto as amostras RO e PA apresentaram similaridades e características intermediárias em relação às anteriormente citadas. Os perfis sensoriais dos chocolates BA e ES foram bastante próximos, sendo que ambos caracterizaram-se por maiores intensidades de sensação adstringente, gosto ácido e gosto amargo. A amostra CM caracterizou-se pela maior intensidade de sabores de caramelo e frutal, aroma de caramelo e gosto doce. As amostras localizadas no eixo positivo da PC1 apresentaram maiores médias de derretimento e, portanto, menor dureza. Os descritores

sabor e aroma de chocolate, sabor floral e sabor de café foram pouco percebidos nas amostras e não contribuíram para a diferenciação de acordo com a região de produção das amêndoas de cacau. De forma geral, todas as informações geradas pela PCA estão de acordo com os resultados do teste de Tukey (Tabela 5).

Neste ponto, é possível verificar que a composição química das amêndoas de cacau (Tabela 1) pode influenciar diretamente nas características dos chocolates produzidos a partir das mesmas. Como exemplo, as diferenças de acidez entre as amêndoas de cacau estavam presentes também nos chocolates e foram detectadas pela equipe sensorial. No processamento industrial, essas diferenças podem ser minimizadas por meio da adequação dos processos – especialmente na torração e conchagem – a fim de promover maior eliminação de ácidos orgânicos voláteis, principalmente o ácido acético. Outra observação é que a percepção do gosto amargo e a sensação de adstringência foram mais intensas para as amostras BA e ES, as quais apresentaram altas concentrações de compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína.

3.3.4 Teste afetivo

3.3.4.1 Caracterização do grupo de consumidores

O grupo de consumidores foi composto majoritariamente por pessoas com até 30 anos (87%), com maior participação de pessoas do gênero feminino (71%). Quanto à frequência de consumo de chocolates, a maior parte dos consumidores (70%) declarou que consome chocolates de uma a três vezes por semana. Em relação aos tipos de chocolates mais consumidos pelos provadores, predominaram os tipos “ao leite” (37%) e “meio amargo” (33%). Portanto, o grupo de consumidores caracterizou-se como um grupo jovem e que consome chocolates com uma frequência relativamente baixa, especialmente quando se trata de chocolates do tipo amargo (Figura 4).

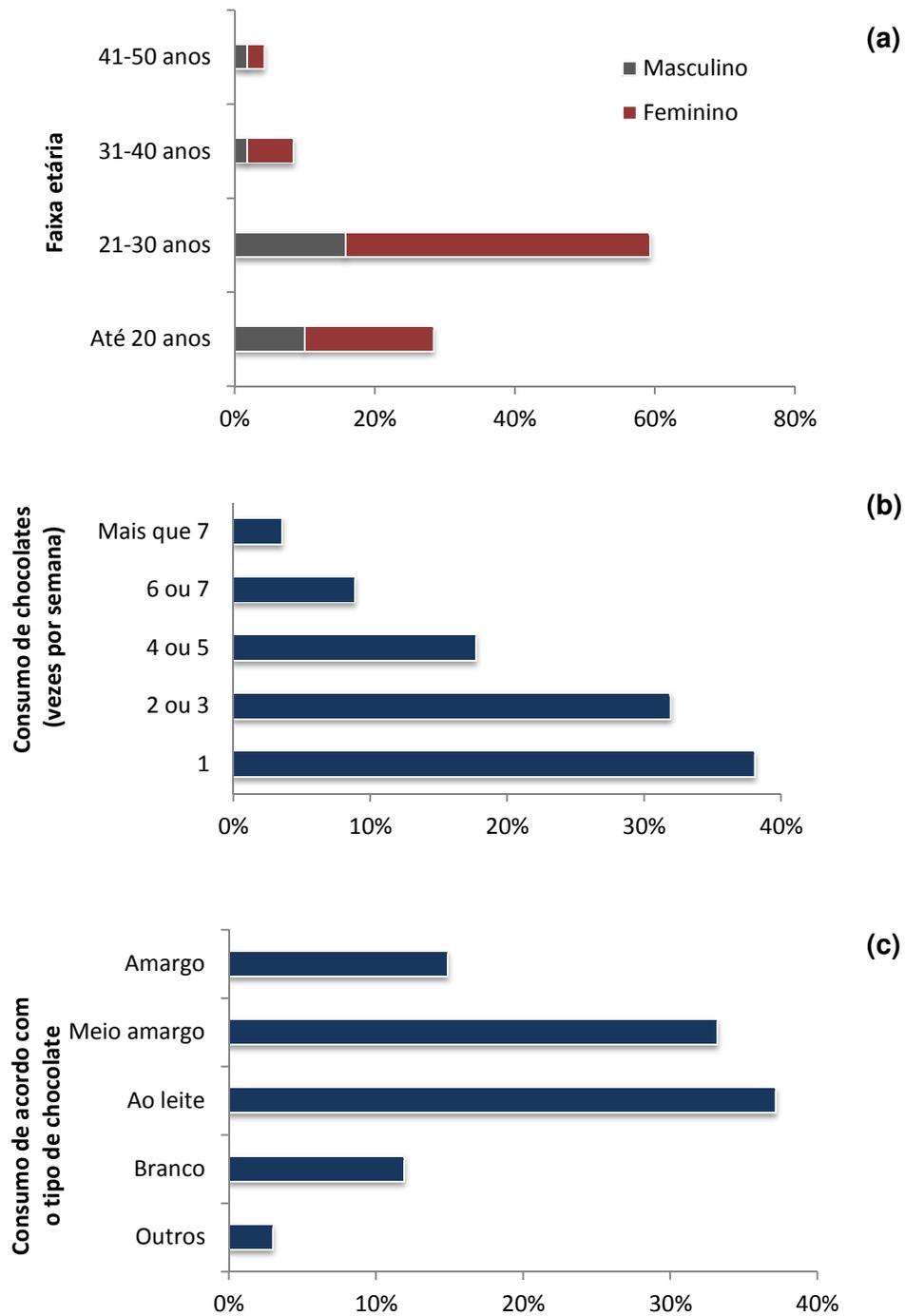


Figura 4. Caracterização do grupo de 120 consumidores que participou do teste de aceitação sensorial dos cinco chocolates do tipo amargo. (a) quanto ao gênero e faixa etária; (b) quanto à frequência de consumo de chocolates (número de vezes por semana) e (c) em relação ao tipo de chocolate mais consumido.

3.3.4.2 Teste de aceitação

As cinco amostras de chocolates foram avaliadas sensorialmente por 120 consumidores quanto à aceitação de aroma, sabor, derretimento, dureza, amargor, acidez e aceitação global (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios para cada atributo avaliado no teste de aceitação sensorial dos cinco chocolates do tipo amargo produzidos com amêndoas de cacau de origens distintas.

Atributo	BA	PA	RO	ES	CM	MDS
Aroma	7,32 (1,35) ^a	7,22 (1,36) ^a	7,26 (1,31) ^a	7,22 (1,42) ^a	6,77 (1,67) ^b	0,42
Sabor	6,76 (1,60) ^a	7,21 (1,45) ^a	7,25 (1,34) ^a	6,83 (1,68) ^a	6,90 (1,88) ^a	0,51
Derretimento	7,09 (1,42) ^{ab}	6,72 (1,46) ^b	6,77 (1,56) ^b	7,47 (1,36) ^a	6,89 (1,55) ^b	0,45
Dureza	7,26 (1,50) ^a	7,12 (1,48) ^a	6,91 (1,67) ^a	7,26 (1,68) ^a	6,94 (1,61) ^a	0,49
Amargor	6,52 (1,91) ^b	7,17 (1,46) ^a	6,97 (1,62) ^{ab}	6,58 (1,87) ^b	6,94 (1,76) ^{ab}	0,53
Acidez	5,97 (1,97) ^c	7,08 (1,57) ^a	6,73 (1,72) ^{ab}	6,36 (1,99) ^{bc}	6,75 (1,95) ^{ab}	0,54
Aceitação global	6,70 (1,62) ^b	7,18 (1,27) ^a	7,16 (1,31) ^{ab}	6,93 (1,57) ^{ab}	6,98 (1,61) ^{ab}	0,47

MDS: Mínima diferença significativa ao nível de erro de 5% pelo teste de Tukey. Valores na mesma linha, com letras em comum, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Valores expressos como média (sd), sendo sd: estimativa do desvio padrão ($n = 120$).

