



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DA ADIÇÃO DE AMÊNDOAS DE CACAU SUB-FERMENTADAS NA
ELABORAÇÃO DE CHOCOLATES INTENSOS: ACEITAÇÃO SENSORIAL E
ESTUDO DO PERFIL DE VOLÁTEIS**

AURORA BRITTO DE ANDRADE

SALVADOR

2020

AURORA BRITTO DE ANDRADE

**EFEITO DA ADIÇÃO DE AMÊNDOAS DE CACAU SUB-FERMENTADAS NA
ELABORAÇÃO DE CHOCOLATES INTENSOS: ACEITAÇÃO SENSORIAL E
ESTUDO DO PERFIL DE VOLÁTEIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliete da Silva Bispo

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Oliveira de Souza

SALVADOR

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, Saionara, Ubirajara e Breno, por todo incentivo, apoio incondicional e assistência durante todo o período do mestrado. Eu amo vocês!

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Eliete Bispo, por me escolher para ser sua orientanda, pela confiança depositada e ensinamentos. Sou grata por ter sido sua aluna.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Carolina Oliveira, por todos os ensinamentos e amparo nos percalços do mestrado. Sabemos que não foram poucos, e por sua ajuda sou grata.

Aos professores, Dr.^a Janice Druzian, Dr.^a Lígia Santana e Dr. Sergio Soares, por suas respectivas colaborações.

As minhas queridas amigas, Weena Damasceno, Rebeca Reis, Rita de Cássia e Geiseane Santos, por estarem comigo em mais uma jornada, apoiando minhas decisões e celebrando minhas conquistas.

À Margarida Lins e Fernanda Oliveira, minhas amigas e parceiras de pesquisa, por todos os momentos vividos, dentro e fora da universidade, pelas dificuldades compartilhadas e por todo apoio.

À M.^a Janaína Alves e Dr. Leonardo Maciel, pela amizade construída e por serem sempre tão solícitos comigo.

À M.^a Calionara de Melo, pelos conselhos e disponibilidade em sanar minhas dúvidas, quanto a análise de voláteis.

À Maria Eduarda, por sua essencial ajuda na correção da gramática inglesa do artigo.

Ao M.e Ivo Andrade, pela amizade e por toda sua ajuda e apoio durante a reta final do mestrado e submissão do artigo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade do mestrado em Ciência de Alimentos.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente tornaram essa conquista possível.

RESUMO

O chocolate é um alimento mundialmente apreciado pelos consumidores, devido ao seu sabor único e propriedades benéficas à saúde. Essas propriedades pró-saúde são ocasionadas pela presença de compostos fenólicos nas sementes de cacau, que durante o processamento são reduzidos. A etapa de fermentação é a principal responsável pela perda de fenólicos, pois está diretamente relacionada com a formação dos precursores de sabor. Todavia, amêndoas de cacau sub-fermentadas têm uma concentração mais alta de compostos fenólicos e alguns precursores já formados. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da adição de massa de cacau sub-fermentada (SCM) nas características sensoriais e no perfil volátil durante o processamento. O processo fermentativo a 48 horas para obtenção de amêndoas sub-fermentadas e 144 horas para amêndoas completamente fermentadas demonstrou-se adequado. O teste de corte e índice de fermentação comprovaram a qualidade das amêndoas obtidas. Em geral, as amostras de chocolate que continham maior concentração de SCM apresentaram menores escores para o atributo sabor, devido ao amargor e adstringência. A maior aceitação positiva foi observada em amostras com proporções de 80 % e 65 % de massa de cacau completamente fermentada (CFM). Um total de sessenta compostos diferentes - ésteres (14), álcoois (8), pirazinas (8), cetonas (7), furanos, furonas, piranos e piranonas (6), ácidos (5), aldeídos (4), pirroles (3), álcoois terpênicos (3) e, outros (2) - foram identificados por HS-SPME-GC-MS. As análises de PCA demonstraram que o perfil dos compostos voláteis foi influenciado pelo processo de fermentação, refletindo satisfatoriamente na qualidade do chocolate.

Palavras-chave: fermentação do cacau, HS-SPME-GC-MS, perfil de composto volátil, qualidade do chocolate, aceitação sensorial.

ABSTRACT

Chocolate is a food worldwide appreciated by consumers, due to its unique flavor and beneficial health properties. These pro-health properties are caused by the presence of phenolic compounds in cocoa beans, which during processing are reduced. The fermentation stage is mainly responsible for the loss of phenolics, as it is directly related to the formation of flavor precursors. However, the sub-fermented cocoa beans have a higher concentration of phenolic compounds and some precursors already formed. Therefore, the objective of this work was to investigate the effect of adding sub-fermented cocoa mass (SCM) on the sensory characteristics and volatile profile during the processing. The 48-hour fermentation process for obtaining sub-fermented cocoa beans and 144 hours for completely fermented cocoa beans showed to be adequate. The cut test and fermentation index proved the quality of the obtained cocoa beans. In general, the chocolate samples that contained the highest concentration of SCM had lower scores for the flavor attribute, due to bitterness and astringency. The greatest positive acceptance was observed in samples with proportions of 80 % and 65 % of completely fermented cocoa mass (CFM). A total of sixty different compounds - esters (14), alcohols (8), pyrazines (8), ketones (7), furans, furones, pyranones and pyranones (6), acids (5), aldehydes (4), pyrroles (3), terpenic alcohols (3) and others (2) - were identified by HS-SPME-GC-MS. The PCA analyzes showed that the profile of volatile compounds was influenced by the fermentation process, reflecting satisfactorily on the quality of the chocolate.

Keywords: cocoa fermentation, HS-SPME-GC-MS, volatile compound profile, chocolate quality, sensory acceptance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processamento do cacau	14
Figura 2 - Semente de cacau.....	15
Figura 3 - Processo de transformação da semente de cacau em amêndoa	16
Figura 4 - Processamento das amêndoas e elaboração do chocolate.....	18
Figura 5 - Amêndoa de cacau torrada com casca, sem casca e nibs de cacau.....	19
Figura 6 - Temperagem do chocolate	24
Figura 7 - Esquema simplificado do sistema HS-SPME-CG-EM.....	27
Figure 1 - Evolution of temperature, pH and total acidity during the fermentation time of sub-fermented cocoa beans.....	45
Figure 2 - Frequency (%) of scores assigned to the chocolate samples in relation to acceptance, just-about-right scale and purchase intention.....	50
Figure 3 - Internal preference mapping obtained with the results of the overall acceptability of the chocolates produced.....	51
Figure 4 - Total relative concentration of major classes of volatile compounds identified by HS-SPME-GC-MS from different process stages.....	56
Figure 5 - Principal component analysis.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfos da manteiga de cacau e seus respectivos pontos de fusão	21
Table 1 - List of identifiers cocoa nibs and chocolate samples with the independent variables obtained from the simplex planning.....	42
Table 2 - Physical and physical-chemical characterization of dry fermented cocoa beans	47
Table 3 - Averages of acceptance test, just-about-right scale of bitter and astringency parameters and purchase intention of chocolates produced	49
Table 4 - Volatile compounds identified by Headspace-Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS) during different fermentation time, in roasted cocoa beans (nibs) and chocolate samples.....	53

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVO GERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
CAPÍTULO 1	12
1. CHOCOLATE	12
1.1. TIPOS DE CHOCOLATES	12
1.2. PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO CHOCOLATE NO BRASIL	13
2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS AMÊNDOAS DE CACAU	13
2.1. COLHEITA E QUEBRA DOS FRUTOS	14
2.2. FERMENTAÇÃO	15
2.3. SECAGEM.....	17
3. PROCESSAMENTO DAS AMÊNDOAS E ELABORAÇÃO DOS CHOCOLATES.	18
3.1. TORREFAÇÃO	19
3.2. DESCASCAMENTO E TRITURAÇÃO.....	19
3.3. MOAGEM.....	20
3.4. MISTURA DOS INGREDIENTES	20
3.4.1. Massa de cacau	20
3.4.2. Manteiga de cacau	20
3.4.3. Açúcar	22
3.4.4. Emulsificante	22
3.5. REFINO.....	22
3.6. CONCHAGEM.....	22
3.7. TEMPERAGEM.....	23
3.8. MOLDAGEM/ RESFRIAMENTO/ DESMOLDAGEM/ EMBALAGEM.....	24
4. COMPOSTOS FENÓLICOS	25
5. FORMAÇÃO DE SABOR DURANTE O PROCESSAMENTO	25
6. ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	26
7. ANÁLISE SENSORIAL	28

7.1. TESTE DE ACEITAÇÃO.....	28
7.2. TESTE <i>JUST-ABOUT-RIGHT</i>	28
7.3. TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
CAPITULO 2.....	37
ABSTRACT.....	38
1. INTRODUCTION.....	38
2. MATERIALS AND METHODS.....	40
2.1. RAW MATERIAL.....	40
2.2. FERMENTATION AND DRYING PROCESSES.....	40
2.3. CUT TEST.....	41
2.4. FERMENTATION INDEX.....	41
2.5. COCOA AND CHOCOLATE PROCESSING.....	41
2.6. SENSORY EVALUATION OF CHOCOLATES.....	42
2.7. ANALYSIS OF VOLATILES.....	43
2.7.1. Extraction of volatile compounds.....	43
2.7.2. Separation and Identification of volatile compounds.....	43
2.8. STATISTICAL ANALYSIS.....	44
3. RESULTS AND DISCUSSIONS.....	44
3.1. PHYSICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF COCOA BEANS.....	44
3.2. SENSORY EVALUATION OF CHOCOLATES.....	48
3.3. VOLATILES COMPOUNDS.....	52
3.3.1. Relative concentration of volatile compounds.....	52
3.3.2. Concentration of acids.....	56
3.3.3. Concentration of alcohols.....	57
3.3.4. Concentration of aldehydes and ketones.....	57
3.3.5. Concentration of esters.....	58

3.3.6. Concentration of pyrazines.....	58
3.3.7. Concentration of others.....	59
3.4. VOLATILE COMPOUNDS PROFILE	59
4. CONCLUSION.....	62
ACKNOWLEDGMENTS.....	63
5. REFERENCES.....	64

INTRODUÇÃO

O chocolate é um alimento mundialmente apreciado pelos consumidores, obtido através do processamento do cacau (*Theobroma cacao L.*) com adição de outros ingredientes como açúcar, manteiga de cacau, lecitina de soja e leite (dependendo do tipo de chocolate) (LIU *et al.*, 2015). O chocolate tem um sabor distinto com notas específicas relacionadas ao genótipo das sementes de cacau, às condições de crescimento e aos fatores de processamento (AFOAKWA *et al.*, 2008).

O processamento do cacau compreende uma série de transformações para produtos de chocolate por meio de etapas de pré-processamento ou beneficiamento (colheita, fermentação e secagem); processamento das amêndoas de cacau, por meio das etapas de limpeza, torrefação, descascamento e trituração, para obtenção dos nibs; moagem para obtenção do líquido de cacau e; prensagem, para obtenção da manteiga de cacau e cacau em pó. O processo tecnológico para elaboração dos chocolates compreende as etapas de mistura dos ingredientes, refino, conchagem, temperagem, moldagem, resfriamento, desmoldagem e embalagem (BECKETT, 2009; CRAFACK *et al.* 2014; ASCRIZZI *et al.*, 2017; BEG *et al.*, 2017).

As amêndoas de cacau têm sido alvo de diversas pesquisas científicas, devido aos potenciais benefícios à saúde cardiovascular, proteções antioxidantes além de auxiliar no equilíbrio do colesterol no organismo (OTHMAN *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2017). Essas propriedades pró-saúde são ocasionadas pela presença natural de compostos fenólicos (flavonóides, metilxantinas, epicatequina e antocianinas), muitas vezes responsáveis por conferir sabor amargo e adstringente da semente de cacau crua ao chocolate (BATISTA *et al.*, 2016; URBAŃSKA; KOWALSKA, 2019).

Todavia, durante o processamento das sementes, o teor de compostos fenólicos é reduzido e, as maiores perdas ocorrem nas etapas de fermentação e secagem (EFRAIM *et al.*, 2010; KONGOR *et al.*, 2016; ALBERTINI *et al.*, 2015) devido a formação dos precursores de aroma e sabor (aminoácidos livres e açúcares redutores), que dão origem aos produtos da reação de Maillard e degradação de Strecker, responsáveis pelo perfil de sabor formado durante a torrefação. A torrefação, por sua vez, é caracterizada pela formação de vários aldeídos, cetonas, pirazinas, pirroles e piradinas, entre outros (AFOAKWA *et al.*, 2008; APROTOSOAIÉ; LUCA; MIRON, 2016). Por este motivo, novas condições de processo para obtenção das amêndoas estão sendo estudadas para possibilitar a manutenção dos compostos fenólicos nos produtos derivados de cacau, como o chocolate (EFRAIM *et al.*, 2010).

As amêndoas de cacau sub-fermentadas (índice de fermentação de 0,7), obtidas com 48 horas de fermentação, possuem alguns dos compostos voláteis já formados (MOREIRA *et al.* 2018), alguns precursores de sabor e alto teor de compostos fenólicos, pois não sofreram fermentação completa. Por esta razão, as amêndoas sub-fermentadas podem aumentar a concentração de compostos antioxidantes, mas também podem conferir um sabor amargo e adstringente, afetando gravemente as características, além de modificar o perfil volátil dos chocolates. Sendo assim, o presente projeto propõe estudar a influência do uso de amêndoas de cacau sub-fermentadas na caracterização e elaboração de chocolates.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Produzir chocolates intensos com potencial funcional a partir da adição de amêndoas de cacau sub-fermentadas à massa de cacau completamente fermentada, além de analisar a influência destas nas características sensoriais dos chocolates e no perfil volátil, durante o processamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar o processo de fermentação das sementes de cacau, através das mediadas de pH, temperatura e acidez total;
- Avaliar a qualidade das amêndoas fermentadas e secas, através dos testes de corte e índice de fermentação;
- Produzir chocolates a partir das misturas de amêndoas sub-fermentadas e completamente fermentadas;
- Realizar análise sensorial através dos testes: *just-about-right* para os parâmetros de amargor e adstringência e, aceitação e intenção de compra;
- Separar e identificar compostos voláteis provenientes dos processos de fermentação e torrefação e nos chocolates produzidos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CHOCOLATE

De acordo com a legislação brasileira o chocolate pode ser definido como o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao L.*), massa (ou pasta ou líquido) de cacau, cacau em pó e/ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo 25 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau (BRASIL, 2005).

Um chocolate de boa qualidade deve possuir uma superfície dura e quebradiça, com bom brilho, na temperatura de 20 a 25°C (*snap*). O chocolate deve fundir rápido e completamente na boca, proporcionando rápido desprendimento de aromas. Não deve apresentar sabor residual ceroso e nem sensação de arenosidade (LUCCAS, 2001).

Em 2017 a Comissão de Desenvolvimento Econômico, Indústria, Comércio e Serviço (CDEICS) aprovou a proposta que fixa o percentual mínimo de 27 % (g/ 100 g) de sólidos totais de cacau nos chocolates e seus derivados, nacionais e importados, comercializados em todo o território nacional. Esta mudança visou adotar os parâmetros utilizados pela União Europeia, onde diversos países são reconhecidos pela excelência na produção de chocolates. A proposta aprovada estabeleceu 10 anos de prazo para as indústrias produtoras de chocolate se adequarem ao novo percentual (HAJE; ARAÚJO, 2017). Tal proposta também estabeleceu percentuais mínimos de cacau para cada tipo de chocolate e para seus derivados.

1.1. TIPOS DE CHOCOLATES

Os tipos de chocolates mais comuns são o amargo ou meio-amargo, também conhecido como chocolate intenso, ao leite e o branco. Os chocolates amargo ou meio-amargo têm como ingredientes principais o líquido de cacau, manteiga de cacau e açúcar. O chocolate ao leite é produzido a partir do líquido de cacau, manteiga de cacau, açúcar e sólidos de leite, enquanto que o chocolate branco é composto por manteiga de cacau, sólidos de leite e açúcar (MDCLEMENTS, 2007). Além de alguns ingredientes, os chocolates também se diferenciam em virtude do teor de cacau e manteiga de cacau utilizados (GLICERINA *et al*, 2016; KONAR *et al*, 2016). Segundo a nova proposta aceita pela CDEICS, os chocolates e derivados do cacau devem:

Chocolate ao leite: conter o mínimo de 27 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau e outros ingredientes, e o mínimo de 14 % (g/100 g) de sólidos totais de

leite oriundo da evaporação parcial ou total de leite inteiro, de leite parcial ou totalmente desnatado, de nata parcial ou totalmente desidratada, de manteiga ou de matéria gorda láctea e outros derivados de leite;

Chocolate amargo ou meio amargo: conter o mínimo de 35 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau, dos quais ao menos 18 % (g/100 g) devem ser de matéria gorda de cacau, proveniente da manteiga de cacau e da massa de cacau e outros ingredientes, e 14 % (g/100 g) devem ser de sólidos totais de cacau isento de gordura;

Chocolate branco: conter o mínimo de 20 % (g/100 g) de sólidos totais de manteiga de cacau e o mínimo de 14 % (g/100 g) de sólidos totais de leite e derivados;

Chocolate em pó: produto obtido pela mistura de açúcar ou adoçante com cacau em pó, deve conter o mínimo de 32 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau (HAJE; ARAÚJO, 2017).

1.2. PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO CHOCOLATE NO BRASIL

A preferência por chocolates intensos em relação ao chocolate ao leite, devido à vantagem para a saúde, aumenta a demanda por cacau (BEG *et al.*, 2017). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil é o sétimo país exportador de cacau no mundo, com 90 % da produção nacional concentrada nos estados da Bahia e do Pará. A agregação de valor do cacau supera 2.000 % desde a amêndoa até o chocolate, e a cadeia produtiva movimentou R\$ 20 bilhões no território nacional (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL, 2020).