Os resultados do teste de aceitação mostram que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras para os atributos: aroma, derretimento, amargor, acidez e aceitação global. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias para os atributos sabor e dureza.

Quanto à aceitação global, pequenas diferenças foram observadas, sendo que o chocolate PA apresentou valor médio superior ao do chocolate BA, o que provavelmente ocorreu devido à maior intensidade do gosto ácido, atributo para o qual as amostras BA e ES apresentaram as menores notas. Quanto ao amargor, observa-se uma diferença significativa entre as amostras BA e PA, o que está de acordo com os resultados da ADQ[®], os quais também demonstraram que o chocolate BA apresenta maiores intensidades de

gosto amargo e de sensação adstringente. Em relação ao derretimento, o chocolate ES diferiu ($p < 0,05$) das amostras PA, RO e CM. Esta diferença está relacionada à maior proporção de triacilgliceróis POO e SOO, o que caracteriza uma manteiga de cacau mais macia e que proporcionou características de derretimento com melhor aceitação pelos consumidores.

Assim como foi observado na ADQ[®], as amostras PA e RO apresentaram similaridades, sem diferença significativa entre as médias para nenhum dos atributos avaliados. De forma geral, os resultados do teste de aceitação refletem o que foi verificado na ADQ[®], mostrando que o consumidor foi capaz de diferenciar as amostras de diferentes origens e que os atributos acidez e amargor influenciaram fortemente na aceitação global.

Em relação à intenção de compra (Figura 5), considerando-se a frequência acumulada das respostas positivas (“certamente compraria” e “possivelmente compraria”), novamente os consumidores mostraram uma tendência de maior aceitabilidade das amostras PA e RO quando comparadas às outras amostras.

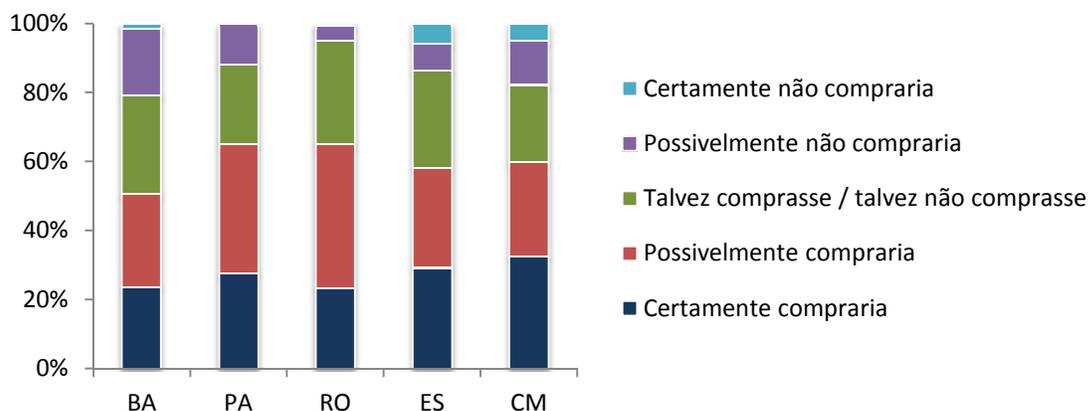


Figura 5. Intenção de compra do grupo de 120 consumidores para os cinco chocolates do tipo amargo.

Apesar das diferenças observadas, é importante destacar que todos os chocolates apresentaram médias muito próximas para a aceitação global e não diferiram ($p > 0,05$) em relação ao atributo de sabor. As médias de aceitação global são equivalentes ao conceito “gostei moderadamente”, sendo que esta avaliação e a baixa capacidade de discriminação entre as amostras podem estar relacionadas ao perfil dos consumidores que participaram do

teste, os quais demonstraram preferência pelos chocolates do tipo ao leite e meio amargo. A este respeito, Torres-Moreno et al. (2012) constataram que os subgrupos de consumidores caracterizados pela menor frequência de consumo de chocolates atribuíram menores notas e tiveram menor capacidade de diferenciação entre as amostras quanto à aceitabilidade.

3.4 Conclusões

As amêndoas de cacau utilizadas neste estudo apresentaram importantes diferenças quanto à composição química, principalmente em relação ao pH, acidez e teores de compostos fenólicos totais, teobromina e cafeína, as quais estão relacionadas com as diferenças sensoriais observadas entre os chocolates elaborados a partir desses lotes de amêndoas.

Quanto à caracterização das manteigas de cacau, as amostras PA, RO e CM apresentaram a composição de ácidos graxos e curva de SFC bastante similares. Em contrapartida, as amostras BA e ES caracterizaram-se por conter manteigas de cacau mais macias (maiores concentrações dos triacilgliceróis POO e SOO e menores valores de SFC para todas as temperaturas avaliadas). Esses resultados sugerem que a consideração geral de que a manteiga de cacau produzida no Brasil é mais macia que a produzida em outros países e necessita ser utilizada em *blends* deve ser restrita àquelas produzidas na Bahia e no Espírito Santo. Ainda, fica evidente a vantagem decorrente da formulação de *blends* entre manteigas de cacau obtidas das amêndoas BA e PA, o que viabiliza a obtenção de características adequadas para o uso em regiões de clima tropical.

A Análise Descritiva Quantitativa permitiu a diferenciação entre os chocolates do tipo amargo elaborados com as amêndoas de diferentes regiões de produção. Foram observadas diferenças importantes no perfil sensorial dos chocolates BA e CM, assim como as amostras RO e PA apresentaram similaridades e características intermediárias em relação às anteriormente citadas. Os perfis sensoriais dos chocolates BA e ES foram bastante próximos e caracterizaram-se por maiores intensidades de sensação adstringente, gosto ácido e gosto amargo. A amostra CM caracterizou-se pela maior intensidade de sabores de caramelo e frutal, aroma de caramelo e gosto doce.

Quanto ao teste de aceitação, verificou-se que o grupo de consumidores foi capaz de diferenciar as amostras de chocolates elaborados com amêndoas de origens distintas, com uma tendência de maior aceitabilidade dos chocolates PA e RO. Assim, constatou-se forte influência dos atributos acidez e amargor sobre a aceitação global e a intenção de compra.

Como diferencial desta pesquisa, foram comparados os perfis sensoriais de chocolates do tipo amargo elaborados com lotes comerciais de amêndoas de cacau produzidos em diferentes estados brasileiros, não apenas por uma equipe sensorial treinada, mas também por um grupo de consumidores.

Cabe destacar que as características químicas e sensoriais incluídas nesta pesquisa não são suficientes para afirmar que os chocolates avaliados apresentam melhor ou pior qualidade, até porque o conceito de qualidade é relativo. As diferenças sensoriais existentes devem ser interpretadas como oportunidades de adaptação do pré-processamento nas fazendas e dos processos tecnológicos nas indústrias para a obtenção de produtos uniformes ou, ainda, para a elaboração de chocolates com características próprias e diferenciadas, visando o segmento de mercado de chocolates de origem única.

REFERÊNCIAS

AFOAKWA, E.O. et al. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p.840–857, 2008.

AOCS. **American Oil Chemists' Society**. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. American Oil Society, Champaign, 2009.

ARLORIO, M. et al. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 106, p. 967–975, 2008.

BECKETT, S. T. **The science of chocolate**. 2 ed. Cambridge: RSC. 2008. 240 p.

BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. United Kingdom: Blackwell Publishing. 2009. 732 p.

COUNET, C. et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6243-6249, 2004.

EFRAIM, P. et al. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacau de diferentes genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n.4, p. 229-236, 2006.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 208 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

EFRAIM, P. et al. Characteristics of cocoa butter and chocolates obtained from cocoa varieties grown in Bahia, Brazil. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 419-428, 2013.

EIGENVECTOR Research Inc. **PLS Toolbox 5.8**. Manson, EUA, 2010.

HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18 ed. Maryland : AOAC, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da lavoura permanente 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 10 out. 2014.

JINAP, S.; DIMICK, P.S.; HOLLENDER, R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. **Food Control**, v. 6, n. 2, p. 105-110, 1995.

LIPP, M. et al. Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 399-408, 2001.

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas a manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. 195 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2001.

MACFIE, H. J. et al. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effect in halls tests. **Journal of Sensory Studies**, v.4, n.2, p.129-148, 1989.

MELO, L.L.M.M.; BOLINI, H.M.A.; EFRAIM, P. Sensory profile, acceptability, and their relationship for diabetic/reduced calorie chocolates. **Food Quality and Preference**, v. 20, p. 138–143, 2009.

RIBEIRO, A.P.B. et al. Physico-chemical properties of Brazilian cocoa butter and industrial blends. Part I - Chemical composition, solid fat content and consistency. **Grasas y aceites**, v. 63 (1), p. 79-88, 2012.

RISNER, C.H. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (-)-epicatechin in Standard Reference Material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans and cocoa butter, **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 892-899, 2008.

ROHSIUS, C.; MATISSEK, R.; LIEBEREI, R. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 432–438, 2006.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCH, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, p. 167-187, 2013.

SAS - **Statistical Analysis System**. System for Windows, versão 9.2 SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA, 2009.

SILVA, A. R. A. **Caracterização de amêndoas e chocolate de diferentes variedades de cacau visando a melhoria da qualidade tecnológica**. 118 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

STONE, H. & SIDEL, J. L. **Sensorial Evaluation Practices**. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 337 p.

THE MATH WORKS INC. **Matlab 7.8**. Natick, EUA, 2009.

TORRES-MORENO, M. et al. Dark chocolate acceptability: influence of cocoa origin and processing conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 404-411, 2012.

CAPÍTULO IV

Quality control of raw cocoa beans by Near-Infrared Spectroscopy combined with chemometrics

Este manuscrito está em fase de preparação e será submetido ao periódico “Food Research International”.

ABSTRACT

This work presents the use of Near-Infrared Spectroscopy (NIR) combined with chemometric analysis as an excellent alternative to the conventional methods currently used for the quality control of cocoa beans. Nine PLS regression models were constructed from the near infrared diffuse reflectance spectra of 81 samples of cocoa beans, allowing the prediction of various chemical parameters (moisture, pH, acidity, total lipids, protein, shell content, total phenolic compounds and theobromine) through direct analysis of samples milled and sieved without any additional preparation. With the exception of caffeine concentration, all of the parameters were predicted with relative errors smaller than an average of 10.2%, which is acceptable when compared to the coefficients of variation of the reference methods usually used. Thus, the results obtained demonstrate that the use of NIR in conjunction with chemometrics is feasible and recommended for the quality control of cocoa beans in various stages of the production chain.

4.1 Introduction

Cocoa beans are the fermented and dried seeds of the cacao tree (*Theobroma cacao* L.) and are considered an important global agricultural commodity. As raw material, the cocoa beans are used for the production of chocolate confectionery, chocolate coated products or in other food products containing cocoa powder, including beverages, cakes, snacks, biscuits and ice cream.

The cocoa seeds are produced and pre-processed on farms, resulting in fermented and dried cocoa beans, which are intended for domestic sale or exportation. The first quality inspection is performed by the cocoa processors, which amounts, basically, to an evaluation of the degree of fermentation and a defective beans count through the cut test and a determination of moisture content (BECKETT, 2009). Further analysis, such as determination of pH, total acidity, lipid content and percentage of shell, can also be performed for parameters related to quality, storage stability and the process yield of cocoa beans.

However, the above mentioned quality parameters provide very limited information about the chemical composition of the samples, especially when the goal is not restricted to quality inspection. A fairly recent demand for the chemical characterization of cocoa beans consists of the evaluation of samples of different varieties and from different origins. Various studies are currently in progress for the purpose of increasing productivity and resistance to diseases, as well as to improve the quality of cocoa beans, mainly through breeding programmes. In this case, the analysis of other components, such as phenolic compounds, theobromine, caffeine and nitrogen compounds becomes essential. All these substances have already been demonstrated to be related to the sensory quality of products derived from cocoa, and additionally, the ratio between the concentrations of theobromine and caffeine has been proposed as a criteria for differentiating between fine and bulk cocoa.

For both the purposes of quality inspection and research, physicochemical characterization of cocoa beans by reference methods is extremely time consuming, labor intensive and expensive, given the requirement for an extensive infrastructure that includes several analytical techniques. In this context, the application of Near-Infrared Spectroscopy

(NIR) has proven to be an excellent alternative for overcoming the challenges by the replacement of the traditional methods.

The analytical methods resulting from the use of the NIR spectroscopic region reflect its most significant characteristics, such as: fast (one minute or less per sample), non-destructive, non-invasive, suitable for in-line use, nearly universal application, with minimal sample preparation demands (PASQUINI, 2003). In addition, it is a multi-analytical technique, allowing for several determinations to be made simultaneously. However, the applications of NIR are almost entirely dependent on chemometric tools. Partial least squares regression (PLS) is a method that can be directly applied to the NIR spectra, resulting in the calibration models used to predict the properties of interest (RAMBO; AMORIM; FERREIRA, 2013).

The feasibility of the application of NIR spectroscopy combined with chemometric tools has been demonstrated for the determination of different analytes in a wide variety of food matrices (SUN, 2009). With respect to cocoa and cocoa products, published studies suggest the use of this technique for a variety of purposes, including: a prediction of the sensory quality of chocolates from the near-infrared spectroscopic measurements of raw cocoa beans (DAVIES et al., 1991); the determination of pre-crystallization in chocolate (SVENSTRUP, HEIMDAL and NØRGAARD, 2005); the analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products (CHE MAN et al., 2005); the quantification of fat, nitrogen, and moisture in cocoa powder (VESELA et al., 2007); rapid determination of sucrose in chocolate mass (COSTA FILHO, 2009); a characterization of the cocoa bean fermentation process (ACULEY et al., 2010); the discrimination of Ghana cocoa beans according to geographical origin (TEYE et al., 2013); the discrimination and quantification of the adulteration of fermented cocoa beans with unfermented cocoa beans (TEYE et al., 2014); and also for determining cocoa fermentation levels through ammonia nitrogen quantification (HUE et al., 2014).

Despite the many applications already being employed, to the best of our knowledge, there are no published studies demonstrating the multivariate calibration of several parameters in the chemical composition of cocoa beans. Therefore, the objective of this study was to demonstrate the feasibility of the application of NIR spectra combined

with chemometric methods for the chemical characterization of raw cocoa beans, in relation to moisture, pH, total acidity, lipid content, shell content, total phenolic compounds, protein and the concentration of caffeine and theobromine.

4.2 Experimental

4.2.1 Samples

Eighty-one samples of fermented and dried cocoa beans originating from four Brazilian states (Bahia, Pará, Rondônia and Espírito Santo), and from the Ivory Coast were analyzed. Pará and Rondônia are located in the North of Brazil; the state of Bahia is located in the Northeast region; and Espírito Santo is in the Southeast region. The Ivory Coast is the world's largest cocoa producer and is located in West Africa. All samples were obtained through partnership with a cocoa processing industry and were received in the period between July 2011 and July 2012. Immediately after arrival to the laboratory, samples were stored in metallised packages made of polyethylene and maintained under refrigeration (4°C).

The determination of moisture, shell, pH, acidity and lipids were performed on ground cocoa beans (cotyledons plus shells). In order to analyze other parameters related to chemical composition (total phenolic compounds, protein and the concentration of caffeine and theobromine), only the internal part of the cocoa beans (cotyledon), obtained through the removal and separation of the shell, was used. For this, the beans were broken by a Rietz mill (ICMA, Campinas, Brazil) and the fragments were separated according to their particle size in a Granutest vibrating sieve (Telastem, São Paulo, Brazil) with apertures of 6.35, 4.76 and 2.38 mm. The separation of testa (the cocoa bean shell) and nibs (small fragments resulting from broken cotyledons) were carried out using a Cocoa Bean Winner (Capco, Ipswich, UK), which is an equipment specific for separating the cocoa bean shells. The nibs were ground and samples were stored in metallised polyethylene packaging and maintained under refrigeration (4°C) until the moment of analysis. To obtain the near-infrared spectra, the ground samples (cocoa beans and cotyledons) were sieved to a

standardized particle size between 0.21 and 0.35 mm and placed in 4 mL, 15 mm x 45 mm glass vials (SUN-SRi, Rockwood, USA).

The NIR spectra of ground cocoa bean samples (cotyledons plus shells) were used for calibration of the moisture, pH, acidity, shell and lipid contents, while the spectra of ground nib samples (cotyledons) were used for calibration of the total phenolic compounds, protein, caffeine and theobromine contents.