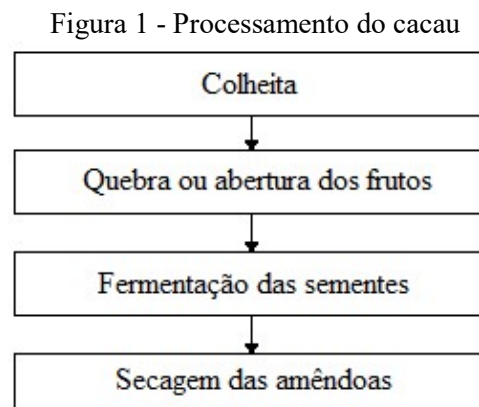
De acordo com o último balanço da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB), o Brasil é o quinto país em volume de vendas de chocolate na categoria de varejo. No ano de 2019, o Brasil teve uma produção de 756 mil toneladas, com queda de 3,1 % em comparação ao ano de 2018, com consumo aparente de 749 mil toneladas, exportou 28 mil toneladas, gerando receita de US\$ 104 milhões, e importou 20 mil toneladas (ABICAB, 2020).

2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS AMÊNDOAS DE CACAU

O cacauíeiro pertence à ordem Malvales, família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao L.*, única utilizada comercialmente para a produção de chocolate (EFRAIM, 2009; CRUZ, 2012; LEITE, 2012). As espécies de *Theobroma cacao L.* são caracterizadas por uma enorme diversidade genética (BARTLEY, 2005). As três principais variedades reconhecidas são Criollo (cacau aromático de sabor suave e baixo amargor), Forastero (cacau a granel de sabor forte e ácido) e, Trinitário (espécie híbrida com características intermediárias) (QIN *et al.*, 2016). No entanto, pesquisas realizadas em 2008 na América Latina sugeriram uma nova classificação com mais precisão da diversidade genética do germoplasma de cacau. Por

meio da nova classificação, foram identificados dez grandes grupos: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nant, Contamana, Amenolado, Purús, Nacional e Gulana (MOTAMAYOR *et al.*, 2008; AFOAKWA, 2016).

O processamento do cacau compreende uma série de transformações para produtos de chocolate por meio de etapas de pré-processamento ou beneficiamento do cacau, processamento das amêndoas e elaboração dos chocolates (CRAFACK *et al.* 2014). O processamento do cacau é caracterizado pelas etapas de colheita, quebra ou abertura dos frutos, seguido da fermentação e secagem. Essas etapas são importantes para garantir a qualidade das amêndoas, que, por sua vez, depende de muitos fatores como a variedade do cacauzeiro, manejo agrônômico, fatores do solo, condições climáticas, e a tecnologia pós-colheita (KONGOR *et al.*, 2016). O fluxograma de processamento do cacau para obtenção das amêndoas está apresentado na Figura 1.



Fonte: BECKETT (2009).

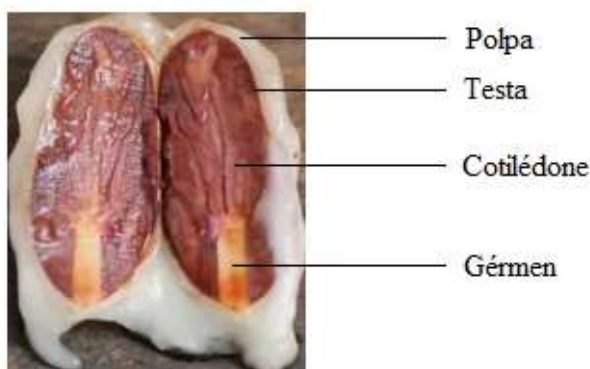
2.1. COLHEITA E QUEBRA DOS FRUTOS

A colheita do cacau é a fase inicial do beneficiamento e deve ser realizada quando os frutos apresentarem ponto ideal de maturação. No Brasil o cacau é colhido praticamente durante o ano inteiro, distinguindo-se dois períodos de safra: o principal de outubro a janeiro e o secundário de maio a agosto. O cacau proveniente do segundo período de safra é conhecido como cacau temporão (CRUZ, 2002). O cacau colhido é disposto em montes para posterior quebra e obtenção das sementes frescas (Figura 2).

O intervalo de tempo para quebra dos frutos é de 2 a 3 dias em relação à colheita, pois este período facilita a separação das sementes da casca (CRUZ, 2012). A quebra deve ser realizada com auxílio de um cutelo ou faca longa (NETO, 2001). As sementes frescas são envolvidas por uma polpa mucilaginosa (branca e doce) que representa 40 % da semente em

peso úmido (SCHWAN; WHEALS, 2004; RORIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2012). Após a quebra, as sementes juntamente com a polpa aderida devem ser submetidas imediatamente a fermentação. Sementes provenientes de quebras em dias diferentes não devem ser fermentadas juntas, pois isso conduz a uma fermentação desigual (BECKETT, 1994; DEUS, 2015).

Figura 2 - Semente de cacau



Fonte: Adaptada de Google imagens (2020).

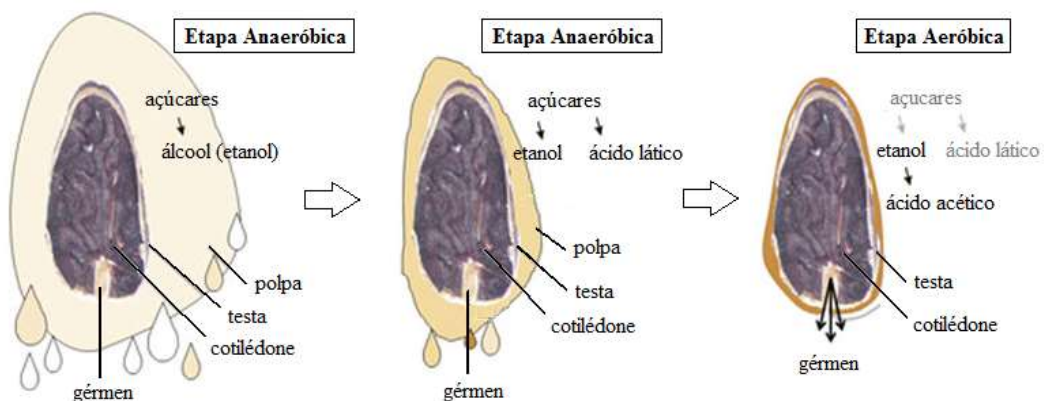
2.2. FERMENTAÇÃO

Processo de fermentação é uma etapa crítica que determina a qualidade do cacau e desenvolve os precursores de sabor do chocolate. Normalmente, esse processo ocorre espontaneamente através da inoculação da polpa com microrganismos (leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético) naturalmente presentes na superfície das vagens de cacau, mãos de trabalhadores, ferramentas, recipientes de fermentação e insetos (JESPERSEN *et al.*, 2005). Os principais microrganismos encontrados na ecologia microbiana da fermentação de cacau são as leveduras *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus*; bactérias ácidos lácticas como *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* e; bactérias do grupo ácido acéticas como a *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter frateurii* (HO; ZHAO; FLEET, 2014).

As sementes obtidas podem ser colocadas em caixas de madeira, conhecidas como cochos de fermentação, ou amontoadas em pilhas que podem ser cobertas com folhas de bananeira para iniciar a fermentação anaeróbica (BEG *et al.*, 2017). No Brasil, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) recomenda o uso dos cochos de fermentação, que são caixas dotadas de paredes com divisórias removíveis no sentido da maior dimensão, para facilitar o revolvimento da massa em fermentação. O fundo deve conter orifícios para a drenagem dos líquidos liberados durante o processo e aeração da massa (LOPES; GARCÍA; VASCONCELOS, 2003).

Os açúcares presentes na polpa mucilaginosa (glicose, frutose e sacarose) fornecem os substratos necessários para dar início ao processo de fermentação. Devido a sua consistência física, a polpa ocupa os espaços vazios entre as sementes de cacau, tornando o ambiente anaeróbico. Essa condição, juntamente com o baixo pH e o elevado teor de açúcares da polpa, favorecem o desenvolvimento de leveduras, que convertem o açúcar em álcool (Figura 3), ocasionando o aumento da temperatura até cerca de 50°C (SAMPAIO, 2011; DEUS, 2015).

Figura 3 - Processo de transformação da semente de cacau em amêndoa



Fonte: Adaptada de Google imagens (2020).

No decorrer das primeiras horas de fermentação o ácido cítrico, principal ácido orgânico da polpa, é metabolizado provocando um leve aumento do pH, que associado ao aumento de temperatura na presença de etanol, cria um ambiente desfavorável para as leveduras. Por outro lado, favorece o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas, tolerantes às condições do meio. Estas convertem o restante dos açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido láctico (SCHWAN; WHEALS, 2004), provocando nova redução do pH. A diminuição do pH em conjunto com o aumento da temperatura nas primeiras 48 horas, ocasionam a morte do gérmen que, conseqüentemente, cria um ambiente para o desenvolvimento dos precursores de aroma, cor e sabor do chocolate (CRUZ, 2012; MACÊDO *et al.*, 2013). Após perder sua habilidade de germinação, as sementes são denominadas amêndoas (AFOAKWA, 2010).

Grandes quantidades de bactérias lácticas e sua atividade excessiva, afetam negativamente o desenvolvimento dos precursores de sabor. Por este motivo, após 48 horas de fermentação, revolvimentos são realizados para promover oxigenação da massa. Esse procedimento de mistura e homogeneização é de extrema importância na uniformização da fermentação. Por fim, ocorre o desenvolvimento das bactérias acéticas, que produzem ácido acético a partir do álcool presente no meio. Esta reação é fortemente exotérmica, sendo

responsável pelo aumento da temperatura e redução do pH de 6,5 para 4,5 (LOPEZ, 1974; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; SAMPAIO, 2011).

Durante a fermentação ocorre a oxidação dos compostos fenólicos, que por consequência promove a redução da adstringência e formação de complexos entre as proteínas e os peptídeos, além de influenciar a transformação de cor dos cotilédones de púrpura a marrom (CRUZ, 2002). Uma amêndoa de cacau bem fermentada apresenta cotilédones de coloração marrom e pH mais baixo (4,75-5,19). Quando há mistura de coloração marrom com violeta, roxo ou púrpura, a amêndoa é classificada como sub-fermentada. Caso a amêndoa apresente coloração de violeta a púrpura e pH alto (5,5-6,0) é considerada como mal fermentada (COHEN; LUCCAS; JACKIX, 2004; AFOAKWA *et al.*, 2008). Chocolates elaborados com pH alto ou pH baixo apresentam notas mais altas de descritores de sabor estranho, enquanto que chocolates produzidos com amêndoas de pH intermediário (5,20-5,49) indicam notas mais altas de sabor de chocolate (JINAP; DIMICK; HOLLENDER, 1995; RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2011).

2.3. SECAGEM

A secagem tem como principal objetivo interromper a fermentação e reduzir a umidade das amêndoas de cacau, tornando-as mais estáveis ao armazenamento (APROTOSOAIE; LUCA; MIRON, 2016). Entretanto, também é responsável pelo desenvolvimento de precursores de sabor, bem como pelos processos de escurecimento dos cotilédones, provocado pela ação da polifenoloxidase, que ocasiona a redução do teor de polifenóis. Muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam durante a secagem, permitindo a redução do amargor, adstringência e acidez das amêndoas, além da formação da cor marrom característica (BECKETT, 2009).

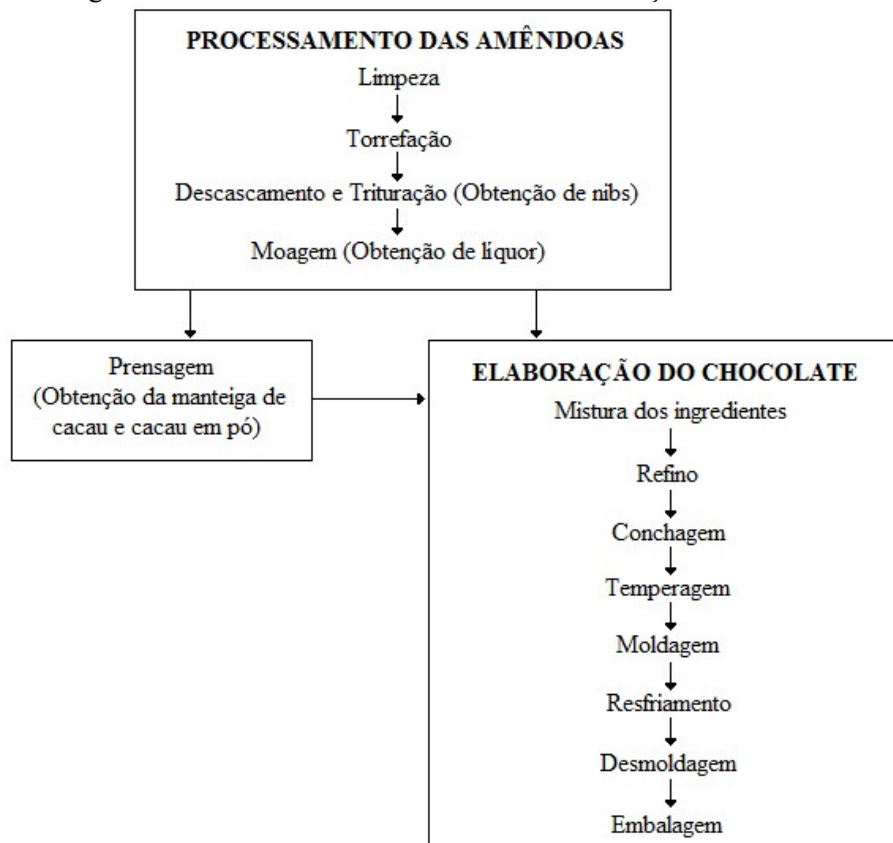
O processo de secagem deve ser iniciado imediatamente após a fermentação para evitar o desenvolvimento de fungos que conferem sabor desagradável ao produto final ou produzir toxinas prejudiciais à saúde (CRESPO, 1985; EFRAIM *et al.*, 2010; DEUS, 2015). A secagem pode ser realizada de forma natural, pela exposição ao sol, ou artificial, em secadores rotativos ou fornos (OETTERER; D'ARCE; SPOTO, 2006), até as amêndoas atingirem o teor de água de 7 a 8 % (AFOAKWA *et al.*, 2008). O processo pode durar de 2 a 10 dias dependendo do método utilizado ou das condições climáticas (PEREIRA, 2013). A secagem natural é a mais utilizada no Brasil e consiste no uso de barcaças, constituídas por um lastro de madeira erguido sobre pilares de alvenaria, com cobertura que desliza sobre trilhos para proteger as amêndoas contra chuva, sereno ou calor excessivo (OETTERER; D'ARCE; SPOTO, 2006).

A qualidade das amêndoas após secagem é avaliada principalmente pelo teste de corte. Esse teste mensura o grau de fermentação das amêndoas pela coloração (marrom, parcialmente marrom, violácea e ardósia) e compartimentação dos cotilédones (bem, parcialmente ou pouco compartimentada). Também avalia a presença de fungos, infestações por pragas durante a estocagem, amêndoas germinadas ou achatadas, assim como o aroma externo. No entanto, a classificação varia de acordo com normas estabelecidas em cada país produtor ou comprador de cacau (SHAUGHNESSY, 1992; EFRAIM *et al.*, 2010).

3. PROCESSAMENTO DAS AMÊNDOAS E ELABORAÇÃO DOS CHOCOLATES

O processamento das amêndoas para elaboração dos chocolates começa com a limpeza das amêndoas fermentadas e secas. Essa etapa visa a remoção de sujidades como pedras, madeiras, metais ou outros materiais estranhos (SAMPAIO, 2011). Em seguida, as amêndoas são submetidas aos processos de torrefação, descascamento e trituração, moagem, mistura dos ingredientes, refino, conchagem, temperagem, moldagem, resfriamento, desmoldagem e, finalmente, embalagem. O fluxograma do processamento das amêndoas e o processo de elaboração dos chocolates está identificado na Figura 4.

Figura 4 - Processamento das amêndoas e elaboração do chocolate



Fonte: Adaptada de FARIA (2019).

3.1. TORREFAÇÃO

A torrefação é o primeiro processo industrial para o desenvolvimento do sabor de chocolate a partir dos precursores já formados (DI CARRO; ARDINI; MAGI, 2015). Nesse processo os precursores do sabor (aminoácidos livres) interagem com os açúcares redutores através de uma série de reações químicas para formar os compostos de Amadori que causam escurecimento não-enzimático por decomposição, bem como a degradação de Strecker, que dá origem a vários tipos de aldeídos, cetonas, pirazinas, pirroles, pironas e furanos, entre outros (AFOAKWA *et al.*, 2008; APROTOSOAIIE; LUCA; MIRON, 2016; HINNEH *et al.*, 2019).

Propriedades da amêndoa torrada, como formação de uma cor marrom característica, textura mais quebradiça, desenvolvimento desejado de sabor torrado e de chocolate, concentração do conteúdo de gordura, redução da acidez total por evaporação de ácidos voláteis e teor de umidade de 1 % a 2 %, dependem das condições do processo, principalmente temperatura e tempo de processamento (OWUSU, PETERSEN, HEIMDAL, 2013; BEG *et al.*, 2017; GIACOMETTI; JOLIĆ, S.; JOSIĆ, D., 2015). O período de torrefação pode durar entre 5 e 120 minutos (geralmente 10 a 35 minutos) a uma temperatura de 95 a 150°C (geralmente 120 a 140°C), dependendo da natureza do cacau e dos requisitos do produto final (IOANNONE *et al.*, 2015; OZTURK, YOUNG, 2017).

3.2. DESCASCAMENTO E TRITURAÇÃO

Nesta etapa as amêndoas torradas são descascadas com rolos de madeira (processo artesanal) ou por descascadores automáticos (processo industrial). O nibs resultante (Figura 5) é separado da casca através da diferença de densidade entre eles. Esta característica permite a separação da casca por peneiragem, ventilação ou sucção (OETTERER, D'ARCE, SPOTO, 2006; CRUZ, 2012).

Figura 5 - Amêndoa de cacau torrada com casca, sem casca e nibs de cacau



Fonte: Adaptada de Google imagens (2020).

3.3. MOAGEM

Após trituração, os nibs devem ser moídos para obtenção da massa de cacau (ou pasta ou líquido), usada como ingrediente para a produção de chocolates (ASCRIZZI *et al.*, 2017). O líquido consiste em um líquido viscoso, utilizado como matéria prima para produção da manteiga de cacau, cacau em pó e o chocolate, conforme tratamento escolhido (KOBELITZ, 2011). A obtenção da manteiga de cacau é conseguida através da extração por prensagem hidráulica. Esse processo produz uma torta resultante que, posteriormente, passa por moinhos e é pulverizada para produção do cacau em pó (OETTERER; D'ARCE; SPOTO, 2006). Esses dois derivados também são utilizados como ingredientes na fabricação de chocolates.