4.2.2 Physicochemical analysis of cocoa beans

Reference methods of the Association of Official Analytical Chemists (HORWITZ, 2006) were used for the determination of moisture, pH, acidity and lipid content. Moisture was measured by drying samples to constant weight at 100°C (method 931.04), in an oven with air circulation, model 520 (Fanem, Guarulhos, Brazil). The pH and titratable acidity (expressed as acetic acid) were measured in aqueous suspension samples (10 g of sample in 90 mL of water), using a TEC-5 digital pHmeter (Tecnal Piracicaba, Brazil), in accordance with methods 970.21 (pH) and 942.15 (potentiometric titration). The lipid content was measured by extraction with petroleum ether in a TE-188 Soxhlet lipid extractor (Tecnal Piracicaba, Brazil), after the acid hydrolysis of the sample, for four hours (method 963.15). The shell content was determined by gravimetric assay.

Protein determination was carried out by the microKjeldahl method, which includes the same steps and principles of the conventional Kjeldahl method described in AOAC (Method 970.22), but employs smaller quantities of sample and reagents. The protein content was calculated from the concentration of total nitrogen by applying a conversion factor of 6.25.

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu reagent method, in accordance with Efraim et al. (2006). The quantification was based on a calibration curve for tannic acid, and the results expressed as tannic acid equivalents per 100 grams of the sample.

Theobromine and caffeine were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD), following the procedure

described by Risner et al. (2008). The chromatographic separation was performed on a Symmetry C₁₈ column (4.6 mm x 75 mm, 3.5 μm) (Waters, Milford, USA) at a temperature of 30°C, with isocratic elution of the mobile phase, containing 0.3% acetic acid and methanol in a ratio of 80:20 (v/v) with a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The peak areas were calculated at 273 nm, and the two analytes were quantified by external standard calibration.

All determinations were carried out in triplicate with the exception of the theobromine and caffeine analyses (two replicates).

4.2.3 Spectroscopic NIR measurements

The ground and sieved samples were directly analyzed by diffuse reflectance, using a NIR reflectance accessory (NIRA) coupled to a Spectrum 100N equipment (Perkin Elmer, Waltham, USA) with Spectrum v. 6.3.1.0132 software (Perkin Elmer, Waltham, USA). A quartz halogen bulb was used as a source of radiation. Spectra (64 scans) were recorded in the reflectance mode, in the range of 10000 to 4000 cm⁻¹ at a resolution of 4 cm⁻¹. The background spectrum was obtained by an internal reference.

4.2.4 Data analysis

The data preprocessing and multivariate analyses were performed using the PLS toolbox 5.8 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, USA) for Matlab 7.8 software (The Math Works, Inc., Natick, USA).

The data set of infrared spectra and their related concentrations were divided into two subsets: calibration and validation. The splitting process was carried out by the Kennard-Stone algorithm (Kennard & Stone, 1969), with 33% of the samples used as an external validation set.

NIR spectra require mathematic tools to reduce the data noise, remove baseline offset and the multiplicative interferences of scatter and particle size. Thus, prior to calibration, the data were preprocessed and mean centered. After testing different preprocessing methods, individually or in combination, the best results were obtained when

Multiplicative Scatter Correction (MSC), Standard Normal Variate (SNV) or first derivative using the Savitzky–Golay method were individually applied to the spectral data.

Isolated PLS models were developed for each component, totaling nine different models. Cross-validation (venetian blinds with 18 data splits) was used to determine the number of latent variables (LV), with the optimum number of latent variables of the calibration model selected at the point of minimum of the root mean square error of cross-validation (RMSECV), or when the minimum could not be observed, the number of LV was chosen so as to avoid over-fitting and to give a lower prediction error (RMSEP). The outliers were identified by analyzing the plot of studentized residual *versus* the leverage, a useful tool to detect outliers, since the leverage defines the influence that a given sample will have on a model and is related to Hotelling's T^2 value, and the studentized residual is an indication of the lack of fit of the concentration (y-value) of a sample (WISE et al., 2006).

In order to improve the performance of the models, variable selection by interval Partial Least Squares (iPLS) was tested, operated in "forward" mode, with 199 variables per interval. In this instance, the iPLS algorithm selects a subset of variables which will give superior prediction compared to using all the variables in a data set, and combines as many intervals as requested by the user until the RMSECV does not improve. Alternatively, a graph of the Variable Importance in Projection (VIP) scores was used for variable selection, which estimates the importance of each variable in the projection used in a PLS model. A variable with a VIP score close to or greater than 1 (one) can be considered important in a given model. Variables with VIP scores significantly less than 1 (one) are less important and might be good candidates for exclusion from the model (WISE et al., 2006).

Regression model performances were evaluated by calculating the coefficient of determination (R^2) between the NIR predicted values and the reference values; percentage of root mean square prediction difference was calculated by Eq.1 (RMSPD); root mean square errors (RMSE), expressed by Eq. (2), was calculated for the calibration (RMSEC), cross validation (RMSECV) and prediction sets (RMSEP). The range error ratio (RER = $Range_y$ of reference data/RMSEP) was also evaluated. According to the American

Association of Cereal Chemists (AACC) – Method 39-00, any model that has $RER \geq 4$ is qualified for screening calibration. When $RER \geq 10$, the model is acceptable for quality control, and if $RER \geq 15$, the model is very good for research quantification (MARTENS & NAES, 1989; RAMBO; AMORIM; FERREIRA, 2013; TREVISAN & POPPI, 2008).

$$RMSPD = 100 \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\hat{y}_i - y_i}{y_i} \right)^2} \quad \text{Eq. 1}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad \text{Eq. 2}$$

where n is the number of samples and \hat{y}_i and y_i are the predicted and the reference value for i th sample, respectively.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Characterization of cocoa bean samples

The 81 samples of cocoa beans that comprised the dataset of this study, presented a wide range of variation for most of the measured parameters (Table 1). This compositional variability was obtained due to the fact that cocoa beans from different producing regions were sampled over the period of one year. This variability is crucial for the calibration models to exhibit good predictive ability for different samples and across the concentration range, including as much information as possible about the composition and interferences naturally occurring in the samples. The lowest dispersion (in terms of the coefficient of variation) was observed for the concentration of protein and fat contents, but as will be discussed below, this variability was sufficient for constructing the multivariate calibration models.

Table 1. Descriptive statistics (mean and standard deviation) for the compositional parameters of cocoa bean samples.

Parameters	Mean	Range	SD	CV(%)
Moisture (%)	7.7	6.0-10.3	0.8	10.7
pH	5.3	4.4-5.9	0.3	5.9
Acidity (%)	1.1	0.7-2.1	0.3	24.1
Fat (%)	44.8	41.0-48.7	1.3	2.9
Shell (%)	13.6	10.3-17.3	1.4	10.3
Protein (%)	15.0	13.8-16.0	0.5	3.1
Total phenolic (%)	5.4	3.0-7.9	1.3	23.1
Caffeine (%)	0.14	0.04-0.26	0.04	28.6
Theobromine (%)	1.1	0.8-1.5	0.1	11.0

SD: standard deviation calculated for the set of samples

CV: coefficient of variation calculated for the set of samples used for the multivariate calibration.

4.3.2 Partial Least Square Regression Modeling

Nine PLS models were built to correlate the quality parameters (moisture, pH, acidity, shell content, total lipid, protein, total phenolic content, caffeine and theobromine) with near infrared diffuse reflectance spectra acquired in the range from 10000 to 4020 cm^{-1} (Figure 1).

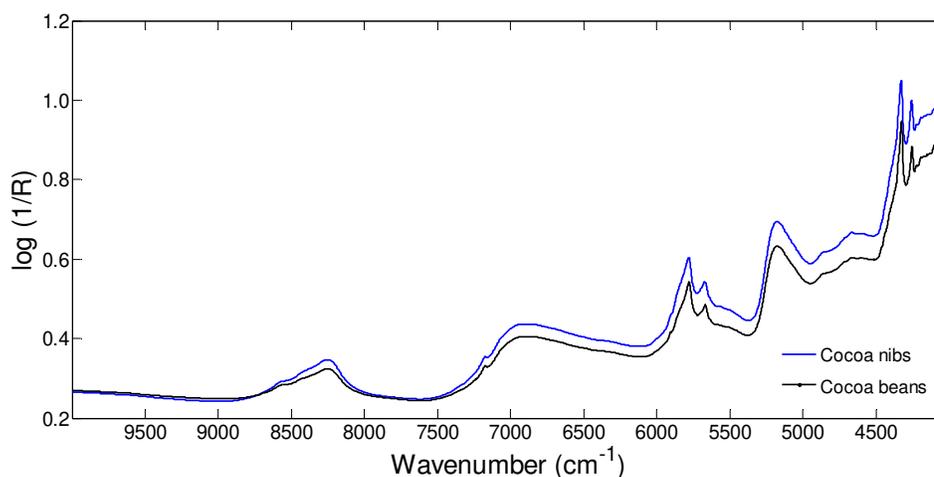


Figure 1. NIR spectra (mean) of cocoa beans and cocoa nibs.

Table 2. Pre-treatments and selected variables for the construction of the PLS models.

Parameter	Pre-treatment	Outliers (X)	Outliers (y)	Variable selection	Wavenumber region (cm ⁻¹)
Moisture	1d (15,2,1)	1	-	iPLS	5998-5800, 5598-5400
pH	MSC	-	-	none	10000-4020
Acidity	SNV	-	-	none	10000-4020
Fat content	1d (15,2,1)	1	1	iPLS	5621-5423, 5223-4826
Shell content	1d (15,2,1)	1	2	iPLS	6815-6020, 5820-5622, 4825-4627
Protein	MSC	1	1	iPLS	5820-5423, 5024-4826
Total phenolic	MSC	3	-	iPLS	10000-9602, 7412-7214, 6019-5821, 4626-4428
Caffeine	MSC	1	1	VIP scores	4500-4020
Theobromine	MSC	1	1	VIP scores	4500-4020

1d (width, order, deriv): Savitzky Golay smoothing and differentiation method that employs the following parameters: width, number of points in filter; order, polynomial order; and deriv., derivative order. MSC: multiplicative signal correction. SNV: Standard Normal Variate. iPLS: interval Partial Least Squares. VIP: Variable Importance in Projection.

The spectral region to be included in the calibration procedure for each analyte was chosen by variable selection methods (Table 2). For pH and acidity, the models with the best performance were obtained using the full range of wavenumbers (10000-4020 cm⁻¹), while for the other parameters it was necessary to select variables for inclusion in the model. In every case - with the exception of theobromine and caffeine - the use of iPLS resulted in calibration models with lower errors of cross-validation (RMSECV) and prediction (RMSEP). For the concentrations of theobromine and caffeine, the same spectral region (4500-4020 cm⁻¹) was selected through the VIP score graphs shown (Figure 2), which is reasonable, since these two molecules differ only by an additional methyl group in the structure of caffeine.

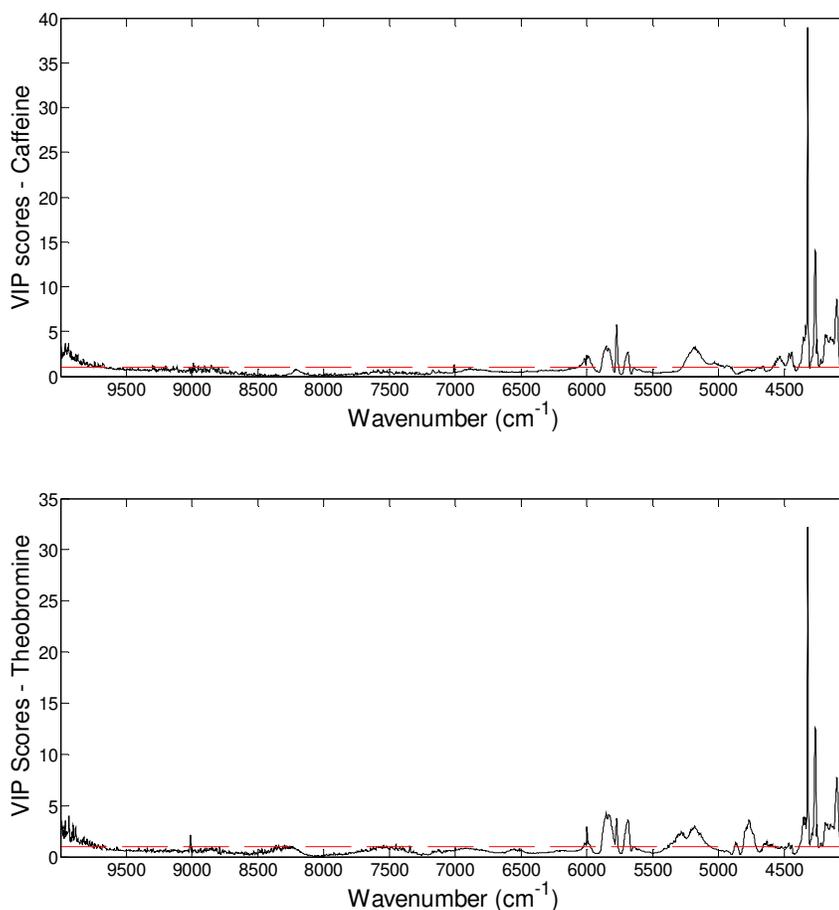


Figure 2. Variable Importance in Projection (VIP) scores graphs for caffeine and theobromine.

The best calibration models were selected based on their prediction ability for the parameters evaluated (Table 3). Thus, we considered the models with better performance those that presented the highest RER and lowest RMSPD values, as well as a satisfactory coefficient of determination (R^2) between the measured values and the values predicted by NIR. For the sake of comparison, the coefficients of variation calculated for the reference methods used are also presented in Table 3.

The calibration models were built by including 4 to 7 latent variables (LV), which is consistent with the literature when it comes to the multivariate calibration of food composition parameters. Probably, this occurs because the parameters analyzed are composed of a mixture of components, which absorbs in different regions of the spectrum. Thus, a larger number of LV need to be added to the model in order to obtain a reasonable percentage of the explained variance of y . For example, the shell content includes indirectly

all compounds that constitute the shell: water, lipids, protein, starch, fiber, ash, theobromine and caffeine (BECKETT, 2009). Veselá et al. (2007) reported calibration models for lipids, nitrogen and moisture in cocoa powder with 3, 7 and 6 LV, respectively. In some cases, the calibration may occur indirectly, when the analyte of interest is correlated in a direct and robust manner with other components of the sample, which also requires a larger number of LV. In this regard, Hue et al. (2014) employed 13 LV in the PLS calibration model for ammonia nitrogen quantification in cocoa beans, which is present in concentrations of approximately 0.02%. Thus, the authors propose the hypothesis that the calibration was obtained indirectly, considering that the degradation of major components during the fermentation of cocoa seeds is linked to the formation of ammonia nitrogen.

Table 3. Performance parameters of the best PLS calibration models obtained.

Parameter	LV	R ²	RMSEC	RMSECV	RMSEP	RER	RMSPD	CV _R (%)
Moisture	4	0.68	0.49	0.65	0.42	10	5.7	1.5
pH	7	0.71	0.14	0.18	0.20	7	3.9	0.7
Acidity	7	0.77	0.13	0.19	0.12	12	10.2	1.9
Fat content	5	0.67	0.61	0.97	1.00	8	2.2	1.1
Shell content	6	0.76	0.50	1.37	0.96	7	6.7	-
Protein	7	0.75	0.23	0.34	0.25	9	1.7	0.8
Total phenolic	6	0.89	0.40	0.63	0.43	12	9.3	4.0
Caffeine	7	0.79	0.01	0.03	0.02	10	18.1	4.5
Theobromine	7	0.77	0.06	0.13	0.06	13	5.2	3.2

LV: number of latent variables; R²: coefficient of determination; RMSEC: root mean square error of calibration; RMSECV: root mean square error of cross validation; RMSEP: root mean square error of prediction; RER: range error ratio (*Range_y* of reference data/RMSEP); RMSPD: percentage of root mean square prediction difference; CV_R: coefficient of variation calculated for the reference method.

In contrast to univariate calibration, it is unusual to obtain coefficients of determination (R²) greater than 0.95 in the multivariate calibration of analytes in complex matrices. Therefore, it can be stated that all of the calibration models showed adequate correlation between the reference values and the values predicted by NIR, as demonstrated by the R² values, which ranged from 0.67 to 0.89, and also by the graphs presented in Figure 3.