3.4. MISTURA DOS INGREDIENTES

A etapa de mistura consiste na homogeneização dos ingredientes em pó (açúcar e em alguns casos o leite) com os ingredientes líquidos e semi-líquidos (manteiga de cacau e massa de cacau fundidos), nas proporções corretas da formulação, por tempo suficiente para se transformarem em uma massa plástica adequada para o refino (MARTINS, 2007; RENISZ, 2017). O emulsificante só é adicionado durante o processo de conchagem.

3.4.1. Massa de cacau

A massa de cacau é o principal ingrediente responsável por conferir o sabor característico de um chocolate (TRENTO, 2018). De acordo com a RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005, massa (ou pasta ou líquido) de cacau é o produto obtido das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao L.*) por processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos. A massa de cacau é um produto obtido após a etapa de moagem das amêndoas previamente torradas (WAINWRIGHT, 1996).

3.4.2. Manteiga de cacau

A manteiga de cacau é um dos ingredientes mais importantes na formulação do chocolate, representando a fase de gordura contínua em que partículas sólidas de açúcar e massa de cacau são suspensas após a etapa de mistura (AFOAKWA, 2014; ASCRIZZI *et al.*, 2017). A manteiga de cacau é responsável por alguns parâmetros de qualidade do chocolate, como dureza e brilho, resistência mecânica suficiente para gerar uma quebra ruidosa (snap), fusão rápida e completa à temperatura corporal, com desprendimento de aroma e sabor durante a degustação (LUCCAS; KIECKBUSCH, 2006).

A manteiga de cacau é formada por diferentes ácidos graxos, principalmente o ácido palmítico (P), esteárico (S) e oléico (O). Esses ácidos graxos são responsáveis pela formação dos triacilgliceróis simétricos, que correspondem a 75 % da composição da gordura, POS (1-palmitato-2-oleato-3-estearato triacilglicerol), SOS (1,3-diestearato-2-oleato triacilglicerol) e POP (1,3-dipalmitato-2-oleato triacilglicerol) (QUAST, L., QUAST, E., DEMIATE, 2011; LEITE, 2012; TRENTO, 2018).

Devido à sua natureza polimórfica, a manteiga de cacau pode cristalizar em seis diferentes formas, dependendo da composição dos triacilgliceróis e condições de cristalização, temperatura e armazenamento (RIBEIRO *et al.*, 2012). O polimorfismo pode ser definido como a capacidade de formar diferentes cristais durante o empacotamento molecular (NARINE; MARANGONI, 1999). As formas cristalinas com menor ponto de fusão são as mais instáveis, porém, tendem a se transformar em formas mais estáveis, com pontos de fusão mais altos (SAMPAIO, 2011). A Tabela 1 apresenta os diferentes polimorfos da manteiga de cacau e seus respectivos pontos de fusão.

Tabela 1 - Polimorfos da manteiga de cacau e seus respectivos pontos de fusão

Tipo (DSC)	Raio X	Ponto de Fusão (°C)
I	Gama	17,3
II	Alfa	23,3
III	Beta-prima	25,5
IV	Beta-prima	27,5
V	Beta	33,9
VI	Beta	36,3

DSC (Differential Scanning Calorimetric ou Calorimetria de Varredura Diferencial)

Fonte: Adaptada de TRENTO (2018).

Como dito anteriormente o ponto de fusão indica a estabilidade das formas cristalinas, sendo: I a forma mais instável e facilmente transformada na forma II, também instável que, por sua vez, tem tendência a se transformar nas formas III e IV, com estabilidades intermediárias; ao passo que a forma V ou beta (β) apresenta alta estabilidade (AFOAKWA, 2010). A forma V é a mais desejada em um chocolate adequadamente temperado, devido a sua característica de estabilidade em temperatura ambiente, fusão na temperatura da boca e possuir propriedades mecânicas excelentes. Contudo, a forma V pode ser facilmente convertida para a forma VI, com o passar do tempo de armazenamento. Por fim, a forma VI possui uma estabilidade inferior a forma V, sendo responsável pelo defeito conhecido como *fat bloom* (migração da gordura e posterior recristalização na superfície do chocolate) em chocolates e, por este motivo deve ser evitada (JAMES; SMITH, 2009; RENISZ, 2017).

3.4.3. Açúcar

Na formulação dos chocolates o açúcar mais utilizado é a sacarose e seu conteúdo pode variar de 30 a 55 %. O açúcar deve ser livre de açúcar invertido e possuir uma baixa umidade para não prejudicar as etapas de refino e conchagem durante o processamento do chocolate (BECKETT, 1988; RENISZ, 2017). A sacarose, um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, é responsável pelo sabor doce e pelo agente de corpo, conferindo boas propriedades de textura e brilho, além de promover a redução de atividade de água, prolongando a vida de prateleira dos chocolates (RICHTER; LANNES, 2007; TRENTO, 2018).

3.4.4. Emulsificante

Os emulsificantes são usados para modificar as propriedades reológicas das massas de chocolates. Devido à sua ação tensoativa, os emulsificantes diminuem a tensão interfacial e o atrito, promovendo a interação entre a fase dispersa (hidrofóbica) e a fase contínua (hidrofílica) da massa de chocolate, formada por manteiga de cacau e gordura do leite, quando contiver, e consequentemente, facilitam a formação e estabilização da emulsão (CUNHA, QUAST, LUCCAS, 2010).

A lecitina de soja é o emulsificante mais comumente utilizado na fabricação de chocolates. Seu uso pode reduzir em até 10 vezes a quantidade de manteiga de cacau nas formulações, além de diminuir o custo de produção dos chocolates, por consequência (SCHANTZ; ROHM, 2005; RENISZ, 2017). A adição de lecitina de soja entre 0,3-0,5 % reduz a viscosidade da massa de chocolate e aumenta a eficiência do processo de conchagem, assim como a tolerância à umidade. Contudo, o excesso de lecitina causa *off-flavors* e aumenta a viscosidade do chocolate (PRAWIRA; BARRINGER, 2009).

3.5. REFINO

O processo de refino reduz o tamanho das partículas do produto para menos de 12 µm, tornando-o imperceptível na boca durante a degustação. O refino também confere ao chocolate uma textura lisa típica (ASCRIZZI *et al.*, 2017)

3.6. CONCHAGEM

A conchagem é a última etapa de importância na formação do sabor característico e desejável do chocolate. Sua função é reduzir a umidade e compostos voláteis indesejados, além de desenvolver uma textura uniforme e promover a mudança de cor (CRUZ, 2012). Durante o

processo de conchagem a massa de chocolate deve ser cisalhada, agitada e aquecida em temperaturas de 50 a 70°C por 8 a 96 horas, dependendo do tipo de chocolate (amargo ou meio-amargo, branco ou ao leite) e do equipamento utilizado (BECKETT, 1994; SAMPAIO, 2011; DEUS, 2015).

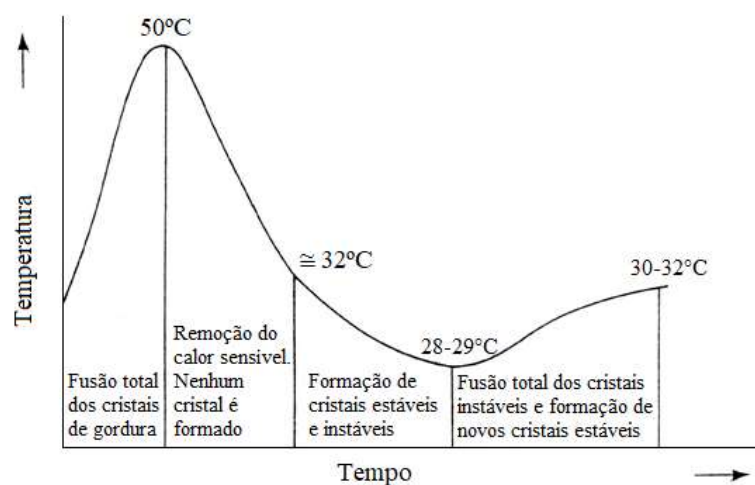
A conchagem é normalmente constituída de 3 fases, sendo a primeira denominada de fase seca, onde ocorre a adição de parte da manteiga de cacau da formulação (RENISZ, 2017). Nesta etapa as inúmeras superfícies expostas durante o refino são envolvidas pela gordura melhorando a fluidez da massa (ALAMPRESE; DATEI; SEMERARO, 2007). A perda da umidade nesta etapa varia de 1,6 % até atingir o teor de 0,6 a 0,8 %. Na fase intermediária, fase pastosa, a quantidade final de manteiga de cacau é adicionada. Há também a eliminação de substâncias que conferem sabores indesejados, como a eliminação de 30 % de ácido acético e a evaporação de até 50 % dos aldeídos de baixa volatilização (BECKETT, 1988; ASCRIZZI *et al.*, 2017; TRENTO, 2018). Por fim, na última etapa é adicionado o emulsificante que, além de afetar a reologia da massa, influencia também na sensibilidade do produto à luz e à temperatura, solidificação, migração de gordura e oxidação dos chocolates (SCHANTZ; ROHM, 2005; RENISZ, 2017).

3.7. TEMPERAGEM

A temperagem é um processo de cristalização controlada que tem por objetivo induzir a formação de cristais estáveis do tipo V (β) na manteiga de cacau, por meio da transferência de calor e de massa através de agitação constante (COHEN; LUCCAS; JACKIX, 2004, SAMPAIO, 2011).

O processo de temperagem inicia-se logo após o término da conchagem, pois a fase gordurosa do chocolate está completamente fundida (40-50°C), sem nenhuma forma cristalina presente (Figura 6). Em seguida é feito um resfriamento controlado sob agitação, para induzir à pré-cristalização da gordura (28-29°C), com formação de cristais estáveis tipo V (β) e instáveis ou metaestáveis. Posteriormente, um novo aquecimento é realizado (30-32°C) para derreter os cristais instáveis, e formar novos cristais estáveis tipo V (β) (CRUZ, 2012). A temperatura adequada para o final do processo de temperagem varia de acordo com o tipo de chocolate, sendo aproximadamente 28°C, 29°C e 32°C, para os chocolates branco, ao leite e amargo ou meio amargo, respectivamente (SCHENK; PESCHAR; 2004).

Figura 6 - Temperagem do Chocolate



Fonte: LUCCAS (2001).

Os fatores mais importantes a serem considerados durante a temperagem de um chocolate, seja em escala artesanal ou industrial, são: velocidade de agitação, que influencia na taxa de transferência de calor e massa no produto; a temperatura, que afeta o resfriamento e consequentemente a cristalização e; o tempo de residência, que deve ser suficiente para que ocorra a formação e a multiplicação dos cristais (SAMPAIO, 2011; RENISZ, 2017). A cristalização continua durante o resfriamento do chocolate moldado, alcançando aproximadamente 75% de cristais ao final do processo (ITAL, 1998).

Além da formação dos cristais estáveis desejáveis para o chocolate, a temperagem também ocasiona rápida solidificação do chocolate no molde; induz um adequado empacotamento dos triglicerídeos que, consequentemente, promove maior contração de volume, facilitando a desmoldagem; evita a formação do defeito *fat bloom* no resfriamento e no armazenamento e; fornece um produto final com boas características de brilho, textura (snap) e fusão (COHEN; LUCCAS; JACKIX, 2004).

3.8. MOLDAGEM/ RESFRIAMENTO/ DESMOLDAGEM/ EMBALAGEM

Após o processo de temperagem, o produto deve ser moldado e resfriado, para desenvolver a porcentagem final dos cristais e formar uma massa quebradiça, brilhante, estável e homogênea (BRIGGS; WANG, 2004; QUAST, 2008; CRUZ, 2012). A etapa de moldagem é feita sob agitação contínua para retirar as bolhas de ar remanescentes na massa do chocolate e evitar a formação de espaços vazios no chocolate pronto (LEITE, 2012).

Na etapa de resfriamento, o produto é resfriado a temperatura de 10-12°C. Nesta etapa acelera-se a multiplicação dos cristais VI, formando uma rede cristalina compacta e estável. A

diferença de temperatura entre o túnel ou geladeira (8-10°C) e o ambiente de trabalho (20-22°C) não deve ser superior a 10°C, para evitar a condensação de umidade sobre o produto (TRENTO, 2018). Em seguida, os chocolates são desmoldados, embalados e armazenados em condições adequadas de temperatura (EFRAIM, 2009).

4. COMPOSTOS FENÓLICOS

O cacau e os seus derivados são importantes fontes de polifenóis, os quais têm atraído muita atenção devido a sua atividade antioxidante e benefícios proporcionados à saúde humana. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é atribuída ao seu potencial de oxirredução, que os permitem atuar como agentes redutores, doando hidrogênio e neutralizando radicais livres. O excesso desses radicais livres causa o estresse oxidativo, relacionado às doenças cardiovasculares, câncer e outras (LEITE, 2012).

No cacau existem três grupos principais de polifenóis: catequinas (flavonóis), antocianinas e proantocianidinas. Os polifenóis são armazenados nas células de pigmentos dos cotilédones, e as antocianinas são responsáveis pela coloração das sementes (AFOAKWA *et al.*, 2008). As sementes de cacau possuem de 6 a 8 % (base seca) de compostos fenólicos em sua composição, enquanto que as amêndoas de cacau fermentadas e secas, apresentam cerca de 37 % de flavonóis representado pelas epicatequinas (35 %) e antocianinas (4 %), além das procianidinas (58 %) (DEUS, 2015; FARIA, 2019). O nibs de cacau possui cerca de 12-18 % (base seca) de compostos fenólicos, sendo 95 % compostos por epicatequina, catequina e procianidina (LEITE, 2012).

Além das propriedades antioxidantes, os polifenóis também afetam as propriedades sensoriais como cor e sabor, pois conferem adstringência e amargor nas sementes de cacau e seus derivados (BATISTA *et al.* 2016). Contudo, durante todos os estágios de processamento do chocolate, os polifenóis presentes nas sementes do cacau, sofrem muitas transformações, incluindo oxidação, polimerização e condensação, que, conseqüentemente, reduzem seu conteúdo (ŻYŻELEWICZ *et al.*, 2018; URBAŃSKA; KOWALSKA, 2019). As maiores perdas ocorrem nas etapas de fermentação e secagem, onde mais de 70 % do teor de epicatequinas é reduzido e, na etapa de torrefação, que provoca uma perda em 30 % no teor total de polifênóis (FARIA, 2019).

5. FORMAÇÃO DE SABOR DURANTE O PROCESSAMENTO

O sabor e aroma únicos característicos do chocolate são resultados da combinação de compostos voláteis e não voláteis, determinados pelo potencial genético das variedades de grãos

de cacau, pelos métodos aplicados durante processamento primário de fermentação e secagem e pelas condições aplicadas durante a torrefação e conchagem na fabricação de chocolate (AFOAWKA *et al.*, 2008; CRAFACK *et al.*, 2014; APROTOSOAIÉ; LUCA; MIRON, 2016).

As metilxantinas (teobromina e cafeína) e os polifenóis, que conferem notas de amargor e adstringência, além dos aminoácidos livres e açúcares redutores, provenientes das etapas de fermentação e secagem, são alguns dos componentes não voláteis que influenciam a formação de sabor do cacau e seus derivados (FARIA, 2019). Dessa forma, as etapas de fermentação e secagem influenciam diretamente na formação de sabor, devido à redução do teor de compostos fenólicos, em detrimento da oxidação enzimática que acarreta na redução do amargor e adstringência, além de promover a formação da cor marrom característica de amêndoas completamente fermentadas e secas (CRUZ, 2002; AFOAWKA *et al.*, 2008).

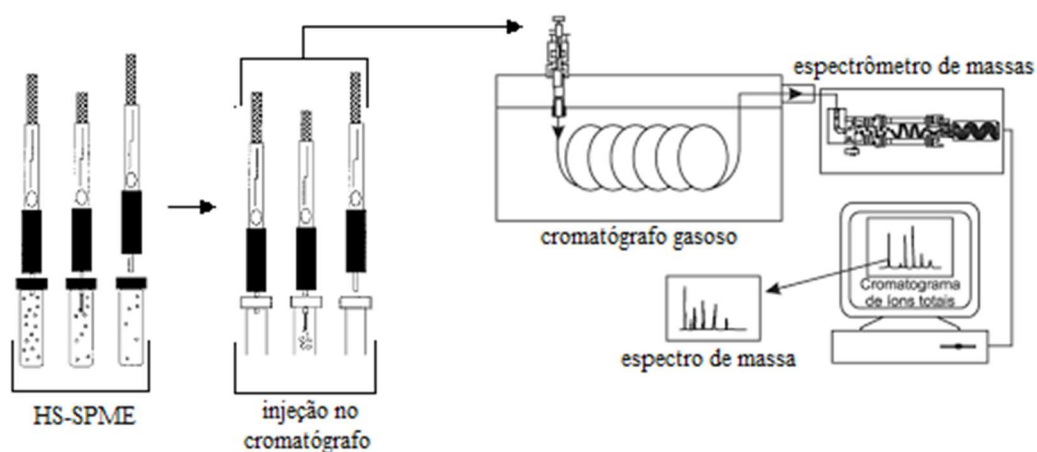
Com relação aos compostos voláteis, a maior parte são formados durante a fermentação e, a partir dos precursores de sabor e aroma durante o processo de torrefação, em consequência da reação de Maillard e degradação de Strecker (AFOAKWA *et al.*, 2008). Os produtos intermediários formados incluem uma variedade de compostos aromáticos ativos, como pirazinas, furanos, aldeídos, cetonas e pirróis, muitos dos quais são de importância primordial para o sabor do chocolate (OWUSU; PETERSEN; HEIMDAL, 2013; CRAFACK *et al.*, 2014). Já o processo de conchagem promove o aumento no teor de alguns compostos como as pirazinas e diminuição de outros, como o ácido acético, melhorando o sabor do chocolate em função da eliminação de compostos responsáveis por sabores residuais não apreciados (AFOAKWA *et al.*, 2008, FARIA, 2019).

6. ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Cerca de 600 compostos voláteis identificados como aldeídos, pirazinas, ácidos, álcoois, ésteres, cetonas, furanos, pirróis, fenóis e álcoois terpênicos são responsáveis pelo sabor e aroma em produtos de cacau e chocolate, além de definirem o valor comercial dos mesmos (ZIEGLER, 2009; KONGOR *et al.*, 2016; UTRILLA-VÁZQUEZ *et al.*, 2020). Entretanto, o perfil de voláteis é influenciado por vários fatores como a variedade do cacau, manejo agrônomico, fatores do solo, condições climáticas e tecnologia pós-colheita, principalmente nas etapas de fermentação e torrefação para o desenvolvimento do aroma durante o processamento do cacau, juntamente com a conchagem para o chocolate (MARSEGLIA *et al.*, 2020). Por esta razão, as indústrias de cacau e chocolate buscam melhorar a qualidade da matéria prima e chocolate produzido, por meio da análise de compostos voláteis.

O método mais aplicado atualmente para a extração de compostos voláteis, sem interferência dos componentes da matriz, é a técnica de microextração em fase sólida no headspace (HS-SPME) seguido da análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector espectrômetro de massas (CG-EM) (MELO, 2018). O sistema HS-SPME-CG-EM (Figura 7) possui fatores de alta sensibilidade e concentração, bem como promove a redução do consumo de solventes orgânicos (JELEŃ; MAJCHER; DZIADAS, 2012; KAWAGUCHI *et al.*, 2013; MARSEGLIA *et al.*, 2020).

Figura 7 - Esquema simplificado do sistema HS-SPME-CG-EM



Fonte: Adaptada de Google imagens (2020).

A técnica HS-SPME-CG-EM se baseia na exposição dos analitos em seu estado vaporizado, extraídos da amostra sólida por aquecimento e, posterior separação através da transferência de massa entre as fases. Após extração os componentes vaporizados são injetados no sistema cromatográfico e são arrastados por uma fase móvel inerte e gasosa (gás de arraste) através da coluna cromatográfica, na qual são separados conforme seus respectivos pontos de ebulição e interações com a fase estacionária presente no interior da coluna. Após separação, os analitos são transferidos para o espectrômetro de massas, com o auxílio de um sistema de vácuo, onde ocorre a ionização e fragmentação das moléculas em um padrão característico de espécie química. Dessa forma, os fragmentos iônicos são separados magneticamente e detectados de acordo com a razão massa/carga (m/z), gerando um espectro de massa de acordo com a intensidade dos sinais detectados (FENSTERSEIFER, 2018).

7. ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é uma ciência crucial no desenvolvimento de novos produtos e/ou novas tecnologias de alimentos, seja no âmbito acadêmico ou industrial. A análise sensorial é definida como um método científico, descritivo ou discriminativo, usado para medir, analisar e interpretar as reações do público consumidor às características dos alimentos, conforme percebidos pelos sentidos da visão, olfato, sabor, tato e audição (DUTCOSKY, 2013).

Existem vários métodos de avaliação sensorial que são selecionados conforme o objetivo da análise, como por exemplo: métodos de sensibilidade, para selecionar ou treinar juízes; ou métodos afetivos, para verificar a aceitabilidade do produto desenvolvido (TEIXEIRA, 2009). De forma geral, os resultados sensoriais indicam o sucesso comercial de qualquer produto alimentício no mercado. Por este motivo, muitos profissionais da área sensorial consideram os testes de aceitação e preferência superiores a outros (LAWLESS; HEYMANN, 2010).

7.1. TESTE DE ACEITAÇÃO

O teste de aceitação revela o grau em que os consumidores gostam ou desgostam de um determinado produto. Para tanto, utiliza-se a escala hedônica que varia gradativamente entre os termos “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”, permitindo que o julgador expresse sua aceitação pelo produto com base nos atributos gosta e desgosta. A escala hedônica pode variar em cinco, sete e nove pontos, sendo a escala hedônica de nove pontos a mais utilizada (MINIM, 2010).

7.2. TESTE *JUST-ABOUT-RIGHT*

Uma segunda escala muito popular é a escala certa ou quase certa (*Just-About-Right*), que combina intensidade e julgamentos hedônicos, para medir a reação do consumidor frente a um atributo específico. Essa escala possui termos contrários em suas extremidades opostas e um ponto central. Os termos identificados nas extremidades são "muito pouco" e "muito" de um atributo específico, enquanto que o ponto central pode ser rotulado como "quase certo" (LAWLESS; HEYMANN, 2010). Uma escala hedônica de cinco pontos, que varia entre “menos intenso que o ideal” e “ mais intenso que o ideal”, também pode ser utilizada (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2006).

7.3. TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

Tratando-se de uma aceitação sensorial positiva, só o fato dos consumidores gostarem não significa necessariamente que irão comprar o alimento avaliado. Nesses casos, avalia-se a intenção de compra com auxílio da escala hedônica de cinco pontos. Tal escala varia entre os termos “certamente compraria” e “certamente não compraria” (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2006).

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. John Wiley & Sons, 2016.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010.
- AFOAKWA, E. O. **Cocoa Production and Processing Technology**. CRC Press, 2014.
- 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, n. 9, p. 840-857, 2008.
- ALAMPRESE, C.; DATEI, L.; SEMERARO, Q. Optimization of processing parameters of a ball mill refiner for chocolate. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 4, p. 629-636, 2007.
- ALBERTINI, B. *et al.* Effect of fermentation and drying on cocoa polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p. 9948-9953, 2015.
- APROTOSOAIÉ, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 73-91, 2016.
- ASCRIZZI, R. *et al.* From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 474-479, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, AMENDOIM E BALAS. Pesquisas e estatísticas: Chocolate: produção, consumo aparente, exportação e importação. Disponível em: <http://www.abicab.org.br/paginas/estatisticas/chocolate/>. Acesso: 09 ago. 2020.
- BARTLEY, B. G. D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. Cabi, 2005.
- BATISTA, N. N. *et al.* Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v. 90, p. 313-319, 2016.
- BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial de chocolate**. 1. ed. Zaragoza. Ed. Acríbia, S. A. Trad. Gonzalez, 432p. 1988.
- BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 2 ed. London: Black Academic e Professional, 1994.
- BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 4. ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2009.
- BEG, M. S. *et al.* Status, supply chain and processing of cocoa-A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 108-116, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 264, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_264_2005.pdf/7a0256b4-79e1-4a5a-8129-7f37ba6f2cd7. Acesso: 21 jul. 2020.

BRIGGS, J. L.; WANG, T. Influence of shearing and time on the rheological properties of milk chocolate during tempering. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 2, p. 117-121, 2004.

COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M. N. H. Revisão: Temperagem ou Pré-Cristalização do Chocolate. **Brazilian Journal Of Food Technology**, p. 23-30, 2004.

CRAFACK, M. *et al.* Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, v. 63, p. 306-316, 2014.

CRESPO, S. Judging the quality of cocoa beans. **The Manufacturing Confectioner**, v. 4, n. 5, p. 59-64, 1985.

CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2002. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255225>. Acesso: 03 ago. 2020.

CRUZ, J. F. M. **Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao L.* resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Salvador, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/8794>. Acesso: 07 ago. 2019.

CUNHA, K. M.; QUAST, L. B.; LUCCAS, V. Influência da adição de lecitina de soja e do poliglicerol poliricinolato nas propriedades reológicas do chocolate. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, 2010.

DEUS, V. L. **Influência dos métodos de secagem nas propriedades antioxidantes de cacau (*Theobroma cacao L.*)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Salvador, 2015.

DI CARRO, M.; ARDINI, F.; MAGI, E. Multivariate optimization of headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of methylpyrazines in cocoa liquors. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 172-177, 2015.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba: Editora Champagnat, V.4, 2013.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, através da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura de bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255232>. Acesso: 07 ago. 2019.

EFRAIM, P. *et al.* Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 142-150, 2010.

FARIA, F. R. **Degradação de polifenóis e formação de compostos de sabor no processamento de chocolate a partir de amêndoas de cacau fermentadas e não fermentadas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/334738>. Acesso: 19 jul. 2020.

FENSTERSEIFER, M. J. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de agrotóxicos organoclorados em água para consumo humano por meio de SPME e GC-MS**. 2018. Relatório de Estágio Supervisionado II. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/192220/TCC%20%20MARIA%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso: 23 nov. 2020.

GIACOMETTI, J.; JOLIĆ, S. M.; JOSIĆ, D. Cocoa processing and impact on composition. In: **Processing and Impact on Active Components in Food**. Academic Press, p. 605-612, 2015.

GLICERINA, V. *et al.* Microstructural and rheological characteristics of dark, milk and White chocolate: A comparative study. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 165-171, 2016.

HAJE, L.; ARAÚJO, N. Comissão aprova percentual mínimo de 27 % de cacau em chocolates e derivados. Câmara dos Deputados, jul. 2017. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/noticias/518342-comissao-aprova-percentual-minimo-de-27-de-cacau-em-chocolates-e-derivados/>. Acesso: 11 ago. 2020.

HINNEH, M. *et al.* Pod storage with roasting: A tool to diversifying the flavor profiles of dark chocolates produced from 'bulk' cocoa beans? (part I: Aroma profiling of chocolates). **Food Research International**, v. 119, p. 84-98, 2019.

HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 72-87, 2014.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Desenvolvimento de recheios para bombons: ingredientes e parâmetros de controle**. Campinas. Novembro, 1998.

IOANNONE, F. *et al.* Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. **Food Chemistry**, v. 174, p. 256-262, 2015.

JAMES, B. J.; SMITH, B. G. Structure of surfaces and composition of extracted chocolate with chocolate, analyzed, spectroscopic radiography, cryoanalysis, electron microscopy and vascular environments, electron microscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.5, p.929-937, 2009.

JELEŃ, H. H.; MAJCHER, M.; DZIADAS, M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 13-26, 2012.

JESPERSEN, L. *et al.* Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4-5, p. 441-453, 2005.

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.

KAWAGUCHI, M. *et al.* Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 280-293, 2013.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 301 p. 2011.

KONAR, N. *et al.* Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. **Trends in Food Science e Technology**, v. 49, p. 35-44, 2016.

KONGOR, J. E. *et al.* Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. **Food Research International**, v. 82, p. 44-52, 2016.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. Springer Science & Business Media, 2010.

LEITE, P. B. **Caracterização de chocolates provenientes de cultivares de cacau *Theobroma cacao* L resistentes a vassoura de bruxa**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Salvador, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/8742>. Acesso: 07 ago. 2019.

LIU, J. *et al.* A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: relationship to sensory perception. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1362-1372, 2015.

LOPES, A. S.; GARCÍA, N. H. P.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum* Schum) e cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal Food Technology**. v. 6, n. 2, p. 309-316, 2003.

LOPEZ, A. S. **The contribution of volatile compounds to the flavour of chocolate and their development during processing**. 1974. Thesis (PhD). Faculty of Agriculture. The University of West Indies. St. Augustine, 1974.

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

LUCCAS, V.; KIECKBUSCH, T. G. Estudo comparativo do polimorfismo da gordura de cupuaçu e da manteiga de cacau por calorimetria diferencial de varredura (DSC). **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, p. 63-68, 2006.

- MACÊDO, A. S. L. *et al.* Estudo prospectivo da fermentação do cacau (*Theobroma cacao l.*) sob o enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1899 a 2012. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 5, p. 362-371, 2013.
- MARSEGLIA, A. *et al.* Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao L.*) from different geographical origins. **Food Research International**, v. 132, p. 109101, 2020.
- MARTINS, R. **DOSSIÊ TÉCNICO: Processamento de Chocolate**. Rio de Janeiro: Redetec Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2007.
- MCCLEMENTS, D. J. **Understanding and controlling the microstructure of complex foods**. Woodhead Publishing. 1 ed. Cambridge, 2007.
- MEILGAARD, M. C.; CARR, B. T.; CIVILLE, G. V. **Sensory evaluation techniques**. CRC press, 2006.
- MELO, C. W. B. **Avaliação físico-química e identificação dos compostos voláteis em chocolates provenientes de diferentes variedades de cacau**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Salvador, 2018.
- MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2010.
- MINISTÉRIO DO DESENSOLVIMENTO REGIONAL. Rota do Cacau. Portal do Governo Brasileiro, jan. 2020. Disponível em: <https://www.mdr.gov.br/component/content/article?layout=edit&id=12537>. Acesso: 11 ago. 2020.
- MOREIRA, I. M. V. *et al.* Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. **Food Research International**, v. 109, p. 196-203, 2018.
- MOTAMAYOR, J. C. *et al.* Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao L.*). **Plos One**, v. 3, n. 10, p.e 3311, 2008.
- NARINE, S. S.; MARANGONI, A. G. Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review. **Food Research International**, v. 32, n. 4, p. 227-248, 1999.
- NETO, P. J. S. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Belém, PA, 2001.
- OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. Barueri. **Manole**, p.612, 2006.
- OTHMAN, A. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1523-1530, 2007.

OWUSU, M.; PETERSEN, M. A.; HEIMDAL, H. Relationship of sensory and instrumental aroma measurements of dark chocolate as influenced by fermentation method, roasting and conching conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 909-917, 2013.

OZTURK, G.; YOUNG, G. M. Food evolution: the impact of society and Science on the fermentation of cocoa beans. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 3, p. 431-455, 2017.

PEREIRA, I. O. **Viabilidade da utilização da casca de cacau como combustível no aquecimento de ar para a secagem de amêndoas de cacau**. 2013. Tese (Doctor Scientiae). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

PRAWIRA, M.; BARRINGER, S. A. Effects of conching time and ingredients on preference of milk chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, n. 5, p. 571-589, 2009.

QIN, X. *et al.* Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 10, p. 2261-2275, 2017.

QUAST, L. B. **Estudo do efeito da adição de gorduras alternativas na cristalização da manteiga de cacau**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

QUAST, L.; QUAST, E.; DEMIATE, I.M. Avaliação de Propriedades Térmicas de Manteiga de Cacau e Gorduras Alternativas. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. 2011.

RENISZ, G. E. **Aplicação da técnica de calorimetria exploratória diferencial em amostras de chocolate para determinar ponto de fusão e cristalização**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso Superior de Engenharia de Alimentos, Campo Mourão, 2017.

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, n. 1, p. 79-88, 2012.

RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. Bombom para dietas especiais: avaliação química e sensorial. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 193-200, 2007.

ROCHA, I. S. *et al.* Effect of the roasting temperature and time of cocoa beans on the sensory characteristics and acceptability of chocolate. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 522-530, 2017.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. *et al.* Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 250-258, 2011.

SAMPAIO, S. C. S. A. **Chocolate meio amargo produzido de amêndoas de cacau fermentadas com polpa de cajá, cupuaçu ou graviola: características físico-químicas, reológicas e sensoriais**. 2011. Dissertação (*Magister Scientiae*). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, 2011.

SCHANTZ, B.; ROHM, H. Influence of lecithin-PGPR blends on the rheological properties of chocolate. **LWT-Food Science and technology**, v. 38, n. 1, p. 41-45, 2005.

SCHENK, H.; PESCHAR, R. Understanding the structure of chocolate. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, n. 3-4, p. 829-835, 2004.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 205-221, 2004.

SHAUGHNESSY, W. J. Cocoa Beans-Planting Through Fermentation-Its Effect on Flavor. **Manufacturing Confectioner**, v. 72, p. 51-51, 1992.

TEIXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 366, p. 12-21, 2009.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, M. P. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), **Food microbiology, fundamentals and frontiers** (pp. 721-733). Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001.

TRENTO, A. S. **Aplicação de perfil flash e perfil de textura para diferenciar chocolates**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso Superior de Engenharia de Alimentos, Campo Mourão, 2018.

URBAŃSKA, B.; KOWALSKA, J. Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the World. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 283, 2019.

UTRILLA-VÁZQUEZ, M. *et al.* Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. **Food Research International**, v. 129, p. 108834, 2020.

WAINWRIGHT, B. The Contribution of Oils and Fats in Confections. **Candy Industrie**, v. 76, n. 09, p. 44-49, 1996.

ZIEGLER, G. Flavour development in cocoa and chocolate. **Industrial chocolate manufacture and use**, v. 4, p. 169-191, 2009.

ŻYŻELEWICZ, D. *et al.* The effect on bioactive components and characteristics of chocolate by functionalization with raw cocoa beans. **Food Research International**, v. 113, p. 234-244, 2018.

CAPITULO 2
INFLUENCE OF SUB-FERMENTED COCOA MASS IN CHOCOLATE
PRODUCTION

Aurora Britto de Andrade^{a,*}; Margarida Lins da Cruz^a; Fernanda Antonia de Souza Oliveira^a;
Ligia Regina Radomille de Santana^b; Carolina Oliveira de Souza^c; Eliete da Silva Bispo^c

^a Post-Graduate Program in Food Science, Pharmacy Facult, Federal University of Bahia, CEP 40170-115, Salvador, BA, Brazil

^b Bahia State University, CEP 41150-000, Salvador, BA, Brazil

^c Pharmacy Facult, Federal University of Bahia, CEP 40170-115, Salvador, BA, Brazil

ABSTRACT

Sub-fermented cocoa mass (SFM) has, as well as the raw cocoa, a high concentration of phenolics compounds. For this reason, a chocolate with addition of SFM to the completely fermented cocoa mass (CFM) was developed. The sensory quality of chocolate is broadly determined by the composition of volatile compounds resulted from microbial metabolism during fermentation, and Maillard reactions that occur during drying, roasting and conching. The aim of this work was to investigate the addition effect of SFM (20 % to 80 %) on the sensory characteristics of chocolates produced and volatile profile during the processing. The SFM and CFM were obtained through fermentation (48 h and 144 h, respectively), drying, roasting and grinding processes. The physical-chemical characterization of cocoa beans indicated the efficiency of the fermentation process, while the cut test and the fermentation index proved the quality of the cocoa beans used in chocolate production. In general, the chocolate samples that contained a higher concentration of SFM presented lower scores for the flavor acceptance, due to the higher bitterness and astringency. The great acceptance was observed on samples with proportions of 80 % and 65 % of CFM. A total fifty-five different volatile compounds were identified in fermented cocoa beans, nibs and chocolates by HS-SPME-GC-MS. PCA analyses demonstrated that the profile of the volatiles compounds in the chocolates, mainly phenylethyl alcohol, 2-phenylethyl acetate and tetramethylpyrazine, was influenced by the fermentation process of the cocoa beans that reflected in the chocolate quality (flowery, honey, fruit, roasted and chocolate flavor).

Keywords: fermented cocoa beans, HS-SPME-GC-MS, volatile compounds, potentially functional, sensory characteristics.

1. INTRODUCTION

Chocolate is a worldwide food appreciated by consumers, obtained through the processing of cocoa beans (*Theobroma cacao L.*) with addition of other ingredients such as sugar, cocoa butter, lecithin and milk (depending on the type of chocolate) (LIU *et al.*, 2015; KRUSZEWSKI; OBIEDZIŃSKI, 2018). The cocoa beans are the target of several scientific researches, due to potential cardiovascular health benefits, antioxidant protections, the help balancing cholesterol in the body (GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN; BERKTAŞ; ÖZÇELİK, 2016; OOI; TING; SIOW, 2020). These pro-health properties are occasioned by the presence of phenolics compounds (flavonoids, methylxantines, epicatechin and anthocyanins), that are often responsible for bitterness and astringency flavor of the raw cocoa seed in chocolate (BATISTA *et al.*, 2016; URBAŃSKA; KOWALSKA, 2019).

The processing of cocoa beans comprises a series of transformation for the chocolate production, via pre-processing steps (harvesting, fermentation and drying) and technological processing such as roasting, refining, conching, tempering and crystallizing (CRAFACK *et al.* 2014; TAN; KERR, 2019). The fermentation and drying processes are critical steps that determine the quality of cocoa and development of the precursors of the chocolate aroma and flavors (BEG *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020). However, the formation of the desirable chocolate aroma and flavor notes is related to the decrease in phenolic compounds during these stages. The fermentation process promotes the reduction of 30 % on the polyphenol content in the first 48 h, reaching up to 90 % at the end of the process (EFRAIM *et al.*, 2010; ALBERTINI *et al.*, 2015). While drying process is responsible to the browning of cotyledons, as result of oxidation and catalysis reactions, carried out by polyphenol oxidase (KONGOR *et al.*, 2016).

Roasting, on other hand, is the first industrial process for used to the development of the characteristics: brown color of roasted beans and the chocolate aroma and flavor including aldehydes, ketones, pyrazines, pyrroles, pyranones and furans, formed by amino acids and sugars through the Maillard reaction and Strecker degradation (DI CARRO; ARDINI; MAGI, 2015; ROCHA *et al.*, 2017; AFOAKWA *et al.*, 2008). Through decades of investigations, the impact of chocolate manufacturing chain on the final aroma and flavor of the product, including cocoa geographical origin, post-harvest, fermentation (starter cultures), drying (natural or artificial), roasting (temperature and time) and conching (time) process, have been established (HINNEH *et al.*, 2019; ACIERNO *et al.*, 2016; ACULEY *et al.*, 2010; AFOAKWA, 2014; MIGUEL *et al.*, 2017; TAN; KERR, 2019). However, the addition of sub-fermented cocoa beans as an ingredient for chocolate production has not been studied.

The sub-fermented cocoa beans (fermentation index of 0.7), obtained with 48 hours of fermentation, have some of volatiles compounds (1-pentanol, 2,3-butanediol, 2-heptanol,

phenethyl alcohol, 2-pentanone, 2-heptanone, benzaldehyde, phenylethyl acetate, 2-acetylpyrrole and linalool) already formed (MOREIRA *et al.*, 2018) and a higher content of the phenolic compounds, because they have not undergone complete fermentation. Phenolic compounds have beneficial effects on human health, which have led to an interest in maintaining them during the processing of cocoa products like chocolate (EFRAIM *et al.*, 2010; LONČAREVIĆ *et al.*, 2018). However, they can impart sensory properties such as color and taste, especially on bitterness and astringent. For this reason, the use of sub-fermented cocoa beans can increase concentration of antioxidant compounds and also severely affect the sensory characteristics of chocolates. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of sub-fermented cocoa mass addition on the sensory characteristics of chocolate through affective tests and identify the volatile compounds formed during the fermentation and roasting processes as well as in chocolate.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. RAW MATERIAL

The conventional cocoa, used as raw material in this study, was obtained from a farm located in the south of Bahia, Brazil (14°41'96 "S and 39°12'109" W). The fruits were harvested in the maturation stage, determined by the color of the epidermis of the fruit, in the secondary crop (August 2018). The fruits were manually opened and the seeds (raw cocoa with surrounding mucilage pulp) were submitted immediately to the fermentation process.

2.2. FERMENTATION AND DRYING PROCESSES

The fermentation process happened according to the technique introduced by the local producer. The fermentation occurred in duplicate, using batches of 40 kg of raw cocoa seed. The raw material was placed in wooden boxes of 50 cm x 40 cm x 70 cm dimensions, with holes of 1 cm in diameter every 5 cm in the bottom, and covered with plantain leaves for natural fermentation. The fermentation was carried out under two conditions: sub-fermentation stage (until 48 hours) and completely fermentation (144 hours), both conditions at room temperature (25°C). According to preliminary analyzes that were not published yet, the fermentation period of 48 hours enables the cocoa beans to have a high content of phenolic compounds. For these reasons, the condition of 48 hours was chosen.

During the fermentation process, the parameters of temperature, total acidity and pH were monitored (AOAC, 1995). Based on the Barel (2016) methodology, the cocoa beans were daily turned up from one box to the other box manually, to certify the aeration and to uniform

the fermentation of the cocoa mass. Subsequently, the sub-fermented cocoa beans and completely fermented cocoa beans of each batch were sun dried in barges for 5 to 7 days, until the final moisture of 8% (AFOAKWA *et al.*, 2008). The beans were manually moved once per day to obtain a uniform drying. After the drying process, the cocoa beans were bagged and transported to the UFBA Pharmacy Faculty, where they were stored at a room temperature until the analysis was performed.

2.3. CUT TEST

After the drying process, the quality of sub-fermented and completely fermented cocoa beans was evaluated according to Brazilian legislation Normative Instruction 38/2008 (BRAZIL, 2008), by the longitudinal cut test of 300 cocoa beans randomly collected. The physical and physical-chemical parameters were evaluated, such as cotyledon characterization and compartmentation of cocoa beans, moisture, pH, total acidity (AOAC, 1995). The results of the cut test were expressed as a percentage, while the others results were expressed as mean \pm standard deviation.

2.4. FERMENTATION INDEX

The fermentation index test was carried out according to Gourieva and Tserrevitinov (1979) with modifications. This spectrophotometric method is based on the degradation of anthocyanins in products such as cyanidin-3- β -D-galactoside and cyanidin-3- α -L-arabinoside during the fermentation process. Anthocyanin pigments in acidic conditions give a red to purple color, with an absorbance of 500-550 nm before fermentation. It is presumed that the oxidation of these products favors the development of brown pigments with absorbance values below 500 nm (MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003). Therefore, the fermentation index is defined as the absorbance ratio measured between 460 nm and 530 nm. Twenty milligrams of grounded sub-fermented and completely fermented dry cocoa beans, defatted, were extracted with 10 mL of methanol: HCl solution (97:3). The extracts were stored at 8°C for 18-20 hours and then; filtered (Qualy 11.0 J.Prolab). Measurements were performed individually in a spectrophotometer UV-Vis (Bel Photonics UV-M51) at wavelengths of 460 nm and 530 nm. The fermentation rates of the samples were calculated using the absorbance ratio.

2.5. COCOA AND CHOCOLATE PROCESSING

The cocoa beans were submitted to cleaning and roasting steps (Drying over, DeLeo, model A35EAF8, 0612), at 120°C for 25 minutes, following the methodology established by

chocolate industries. Then, the roasted cocoa beans were crushed by a manual pressing with wooden roll, to remove the peel and germ (to obtain cocoa nibs).

The cocoa mass content was determined according to simplex planning, through the independent variables X_1 and X_2 (Table 1), corresponding the sub-fermented nibs percentage and completely fermented nibs percentage, respectively. Proportion levels ranged from 20 % to 80 %, according to preliminary experiences. The control treatment was identified as CFN (100 % completely fermented cocoa nibs).

Table 1 - List of identifiers cocoa nibs and chocolate samples with the independent variables obtained from the simplex planning.

Samples		Independent variables	
Nibs	Chocolates	X_1 (%)	X_2 (%)
N1	C1	80	20
N2	C2	20	80
N3	C3	65	35
N4	C4	35	65
N5	C5	50	50
SFN	-	100	0
CFN	CC	0	100

X_1 : sub-fermented cocoa nibs (SFN) and sub-fermented cocoa mass (SFM) for chocolate samples; X_2 : completely fermented cocoa nibs (CFN) and completely fermented cocoa mass (CFM) for chocolate samples.

Source: The authors (2020).

The base formulation for the production of chocolates was 66.3 % of cocoa content: cocoa mass (610 g), commercial refined sugar (333.5 g), cocoa butter (53 g) (Barry Callebaut, Ilheus) and lecithin from soybean (3.5 g) (Our Creator, Pantec Food Technology, Sao Paulo). Cocoa nibs were grounded (NutriNinja, model BL480BR30, HAI XIN Technology (Shezhen)) to obtain the cocoa liquor, which was transferred with the other ingredients to the conching step in the Melanger equipment (Model Spectra 11, USA). The conching and refining process lasted 24 hours, following the methodology of Leite, Bispo and Santana (2013). The chocolates were produced with the same proportions of the cocoa mass mentioned in Table 1. The control chocolate was identified as CC. Afterwards, the chocolates were molded in a polyethylene former, producing 5 grams bars. The chocolates were cooled, wrapped in aluminum packaging and stored at 8°C until analyzes.

2.6. SENSORY EVALUATION OF CHOCOLATES

The judges received 5 grams squares of each chocolate samples, which were served in plastic plates labelled with 3-digit random numbers, according to a randomized block design. Water and cracker biscuit without salt were used to cleanse the palate. Volunteers without

restriction - regardless of age, sex or social class - who were not trained, recruited from the Federal University of Bahia, Brazil, were invited to participate of the sensory tests according to the available interest time and the absence of allergy to cocoa or chocolate. Ethical clearance approval was granted by the Research Ethics Committee of the University of Bahia State - UNEB (Process n.1.231.812) and CAAE (Presentation Certificate for Ethical Appreciation): 47478315.0.0000.0057 for sensory evaluation of this study. Prior to testing, each participant signed a consent form.

Previously, was performed a sensory evaluation using the just-about-right scale for the evaluation of the bitterness and astringency attributes in the chocolate samples, through a five point scale ranging from 5 = much more bitter/astringent than the ideal to 1 = much less bitter/astringent than the ideal. The test was carried out in individual sensory booths at 22°C with white light using 75 volunteers. The acceptance test was carried out with 120 judges that evaluated the acceptability of the appearance, aroma, flavor, texture and overall acceptability of the chocolates using a 9-points hedonic scale (9 = liked extremely to 1 = disliked extremely); and in the same session, the judges also evaluated the purchase intention through a purchase intention test (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2006), using a 5-points scale, ranging from 5 = certainly would buy to 1 = certainly would not buy.

2.7. ANALYSIS OF VOLATILES

2.7.1. Extraction of volatile compounds

The volatile compounds from samples (2.0 g) shown in Table 1 were extracted using the Headspace-Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME) Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) technique, as previously described (RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2011). A 50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) SPME fiber provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used to extract the volatile compounds from the seeds, cocoa beans, cocoa nibs and chocolates. The fiber was equilibrated for 5 minutes at 250°C, while the sample was equilibrated for 20 minutes at 60°C and then exposed to the fiber for 40 minutes at the same temperature. The chocolate samples analyzed by HS-SPME-GC-MS were chosen (C1, C2 and C4), as well as the respectively cocoa nibs. The raw cocoa seed (RCS), sub-fermented dry cocoa beans (SCB), completely fermented dry cocoa beans (CCB) and control chocolate (CC) were also analyzed in duplicate.

2.7.2. Separation and Identification of volatile compounds

The volatile compounds were analyzed by the Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) (Perkin Elmer Clarus 500, Model CT 06484, Shelton, EUA), equipped with an Omegawax 250 capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness). The oven temperature was set at 50°C for 1 min, which was then increased up to 240°C at a rate of 3°C min^{-1} , and finally maintained at 240°C for 5 minutes. The carrier gas was helium with high-purity at 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The injector, at splitless mode was set at 250°C for (5 min). The selective mass detector was a quadrupole (Perkin Elmer Clarus 500, Model CT 06484, Shelton, EUA), with an electronic impact ionization system at 70 eV, 230°C interface temperature, 150°C of quadrupole temperature and 230°C of source temperature. Injections were performed by fiber exposition for 5 min at 250°C. Volatile compounds were identified by comparing the mass spectra of the compounds in the samples with the database of the National Institute of Standards and Technology (NIST Mass Spectral library, version 2.0, 2005), with a match of the least 80 % (UTRILLA-VÁZQUEZ *et al.*, 2020). A maximal acceptable coefficient of variation was 30 % for a given compound (CEVALLOS-CEVALLOS *et al.*, 2018). Aroma descriptors were obtained through literature. The relative percentages of individual volatile compounds were calculated from the total contents of volatiles on the chromatograms (ASCRIZZI *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020).

2.8. STATISTICAL ANALYSIS

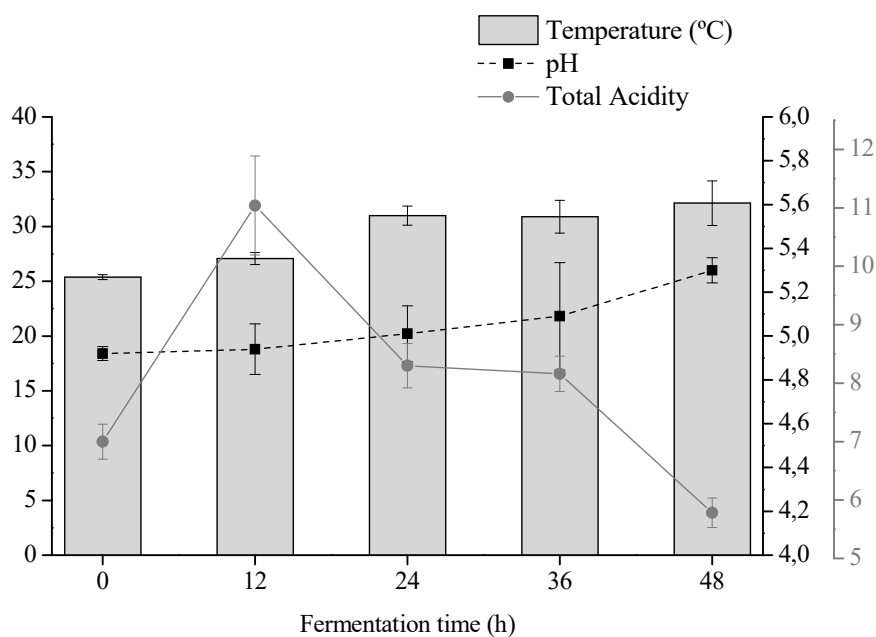
The scores obtained from the acceptance and purchase intention tests of the chocolates, the physical and physical-chemical characterization of the fermentation and drying process were subjected to statistical analysis based on ANOVA. The means of acceptance test were compared using Tukey test at a 5 % probability ($p < 0.05$), while the physical and physical-chemical characterization were compared using Student T test, with the same level of significance between samples. The just-about-right test was subjected to a statistical analysis based on Friedman test at a 5 % probability ($p < 0.05$). The data were presented in the configuration: mean \pm standard deviation. The peak area of each volatile was obtained and aligned by using Principal Component Analysis (PCA). Tukey test also was applied to analyze the differences among the means of the volatile compounds. All statistical analyzes were performed using XLSTAT® (Addinsoft INC., Anglesey, United Kingdom, 2020).

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. PHYSICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF COCOA BEANS

The fermentation process resulted in an increase of temperature on the first hours, reaching 32°C with 48 hours of fermentation (Figure 1). This increase results from the intense activity of yeasts and lactic acid bacteria which thrive in the sugar rich, acidic and anaerobic environment. Simultaneously, citric acid assimilating heterofermentative lactic acid bacteria cause a slight increase in pH of the pulp, which together with the increased oxygen tension favours growth of aerobic acetic acid bacteria. Ethanol initially formed by the yeasts is oxidized into acetic acid by acetic acid bacteria in an exothermic process that cause a temperature increase (CAMU *et al.*, 2007; CRAFACK *et al.*, 2014). The conditions of high temperature and acidity, inhibit the germination of the seeds causing death of the embryo (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001). During the cocoa complete fermentation (144 hours), the highest temperature obtained generally ranges between 43.5°C and 50°C (LOPES; PEZOA-GARCÍA; VESCONSELOS, 2003). Moreira *et al.* (2018) found a temperature variation between 29°C at the beginning of the fermentation process and 48°C at the end of 144 hours. Studying the cocoa hybrids CEPEC2004, PH15, PS1319 and SJ02, they observed that the highest temperature was found in the end of fermentation, ranging from 49.18°C to 48°C between them.

Figure 1 - Evolution of temperature, pH and total acidity during the fermentation time of sub-fermented cocoa beans



Source: The authors (2020).

The fermentation process was also evaluated by pH and total acidity. Figure 1 shows the values found for both parameters during the 48 hours of fermentation. It was found that the pH of the raw cocoa seed (0 hours) varied in the first hours, until reaching 5.04 at the end of the sub-fermentation process (48 hours), while the acidity of the seeds increased and subsequently reduced to 5.78 during the same period. Both parameters analysed showed a significant difference ($p < 0.05$). A very low pH can indicate lower quality cocoa beans. Portillo, Grasiani and Betancourt (2007) found that pH values lower than 4.5 decreased cocoa beans aromatic potential, thus, chocolate manufactured with intermediate pH (5.20-5.49) was evaluated with higher notes of chocolate flavor (JINAP; DIMICK; HOLLENDER, 1995).