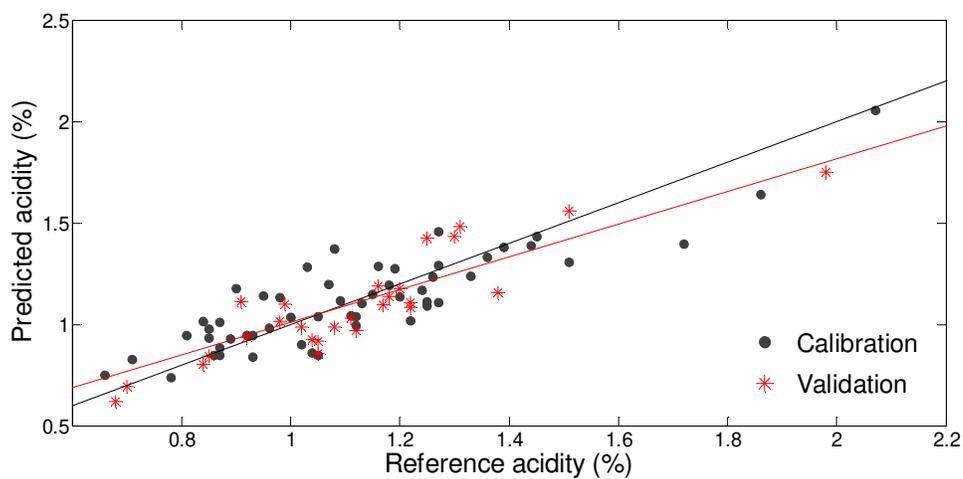
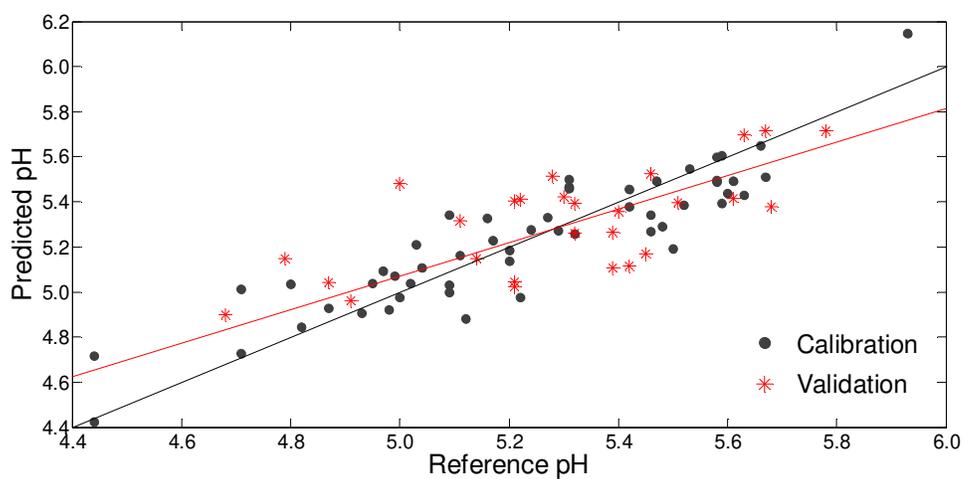
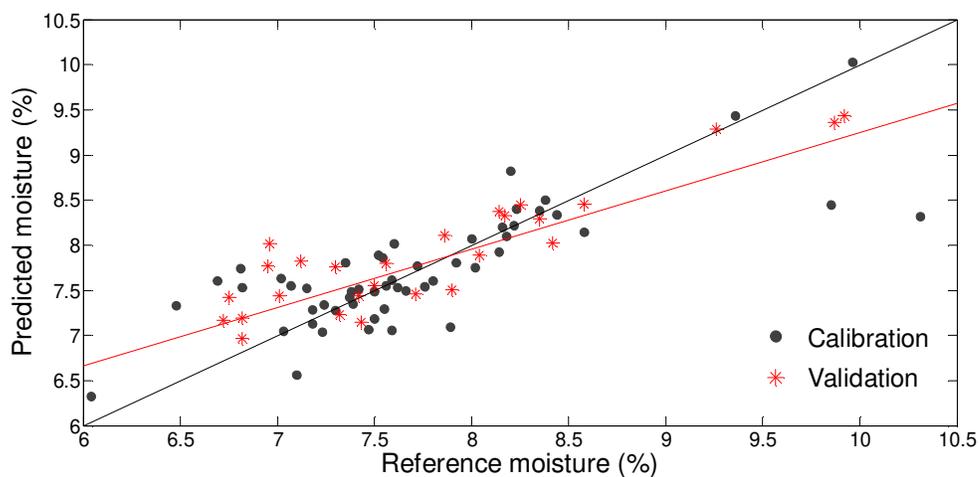


Figure 3. Concentration correlation plots between the PLS models (predicted) and reference results measured by conventional methods.

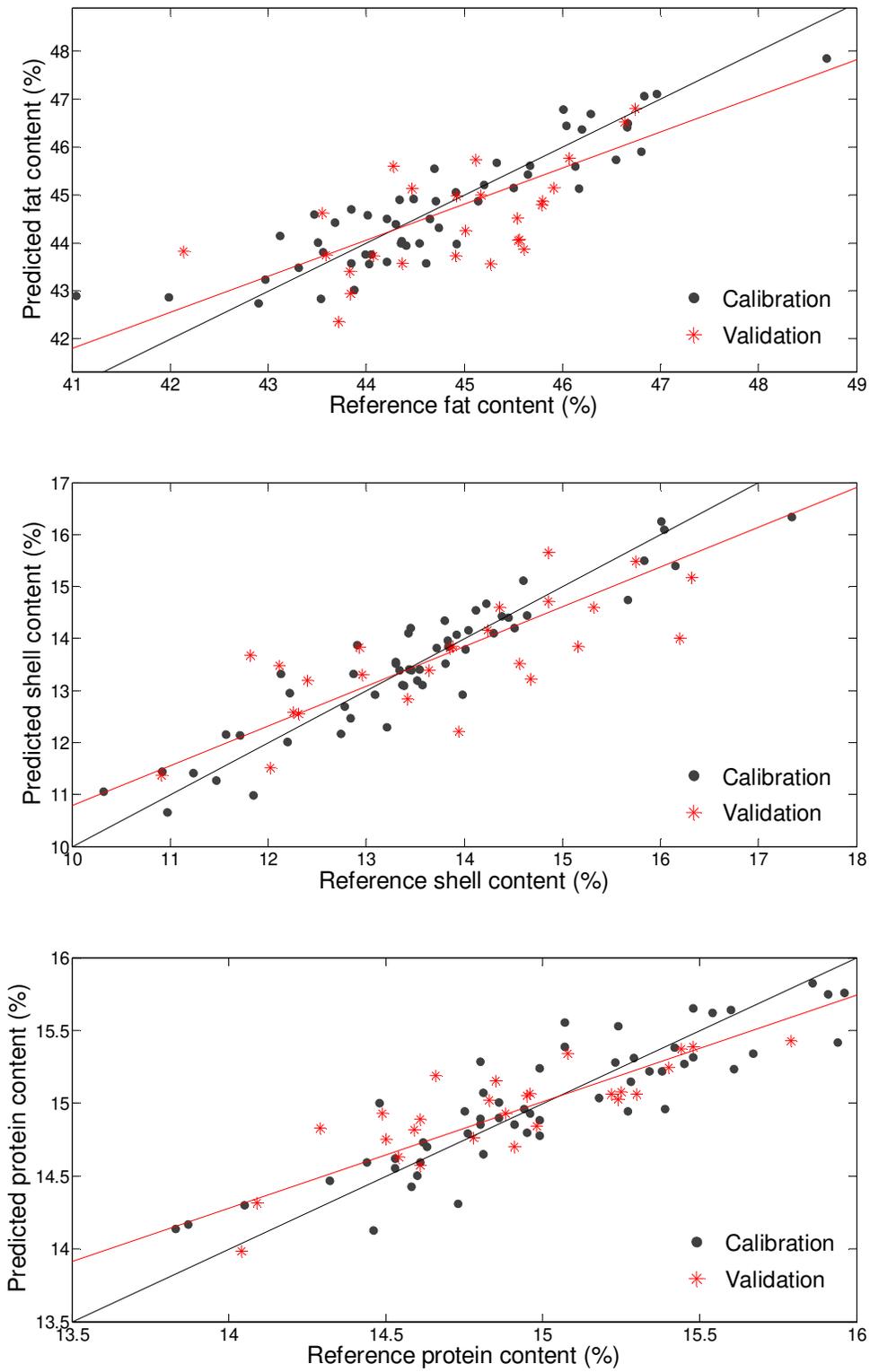


Figure 3 (cont.). Concentration correlation plots between the PLS models (predicted) and reference results measured by conventional methods.