Table 2 shows the results of the physical and physical-chemical determinations (moisture, pH, total acidity, cut test and fermentation index) performed on the sub-fermented dry cocoa beans (SCB) and completely fermented dry cocoa beans (CCB) after drying process. The moisture content of the cocoa beans remained below 8 %, while the pH and total acidity varied considerably in relation to the fermentation time. The SCB and CCB fermented cocoa beans presented a pH of 6.19 and 4.45; and acidity of 12.68 and 20.42 (meq NaOH/ 100 mL), respectively. Moisture was the only parameter that showed no significant difference ($p > 0.05$). According to Afoakwa *et al.* (2008), if cocoa beans have a high pH (5.5–5.8) after fermentation, they are considered sub-fermented with a low index of fermentation, while cocoa beans with lower pH (4.75–5.19) are considered well fermented. Chocolates made from cocoa beans with a high and lower pH were evaluated sensorially, with lower notes of chocolate and higher notes

of off-flavor descriptors. For this reason, chocolates are generally produced with intermediate pH (5.20–5.49) (JINAP; DIMICK; HOLLENDER, 1995). Efraim *et al.* (2010), carried out a similar study when analyzing the pH and acidity of dried cocoa beans at the beginning of fermentation, after 36 hours and 168 hours. The authors obtained values of 5.18, 5.43 and 5.84 for pH, respectively; and acidity of 8.94, 12.64 and 13.76 for the studied times.

Table 2 - Physical and physical-chemical characterization of dry fermented cocoa beans

		Samples	
		SCB	CCB
Physicochemical changes	Moiture (%)	7.75 ± 0.37 ^a	7.74 ± 0.25 ^a
	pH	6.19 ± 0.03 ^a	4.45 ± 0.04 ^b
	Total acidity (mEqNaOH/100g)	12.68 ± 0.75 ^a	20.42 ± 0.60 ^b
Characterization	Brown (%)	0.00	33.67
	Violet (%)	17.67	16.33
	Brown/Violet (%)	0.00	47.33
	White (%)	3.67	1.33
	Slate (%)	77.67	0.00
Defects	Flattened (%)	1.00	0.33
	Broken (%)	0.00	1.00
	Moldy (%)	0.00	0.00
	Germinated (%)	0.00	0.00
	Smoke (%)	0.00	0.00
	Damaged by insects (%)	0.00	0.00
Cotyledon compartmentation	Without compartmentation (%)	32.33	7.67
	With compartmentation (%)	67.67	92.33
Fermentation index	FI (Fraction I/Fraction II)	0.70 ± 0,03 ^a	1.13 ± 0.02 ^b

SCB means sub-fermented dry cocoa beans. CCB means completely fermented dry cocoa beans.

Mean ± Standard Deviation. Means followed by the same letters in line are not statistically different (Student's T Test; $p > 0.05$).

Source: The authors (2020).

According to Lopez (1983) the cocoa acidity is not typical of seeds, but is acquired during fermentation when cotyledon tissues absorb acids and other substances produced by microorganisms involved in the process. Estimation of the degree of fermentation is commonly carried out by assessing the characteristics changes inside the cocoa bean, or phenolic compounds as an indication of fermentation (LEÓN-ROQUE *et al.*, 2016). Characteristics changes inside the cocoa bean can be obtained by visual assessment, using the cut test: unfermented beans are grey (slate), sub-fermented cocoa beans are violet or purple and completely fermented cocoa beans are brown (CAPORASO *et al.*, 2018).

The cut test of the dry fermented cocoa beans was performed by evaluating the characteristics inside the cocoa beans, defects and compartmentalization of the cotyledons. It was observed that the dominant characteristics of SCB were slate (77.67 %) and violet (17.67

%), and for the CCB sample the predominant characterization was brown/violet (47.33 %) and brown (33.67 %). The violet characteristic of the raw cocoa beans and sub-fermented dry cocoa beans comes from phenolic compounds and anthocyanins which, during fermentation process, form poly-condensate products responsible for the typical brown characteristic on cocoa derived products (REDGWELL; TROVATO; CURTI, 2003). Phenols in cocoa beans are stored in the pigment cells of the cotyledons of the seeds and depending on the amount of anthocyanins, those pigment cells, also called polyphenol-storage cells, are white to deep purple (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; BEG *et al.*, 2017).

Regarding the cotyledon compartmentation, it was found that the SCB showed 67.67 % compartmented cotyledons and 32.33 % non-compartmented. The CCB presented 92.33 % of compartmented cotyledons, being considered well fermented. Compartmentalization is consequence of the rupture of cell walls caused by the death of the embryo, due to the high temperature and acid formation, bring substances that were previously separated into different types of cells, causing a series of important biochemical reactions for the formation of flavor precursors of cocoa beans (EFRAIM *et al.*, 2010). In this study, was visually verified the absence of the smoke aroma, moldy cocoa, damaged by insects or germinated. The quantity of flattened and broken cocoa beans was equal to 1 %. Therefore, through the cut test, the SCB (48 h) were considered out of type because they presented slate color over 15 %, while the cocoa beans fermented for 144 hours (CCB) were classified as Type I, with superior quality (BRAZIL, 2008).

The fermentation index is another method used to evaluate the efficiency of the fermentation in cocoa beans through the color (CAMU *et al.*, 2008). In this study it was observed that SCB exhibit fermentantion index of 0.70, whilst the CCB showed 1.13, differing significant ($p < 0.05$). Fermentation index has been shown to increase continuously over fermentation time (ROMERO-CORTES *et al.*, 2013), being previously correlated with total polyphenol content, which starts to decrease significantly over fermentation. Polyphenol content in cocoa is an important quality parameter, as it affects the bitterness and astringency of the final product, as well as its health properties (CAPORASO *et al.*, 2018).

3.2. SENSORY EVALUATION OF CHOCOLATES

The scores for the appearance and texture attributes corresponded to the hedonic term "liked moderately" (Table 3). The samples C1-C5 showed no significant difference ($p > 0.05$) for these attributes. The scores of the aroma attribute varied between "liked lightly" and "liked moderately", and the flavor attribute was between "disliked lightly" and "liked lightly". The C1

sample presented lower score for flavor and overall acceptability. The scores of overall acceptability attributed varied between “neither liked/ neither disliked” and “moderately liked”. The relationship between the presence of sub-fermented cocoa mass (SFM) and sensory acceptability seems to be highly significant ($p < 0.05$). The chocolate samples with higher concentration of SFM showed lower scores for consumer acceptance, possibly due to the presence of bitter and astringent flavor caused by higher levels of phenolic compounds. Higher acceptance scores were observed on chocolate samples with proportions of 20 % (C2) and 35 % (C4) of SFM.

Table 3 - Averages of acceptance test, just-about-right scale of bitter and astringency parameters and purchase intention of chocolates produced

Attributes	Samples/Average scores				
	C1	C2	C3	C4	C5
Hedonic Scale					
Appearance	7.64 ± 1.41 ^a	7.87 ± 1.29 ^a	7.68 ± 1.35 ^a	7.86 ± 1.09 ^a	7.69 ± 1.33 ^a
Aroma	6.75 ± 1.64 ^b	7.34 ± 1.46 ^a	6.73 ± 1.64 ^b	7.24 ± 1.38 ^{a, b}	7.00 ± 1.47 ^{a, b}
Flavor	4.88 ± 2.36 ^c	6.36 ± 2.19 ^{a, b}	5.60 ± 2.17 ^{b, c}	6.56 ± 2.02 ^a	5.84 ± 2.13 ^{a, b}
Texture	7.02 ± 1.85 ^a	7.50 ± 1.53 ^a	7.09 ± 1.89 ^a	7.58 ± 1.40 ^a	7.23 ± 1.59 ^a
Overall Quality	5.35 ± 2.07 ^c	6.81 ± 1.81 ^a	6.03 ± 2.03 ^{b, c}	6.90 ± 1.79 ^a	6.36 ± 1.97 ^{a, b}
Just-about-right Scale*					
Bitter (%)	3.75 ± 1.40 ^c	2.09 ± 1.36 ^a	3.11 ± 1.43 ^{b, c}	2.72 ± 1.40 ^a	2.91 ± 1.31 ^b
Astringency (%)	3.75 ± 1.45 ^b	2.01 ± 1.26 ^a	3.17 ± 1.46 ^b	2.56 ± 1.35 ^a	3.13 ± 1.29 ^b
Purchase Intention	2.38 ± 1.26 ^a	3.56 ± 1.44 ^c	2.89 ± 1.36 ^b	3.56 ± 1.32 ^c	2.93 ± 1.33 ^b

Mean ± Standard Deviation. Means followed by the same letter in line do not differ significantly (Tukey test; $p > 0.05$; *Friedman test; $p > 0.05$). C1 (80 % sub-fermented cocoa mass (SFM): 20 % completely fermented cocoa mass (CFM)), C2 (20 %: 80 %), C3 (65 %: 35 %), C4 (35 %: 65 %), C5 (50 %: 50 %).

Source: The authors (2020).

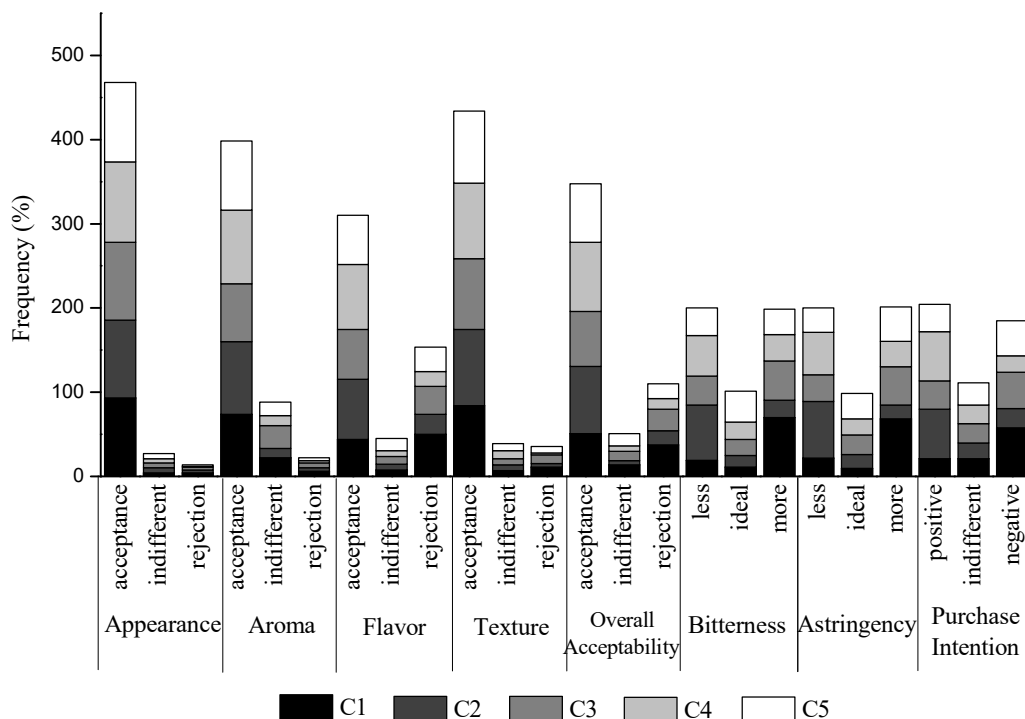
Regarding the just-about-right scale for the intensity of attributes bitterness and astringency, it was observed that samples C1 and C3 showed greater intensity of bitterness and astringency. This result was already expected, since both samples were developed with the highest concentrations of SFM, with high content of phenolic compounds that would not be oxidized during the uncomplete fermentation and roasting process. Samples C4 and C5 indicated intermediate intensities for the bitter taste and astringent taste, respectively. Sample C2 obtained the lowest intensity for both attributes, caused by the lower amount of SFM used in formulation.

In relation to the purchase intention, samples C2 and C4 showed the same positive score, corresponding to the hedonic term “certainly would buy”, followed by sample C5 with a high

intention of “maybe buying/ maybe not buying” and, sample C1 exhibited the lowest purchase intention represented by the category "certainly would not buy". There was a significant difference ($p < 0.05$) between the evaluated attributes from the ideal scale and purchase intention test. Jinap, Jamilah and Nazamid (2005) studied changes in the polyphenols ability to produce astringency during cocoa beans roasting. Their results indicated that astringency reduction in cocoa products is determined by the loss of polyphenols through its oxidation and exudation from the cocoa beans, and by interactions with proteins during the process. The polyphenol–protein interaction would reduce the capacity of polyphenol to precipitate salivary proline-rich protein, thus decreasing the astringent sensation.

Figure 2 shows the frequency distribution of "acceptance" (scores from 6.0 to 9.0), "indifference" (scores equal to 5.0) and “rejection” (scores from 1.0 to 4.0), associated with the five samples of chocolate for attributes such as aroma, flavor, texture and overall acceptability through the hedonic scale used. There is also the frequencies of "ideal" (score 3.0 of scale), "more intense than the ideal" (scores from 4.0 to 5.0 of scale) and "less intense than the ideal" (scores from 1.0 to 2.0 of scale) for attributes bitterness and astringency. Finally, the response frequency for purchase intention "positive" (scores 4.0-5.0), "indifferent" (score 3.0) and “negative” (scores 1.0-2.0).

Figure 2 - Frequency (%) of scores assigned to the chocolate samples in relation to acceptance, just-about-right scale and purchase intention

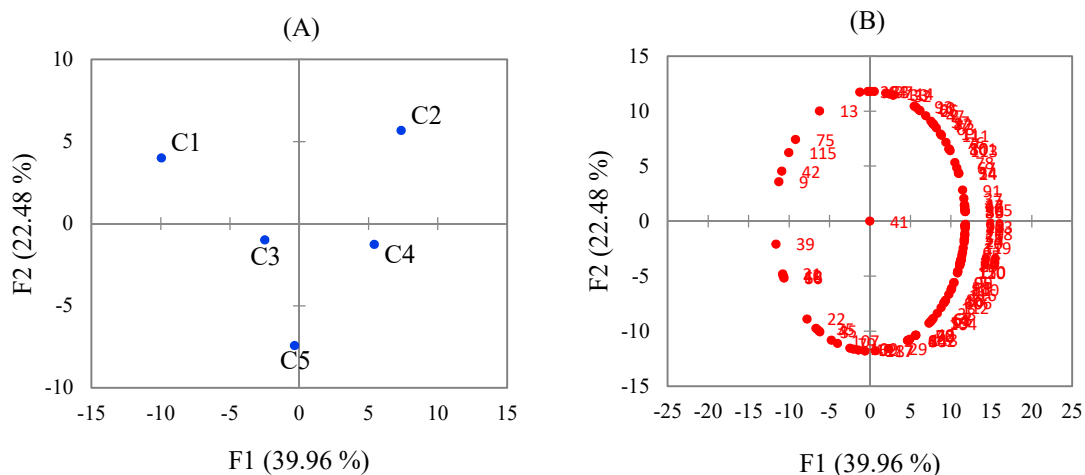


C1 (80 % sub-fermented cocoa mass (SFM): 20 % completely fermented cocoa mass (CFM)), C2 (20 %: 80 %), C3 (65 %: 35 %), C4 (35 %: 65 %), C5 (50 %: 50 %).
Source: The authors (2020).

Considering the ideal bitterness and astringency, the C5 sample stood out with 37 % and 30 %, respectively. The purchase intention was considered adequate for all samples, since samples produced with a higher content of SFM were already expected to have a negative purchase intention. Consequently, samples C2 and C4 showed 58.5 % positive purchase intention, whilst that sample C1 indicated 57.6 % negative purchase intention. In an overall assessment, C1 and C3 had the highest rejections in all parameters, while that C5 obtained moderated rejection. The best acceptance for the attributes: appearance, aroma, flavor, texture, overall acceptability, bitterness and astringency and purchase intention, was showed by the C4 followed by C2.

Figure 3 shows the internal preference map for the overall acceptability attribute, and explains 62.43 % of total variation, showed in two components; F1 (39.96 %) and F2 (22.48 %). In this study it was possible to visualize the preference of most judges for the C2 and C4 samples (lowest % of SFM). Figure 3A exhibits which samples were preferred by the judges, indicated through positive and negative axis, whilst in Figure 3B the dots represent the 120 judges, located near the region of the samples of your preference. The preference for these chocolates samples probably was due to the lower intensity of bitterness and astringency. Conversely, the less accepted chocolate samples (C1 and C3) were produced with 80 % and 65 % of SFM, respectively.

Figure 3 - Internal Preference Mapping obtained with the results of the overall acceptability of the chocolates produced.



Samples preferred by the judges (A) and representation of judges (B). C1 (80 % sub-fermented cocoa mass (SFM): 20 % completely fermented cocoa mass (CFM)), C2 (20 %: 80 %), C3 (65 %: 35 %), C4 (35 %: 65 %), C5 (50 %: 50 %).

Source: The authors (2020).

3.3. VOLATILES COMPOUNDS

3.3.1. Relative concentration of volatile compounds

Fifty-five volatiles compounds were identified by HS-SPME-GC-MS during the fermentation and drying process, in cocoa nibs and in chocolate samples. They are exhibited by a functional chemical group in Table 4. Some of these compounds have been reported as responsible for producing desirable note flavors and off-flavors in cocoa beans during the fermentation, drying and roasting process (RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2011). Twenty-five volatile compounds were detected at the beginning (0 h) of fermentation process; while twenty-nine and thirty-five volatiles compounds were found at 48 h and 144 h of fermentation, respectively. Forty-nine volatile compounds were detected in cocoa nibs samples and forty-one volatiles compounds were detected in chocolate samples.

Table 4 - Volatile compounds identified by Headspace-Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS) during different fermentation time, in roasted cocoa beans (nibs) and chocolate samples

Group	Retention time (min)	Compound	Odor description	Samples found		
				Cocoa beans	Cocoa nibs	Chocolates
<i>Acids</i>						
1	37.49	2-ethyl hexanoic acid		all		all
2	41.39	octanoic acid	Sweet, cheese, oily, fatty ^{b,c}	all	CFN, N1, N2, N4	all
3	44.61	nonanoic acid	Green, fatty ^b	all	CFN, N1, N2, N4	all
4	47.91	decanoic acid	Rancid, fatty, metal ^b	CCB		all
<i>Alcohols</i>						
5	5.00	prenol		RCS		
6	6.74	3-methyl-2-butanol			SFN, N1	C1
7	9.37	1-pentanol	Flowery, sweet ^d , nail polish, pungen ^c	all	all	all
8	13.45	2-heptanol	Citrus, fresh, lemon grass-like ^a , sweet, citrusy ^{b,c,e,f}	all	all	all
9	15.60	3-ethoxy-1-propanol		SCB	SFN	
10	22.25	2,3-butanediol	Cocoa butter ^{c,f} , sweet, flowery ^d , creamy, buttery ^c	SCB, CCB	all	all
11	35.67	phenylethyl alcohol	Flowery ^d , spicy, honey-like, rose ^{a,b} , caramel ^c	all	all	all
<i>Aldehydes</i>						
12	3.25	2-methylbutanal	Malty, chocolate-like ^{a,b,c,f} , cocoa ^{d,e}	RCS, CCB	CFN, N1, N2, N4	all
13	21.36	benzaldehyde	Bitter ^{a,c} , grass ^d , candy, almond, burnt sugar ^c	all	all	all
14	40.98	5-methyl-2-phenyl-2-hexenal	Cocoa ^{a,c} , sweet, roasted cocoa ^d		CFN, N1, N2, N4	C2, C4, CC
<i>Esters</i>						
15	2.93	ethyl acetate	Pineapple ^{c,f} , jasmine ^b , nail polish, fruity ^d	CCB	CFN, N1, N2, N4	
16	4.44	isobutyl acetate	Fruit ^f , apple, banana ^{b,d,e}	CCB	N1, N2, N4	
17	5.65	2-pentanol acetate = amyl acetate		CCB	CFN, N1, N2, N4	
18	6.88	isoamyl acetate	Banana ^b , pear ^d , fruit ^f	CCB	all	C1, C2, CC
19	17.98	ethyl octanoate	Fruity, floral ^f , pineapple ^{a,c} , flowery ^c	SCB, CCB	all	all
20	25.90	ethyl decanoate	Pear, grape ^f , brandy ^{a,b,d,e}	CCB	CFN, N2, N4	all
21	26.64	1,3-propanediol diacetate			CFN	C2, C4, CC
22	27.40	diethyl succinate	Pleasant aroma ^f		CFN, N1, N2, N4	C2, C4, CC

(continued on next page)

Table 4 (continued on next page)

Group	Retention time (min)	Compound	Odor description	Samples found		
				Cocoa beans	Cocoa nibs	Chocolates
23	29.25	benzyl acetate	Floral, jasmine ^{b,f} , rose ^d , fresh ^c	SCB, CCB	CFN, N2, N4	C2, C4, CC
24	31.30	ethylphenyl acetate	Fruit, sweet ^f , honey-like ^{a,b} , flowery, rose ^{d,e}	SCB, CCB	all	all
25	32.33	2-phenylethyl acetate	Fruity, sweet ^c , honey ^a , floral ^f , flowery ^d	all	all	all
26	33.13	isopenthyl acetate		all	all	all
27	33.37	ethyl laurate	Leaf, fruit, floral ^{b,c,f}	SCB, CCB	all	all
<i>Furans, Furones, Pyrans & Pyranones</i>						
28	19.18	furfural	Bread, almond, sweet ^c		SFN, N1	C1
29	23.40	5-methyl furfural	Caramellic, breadly, coffee-like ^c		all	
30	26.84	furfuryl alcohol			SFN, N1	C1
31	37.43	3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone (maltol)	Nutty ^f		CFN, N1, N4	
32	40.66	5-acetyldihydro-2(3H)-furanone			all	all
33	47.18	3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one			CFN, N4	CC
<i>Ketones</i>						
34	3.97	2-pentanone	Fruit ^f , sweet, cheesy ^{b,d,e}	all	SFN	
35	8.60	2-heptanone	Fruity ^f , cheese-like ^a , flowery ^b , green ^d , pear, grape, brandy ^c	all	all	
36	16.13	2-nonanone	Flowery, fatt ^d , fruit, musty ^c	all	all	all
37	23.54	3,6-heptanedione		RCS		
38	25.39	butyrolactone	Must, flowery, almond, sweet, aromatic creamy ^{b,c}	SCB, CCB	all	all
39	26.21	acetophenone	Sweet, almond, flowery ^f , must-like ^{a,b} , almond, pungent ^c	all	all	all
40	38.51	3-methoxy-3-methyl-2-butanone		RCS		
<i>Pyrazines</i>						
41	11.37	methylpyrazine	Cocoa, green, hazelnut ^d , nutty, chocolate, roasted ^c	SCB, CCB	all	all
42	13.87	ethylpyrazine	Peanut-butter, musty, nutty ^d		SFN, N1, N2, N4	
43	14.34	2,3-dimethylpyrazine	Caramel, cocoa ^{a,b,e} , sweet ^f , baked ^d	all	all	all
44	15.86	2-ethyl-6-methylpyrazine	Roasted, green, coca-like ^a		SFN, N2, N4	
45	16.57	trimethylpyrazine	Cocoa, roasted nuts, peanut ^c	all	all	all
46	19.36	tetramethylpyrazine	Roasted, green, coffee, cocoa ^a , milk-coffee, chocolate ^{b,e}	all	all	all
47	20.88	2,3,5-trimethyl-6-ethylpyrazine	Candy, sweet ^{b,d,f}		CFN, N1, N2, N4	all

Table 4 (continued)

Group	Retention time (min)	Compound	Odor description	Samples found		
				Cocoa beans	Cocoa nibs	Chocolates
<i>Pyrroles</i>						
48	37.68	2-acetylpyrrole	Chocolate, hazelnut ^{b,c,d,e,f}	all	all	all
49	39.45	1H-pyrrole-2-carboxaldehyde	Nutty ^f		all	all
50	42.01	2-formyl-1-methylpyrrole			all	CC
<i>Terpene alcohols</i>						
51	18.16	cis-linalool oxide (furanoid)	Sweet, nutty ^{a,f} , flowery ^d	RCS, SCB		
52	22.49	linalool	Flowery ^a , lavender ^c , rose ^d	all	all	all
53	30.54	trans-linalool oxide (pyranoid)	Floral ^a	all	all	all
<i>Others</i>						
54	33.96	2-methoxy phenol (guaiacol)	Smoke, sweet ^c , phenol, spicy ^c	CCB	CFN, N4	CC
55	63.87	xanthone		all	all	all

^a Ascrizzi *et al.* (2017)

^b Rodriguez-Campos *et al.* (2011) and Rodriguez-Campos *et al.* (2012)

^c Moreira *et al.* (2018)

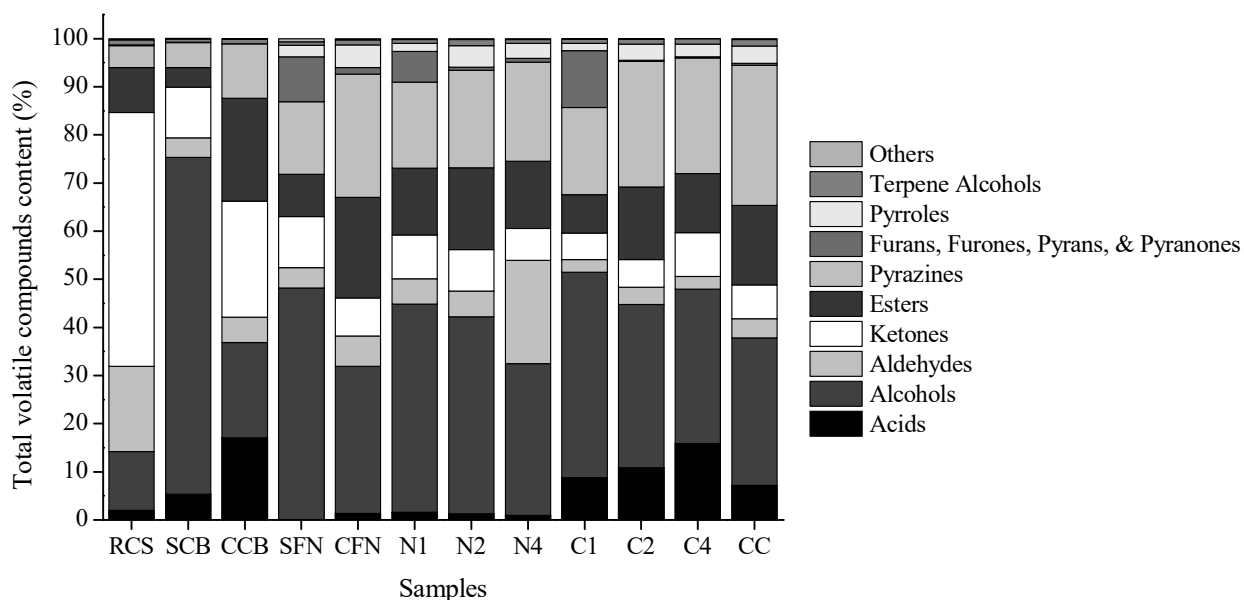
^d Crafacck *et al.* (2014)

^e Utrilla-Vázquez *et al.* (2020)

^f Aprotosoie *et al.* (2016)

In general, the total content of alcohols, acids, pyrazines and esters were higher than the content of aldehydes and ketones, pyrroles, furans, furones, pyrans, pyranones, terpene alcohols and others (Figure 4). The esters (13) group showed a higher number of individual compounds than alcohols (7), pyrazines (7), ketones (7), furans, furones, pyrans and pyranones (6), acids (4), aldehydes (3), pyrroles (3), terpene alcohols (3) and others compounds (2) groups. A superior number of compounds were found by Moreira *et al.* (2018) at the beginning and end of the fermentation of hybrids cocoa (CEPEC2004, PH15, PS1319 and SJ02) and in chocolate samples. They found 23 alcohols, 18 esters, 13 ketones, 11 aldehydes, 9 acids, 2 pyrazines, 1 pyrrole and 1 compound of another group.

Figure 4 - Total relative concentration of major classes of volatile compounds identified by HS-SPME-GC-MS from different process stages



RCS means raw cocoa seed; SCB means sub-fermented dry cocoa beans; CCB means completely fermented dry cocoa beans; SFN means sub-fermented cocoa nibs; CFN means completely fermented cocoa nibs; N1 means 80 % of SFN: 20 % of CFN; N2 means 20 %: 80 %; N4 means 35 %: 65 %, C1 means 80 % of sub-fermented cocoa mass (SFM): 20 % of completely fermented cocoa mass (CFM); C2 means 20 %: 80 %; C4 means 35 %: 65% and; CC means control chocolate.

Source: The authors (2020).

3.3.2. Concentration of acids

Four volatile acids were detected in all samples. The total content of acids increased significantly ($p < 0.05$) during the fermentation and drying process (Figure 4). These increases are results of the metabolisms of sugars contained in the pulp of cocoa (BONVEHÍ, 2005). The

highest total content of acids were found in the samples CCB (17.04 %) due to the presence of nonanoic acid. The chocolate samples were characterized by the presence of all acids identified: nonanoic acid (5.52-12.23 %), octanoic acid (1.11-4.62 %), 2-ethylhexanoic acid (0.23-1.46 %) and decanoic acid (0.29-0.74 %).

3.3.3. Concentration of alcohols

Alcohols were the most prevalent group (> 30%) of volatile compounds detected in most samples (Figure 4). This chemical group is generally desired to obtain chocolate with flowery and candy notes (ACULEY *et al.*, 2010). They are produced during the fermentation process as a result of microbial activity and heat degradation of amino acids (RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2011). However, the content of alcohols decreases through chemical degradation or volatilization during drying and roasting. This fact was confirmed by the higher total alcohol content ($p < 0.05$) present in the SCB sample (69.95 %), collected during the intense period of microbiological activity in the fermentation and, consequently SFN (48.20 %), N1 (43.24 %) and C1 (42.75 %). The elevated content was due to the presence of the phenylethyl alcohol (flowery, spicy, and honey-like aroma), a superior alcohol that increased over fermentation and drying process (4.77-49.48 %), and decreased during roasting (21.90-35.83 %) and in chocolate samples (25.69-36.87 %). 2,3-butanediol, another alcohol desirable for high quality cocoa products, was observed in samples with a high content of completely fermented dry cocoa beans: CCB (5.81 %), CFN (5.54 %), N2 (8.62 %); and also showed decrease after conching process: C2 (5.13 %) and CC (4.40 %). The influence of the sub-fermented dry cocoa beans was also verified in 1-pentanol, which presented high content in the SCB (17.30 %), SFN (5.47 %), N1 (5.61 %) and C1 (1.04 %) samples.

3.3.4. Concentration of aldehydes and ketones

Aldehydes and ketones are formed by Strecker degradation of the free amino acids during the roasting (AFOAKWA *et al.*, 2008; APROTOSOAIE; LUCA; MIRON, 2016; ZIEGLEDER, 2009). A high content of aldehydes and ketones is favorable for cocoa quality, due to desirable flavors of cocoa and malty. The mainline aldehyde found in all samples was benzaldehyde (2.23-20.37 %), responsible to confers an intense bitter taste (BONVEHÍ, 2005). 2-methylbutanal (malty and chocolate-like flavor) was also detected in the processing steps, albeit in smaller content of 0.21-3.84 %. The highest total content of aldehydes ($p < 0.05$) was found in N4 sample (21.50 %).

The influence of sub-fermented cocoa mass (SFM) was observed in ketone group. The 2-nonanone and acetophenone were found in all samples. 2-nonanone showed a higher content in samples with high amount of completely fermented dry cocoa beans: CCB (16.00 %), CFN (3.55 %), N2 (3.43 %), C2 (2.68 %) and CC (3.66 %); while acetophenone showed a higher content in samples with a high amount of sub-fermented dry cocoa beans: SCB (7.87 %), SFN (4.37 %), N1 (3.91 %) and C1 (3.00 %). These compounds produced cocoa with flowery and sweet flavor notes (UTRILLA-VÁZQUEZ *et al.*, 2020). However, the higher total content of ketones ($p < 0.05$) was identified in RCS (52.78 %), decreasing during the process steps (Figure 4).

3.3.5. Concentration of esters

Esters are the second most important class of volatile compounds after pyrazines, which provide a fruity flavor in cocoa and derivatives (RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2012). Esters originate from the reaction of an organic acid with an alcohol during the anaerobic phase of fermentation (APROTOSOAIÉ; LUCA; MIRON, 2016; QIN *et al.*, 2016). Thirteen esters were identified in this study (Table 4). The higher total content of esters ($p < 0.05$) was identified in CCB (21.41 %) sample due to 2-phenylethyl acetate. The 2-phenylethyl acetate was found in a higher content in most of samples with high amount of completely fermented dry cocoa beans: CCB (7.50 %), CFN (9.87 %), N2 (9.03 %), C2 (9.54 %) and CC (11.13 %). This volatile compound is also considered one of the key aroma. Ethyl phenylacetate (fruit, sweet, honey-like flavor) was another desired ester found in samples with high content of completely fermented cocoa beans (0.11 to 2.62 %).

3.3.6. Concentration of pyrazines

The group of pyrazines is one of the most important volatile compounds in roasted cocoa beans, representing 40 % of the aroma in roasted cocoa (BONVEHÍ, 2005). Most pyrazines are obtained from Strecker degradation and Maillard reaction, mainly present in foods processed under a high temperature and low-humidity conditions (YU; ZHANG, 2010). However, tetramethylpyrazine (cocoa and chocolate flavor), trimethylpyrazine (cocoa and roasted nuts flavor) and methylpyrazine (nutty, roasted and chocolate flavor) were reported to partly evolve from microbiological activities during fermentation (HINNEH *et al.*, 2019). In this study, it was observed that the total content of pyrazines group ($p < 0.05$) ranged from 4.52 to 29.13 % (Figure 4), and the higher total content was exhibit in CC (29.13 %), C2 (26.11 %) and C4 (24.03 %) samples, respectively, which can explain the positive acceptance of these chocolates.

The higher content observed was in the tetramethylpyrazine (3.49-24.89 %), followed by trimethylpyrazine (0.33-13.22 %), methylpyrazine (0.42-3.99 %) and 2,3-dimethylpyrazine (0.15-1.11 %).

3.3.7. Concentration of others

Others compounds were also identified in this study, such as 5-methylfurfural (caramellic and coffee-like flavor) that was found in cocoa nibs with content ranged from 0.19 to 0.50 %. Furfuryl alcohol and furfural (bread, almond and sweet flavor) were found only in samples with higher amount of sub-fermented cocoa nibs: SFN (1.08 % and 7.66 %), N1 (0.99 % and 4.93 %) and C1 (1.25 % and 10.37 %), respectively. The 5-acetyldihydro-2(3H)-furanone was detected in all cocoa nibs (0.12-0.31 %) and chocolates (0.16-0.27 %) samples. As per as Ziegler (2009), furanones and pyranones are generated during roasting via degradation of monosaccharides, with optimal condition at 130°C for 20 min. The total content of furans, furones, pyrans and pyranones ranged from 0.22 to 11.77 % ($p < 0.05$), while the total concentration of pyrroles group ranged from 0.02 to 4.75 % ($p < 0.05$). The 2-acetylpyrrole (chocolate and hazelnut flavor) was found in all samples, with a increase after roasting (0.02-3.87 %) and a decrease after conching process (1.12-3.19 %).

Others volatiles identified include linalool, pyranoid and furanoid, in terpene alcohols group ($p < 0.05$). Linalool is generally considered a product of biosynthesis and is found in its glycosidically bound formed in the fruit pulp and in the cocoa bean cotyledons (CRAFAK *et al.*, 2014; ZIEGLER, 1990). Linalool and pyranoid were found in all samples with a ranged from 0.54 to 1.01 % and 0.06 to 0.39 %, respectively. Furanoid was found only in RCS (0.08 %) and SCB (0.03 %) samples. These compounds confer a flowery, floral and nutty flavor, respectively. Another compound indentified was guaiacol with content ranged from 0.07 to 0.21 %.

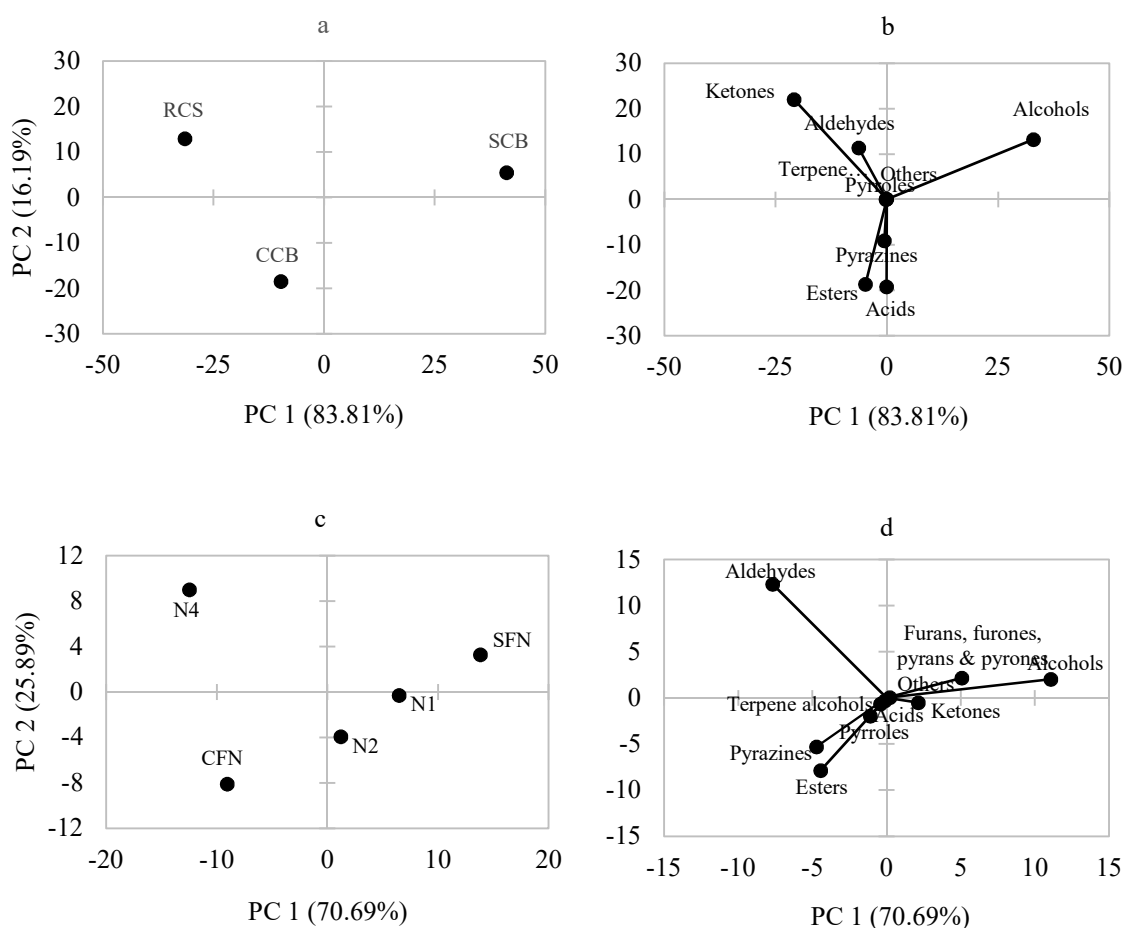
3.4. VOLATILE COMPOUNDS PROFILE

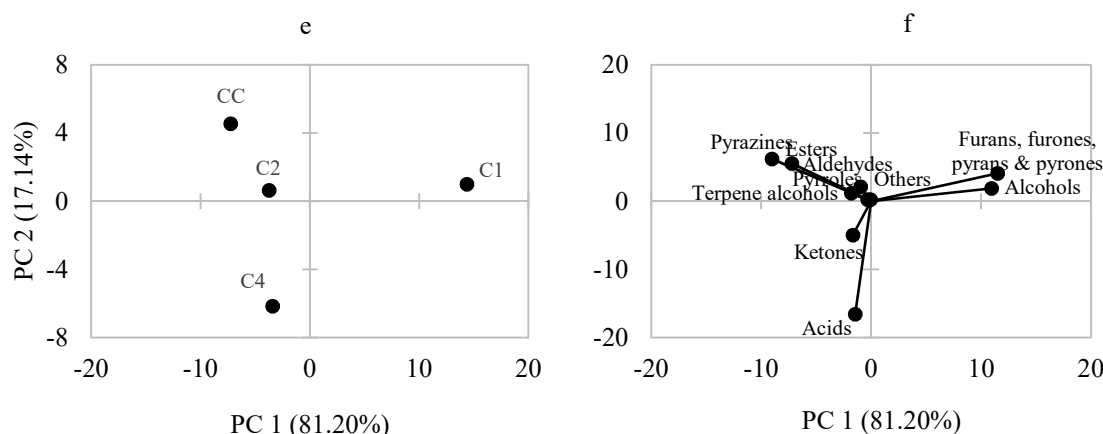
A principal component analysis (PCA) was performed to compair volatiles profiles in samples of fermented dry cocoa beans, cocoa nibs and chocolates. In accordance with Shin *et al.* (2010), PCA can reduce the number of dimensions and define the number of principal components, by compressing the data based on their similarities and differences. With 100 % explain variation, PC1 (83.81 %) and PC2 (16.19 %), the score plot in Figure 5a shows a clear separation of the samples obtained from fermentation and drying process. Completely fermented dry cocoa beans samples (CCB) cluster on the negative axis of PC1, whilst the sub-

fermented dry cocoa beans (SCB) cluster on the positive axis of PC1. Raw cocoa seed (RCS), on other hand, cluster on the positive axis of PC2.

The loading plot in Figure 5b shows that the most of chemical groups of volatile compounds identified have positive loadings on PC1 (clustering to the right in the plot), indicating that the SCB sample was characterized by higher content of volatiles, such as alcohols (phenylethyl alcohol and 1-pentanol). The negative axis of PC1 was characterized by esters (isoamyl acetate and 2-phenylethyl acetate), pyrazines (tetramethylpyrazine) and acids (nonanoic acid) identified in CCB sample. The RCS was located in positive axis of PC2 and was associated with a greater abundance of different ketones (acetophenone, 2-pentatone, 2-heptanone and 2-nonanone) and aldehydes (benzaldehyde and 2-methylbutanal).

Figure 5 - Principal component analysis





Score plot (a) and loadings plot (b) of PC1 and PC2, from volatile compound after fermentation and drying process. Score plot (c) and loadings plot (d) of PC1 and PC2, from volatile compounds in the samples of cocoa nibs. Score plot (e) and loadings plot (f) of PC1 and PC2, from volatile compounds in all chocolate samples. Source: The authors (2020).

During roasting process, the typical roasty and chocolate flavor generated by Maillard reactions, and the specific texture of the beans are developed (APROTOSOAIE; LUCA; MIRON, 2016; IOANNONE *et al.*, 2015). For the nibs samples, PCA (Figure 5c and d) explains 96.56 % of the total variation of the data in two components; PC1 (70.69 %) and PC2 (25.89 %). According to scores (Figure 5c) and loading plot (Figure 5d), SFN and N1 samples were located in positive axis of PC1 component and were associated with a greater abundance of different alcohols (phenylethyl alcohol, 1-pentanol, 2,3-butanediol and 2-heptanol), furans, furones, pyrans, pyranones (furfural and furfuryl alcohol) and ketones (acetophenone, 2-nonanone, 2-heptanone and butyrolactone). Many of compounds indentified in these groups (Table 4) have a desirable attributes described as flowery, sweet, fruit and nutty odor description. The N2 sample also was located in positive axis of PC1 and exhibited a greater abundance of ketones (acetophenone and 2-nonanone), acids (nonanoic acid), pyrroles (2-acetylpyrrole) and terpene alcohols (linalool). CFN sample was located in negative axis of PC1 component and showed high abundance of pyrazines (trimethylpyrazine and tetramethylpyrazine) and esters (2-phenethyl acetate, isoamyl acetate and ethylphenyl acetate), while the N4 sample, located in positive axis of PC2, exhibited a greater abundance of aldehydes (benzaldehyde and 2-methylbutanal), responsible for fruit, honey and roasted cocoa odor descriptors.

Figure 5e and f present the distribution of the scores and the loading plot obtained from the PCA in chocolate samples. The PCA explain 98.34 % of the total variability of the major chemical groups in two components: PC1 (81.20 %) and PC2 (17.14 %). The CC and C2 samples were located in the positive axis PC2 and were correlated with abundance of pyrazines

(tetramethylpyrazine and trimethylpyrazine), esters (2-phenylethyl acetate and ethylphenyl acetate), aldehydes (benzaldehyde), pyrroles (acetylpyrrole) and terpene alcohols (linalool and pyranoid). The majority presence of these compounds may explain the positive acceptance of the chocolate samples (C2), due to the volatile profile obtained (buttery, honey-like, sweet, flowery, fruit, roasted, chocolate and hazelnut flavors). Conversely, C4 was located in negative axis of PC1, revealing a higher content of ketones (butyrolactone, acetophenone and 2-nonanone) and acids (nonanoic and octanoic acids). C1 sample was observed in the positive axis of PC1, which was correlated with a greater abundance of alcohols (phenylethyl alcohol, 2,3-butanediol and 1-pentanol) and furans, furones, pyrans and pyranones (furfural and furfuryl alcohol). According to the high content of volatiles compounds found in C1 sample, the volatile profile obtained was green, flowery, bitter, caramel, almond and roasted flavor, emphasizing the astringent and bitter taste observed in the test just-about-right scale.

The correlation between volatile aroma and sensory attributes may not indicate precisely the cause and effect, however, it shows that the variables change in the same way. The presence of a volatile compound identified in high content, can be correlated with a high intensity of a flavoring attribute (OWUSU; PETERSEN; HEIMDAL, 2013). It was observed that volatiles compounds such as nonanoic acid, phenylethyl alcohol, acetophenone, butyrolactone, furfural, furfuryl alcohol and tetramethylpyrazine showed high content in chocolates produced with 80 % and 35 % of sub-fermented dry cocoa beans. Regarding to volatile compounds found during the steps of processing, phenylethyl alcohol was found in all samples and showed the greater content only in samples resulted from sub-fermented dry cocoa beans, while the 2-phenylethyl acetate and tetramethylpyrazine showed higher content in samples resulting from completely fermented dry cocoa beans.

4. CONCLUSION

The fermentation process of sub-fermented cocoa beans showed an increase in temperature and pH, as well as a reduction in acidity, consistent with the action of microorganisms in the first 48 h of fermentation. Regarding the physical-chemical characterization of the sub-fermented and completely fermented dry cocoa beans, it was observed that the moisture content was satisfactory (lower than 8 %), as well as the pH and total acidity, indicating the efficiency of the fermentation and drying processes. The completely fermented cocoa beans showed higher acidity, due to the production of nonanoic acid. The cut test and fermentation index proved the quality of the cocoa beans used in this study. The influence of the sub-fermented cocoa mass on the sensory characteristics and volatile profile of

the chocolate samples was suggested. The use of sub-fermented cocoa mass in highest percentage (80 %) had a negative impact on sensory characteristics, especially about the flavor, bitterness and astringency attributes. On the other hand, 35 % and 20 % percentage of sub-fermented cocoa mass showed a positive acceptance between the judges for all attributes evaluated, reaching the proposed objective of this study. The set period to sub-fermentation process was sufficient for the development of the precursors of the characteristic chocolate flavor. The results showed that there could be a large number of volatile compounds present in the beginning of fermentation, after 48 hours and 144 hours. Fermented dry cocoa beans could be characterized as having a greater content of compounds such as alcohols, ketones, pyrazines, esters and acids. Cocoa nibs presented a higher content of alcohols, pyrazines, esters, ketones and aldehydes, whilst chocolates showed a greater content of alcohols, pyrazines, esters, ketones, acids and pyrroles.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Riachuelo Farm for obtaining the raw material and assistance in carrying out the fermentation and drying steps of this study; the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia Bahia (FAPESB), for the concession of master's degree fellowship (BOL0683/2019); the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for financial support (4035981/2016-8) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors also thank the researchers Janaina de Carvalho Alves and Leonardo Fonseca Maciel for their collaboration.

5. REFERENCES

- ACIERNO, V. *et al.* Factors contributing to the variation in the volatile composition of chocolate: Botanical and geographical origins of the cocoa beans, and brand-related formulation and processing. **Food Research International**, v. 84, p. 86-95, 2016.
- 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. S300-S307, 2010.
- AFOAKWA, E. O. **Cocoa production and processing technology**. CRC Press, 2014.
- 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, n. 9, p. 840-857, 2008.
- ALBERTINI, B. *et al.* Effect of fermentation and drying on cocoa polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p. 9948-9953, 2015.
- APROTOSOAIE, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 73-91, 2016.
- ASCRIZZI, R. *et al.* From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 474-479, 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 1995.
- BAREL, M. **Du cacao au chocolat: L'épopée d'une gourmandise**. Quae, 2016.
- BATISTA, N. N. *et al.* Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v. 90, p. 313-319, 2016.
- BEG, M. S. *et al.* Status, supply chain and processing of cocoa-A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 108-116, 2017.
- BONVEHÍ, J. S. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 1-2, p. 19-29, 2005.
- BRAZIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Normative Instruction 57 of November 12, 2008. Technical Regulation of Cocoa Almond. Federal Official Gazette, Brasilia, November 13, 2008. Section I, p.2, 2008.
- CAMU, N. *et al.* Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, 2007.
- CAMU, N. *et al.* Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 13, p. 2288-2297, 2008.

- CAPORASO, N. *et al.* Hyperspectral imaging for non-destructive prediction of fermentation index, polyphenol content and antioxidant activity in single cocoa beans. **Food chemistry**, v. 258, p. 343-351, 2018.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. *et al.* Time-related changes in volatile compounds during fermentation of bulk and fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.
- CRAFACK, M. *et al.* Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, v. 63, p. 306-316, 2014.
- DI CARRO, M.; ARDINI, F.; MAGI, E. Multivariate optimization of headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of methylpyrazines in cocoa liquors. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 172-177, 2015.
- EFRAIM, P. *et al.* Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 142-150, 2010.
- GOURIEVA, K. B.; TSEREVITINOV, O. B. Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans. **USSR patent**, v. 646, 1979.
- HINNEH, M. *et al.* Pod storage with roasting: A tool to diversifying the flavor profiles of dark chocolates produced from ‘bulk’ cocoa beans?(part I: Aroma profiling of chocolates). **Food Research International**, v. 119, p. 84-98, 2019.
- GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M.; BERKTAŞ, İ.; ÖZÇELİK, B. Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. **LWT**, 66, 252-259, 2016.
- IOANNONE, F. *et al.* Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. **Food Chemistry**, v. 174, p. 256-262, 2015.
- 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.
- JINAP, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 6, p. 917-924, 2005.
- KONGOR, J. E. *et al.* Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. **Food Research International**, v. 82, p. 44-52, 2016.
- KRUSZEWSKI, B.; OBIEDZIŃSKI, M. W. Multivariate analysis of essential elements in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. **LWT**, 98, 113-123, 2018.

LEITE, P. B.; BISPO, E. S.; SANTANA, L. R. R. Sensory profiles of chocolates produced from cocoa cultivars resistant to *Moniliophthora Perniciosa*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 594-602, 2013.

LEÓN-ROQUE, N. *et al.* Prediction of fermentation index of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) based on color measurement and artificial neural networks. **Talanta**, v. 161, p. 31-39, 2016.

LIU, J. *et al.* A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: relationship to sensory perception. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1362-1372, 2015.

LONČAREVIĆ, I. *et al.* Enrichment of white chocolate with blackberry juice encapsulate: Impact on physical properties, sensory characteristics and polyphenol content. **LWT**, 92, 458-464, 2018.

LOPES, A. S.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 309-316, 2003.

LOPEZ, A. S. F. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. **Revista Theobroma (Brasil)** v. 13 (3) p. 233-248, 1983.

MEILGAARD, M. C.; CARR, B. T.; CIVILLE, G. V. **Sensory evaluation techniques**. CRC press, 2006.

MIGUEL, M. G. D. C. P. *et al.* Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT**, 77, 362-369, 2017.

MISNAWI, J. S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Effects of Cocoa Liquor Roasting on Polyphenol Content, Hydrophobicity and Astringency. **ASEAN Food Journal**, v. 12, n. 2, p. 103-114, 2003.

MOREIRA, I. M. V. *et al.* Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. **Food Research International**, v. 109, p. 196-203, 2018.

OOI, T. S.; TING, A. S. Y.; SIOW, L. F. Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. **LWT**, 122, 108977, 2020.

OWUSU, M.; PETERSEN, M. A.; HEIMDAL, H. Relationship of sensory and instrumental aroma measurements of dark chocolate as influenced by fermentation method, roasting and conching conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 909-917, 2013.

PEREIRA, A. P. M. *et al.* Dynamics of *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus* spores inoculated in different time intervals during simulated cocoa beans fermentation. **LWT**, 120, 108941, 2020.

PORTILLO, E.; GRAZIANI, L.; BETANCOURT, E. Análisis químico del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el sur del lago de Maracaibo. **Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)**, v. 24, n. 3, p. 522-546, 2007.

QIN, X. *et al.* Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 10, p. 2261-2275, 2017.

REDGWELL, R. J.; TROVATO, V.; CURTI, D. Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 511-516, 2003.

ROCHA, I. S. *et al.* Effect of the roasting temperature and time of cocoa beans on the sensory characteristics and acceptability of chocolate. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 522-530, 2017.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. *et al.* Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 250-258, 2011.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. *et al.* Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 277-288, 2012.

ROMERO-CORTES, T. *et al.* Relationship between fermentation index and other biochemical changes evaluated during the fermentation of Mexican cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 10, p. 2596-2604, 2013.

SHIN, E. *et al.* Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1262-1270, 2010.

TAN, J.; KERR, W. L. Characterizing cocoa refining by electronic nose using a Kernel distribution model. **LWT**, 104, 1-7, 2019.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, M. P. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), **Food microbiology, fundamentals and frontiers** (pp. 721-733). Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001.

URBAŃSKA, B.; KOWALSKA, J. Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the World. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 283, 2019.

UTRILLA-VÁZQUEZ, M. *et al.* Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. **Food Research International**, v. 129, p. 108834, 2020.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 423-447, 2000.

YU, A.; ZHANG, A. The effect of pH on the formation of aroma compounds produced by heating a model system containing L-ascorbic acid with L-threonine/L-serine. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 214-219, 2010.

ZIEGLEDER, G. Flavour development in cocoa and chocolate. **Industrial Chocolate Canafacture and Use**, v. 4, p. 169-191, 2009.

ZIEGLEDER, G. Linalool contents as characteristic of some flavor grade cocoas. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 191, n. 4-5, p. 306-309, 1990.