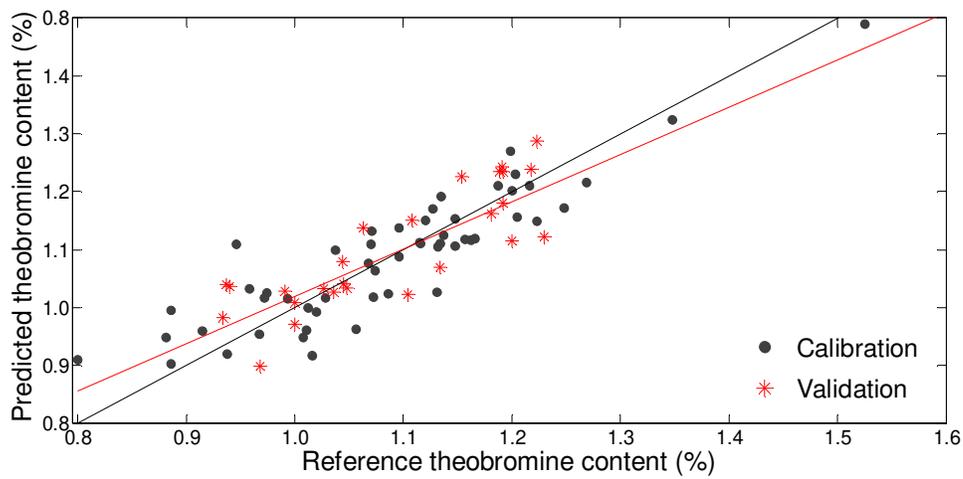
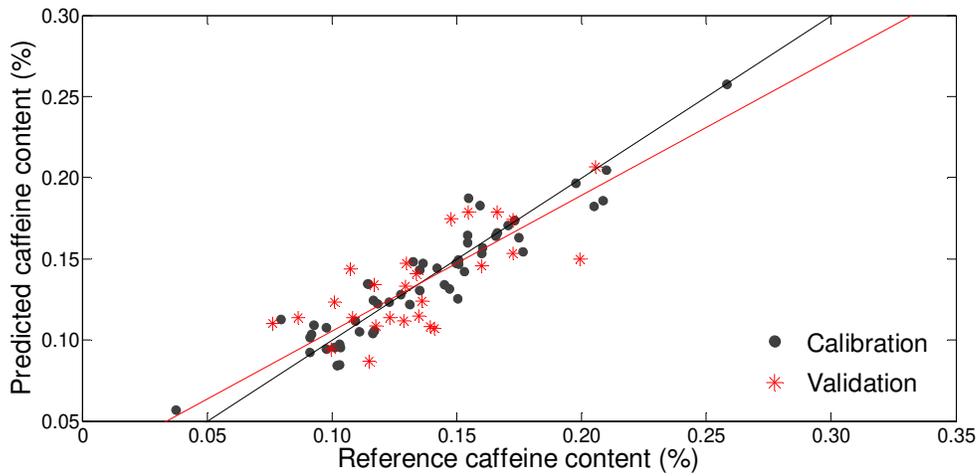
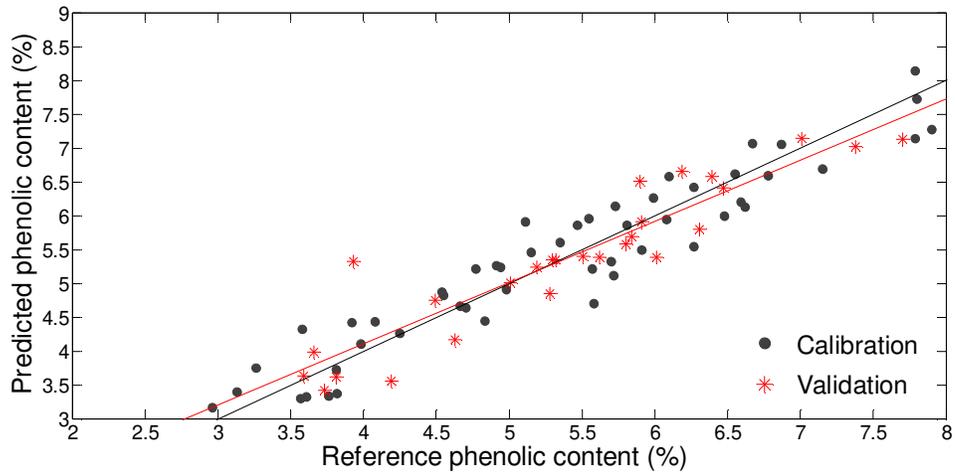


Figure 3 (cont.). Concentration correlation plots between the PLS models (predicted) and reference results measured by conventional methods.

The most important consideration about the performance of a calibration model is its ability to predict the chemical parameters evaluated. Therefore, it is desirable that RMSEC, RMSECV and RMSEP values be as small as possible, with, however, the important condition that they are of the same order of magnitude. Low values of RMSEC associated with high values of RMSEP indicate that overfitting has occurred in the construction of the model, resulting in an excellent fit for the data used in the calibration, but possessing low predictive ability for new samples. According to Table 3, all of the parameters resulted in low values of RMSEC, RMSECV RMSEP, with no evidence of overfitting.

The RMSEP values can be better assessed through the values of RMSPD, which represents the mean relative error of prediction. Thus, the RMSPD values obtained were between 1.7% and 18.1% for protein content and concentration of caffeine, respectively. The larger error associated with the prediction of caffeine concentration is justified by the lower concentration of this analyte in the sample, which ranged from 0.04% to 0.26%, with an average of 0.14%. This concentration range is very close to 0.1%, which is considered the NIR sensitivity limit for quantitative purposes (HUE et al., 2014).

To assess the feasibility of employing NIR as a method of quantification, it is very useful to make a comparison between the values of RMSPD and the values of the coefficient of variation of the reference method (CV_R). Considering that the multivariate calibration models constructed are based on the values measured by the reference methods, it is clear that the errors related to NIR prediction include errors associated with these conventional methods. Therefore, the comparison between RMSPD and CV_R can be used to evaluate whether the multivariate calibration model is suitable for quantifying the parameters of interest. For example, for the quantification of total lipids, the NIR prediction was adequate, since the relative error of prediction is 2.2%, very close to the coefficient of variation of the conventional method (1.1%). In general, for all of the analytes, this comparison between RMSPD and CV_R supports the conclusion that the application of NIR is viable for quantifying these parameters in cocoa beans, especially when considering the complexity of the conventional methods used.

The results discussed up to this point demonstrate the satisfactory performance of NIR associated with chemometrics to predict the parameters of chemical composition in cocoa beans. However, it is important to emphasize that the feasibility of applying the technique depends on the purpose for which the results are intended. To do so, in conjunction with the performance parameters previously discussed, the value of RER, which relates the concentration range of reference values with RMSEP, can also be evaluated. The higher the RER value, the greater the predictive ability of the model, with a calibration model that results in $RER \geq 4$ being considered as qualified for screening calibration. When $RER \geq 10$, the model is acceptable for quality control, and if $RER \geq 15$, the model is very good for research quantification (RAMBO; AMORIM; FERREIRA, 2013). As can be seen in Table 3, the calibration models developed showed RER as between 7 and 13, and thus able for screening calibration (pH, lipids, shell and protein) or for quality control (moisture, acidity, total phenolics, caffeine and theobromine). Despite having presented $RER < 10$, the protein and lipid content parameters are predicted with very low values of RMSPD (2.2% and 1.7%, respectively). In contrast, the calibration model to predict the concentration of caffeine showed RER equal to 10 and RMSPD at 18.1%. This demonstrates the need for joint evaluation of the performance parameters of the calibration model, taking into account the accuracy required.

An overall assessment of the results suggests that the PLS models constructed are satisfactory to predict the compositional parameters evaluated. Some restrictions must be placed in relation to the quantification of caffeine, which can be performed only for purposes of screening. From the point of view of the supply chain of cocoa, NIR technology could successfully be used in the area of production and for the kind of quality control performed in cocoa processing industries. As an example, the determination of moisture, pH, acidity and total phenolics by NIR could be an important tool for controlling the fermentation of cocoa beans in the pre-processing step. Similarly, proximate compositional parameters such as moisture, lipid and protein content could be rapidly determined by the cocoa processors before processing. For these applications, the calculated RMSEP and RMSPD values are acceptable and the results could then be predicted with adequate accuracy.

4.4 Conclusion

The results of this work show the feasibility of the application of NIR in conjunction with chemometrics for the prediction of moisture, pH, acidity, total lipids, shell content, protein, total phenolic compounds and theobromine in cocoa beans. The evaluation of the performance parameters from the PLS models allows us to state that they are applicable for the quality control of this commodity, providing results with the required level of accuracy. By providing the conditions for an analysis with minimal demands for sample preparation and allowing for rapid determination, while avoiding the generation of waste, NIR technology provides an excellent alternative to replace the conventional methods typically used for the quality control of cocoa beans.

REFERENCES

ACULEY, P. C. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 75 n. 6, p. 300-307, 2010.

BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4th ed. United Kingdom: Blackwell Publishing. 2009, 732 p.

CHE MAN, Y. B. et al. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 90, p. 815-819, 2005.

COSTA FILHO, P. A. Rapid determination of sucrose in chocolate mass using near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, p. 206-211, 2009.

DAVIES, A. M. C. et al. Prediction of chocolate quality from near-infrared spectroscopic measurements of the raw cocoa beans. **Vibrational Spectroscopy**, v. 2, p. 161-172, 1991.

EFRAIM, P. et al. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacauero de diferentes genótipos **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n.4, p. 229-236, 2006.

EIGENVECTOR RESEARCH INC. **PLS Toolbox 5.8**. Manson, USA, 2010.

HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Maryland : AOAC, 2006.

- HUE, C. et al. Near infrared spectroscopy as a new tool to determine cocoa fermentation levels through ammonia nitrogen quantification. **Food Chemistry**, v. 148, p. 240–245, 2014.
- KENNARD, R.W.; STONE, L. A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11(1), p. 137–148, 1969.
- MARTENS, H; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York, NY: John Wiley, 1989. 419 p.
- PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n.2, p. 198-219, 2003.
- RAMBO, M.K.D; AMORIM, E.P.; FERREIRA, M.M.C. Potential of visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics for analysis of some constituents of coffee and banana residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 775, p. 41-49, 2013.
- RISNER, C.H.; “Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, cafferine, and (-)-epicatechin in Standard Reference Material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter”. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 892-899, 2008.
- SUN, D. (ed.). **Infrared spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Elsevier/Academic, 2009. 424 p.
- SVENSTRUP, G.; HEIMDAL, H.; NØRGAARD, L. Rapid instrumental methods and chemometrics for the determination of pre-crystallization in chocolate. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 953-962, 2005.
- TEYE, E. et al. Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 183–189, 2013.
- TEYE, E. et al. Feasibility study on the use of Fourier transform near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate and quantify adulteration in cocoa beans. **Food Research International**, v. 55, p. 288-293, 2014.
- THE MATH WORKS INC. **Matlab 7.8**. Natick, USA, 2009.
- TREVISAN, M.G.; POPPI, R.J. Direct determination of ephedrine intermediate in a biotransformation reaction using infrared spectroscopy and PLS. **Talanta**, v. 75, p. 1021-1027, 2008.
- VESELÁ, A. et al. Infrared spectroscopy and outer product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. **Analytica Chimica Acta**, v. 601, p. 77-86, 2007.
- WISE, B. M. et al. **Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo**. Eigenvector Research, Inc. 2006. 414 p.

CONCLUSÃO GERAL

A ampla abordagem a respeito da qualidade de amêndoas de cacau permitiu reconhecer deficiências nesta cadeia produtiva no que se refere ao fornecimento de produtos padronizados e de qualidade reconhecida. Uma das principais limitações identificadas consiste na falta de métodos objetivos e harmonizados para a classificação de lotes comerciais, os quais permitiriam a identificação de amêndoas de cacau com qualidade superior e, portanto, tornariam viável um sistema de remuneração de acordo com a qualidade. Assim, o uso de novas ferramentas para o monitoramento da qualidade de amêndoas de cacau durante as diversas etapas do processamento é recomendado para que sejam aprimoradas e atendidas as especificações do mercado interno e externo.

A caracterização física e química de um grande número de amostras de amêndoas de cacau de diferentes estados brasileiros forneceu informações atualmente não disponíveis na literatura e que serão muito úteis para caracterizar e acompanhar as mudanças da cacauicultura brasileira. Como diferencial, os resultados mostraram que cacau brasileiro não é sinônimo de cacau da Bahia e que mudanças significativas podem ocorrer no que diz respeito às características tecnológicas e sensoriais na medida em que outros estados continuarem a aumentar a sua participação no mercado.

A avaliação sensorial dos chocolates elaborados a partir das amêndoas de cacau de origens distintas mostrou diferenças significativas entre as amostras, as quais foram identificadas pela equipe de assessores treinados e também pelo grupo de consumidores. De forma geral, as diferenças sensoriais puderam ser explicadas pelas variações na composição química das amêndoas de cacau utilizadas no processamento dos chocolates. Quanto à caracterização das manteigas de cacau, verificou-se que a consideração geral de que a manteiga de cacau produzida no Brasil é mais macia que a produzida em outros países e necessita ser utilizada em *blends* deve ser restrita àquelas produzidas na Bahia e no Espírito Santo. Ainda, as características de composição e perfil de sólidos das manteigas de cacau provenientes da Bahia e do Pará indicaram a viabilidade da formulação de *blends* para a obtenção de características adequadas para o uso em regiões de clima tropical. Essas informações, anteriormente não disponíveis na literatura, são relevantes para a adaptação

do pré-processamento nas fazendas e dos processos tecnológicos nas indústrias de acordo com as características das matérias primas, o que possibilita a obtenção de produtos uniformes ou, até mesmo, a elaboração de chocolates com características próprias e diferenciadas, visando o segmento de mercado de chocolates de origem única.

A Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) mostrou-se uma importante ferramenta para o controle de qualidade de amêndoas de cacau, permitindo a análise com condições de mínimo preparo de amostra, não geração de resíduos, rapidez e fornecimento simultâneo de resultados confiáveis para os diversos parâmetros avaliados. As análises por NIR, após o estabelecimento dos modelos de calibração multivariada, requerem apenas o espectrofotômetro de infravermelho próximo e os softwares para a aplicação de quimiometria. Porém, não se pode deixar de citar que o emprego adequado desta técnica exige a manutenção e melhoria contínua dos modelos de calibração, o que envolve a capacitação dos colaboradores e apoio de um profissional especializado. De toda forma, a infraestrutura e os investimentos requeridos são consideravelmente inferiores aos exigidos pelos métodos convencionais utilizados para a determinação dos mesmos parâmetros de qualidade. Como exemplo, as análises que constam nesta pesquisa envolveram o teste e a utilização de diferentes métodos analíticos, incluindo análises clássicas para a determinação de parâmetros de composição, técnicas espectrofotométricas e cromatográficas com diversos detectores. Para tal, muitas parcerias foram realizadas para possibilitar o acesso aos diferentes equipamentos e conhecimentos necessários para a execução da pesquisa. Por fim, as ferramentas quimiométricas foram fundamentais para o tratamento e visualização dos dados, permitindo interpretações e conclusões que não são viáveis pela aplicação da análise univariada.

ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP



CEP, 24/04/12.
(PARECER CEP: N° 705/2011)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE CACAU APLICADOS À IDENTIFICAÇÃO DE VARIEDADES PROMISSORAS QUANTO À QUALIDADE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Adriana Reis de Andrade Silva

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o adendo que inclui o projeto “PROPOSTA DE UM PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE CACAU E DERIVADOS: APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA”, com a finalidade de doutorado da aluna Juliana Campos Hashimoto e acrescenta seis amostras de amêndoas de cacau secas e fermentadas do Pará, Bahia, Amazonas, Rondônia, Espírito Santo e da Costa do Mafim, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de abril de 2012.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP