



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

GEISIANE DOS SANTOS SILVA

**BIOACESSIBILIDADE IN VITRO DE AMINAS BIOATIVAS EM
CHOCOLATES PRODUZIDOS A PARTIR DA MISTURA DE
AMÊNDOAS DE CACAU SUB E COMPLETAMENTE
FERMENTADAS**

UFBA

SALVADOR

2021



GEISIANE DOS SANTOS SILVA

**BIOACESSIBILIDADE IN VITRO DE AMINAS BIOATIVAS EM
CHOCOLATES PRODUZIDOS A PARTIR DA MISTURA DE
AMÊNDOAS DE CACAU SUB E COMPLETAMENTE
FERMENTADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAli) da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Prof^ª. Dr^ª. Eliete da Silva Bispo

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Beatriz de Abreu Glória

Coorientadora

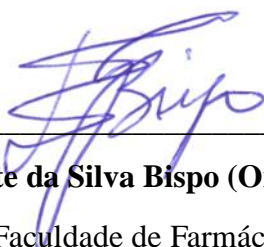
SALVADOR

2021

GEISIANE DOS SANTOS SILVA

**BIOACCESSIBILIDADE IN VITRO DE AMINAS BIOATIVAS
EM CHOCOLATES PRODUZIDOS A PARTIR DA
MISTURA DE AMÊNDOAS DE CACAU SUB E
COMPLETAMENTE FERMENTADAS**


A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado do(a) candidato(a) **Geisiane dos Santos Silva**, em sessão pública realizada em 03/12/2021.



Dr^a. Eliete da Silva Bispo (Orientador)

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal da Bahia (UFBA, Salvador, BA)



Dr^a. Alessandra Santos Lopes (Membro titular)

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Universidade Federal do Pará (UFPA, PA)



Dr. Bruno Martins Dala Paula (Membro titular)

Faculdade de Nutrição

Universidade Federal de Lavras (UFLA, MG)

Salvador, 03 de dezembro de 2021.

Dedico este trabalho,

À Deus;

À minha família;

Aos meus amigos.

Meus agradecimentos,

À Deus, pelo dom da vida e por sua constante presença na minha vida, por guiar meus passos, mesmo quando eu acredito que não sou capaz.

Aos meus pais e à minha irmã por todo amor, preocupação, incentivo e apoio durante toda minha vida e diante de cada uma das minhas escolhas.

À minha orientadora, Prof^{ra}. Dr^a. Eliete da Silva Bispo pela paciência e confiança, por compartilhar seu conhecimento, por ter me escolhido e dedicado um pouco do seu tempo e de sua experiência. Obrigada por aceitar o desafio de orientar sua “última aluna” no Programa da Pós-graduação.

À minha coorientadora Profa. Dr. Maria Beatriz Abreu Glória, pela confiança, colaboração, disponibilidade e grande contribuição para realização desse trabalho.

À minha banca de qualificação, pela leitura do trabalho e valiosas contribuições constituída pelo Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira e, de forma especial o Prof. Dr. Bruno Martins Dala Paula pelo apoio, disponibilidade. Obrigada por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial. Seu exemplo, sua dedicação e seu incentivo foram sempre muito importantes para o meu crescimento pessoal e profissional, sou muito grata por todos os seus ensinamentos.

Aos funcionários e colaboradores dos laboratórios de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Laboratório de Nutrição Experimental, Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) e LBqA e LCC, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por disponibilizar a estrutura necessária à realização deste projeto, e os seus colaboradores pelo suporte e pela ajuda com as análises realizadas.

À Fazenda Riachuelo e a Fazenda Leolinda, e seus colaboradores pelo fornecimento de amostras necessárias para a condução deste estudo.

Aos meus amigos, os que fiz durante esses anos de pós graduação e os amigos que já me acompanham a vida inteira, que aplaudem minhas conquistas e vibram comigo em cada etapa vencida. Um agradecimento especial a Valterney L. Deus, com quem tive o privilégio de trabalhar durante o mestrado, obrigada pelo suporte, pela amizade, disponibilidade, incentivo e pela atenção de sempre.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho.

Às agências, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado (nº do processo: 88887.504358/2020-00) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro (nº do processo: 4035981/2016-8)

A todos, muito obrigada!

*“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo propósito debaixo do céu”
(Ecl. 3.11)*

RESUMO

A saúde e o bem-estar do ser humano têm sido o foco de muitas pesquisas na área de alimentos, devido à tendência da população pela busca de alimentos e produtos mais saudáveis. O chocolate, bem como produtos derivados do processamento do cacau (*Theobroma cacao* L.), são amplamente consumidos e apreciados em muitos países e culturas devido ao seu valor hedônico e pela presença de constituintes funcionais com efeitos benéficos para a saúde humana, como os diversos compostos bioativos entre eles os polifenóis que são amplamente estudados e outros grupos de bioativos, ainda pouco explorados como as aminas. As aminas são bases orgânicas de baixo peso molecular que possuem atividade biológica e podem ser encontradas naturalmente em alimentos, formadas a partir da ação descarboxilase de micro-organismos durante o processamento, em especial nas etapas onde há fermentação, no armazenamento como produto da contaminação microbiológica ou durante a digestão pela microbiota intestinal. Considerando as possíveis alterações nos teores de aminas nas amêndoas de cacau durante a fermentação, a necessidade de se produzir chocolates com elevada qualidade, além dos escassos estudos de bioacessibilidade de aminas no chocolate, esta pesquisa teve como objetivo investigar a influência do cacau subfermentado - UF (48h) - (0-65%), sobre as aminas bioativas em chocolate e sua bioacessibilidade *in vitro*. As mesmas oito aminas foram encontradas nos dois grupos e diferiram em relação à contribuição nos teores totais [A- 0 e 20% UF (34 mg/kg) e B-35 a 65% UF (17 mg/kg)]. Baixos níveis de aminas estavam presentes na fase oral, representando aminas livres. A digestão gástrica foi eficaz na liberação de tiramina, serotonina e agmatina (A), espermidina (A) e feniletilamina dos conjugados. A digestão intestinal foi eficiente na liberação de putrescina, cadaverina, histamina e espermidina (B). Tiramina e feniletilamina apresentaram maior bioacessibilidade, que não foi afetada pela adição de cacau UF. A agmatina e a serotonina tiveram a menor bioacessibilidade e estiveram presentes apenas em A. Ao adicionar diferentes proporções de cacau UF durante a produção do chocolate, os níveis e a bioacessibilidade das aminas podem ser modulados, bem como sua ligação aos conjugados.

Palavras-chave: Fermentação. Aminas bioativas. Chocolate. Poliaminas. Nibs de cacau.

ABSTRACT

The health and well-being of the human being has been the focus of much research in the food area, due to the population's tendency to search for healthier foods and products. Chocolate, as well as products derived from cocoa (*Theobroma cacao* L.) processing, are widely consumed and appreciated in many countries and cultures due to their hedonic value and the presence of functional constituents with beneficial effects on human health, such as the various bioactive compounds among them the polyphenols that are widely studied and other groups of bioactives, still little explored such as amines. Amines are organic bases of low molecular weight that have biological activity and can be found naturally in foods, formed from the decarboxylase action of micro-organisms during processing, especially in the steps where there is fermentation, in storage as a product of microbiological contamination or during digestion by the intestinal microbiota. Considering the possible changes in the levels of amines in cocoa beans during fermentation, the need to produce high quality chocolates, and the scarce studies on bioaccessibility of amines in chocolate, the objective of this study was to investigate the influence of under-fermented – UF (48h) cocoa (0-65%) on bioactive amines in chocolate and their *in vitro* bioaccessibility. The same eight amines were found in two groups regarding total contents [A-0 & 20% UF (34 mg/kg) and B-35 to 65% UF (17 mg/kg)]. Low levels of amines were present in the oral phase, representing free amines. Gastric digestion was effective in releasing tyramine, serotonin and agmatine (A), 24 spermidine (A) and phenylethylamine from conjugates. Intestinal digestion was efficient in releasing putrescine, cadaverine, histamine and spermidine (B). Tyramine and phenylethylamine showed highest bioaccessibility, which was not affected by the addition of UF cocoa. Agmatine and serotonin had lowest bioaccessibility, and were present only in A. By adding different proportions of UF cocoa during chocolate production, the levels and bioaccessibility of amines can be modulated as well as their binding to conjugates.

Keywords: *Fermentation. Bioactive amines. Chocolate. Polyamines. Cocoa nibs*

LISTA DE FIGURAS

<i>CAPÍTULO I</i>		14
Figura 1	(a) Fruto do cacaureiro (b) Pilha de cacau para processamento de chocolate na indústria para processamento (b) Polpa do cacau retirada manualmente.....	19
Figura 2	(a) Manipuladores utilizando facões para abertura do fruto. (b) Polpa separada da casca (c) e (d) Fruto apresentando inconformidade, não recomendado para uso na produção.....;	26
Figura 3	Processo fermentativo de amêndoas de cacau - a) Caixa de madeira vazia b) Fermentação em caixas de madeira com medidor de temperatura, controle do processo fermentativo c) Caixa de madeira cheia com as amêndoas em processo d) Revolvimento da massa durante o processo.....	28
Figura 4	Grãos de cacau secando em barcaças após a fermentação.....	31
Figura 5	Nibs (amêndoas torradas e fermentadas) triturados: a) Totalmente fermentados por 144h b) Parcialmente fermentados por 48h.....	32
Figura 6	a) Processo de conchagem na fase inicial. b) Processo na fase final. c) Chocolate retirado ao final do processo.....	35
Figura 7	Processo de temperagem com controle de temperatura.....	36
Figura 8	a) Processo de moldagem b) Chocolate na forma após processo de resfriamento c) chocolate desmoldado.....	37
 <i>CAPÍTULO II</i>		49
Figura 1	Schematic representation of <i>in vitro</i> gastrointestinal digestion phases: oral, gastric and intestinal of chocolates made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans.....	60
Figura 2	Levels of free bioactive amines in chocolates made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans.....	61
Figura 3	Changes on the levels of total free bioactive amines during oral, gastric and intestinal stages of <i>in vitro</i> gastrointestinal digestion of chocolate made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans.....	67
Figura 4	Principal component analyses (PCA) and hierarchical cluster analyses (HCA) of free bioactive amines in chocolates (C) made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans and respective digests after Oral (C-O), Oral+Gastric (C-G) and Oral+Gastric+Intestinal (C-I) <i>in vitro</i>	

digestions (a) PC1 and PC2 plots; (b) Biplot of bioactive amines (PC1 and PC2:
95.3 %); (c) Scree plot of bioactive amines; and (d)
dendrogram..... 76

LISTA DE TABELAS

<i>CAPÍTULO II</i>	49
Tabela 1	Chocolates made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans..... 57
Tabela 2	Contents of free bioactive amines in chocolate and solutions from the oral (O), gastric (G) and intestinal (I) <i>in vitro</i> digestion phases of chocolates made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICACAU	Acordo Internacional de Cacau
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária do Brasil
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano Cacaueira
EFSA	European Food Safety Authority
FDA	Food and Drug Administration
ICCO	International Cocoa Organization
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I</i> - Bioacessibilidade <i>in vitro</i> de amins bioativas em chocolates produzidos a partir da mistura de amêndoas de cacau sub e completamente fermentadas	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	27
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Cacau (<i>Theobroma cocoa</i> L.): características gerais	18
3.2 Aspectos históricos do cacau e chocolate	20
3.3 O mercado do cacau	21
3.4 Amins Bioativas	22
3.5 Pré processamento do cacau	25
3.5.1 Colheita e abertura dos frutos	25
3.5.2 Fermentação	26
3.5.3 Secagem	30
3.5.4 Torrefação	31
3.5.5 Trituração e descascamento	32
3.6 Processamento do chocolate	32
3.6.1 Mistura	33
3.6.2 Refino	33
3.6.3 Conchagem	34
3.6.4 Temperagem	35
3.6.5 Moldagem e Resfriamento	36
3.7 Chocolate	37
3.8 Bioacessibilidade <i>in vitro</i>	39
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
<i>CAPÍTULO II</i> - Bioaccessibility of bioactive amines in dark chocolates made with different proportion of under-fermented cocoa beans	48

Capítulo I

Bioacessibilidade in vitro de aminos bioativas em chocolates produzidos a partir da mistura de amêndoas de cacau sub e completamente fermentadas

1 INTRODUÇÃO

A saúde e o bem-estar do ser humano tem sido o foco de muitas pesquisas na área de alimentos, devido à tendência da população pela busca de alimentos e produtos mais saudáveis. O chocolate é um destes produtos alimentícios, que vem sendo alvo de diversas pesquisas científicas, que demonstram potenciais benefícios à saúde cardiovascular, atividade antioxidante, controle dos níveis de colesterol sanguíneo e outros (GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN; BERKTAŞ; ÖZÇELİK, 2016; OOI; TING; SIOW, 2020).

Cada etapa do processamento do cacau (*Theobroma cacao* L.) pode modificar a composição bioquímica, dentre elas, pode-se destacar a fermentação e torrefação que são consideradas etapas essenciais da formação de sabor e aroma do cacau (AFOWAKA, 2008), além disso, a participação de diferentes tipos de micro-organismos como leveduras, bactérias produtoras de ácido lático, ácido acético e formadoras de esporos do gênero *Bacillus* (JEON; LEE; MAH, 2018; LIANG *et al.*, 2019; HAO; SUN, 2020) auxiliam na ocorrência de várias reações químicas e bioquímicas resultando no processo resultando na formação e liberação de novos compostos, que podem ser influenciados por fatores intrínsecos a matéria prima, genótipo, local de origem e formas de cultivo, entre outros fatores que podem influenciar esse processo como condições climáticas, as operações de beneficiamento do cacau iniciadas na fazenda até as etapas de processamento tecnológico do próprio chocolate (DEUS *et al.*, 2020; SPIZZIRRI *et al.*, 2019; BARIŠIĆ *et al.*, 2019; DO CARMO BRITO *et al.*, 2017).

O chocolate é um produto alimentício bastante apreciado, preparado a partir do processamento de grãos de cacau fermentados e torrados, adicionados a outros ingredientes, afim de, formar uma mistura pastosa através de processos tecnológicos (refino, conchagem, têmpera e cristalização) que no final do processamento, pode ser moldada na forma desejada (BECKETT, 2009; CRAFACK *et al.*, 2013). De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e derivados (ABICAB), o Brasil segue entre os seis maiores países que lideram as vendas de chocolate do mundo, estando atrás dos Estados Unidos, Rússia, Alemanha, Reino Unido. Atualmente o Brasil exporta chocolates para 140 países, sendo que a maior parte das exportações de chocolate fabricados é direcionada ao Mercosul (ABICAB, 2019).

O consumo de produtos de cacau e o chocolate, se realizado de forma moderada, além do prazer pessoal, pode oferecer benefícios à saúde contribuindo para a nutrição humana por meio do fornecimento de lípidos, açúcares, minerais e diversos compostos, como os fenólicos (flavonoides, metilxantinas, epicatequina e antocianinas), bem como outros compostos

bioativos, incluindo as aminas biogênicas (DA SILVA OLIVEIRA *et al.*, 2011; RESTUCCIA; SPIZZIRRI; PICCI, 2015; URBAŃSKA; KOWALSKA, 2019).

As aminas bioativas são bases orgânicas de baixo peso molecular que possuem atividade biológica e podem ser classificadas em poliaminas e aminas biogênicas (GLÓRIA, 2005). As aminas podem encontradas em alguns alimentos, os fermentados, por exemplo, podem ser fontes de aminas bioativas (JEON; LEE; MAH, 2018; LATORRE-MORATALLA *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2019; MAJCHERCZYK; SURÓWKA, 2019; DEUS *et al.*, 2020; ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2021). Portanto, o chocolate é uma fonte interessante destas substâncias. O interesse nas aminas bioativas do chocolate depende da promoção da saúde devido às propriedades de algumas aminas como a espermidina agmatina, feniletilamina, entre outras (TAKSANDE *et al.*, 2015; BILGE *et al.*, 2020; AGLAWE *et al.*, 2021), mas também, sobre os efeitos adversos exercidos principalmente por histamina e tiramina, sendo estabelecido para tiramina 600 mg de tiramina por pessoa por refeição e de 50 mg de histamina por pessoa por refeição para indivíduos saudáveis (EFSA, 2011)

Por essa perspectiva, o trabalho consiste na produção chocolates com amêndoas subfermentadas e fermentadas, tendo em vista possíveis alterações nos teores de aminas nas amêndoas de cacau durante a fermentação e o entendimento sobre o comportamento das aminas bioativas livres durante o processo de digestão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Determinar os teores de aminos bioativas livres e avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de chocolates produzidos, a partir da mistura de amêndoas de cacau sub fermentadas e fermentadas

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Produzir chocolates com as formulações predefinidas a partir da mistura de amêndoas de cacau sub fermentadas e fermentadas;
- ✓ Verificar o impacto da utilização de cacau obtido com diferentes tempos de fermentação (48 e 144 h) no perfil e teores de aminos bioativas, a fim de indicar a produção de um alimento fonte de compostos desejáveis e com baixo teor daqueles indesejáveis à saúde humana;
- ✓ Determinar a proporção máxima em que o cacau sub fermentado possa ser misturado à formulação original do chocolate, sem afetar negativamente (ou reduzir) o perfil de poliaminas e serotonina;
- ✓ Proporcionar elementos para a compreensão da liberação de aminos bioativas livres pelo chocolate ao longo das três principais fases da digestão: (i) oral, (ii) gástrica e, (iii) intestinal.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Cacau (*Theobroma cocoa* L.): Características Gerais

O cacau (*Theobroma cocoa* L.) fruto do cacauzeiro é um alimento bastante apreciado no Brasil e no mundo, devido à versatilidade de uso tanto da polpa quanto da amêndoa, principal matéria prima da produção de chocolates (AFOWAKA, 2010). O cacauzeiro é originário de regiões de áreas florestais pluviais da América Tropical e pertence ao gênero *Theobroma*, família das *Malvaceae* (CEPLAC, 2018).

A árvore do cacau ou cacauzeiro que pode ser de pequeno a médio porte de folhas sempre verdes e têm até cerca de 300 mm de comprimento. As flores e, portanto, os frutos crescem do tronco e nos galhos mais grossos (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

A espécie *Theobroma Cacao* pode ser subdividida em grupos denominados forasteiro, crioulo e trinitário que variam de acordo com as características morfológicas, que dependendo da variedade podem ser diferenciados pelo tamanho, forma, cor e aparência e a distribuição geográfica (REHEM, 2006). Nos séculos XVI e XVII, o cacau foi introduzido na Ásia, e o primeiro a aparecer nessa época foi de um tipo chamado Criollo, que atualmente corresponde a cerca de 5% da produção mundial, característicos por possuir grãos de cor clara e sabor suave, porém bem mais suscetível a doenças e por esta razão que tornou o seu cultivo tornou-se raro (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

O segundo tipo de cacau é chamado Forastero, tipo mais comum, que foi introduzido na Bahia no século XVIII. Os grãos de cacau frescos do tipo Forastero têm coloração violeta, mais liso e são menores quando comparados aos demais, quando abertos. Podem desenvolver *flavor* e sabor mais intensos após fermentação e torrefação. O terceiro tipo de cacau é chamado Trinitário, espécie essa que resulta da hibridação entre Forastero e Criollo. Um quarto tipo, não muito comum, é o Nacional, que é cultivado apenas no Equador e provavelmente é originário da região amazônica do Equador, e produz amêndoas com notas florais, porém essas espécies são altamente suscetíveis às doenças como a vassoura-de-bruxa e da podridão (AFOWAKA, 2010; VEGA; KWIK-URIBE, 2012; GUTIÉRREZ, 2017; BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

O fruto (Figura 1a e 1b) é composto por casca, polpa e sementes (Figura 1c). Cada fruto contém entre 20 e 50 sementes envoltas por uma polpa mucilaginoso branca e doce, e a casca representa 75% do total (AFOWAKA, 2010). Geralmente o amadurecimento varia de 140 a 205 dias, com uma média de 167 dias. A semente varia de elipsóide a ovoide com 2- 3

cm de comprimento (OETTERER, 2006; AFOAKWA, 2010).

Figura 1 - (a) Fruto do cacaureiro (b) Pilha de cacau para processamento de chocolate na indústria para processamento (c) Polpa do cacau retirada manualmente



Fonte: A autora

Os grãos de cacau, principal matéria prima do chocolate, contribuem para a nutrição humana através do fornecimento de lipídios, açúcares e diversos compostos bioativos. Dispõe de uma composição química única, com cerca de 500 compostos, dentre estes, os polifenóis e compostos voláteis que são amplamente estudados (PAZ-YÉPEZ *et al.*, 2019; URBAÑSKA; KOWALSKA, 2019; URBAÑSKA; DEREWIAKA; LENART, 2019). Um grupo, dentre os quais merecem destaque são as metilxantinas, como a teobromina e cafeína, compostos fenólicos não flavonoides e flavonoides frequentemente encontradas em quantidades consideráveis em produtos de cacau e derivados (KREIBICH, 2016; BARRIOS *et al.*, 2018). Além disso, são encontrados outros grupos de bioativos como as aminas, que vem sendo foco de muitas pesquisas, e podem ser encontradas naturalmente em alimentos (DALA-PAULA; STARLING; GLÓRIA, 2021b) formadas a partir da ação descarboxilase de micro-organismos durante o processamento, em especial nas etapas onde há fermentação (DO CARMO BRITTO *et al.*, 2017) ou durante o armazenamento como produto da contaminação microbiológica (SPIZZIRRI *et al.*, 2019).

3.2 Aspectos históricos do cacau e chocolate

Acredita-se que, quando os primeiros colonizadores chegaram à América, o cacau já era cultivado pelos índios, principalmente os Astecas, no México, e os Maias, na América Central. Segundo historiadores, o *cacahualt*, como era chamado o cacauero, tratava-se de uma planta de origem sagrada e era utilizado tanto como planta decorativa, quanto o fruto para alimentação. Há registro que por um período as sementes eram utilizadas como moeda de troca pelos índios. Os Astecas acreditavam ser uma planta de origem divina, fato que pode ter influenciado o botânico sueco Carolus Linneu (1707 – 1778), que denominou a planta de *Theobroma cacao* de “manjar dos deuses” (CEPLAC, 2018).

A base da economia regional no período colonial no Brasil tinha como principal produto o açúcar, tendo como base interesses de Portugal. Foi então, a partir de 1570, devido a crises na indústria açucareira fizeram com que os interesses da coroa portuguesa em por volta de 1770, mudasse o foco, devido à ascensão da produção de chocolate na Europa e Estados Unidos, abrindo espaço para a cacauicultura. O primeiro país a utilizar o chocolate em sua culinária foi à Espanha, porém não existem dados exatos relacionados à data, existem indícios e suposições em que o produto foi levado pela primeira vez ao país por Cristóvão Colombo em 1502. Outra possibilidade é que o chocolate tenha chegado à Espanha em 1544, com representantes *kekchi*, povo maia da Guatemala, que vieram trazendo presentes em visita à corte do príncipe da época. Mas, somente em 1585 foi registrada a chegada de grãos de cacau à Espanha a partir de Vera Cruz, no México. Sendo assim, o primeiro ano em que o chocolate foi servido como bebida quente adoçada e aromatizada e tornou-se popular na corte espanhola. O chocolate em barra teve sua primeira aparição em 1657, onde um francês abriu uma loja em Londres, na qual o chocolate sólido utilizado para fazer a bebida podia ser comprado de 10 a 15 xelins por libra-peso, bastante caro para época, onde poucos tinham acesso.

A introdução da espécie *Theobroma Cacao*, no Brasil, mais especificamente na Bahia ocorreu em 1746, trazido do Estado do Pará, onde passou a ser cultivada em várias localidades no sul do Estado, onde esses materiais genéticos receberam a denominação de “*cacau comum da Bahia*” (LEAL, 2004).

Em 1828, C.J. Van Houten patenteou um processo para prensar grande parte da gordura ou manteiga de cacau que eram feitos a partir de grãos de cacau moídos e torrados e assim obter cacau em pó. A base que se tem hoje para produção de chocolates doces (mistura de manteiga de cacau, açúcar, licor de chocolate) foi implantada em 1847, pela firma inglesa Fry and Sons (BRITANNICA ACADEMIC, 2016; ABICAB, 2019).

3.3 O mercado do cacau

O cacau é produzido em países em uma faixa entre 10°N e 10°S onde o clima é favorável para o cultivo de cacaueiros (ICCO, 2013). Alguns elementos, como clima e forma de manejo, são fatores limitantes no custo e cultivo de uma produção cacauera. Desta forma, analisar a cadeia produtiva do cacau com enfoque na produção e do preço, é essencial para ajustar e equilibrar a oferta e demanda do cacau em amêndoas e de seus insumos (ZUGAIB; BARRETO, 2014).

No Brasil, o Acordo Internacional de Cacau de 2010 (AICACAU, 2010), que tem como papel a troca de informações e promoção do consumo do cacau traz algumas definições, referentes ao grão de cacau e derivados; cacau *fino* ou cacau *com aroma*, produtos reconhecidos por aroma, cor e produção específicos; e por fim os produtos de cacau, que por definição são aqueles produtos feitos exclusivamente de grãos de cacau, como pasta/licor de cacau, manteiga de cacau, cacau em pó não adoçado, torta de cacau e *nibs* de cacau (DE MELLO, 2005).

No ano de 2018, o Brasil importou aproximadamente 62,4 mil toneladas de amêndoas de cacau de países do continente africano. E realizou compras consideravelmente grandes de seus subprodutos como chocolates e outros derivados, sendo exportados principalmente da Suíça, Indonésia, Holanda e Costa do Marfim. Ainda em estado de recuperação em relação à décadas anteriores, o Brasil vem se destacando na produção de cacau em quantidade e na qualidade das amêndoas, no ano de 2019 teve sua produção totalizada em 255.184 toneladas de cacau em todo o território, onde os estados com maior índice de produção foram o Pará com aproximadamente 116 toneladas de cacau, seguido da Bahia com 122.568 toneladas de cacau (BRASIL, 2019; CEPLAC, 2019).

O principal país produtor de cacau é a Costa do Marfim (39,0%) seguido de Gana (14,5%); Indonésia (14,0%), Nigéria (6,3%), Equador (5,1%), Camarões (5,0%) e o Brasil ocupando a sétima posição mundial (4,6%) (FAOSTAT, 2020). De acordo com dados da *International Cocoa Organization* (ICCO), em fevereiro de 2020 a Costa do Marfim alcançou 1.469 milhões de toneladas contra as 1.343 milhões de toneladas registradas no mesmo período da temporada anterior (2018/19) de exportação do cacau (ICCO, 2020).

3.4 Aminas bioativas

As aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular derivadas da amônia que são formadas durante processos metabólicos

normais em animais, plantas e micro-organismos e estão desta forma, presentes nos alimentos (MEDINA *et al.*, 2003; GLÓRIA, 2005).

As aminas bioativas podem ser classificadas de acordo com a estrutura química, podendo ser alifáticas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina, triptamina e serotonina). Quanto ao número de grupamentos amina, podem ser classificadas como monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (putrescina, cadaverina, serotonina, histamina), ou poliaminas (espermina, espermidina, agmatina). Podem ser classificadas ainda, de acordo com a via biossintética, podendo ser naturais ou biogênicas (GLORIA, 2005; KALAC, 2014). Aminas naturais são formadas pela biossíntese de moléculas simples, enquanto, as aminas biogênicas são produzidas a parte de reações de descarboxilação por micro-organismos presentes no meio, dando destaque a alimentos que passam por processo fermentativo (DO CARMO BRITTO *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2018; BARBIERI; MONTANARI; GARDINI; TABANELLI, 2019; MAJCHERCZYK; SURÓWKA, 2019).

Alguns fatores podem influenciar na intensificação, ou redução na quantidade de aminas como: temperatura, pH do meio, concentração de oxigênio, presença de vitaminas e coenzimas, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis podem afetar a produção de aminas pelos micro-organismos (GLÓRIA, 2005). A formação das aminas biogênicas por descarboxilação pode ocorrer por ação térmica durante processamento do alimento e, principalmente, a ação de micro-organismos, realizada por espécies como *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* (ORACZ & NEBESNY, 2014; CVETKOVIĆ *et al.*, 2015; HAO & SUN, 2020). Em alimentos fermentados a disponibilidade das aminas depende principalmente de seus precursores, da presença de micro-organismos e das condições favoráveis para seu crescimento e (ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014; DOEUN; DAVAATSEREN; CHUNG, 2017; GU *et al.*, 2018; LIANG *et al.*, 2019; PARK; LEE; MAH, 2019).

O cacau fermentado consiste em uma boa fonte de aminas conforme discutem Do Carmo Britto *et al.* (2017), onde o processo fermentativo foi dividido em etapas: no início da fermentação com o pH baixo, foram encontrados altos teores de triptamina, fenólicos e antocianinas, num segundo momento denominado “meio do processo fermentativo” foram encontrados altos teores de espermina, aminas biogênicas totais, poliaminas totais e aminas bioativas totais. E ao final encontraram maiores valores de acidez total e maior teor de espermidina. Chegando a conclusão que o perfil de aminas bioativas pode ser influenciado

pela interação com outras substâncias bem como pelo processo fermentativo natural que grãos de cacau são submetidos normalmente (DO CARMO BRITO *et al.*, 2017; DEUS *et al.*, 2020).

Em baixas concentrações, as aminas biogênicas são essenciais para muitas funções fisiológicas no organismo e dependendo do tipo específico da amina, podem atuar na regulação do crescimento, mediação de processos de inflamação; biorregulação; atividades celulares de divisão e diferenciação; ação antioxidante e antienvelhecimento; ação neuroativa; envolvimento em processos comportamentais e fisiológicos, como regulação cardiovascular, sensibilidade, impulsividade alterações de humor, entre outros (GLÓRIA, 2005; ÖNAL, 2007; KALAIČ, 2014; PRETI; RAPA; VINCI, 2017; VADODARIA *et al.*, 2018; YILMAZ; GÖKMEN, 2020). Em contrapartida a elevada ingestão pode provocar sintomas adversos e causar alterações no organismo causando dores de cabeça, dificuldades respiratórias, hipertensão e alergias, e, em casos mais graves hemorragia intracelular e até mesmo a morte (EFSA, 2011; HE *et al.*, 2017).

As aminas bioativas estão presentes no cacau e seus subprodutos, como o chocolate (Restuccia *et al.*, 2015; Spizzirri *et al.*, 2019; Dala- Paula *et al.*, 2021; Delgado-Ospina *et al.*, 2021; Deus *et al.*, 2020; 2021). Deus *et al.* (2020) encontraram valores de aminas nos chocolates monoclonais brasileiros, produzidos a partir de clones de cacau cultivados na mesma fazenda, atingindo teores variáveis de 9,10 a 32,47 mg/kg. Entre as nove aminas investigadas, cinco estavam presentes no cacau não fermentado cacau, com níveis médios totais de 30,9 mg/ kg, sendo a amina predominante, a espermidina (43,4% do total), seguida pela serotonina (28,5%), tiramina (18,2%), putrescina e triptamina, com contribuição de ~ 5% cada. Do Carmo Brito *et al.* (2017) detectaram apenas quatro aminas no cacau amazônico após 24 horas de fermentação (espermidina, espermina, triptamina e tiramina). Dados de aminas em cacau não fermentado são escassos na literatura, pois para produção do chocolate normalmente utiliza-se o cacau fermentado. Delgado-Ospina *et al.*(2020) sugere que as práticas de fermentação e secagem afetam a microbiota de grãos e cascas, o que explica a grande variabilidade do conteúdo de aminas biogênicas.

Restuccia *et al.* (2016) avaliaram oito aminas (cadaverina, serotonina, histamina, espermidina, espermina, tiramina, putrescina e β -feniletilamina) em seis amostras de chocolates 60 e 70% de cacau, com teores totais de aminas que variaram de 10,4 a 65,0 mg/kg. Os pesquisadores não detectaram cadaverina e serotonina em nenhuma das amostras, e β -feniletilamina em apenas uma. Deus *et al.* (2020) avaliaram várias amostras de chocolates (70% de massa de cacau) produzidas a partir de nove diferentes clones de cacau e detectaram

espermidina, putrescina, tiramina, triptamina e feniletilamina em todas as amostras, enquanto agmatina, serotonina e cadaverina foram encontradas em apenas algumas amostras.

A produção de aminas biogênicas durante os processos fermentativos está bem reportada na literatura científica, sendo umas das explicações para os resultados encontrados (GU *et al.*, 2018; BARBIERI *et al.*, 2019; MAJCHERCZYK; SURÓWKA, 2019). As aminas podem ser encontradas em diferentes formas químicas nos alimentos, podendo ocorrer livre ou conjugadas com outros compostos, incluindo polifenóis, flavonoides, antocianinas e proteínas, todos presentes em elevadas concentrações no chocolate (CASAL *et al.*, 2004; BARIŠIĆ *et al.*, 2020; GODOČIKOVÁ *et al.*, 2020).

3.5 Pré processamento do cacau

O pré-processamento do cacau é caracterizado pelas etapas de colheita, quebra ou abertura dos frutos, pela fermentação e secagem (BECKETT, 2009; CRAFACK *et al.*, 2013; TAN; KERR, 2019). O controle de qualidade do cacau não inclui apenas os aspectos importantes do sabor e da pureza das amêndoas de cacau, mas toda cadeia produtiva e controle dos processos adotados, que podem impactar na qualidade do produto final (FERREIRA *et al.*, 2013). As etapas estão interligadas e tem grande importância para qualidade do produto, sendo cada uma responsável pelo bom resultado da etapa seguinte. Muitos fatores como a variedade do cacau, manejo agrônômico, fatores do solo, condições climáticas, e a tecnologia pós-colheita, podem influenciar no processamento adequado do cacau para produção do chocolate. Por causa disso, é necessária a avaliação dos parâmetros físicos, químicos e organolépticos que permitem determinar a qualidade em relação à variedade e ao meio ambiente (MARTINS *et al.*, 2011; DEL ROSARIO BRUNETTO *et al.*, 2007).

3.5.1 Colheita e abertura dos frutos

O fruto deve ser retirado da árvore manualmente, com auxílio de utensílios adequados (podão, facão, facas e/ou tesouras) devidamente higienizados e limpos, devendo ser colhidos de acordo com o grau adequado de maturação, frutos amarelo ouro no caso dos forasteros, e alaranjado no caso dos híbridos (FERREIRA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2011).

Inicia-se a quebra do cacau com um corte em sentido transversal, com cuidado evitando-se que as sementes sejam danificadas. As sementes são retiradas com a polpa aderida, e submetidas à fermentação. O intervalo entre a quebra e o início da fermentação não deve ser superior a 24 horas para que não ocorram reações químicas indesejáveis

(FERREIRA *et al.* 2013; MARTINS *et al.*, 2011).

Sementes provenientes de quebras em dias diferentes não devem ser fermentadas juntas, pois isso conduz a uma fermentação desigual (BECKETT, 2009; EFRAIM, 2004; MARTINS *et al.*, 2011). Frutos infectados ou doentes (Figura 2) ou perfurados devem ser descartados.

Figura 2 – (a) Manipuladores utilizando facões para abertura do fruto. (b) Polpa separada da casca (c) e (d) Fruto apresentando inconformidade, não recomendado para uso na produção.



Fonte: A autora.

3.5.2 Fermentação

A fermentação é uma etapa crucial para se obter amêndoas de boa qualidade, devido as complexas reações bioquímicas e enzimáticas envolvidas no processo (MUÑOZ *et al.*, 2020). O tempo requerido para a fermentação das sementes é variável e depende do material genético, e isso irá influenciar na formação dos principais precursores de sabor do chocolate, componentes como as metilxantinas, que dão amargura ao cacau e os flavonoides responsáveis pela cor e adstringência (EFRAIM *et al.* 2010; MINIFIE, 2012).

Para que ocorra uma boa fermentação, etapas que a precedem (colheita e a quebra) devem ser executadas com segurança e eficiência para que se obtenha um produto fermentado de qualidade. O processo fermentativo ocorre quando a polpa é removida e transferida para pilhas, caixas ou cestas para fermentação, onde ocorre o revolvimento da polpa periodicamente, que tem como o objetivo de uniformizar, arejar e manter a temperatura

constante em toda pilha, para que as reações ocorram de forma adequada (BECKETT, 2009; MARTINS *et al.*, 2011; MINIFIE, 2012).

Nas grandes plantações a fermentação é feita normalmente em caixas de madeira, bem projetadas para drenar o líquido e manter a entrada de ar e temperatura constante (BECKETT, 2009). A polpa inicialmente esbranquiçada e consistente é composta por cerca de 85% de água e 10 - 15% de açúcares com pequenas quantidades de ácido cítrico, pentosanos e proteínas, sendo assim um ótimo meio para o crescimento de micro-organismos (OETTERER, 2006; BECKETT, 2009; MINIFIE, 2012)

Durante o processo, ocorrem reações químicas importantes onde os açúcares são quebrados por diferentes micro-organismos dentre eles leveduras e bactérias produtoras de ácido láctico, ácido acético e formadoras de esporos do gênero *Bacillus* (ZHAO *et al.*, 2014; JEON; LEE; MAH, 2018; LIANG *et al.*, 2019; HAO; SUN, 2020), formando pequenas quantidades de álcool etílico, ácido láctico e também a mudança significativa de cor (BECKETT, 2009). Nas primeiras 48 horas ocorre a fermentação alcoólica, onde as leveduras anaeróbicas em meio ácido, com pH abaixo de 4,0, se multiplicam convertendo os açúcares em álcool etílico e gás carbônico e há elevação da temperatura durante esse processo. Normalmente a partir do segundo dia ocorre o revolvimento da massa de cacau, para que a temperatura não se eleve mais que 45 °C favorecendo a ação das enzimas. Após as 48 horas, inicia-se a fermentação láctica, pelas bactérias que estão presentes desde o início da fermentação, porém com sua atividade intensificada entre 48 e 96 horas. As bactérias lácticas convertem açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido láctico. Ainda nessa fase, a temperatura é elevada entre 45 e 50 °C, aumentando a difusão de conteúdos celulares e reações que proporcionam alterações organolépticas (cor, sabor, odor) da semente. Na terceira fase, ou fase acética ou aeróbica o processo é favorecido pela indução do oxigênio onde acontece a multiplicação das bactérias acéticas e a transformação do álcool em ácido acético, tornando o tegumento permeável, permitindo que as amêndoas sofram ação das enzimas, devido principalmente à elevação da temperatura, ocorrendo novos revolvimentos a cada 24 horas (OETERRER, 2006; MARTINS *et al.*, 2011; SCHWAN *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2019; HAO; SUN, 2020). Com isso a polpa perde cerca de 65% de seu peso e o líquido resultante formado é drenado, conforme a temperatura sobe e segue até que se tenha completado o processo fermentativo (BECKETT, 2009).

Figura 3 – Processo fermentativo de amêndoas de cacau – (a) Caixa de madeira vazia (b) Fermentação em caixas de madeira com medidor de temperatura, controle do processo

fermentativo (c) Caixa de madeira cheia com as amêndoas em processo (d) Revolvimento da massa durante o processo.



Fonte: A autora

As amêndoas com pH mais alto (5,5-5,8) são consideradas não fermentados ou com baixo índice de fermentação e com pontuação no teste de corte, e aquelas com pH mais baixo (4,75-5,19), são classificadas como amêndoas bem fermentados (AFOAKWA *et al.*, 2008). Uma amêndoa não fermentada possui cor cinza e ardósia, passando por roxo e marrom-púrpura a marrom escuro. Os chocolates que são fabricados a partir de grãos não fermentados tem um sabor muito amargo e adstringente, com pouco sabor de chocolate e tem uma aparência marrom acinzentada (COHEN; JACKIX; SOUSA, 2004; BECKETT, 2009; MINIFIE, 2012).

A fermentação é uma das etapas fundamentais para determinar a qualidade do cacau (MUÑOZ *et al.*, 2019; DE ANDRADE *et al.*, 2021). Alguns compostos podem ser reduzidos ao longo do processo fermentativo como o conteúdo total de ácidos, álcoois, alguns aldeídos e cetonas em decorrência das fases fermentativas e devido especialmente a predominância e ação de microrganismos (De Andrade *et al.*, 2021).

A fermentação influencia diretamente na quantidade total de compostos fenólicos no cacau sendo este, considerado um importante parâmetro de qualidade, pois afeta o amargor e a adstringência do produto final, bem como suas propriedades funcionais

(CAPORASO *et al.*, 2018). Do Carmo Brito *et al.* (2017) encontraram concentrações de fenólicos totais, variando de 77,31 mgCE g⁻¹ para o cacau não fermentado a 53,03 mgCE.g⁻¹ para o fermentado. Melo *et al.*(2020) encontraram valores superiores, sendo o conteúdo total médio de 395,15 a 154,96 mgECE.g⁻¹ para sementes não fermentadas e após 144 h de fermentação, respectivamente, representando assim uma redução de 60% nos teores totais. Comportamento semelhante foi observado para os flavonóides totais nas amostras de cacau não fermentado, com valores superiores aos grãos fermentados, de 116,99 a 42,34 mgECE.g⁻¹, respectivamente, enquanto as antocianinas diminuíram em 41% após 48 horas e 80% após 144 horas, corroborando com os resultados de Do Carmo Brito *et al.* (2017) que relatou uma redução semelhante para antocianinas, para grãos de cacau frescos e após 7 dias de fermentação.

O cacau e seus subprodutos são ricos em compostos fenólicos, entretanto podem variar quantitativamente de acordo com a variedade de cacau, origem geográfica, estágio de maturação, cultivo, práticas pós-colheita, condições edafoclimáticas, fermentação e processamento do cacau e também do chocolate (do Carmo Brito *et al.*, 2017; Melo *et al.*, 2020; Deus *et al.*, 2020). Há uma mudança significativa no perfil e nos níveis de algumas aminas bioativas, já que as condições prevalentes durante a fermentação, como a proteólise com liberação de aminoácidos e a presença de microrganismos com atividade de descarboxilase favorecem à produção de aminas no processo (DO CARMO BRITO *et al.*, 2017; Delgado-OSPINA *et al.*, 2021; DEUS *et al.*, 2021).

Do Carmo Brito *et al.* (2017) caracterizou a fermentação dos grãos do cacau, e detectaram maiores teores de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e triptamina no início da fermentação. A partir do quarto dia ou meio da fermentação, o cacau fermentado teve os maiores teores de espermina, espermidina e espermina, e no final da fermentação (até 168 horas) tiveram os maiores valores de acidez total e de espermidina, enquanto houve redução de fenólicos totais, antocianinas e espermina. Demonstrando assim as mudanças no perfil das aminas bioativas durante a fermentação e quantidade total. Em consonância com esse estudo, Deus *et al.* (2020) detectaram mudanças significativas nos níveis totais de aminas, bem como em aminas individuais no cacau durante a fermentação, os autores observaram que os níveis totais foram maiores em 96-120 h, mas, ao final da fermentação, eram apenas 59% dos níveis iniciais e perceberam que a fermentação pode afetar de forma diferente dependendo da amina em questão, podendo tanto favorecer a formação, quanto a degradação, por exemplo a feniletilamina teve um aumento de três vezes mais no cacau fermentado quando comparado os níveis iniciais na fermentação, enquanto tirosina e tiramina

eram apenas 40% dos níveis iniciais. O cacau fermentado teve predomínio de espermidina (54,6%), seguido por feniletilamina (17,4%), tiramina (14,8%), putrescina (8,9%) e triptamina (4,3%). Sendo assim a fermentação se torna uma etapa importantíssima para determinação de compostos desejáveis no produto final.

3.5.3 Secagem

O processo de secagem deve ocorrer logo após a fermentação, os grãos são removidos da pilha ou caixa e são transferidos para o local onde ocorrerá a secagem dos grãos. Em áreas onde o clima é favorável e seco, os grãos são secos de forma natural, ao sol, pois trata-se de um processo simples e de baixo custo, ou pode ser realizada de forma artificial em secadores ou rotativos ou fornos (HANCOCK; FOWLER, 1994; BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

Sendo assim as amêndoas devem ser levados para a barcaça, balcões, estufas ou qualquer outra instalação adequada, pois logo após o processo fermentativo a massa cacau apresenta um teor de umidade em torno de 60% (MARTINS *et al.*, 2011). Geralmente, para obter um grão seco com teor de umidade de 7 a 8%, leva cerca de uma semana em tempo ensolarado, necessário para impedir o crescimento de fungos durante o armazenamento, e gerar um produto mais estável e com baixa perecibilidade (BECKETT, 2009; AFOWAKA, 2010). Esse processo proporciona a continuidade das mudanças químicas das amêndoas tais como a redução da acidez, a diminuição da adstringência e potencialização da liberação dos componentes precursores do sabor característico do chocolate, além disso, os grãos desenvolvem a cor marrom característica (MARTINS *et al.*, 2011; AFOWAKA, 2010).

Figura 4 - Grãos de cacau secando em barcaças após a fermentação



Fonte: A autora

3.5.4 Torrefação

Após a secagem e fermentação, a torrefação é o processo aplicado a muitos alimentos como meio de desenvolvimento de sabor e aroma, características essenciais para o chocolate (MINIFIE, 2012). Durante a torrefação da amêndoa, várias mudanças ocorrem, o que favorece na maximização de precursores de sabor decorrentes da fermentação e secagem: a perda de umidade; a casca desprende-se facilitando a sua retirada; há escurecimento devido a aplicação do binômio tempo x temperatura nas amêndoas favorecendo a cor e sabor final decorrente da reação de *Maillard*. Entretanto há perda de alguns compostos importantes: ocorre a degradação dos aminoácidos; as proteínas são parcialmente desnaturadas; os açúcares redutores naturais são destruídos durante a degradação dos aminoácidos, além de perda de ácidos voláteis e outras substâncias que contribuem para a acidez e amargor das amêndoas. As substâncias que sofrem menos alterações são as gorduras e os alcalóides (EFRAIM, 2004; VEGA; MINIFIE, 2012; KWIK-URIBE, 2012).

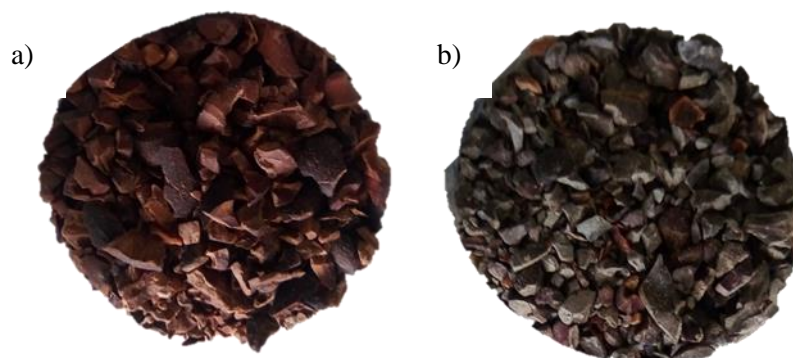
Durante a torrefação, a temperatura pode variar de 95 a 145 °C (200–295 °F), dependendo do tipo de processamento, equipamento, tipo de alimento e produto final que se deseja. Devido às suas temperaturas altas, a torrefação causa redução do número de micro-organismos garantindo a segurança do ingrediente (VEGA; KWIK-URIBE, 2012). O cacau é normalmente torrado à temperaturas entre 120 e 140 °C (248–284 °F), quando comparado a temperatura de torrefação de nozes ou café superiores a 200 °C (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017)

O processo pode ser dividido em duas partes: o primeiro é um processo de secagem, no qual a amêndoa é submetido a aquecimento a baixa temperatura, fazendo com que a casca se desprenda e praticamente não tem efeito de torrefação, não ultrapassando 100 °C (212 °F). Posteriormente, passa por um tratamento com temperatura mais alta atingindo o estágio de torrefação (VEGA; KWIK-URIBE, 2012).

3.5.5 Trituração e descascamento

Após a torrefação, ainda quente as amêndoas passam pelo processo de descascamento. A ação do calor proporciona um espaçamento favorável entre a casca e o cotilédone, facilitando a sua separação da casca. Geralmente as amêndoas passam por moinhos que as trituram grosseiramente produzindo os *nibs* (amêndoas torradas e fermentadas, Figura 4), além de proporcionar a separação da casca através de um sistema composto por peneiras e colunas de ar que agem conjuntamente para sua retirada. A casca é arrastada pela coluna de ar, através do princípio de separação por densidade (COHEN; JACKIX; SOUSA, 2004).

Figura 5 - *Nibs* (amêndoas torradas e fermentadas) triturados: (a) Totalmente fermentados por 144h. (b) Parcialmente fermentados por 48h



Fonte: A autora

3.6 Processamento do chocolate

Para a produção do chocolate, os *nibs* passam por uma nova moagem e são transformados em massa ou pasta de cacau (OETTERER, 2006). Durante o processo de moagem dos *nibs*, a gordura no seu interior é liberada devido à ruptura da célula, produzindo um espesso licor de cacau (GUTIÉRREZ; PÉREZ, 2015). Normalmente o cacau é moído duas vezes, processos esses chamados de moagem grossa e moagem fina, sendo o primeiro com um moinho de impacto, geralmente utilizados para sólidos e o segundo o moinho de bolas ou discos capazes trabalhar com pastas ou líquidos, reduzindo cada vez mais o tamanho de partícula, tornando-os menos arenoso ou áspero ao paladar (BECKETT, 2008; BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017). Os moinhos de impacto são alimentados com os *nibs* por uma rampa em câmara hermética contendo dois discos posicionados verticalmente. Um disco gira contra o outro disco que encontra-se fixo, moendo o cacau através da pressão e fricção da força de cisalhamento. A ação de cisalhamento faz com que as partículas se desintegram, liberando grandes quantidades de gordura do seu interior. Os moinhos de bolas são capazes de trabalhar com líquidos e, portanto, precede os moinhos de impacto. São montados em torno de um eixo principal que gira na direção oposta ao outro eixo, promovendo ação combinada de impacto e forças de fricção capazes de moer o cacau e reduzir o tamanho das partículas a *mícrons* de largura devido às rotações opostas e a diferença de velocidade entre as bolas e os cilindros (BECKETT, 2008; GUTIÉRREZ; PÉREZ, 2015).

O processo de fabricação de chocolate consiste basicamente nos seguintes processos: mistura, refinamento, conchagem da pasta de chocolate, temperagem, moldagem e desmoldagem (AFOAKWA, 2010; CRAFACK *et al.* 2013; ASCRIZZI *et al.*, 2017; BEG *et al.*, 2017).

3.6.1 Mistura

A mistura consiste na primeira etapa do processo de produção de chocolates, onde os ingredientes são misturados por tempo suficiente para se transformarem em uma pasta homogênea (COHEN; JACKIX; SOUSA, 2004). Na massa de cacau, são adicionados açúcar, manteiga de cacau e lecitina de soja. Pode ainda, adicionar outros tipos de ingredientes como leite em pó, aromatizantes, dependendo da categoria do produto desejado (AFOWAKA, 2010).

3.6.2 Refino

O refino é primeiro estágio de controle de qualidade do chocolate, processo esse, que através da redução granulométrica da massa de cacau e os cristais de açúcar adicionados, favorecem a qualidade sensorial do chocolate fazendo com que as partículas sejam reduzidas eliminando a arenosidade capaz de ser detectada pela boca, o que não é desejável na textura final do produto (COHEN; JACKIX; SOUSA, 2004). Normalmente no processo de refino, utiliza-se uma série de cilindros pesados em rotação a baixa velocidade capaz de promover choque e cisalhamento do material depositado que entra em atrito com o equipamento permitindo a formação de uma massa mais viscosa do chocolate ao longo do tempo (BECKETT, 2009).

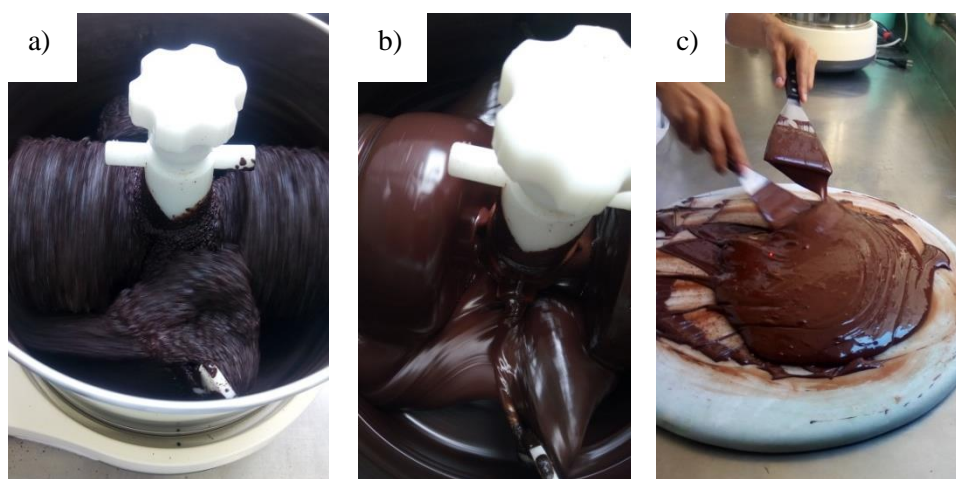
3.6.3 Conchagem

Embora os processos de pré processamento do cacau (fermentação, secagem) sejam capazes de desenvolver precursores do sabor do chocolate, há também a formação de muitos compostos indesejáveis. O objetivo da conchagem é remover os ácidos volatéis formados durante o processo de fermentação e produção de compostos voláteis desejáveis, responsáveis pelo sabor e aroma específicos do chocolate (BECKETT, 2009). A conchagem é um processo essencial que contribui para o desenvolvimento da viscosidade, textura e sabor finais, através da eliminação de compostos indesejáveis (ácidos graxos e aldeídos), redução de umidade, modificação da viscosidade, produção de uma textura uniforme, e mudanças na cor devido à emulsificação e oxidação de taninos (AFOAKWA *et al.*, 2008; BECKETT, 2009).

O equipamento onde ocorre a conchagem consiste basicamente em uma cama plana de granito onde desliza roletes presos aos braços robustos de aço, que em movimentos circulares contínuos associados a pás presas nas extremidades promovem ação de cisalhamento e mistura, devido ao choque do material nas paredes do equipamento. Durante a conchagem, o atrito interno aumenta a temperatura de forma constante, o que causa a evaporação dos

compósitos voláteis e ácidos graxos de cadeia curta que são reduzidos em cerca de 30% (AFOAKWA *et al.*, 2008; BECKETT, 2009; BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017). As mudanças físicas consistem na quebra de quaisquer aglomerados e o revestimento das partículas não gordas por uma película de gordura. A massa de chocolate é liquefeita pela adição da manteiga de cacau sob trabalho mecânico contínuo. O tempo de concha é variável, dependendo do chocolate que se deseja produzir, ocorre normalmente entre 12 a 24 horas (WINIFIE, 1989; AFOAKWA *et al.*, 2008).

Figura 6 – (a) Processo de conchagem na fase inicial. (b) Processo de na fase final. (c) Chocolate retirado ao final do processo



Fonte: A autora

3.6.4 Temperagem

A temperagem ou pré-cristalização, influencia diretamente nas propriedades físicas e sensoriais do chocolate, sendo assim, é um processo controlado que submete a gordura presente a tratamentos térmicos e mecânicos, para a obtenção de sua forma cristalina mais estável (COHEN; JACKIX; SOUSA, 2004; BECKETT, 2009).

O processo de temperagem envolve agitação, e o tempo e temperatura de cristalização que devem ser suficientes para que ocorra a formação dos cristais estáveis. A temperatura exerce uma função essencial sendo a força propulsora de cristalização. O processo de temperagem para o chocolate inicia-se com a fusão completa da fase gordurosa do chocolate em temperatura de 40/50°C (GUTIÉRREZ; PÉREZ, 2015, 2015). A composição relativamente homogênea dos triglicerídeos presentes na mistura confere à manteiga de cacau a cristalização, porém os cristais produzidos podem variar de acordo com sua dureza e pontos de fusão. A manteiga de cacau pode se cristalizar em várias formas polimórficas em função dos triglicerídeos na sua composição. As gorduras podem cristalizar em várias estruturas

diferentes são portanto polimórficas, outro fator importante é a diferença na simetria das cadeias, que pode gerar um conjunto complexo de polimorfos que variam das formas mais instáveis às estáveis. Diante dessa situação, a indústria do chocolate, reconhece seis formas polimórficas de manteiga de cacau (I-VI), nomeadas de α , β e γ (AFOWAKA, 2008). O tamanho dos cristais e sua orientação são fatores determinantes de aparência brilhante, odor agradável, textura, suavidade, quebra adequada (chamado de snaps), estabilidade do chocolate, sensação de derreter na boca e propriedades funcionais das gorduras, enquanto a ordem cristalina interna dos ácidos graxos define o ponto de fusão (NELSON, 1994; KREIBICH, 2016). Os cristais do tipo β são os mais utilizados, devido sua forma mais estável, garantindo a estabilidade na conformação do chocolate produzido (BECKETT, 2009).

O processo de têmpera acontece da seguinte forma: o chocolate derretido é resfriado proporcionando a cristalização homogênea da gordura, dando origem a formação dos cristais estáveis (β). Uma vez os cristais formados, se unem a temperatura é então elevada para impedir que eles se solidifiquem. Este procedimento também permite evitar manchas brancas de gordura (fat bloom) que podem ser formadas na superfície do chocolate (AFOWAKA, 2008; GUTIÉRREZ; PÉREZ, 2015). Depois de temperado, o chocolate pode ser usado de várias maneiras, moldado em sólidos, ou em conchas vazias que podem ser preenchidas com diferentes centros, desde bombons duros e moles até centros muito líquidos, podem ser usados para revestir biscoitos, caramelo, nozes, frutas, sorvete, entre outros (BECKETT, 2009).

Figura 7 - Processo de temperagem manual com controle de temperatura

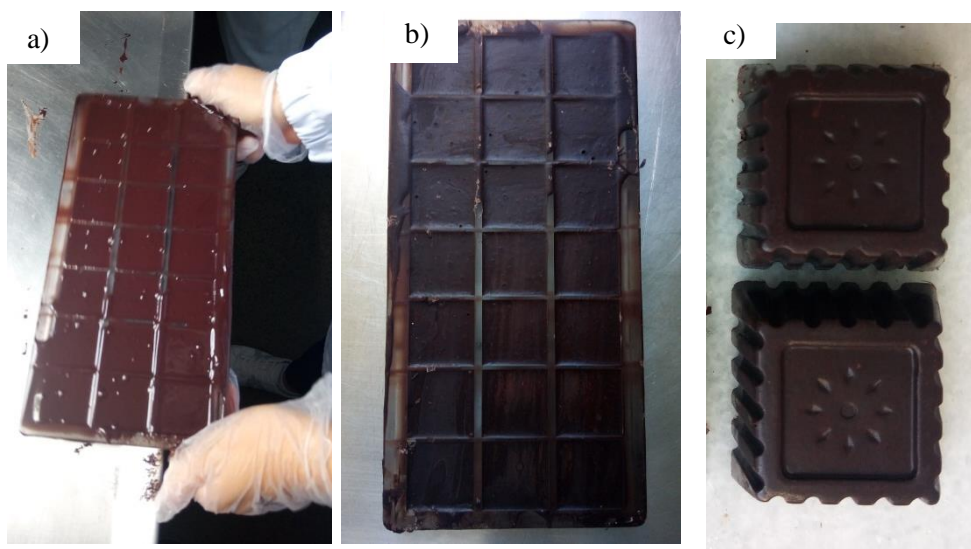


Fonte: A autora

3.6.5 Moldagem e resfriamento

O chocolate obtido após o processo de temperagem pode ser acomodado em fôrmas variadas, geralmente de policarbonato, e dependendo do tipo e quantidade desejada, são devidamente preenchidas realizando-se uma vibração manual ou mecânica a fim de acomodar corretamente a massa nos moldes e retirada de bolhas de ar. No processo industrial são utilizadas mesas vibratórias evitando a formação de espaços vazios no chocolate produzido (LEITE, 2012). Em seguida, com auxílio de uma espátula retira-se o excesso do produto da superfície, e assim levados para refrigeração. Após o período de endurecimento do chocolate, é realizada a desmoldagem através da inversão das fôrmas em ambiente higienizado e encaminhado para embalagem final (COHEN; JACKIX; SOUSA, 2004).

Figura 8 - a) Processo de moldagem b) Chocolate na forma após processo de resfriamento c) chocolate desmoldado



. Fonte: A autora

3.7 Chocolate

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define chocolate através da resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005 aprova o “Regulamento técnico para chocolate e produtos de cacau” e definindo-o como:

“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. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados” (BRASIL, 2005).

Essa definição difere nas quantidades mínimas exigidas pelo padrão internacional da *Codex Alimentarius*, que classifica o produto como chocolate, aqueles que contêm com base no extrato seco, pelo menos 35% de sólidos de cacau, sendo pelo menos 18% proveniente da manteiga de cacau e 14% para massa de cacau (CODEX, 2003).

No ano de 2017 a Comissão de Desenvolvimento Econômico, Indústria, Comércio e Serviço aprovou 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, parâmetros esses que são utilizados pela União Europeia e estabeleceu percentuais mínimos de cacau para cada tipo de chocolate. Sendo assim, o chocolate em pó deve conter no mínimo de 32% de sólidos totais de cacau; o chocolate ao leite o mínimo de 27% de sólidos totais de cacau e o mínimo de 14% de sólidos totais de leite; o chocolate amargo ou meio amargo deve conter o mínimo de 35% de sólidos totais de cacau, dos quais ao menos 18% devem ser provenientes da manteiga de cacau e da massa de cacau e outros ingredientes, e 14% devem ser de sólidos totais de cacau isenta de gordura; e o chocolate branco, no mínimo de 20% de sólidos totais de manteiga de cacau.

A CODEX descreve outras composições em relação a produção de chocolate, para chocolate meio-amargo, deve conter no mínimo 35% de sólidos de cacau (matéria seca), dos quais no mínimo 18% deve ser manteiga de cacau e 14% sólidos de cacau livres de gordura; chocolate ao leite deve conter no mínimo 25% de sólidos de cacau (matéria seca), incluindo no mínimo 2,5% de sólidos de cacau livres de gordura, e um teor mínimo de sólidos derivados do leite entre 12 e 14% incluindo no mínimo 2,5 e 3,0% de gordura do leite e para o chocolate branco deve conter no mínimo 20% de manteiga de cacau (matéria seca) e 14% de sólidos derivados do leite incluindo no mínimo 2,5 e 3,5 % de gordura do leite (CODEX, 2003).

3.8 Bioacessibilidade *in vitro*

Para entendimento da absorção de nutrientes pelos organismos vivo, é importante entender como o nutriente torna-se disponível durante a ingestão. Com isso a diferença de conceitos relativos à biodisponibilidade são bastante esclarecedoras para o entendimento de termos específicos dessa terminologia. A biodisponibilidade vem sendo definida como a proporção do composto ingerido, nutriente ou outro composto não nutriente, inicialmente presente em um alimento, ou fármaco, que é absorvido e utilizado pelo organismo para desempenhar o seu efeito bioativo nos órgãos alvos (SENGUL et al., 2014). Entre os fatores

que determinam a biodisponibilidade de compostos bioativos está a bioacessibilidade, que é definida como a fração de um composto que é liberado da matriz alimentar e se encontra potencialmente disponível para absorção e metabolização, podendo ser determinada de duas maneiras *in vivo* e *in vitro* (TOGNON, 2012; LIMA, 2014; HELENO *et al.*, 2015).

O processo de digestão de um ser vivo, segue basicamente três etapas principais, inicialmente tem a digestão mecânica iniciada na boca, com a mastigação dos alimentos, onde o alimento é triturado e há redução do tamanho das partículas até obter-se uma mistura de aspecto pastoso e também o início da digestão química com a presença da amilase salivar e também da lipase salivar (RODRIGUES, 2017). Em seguida o processo digestão química continua no estômago com a digestão de proteínas com a secreção de ácido clorídrico e enzimas, sendo a principal função da digestão gástrica é a quebra parcial das frações proteicas dos alimentos com a atuação da enzima pepsina, onde os alimentos misturados com as secreções gástricas para produzir o quimo, um líquido espesso composto pelos alimentos ingeridos e as secreções salivares e gástricas. Logo após o quimo acidificado é transportado ao duodeno, onde é neutralizado tem o seu pH ácido neutralizado pelo bicarbonato de sódio presente no suco pancreático que é liberado pelo pâncreas exócrino, a partir do estímulo do hormônio secretina, liberado pelo duodeno. Já na fase da digestão intestinal a vesícula biliar secreta a bile no duodeno, que auxilia na emulsificação, hidrólise e absorção de lipídios (BJARNASON; SHERWOOD, 2014; PEIXOTO, 2015). Mas apenas no intestino delgado, é que ocorre a principal absorção dos nutrientes: gorduras, carboidratos, proteínas, minerais, vitaminas, água e eletrólitos. Sendo assim, o sistema atua na biotransformação dos componentes alimentares tornando-os mais acessíveis para o organismo, ou seja, em uma forma mais biodisponível (PEIXOTO, 2015). O método gastrointestinal *in vitro* é uma técnica que é aplicada em uma amostra alimentar seguindo as mesmas diretrizes do processo da digestão humana, imitando as condições fisiológicas e controlando os principais fatores envolvidos (temperatura, velocidade de agitação, composição química e enzimática) e em seguida a solução resultante é levada para quantificação do nutriente de interesse (TOGNON, 2012). Atualmente os métodos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* são amplamente utilizados, uma vez que são rápidos, seguros, viáveis e não têm as questões éticas dos métodos *in vivo* (PEREIRA, 2014).

Apesar da relevância do tema, poucos trabalhos são reportados na literatura em relação aos elementos presentes no chocolate amargo. Martini, Conte e Tagliazucchi (2018) analisaram os compostos fenólicos após digestão gastrointestinal *in vitro* em chocolate amargo, e observaram a diminuição considerável dos compostos fenólicos totais e

individuais. Entretanto, dentre as frações individuais, os ácidos fenólicos e os ácidos hidroxicinâmicos apresentaram maior bioacessibilidade (de 41,2% a 45,1%), e houve diminuição da atividade antioxidante após a etapa gástrica e no final da digestão. Dala-Paula et al. (2021) analisaram, pela primeira vez, aminas e aminoácidos em chocolate amargo com 70% cacau por meio de simulação *in vitro* da digestão oral, gástrica e intestinal. Os autores identificaram que todas as aminas investigadas apresentaram alta bioacessibilidade com leve influência das enzimas digestivas. As aminas aumentaram após a digestão gastrointestinal: tiramina (13 vezes), triptamina (9 vezes), outras (2,4–4,2 vezes) e histamina apareceu apenas na fase intestinal, enquanto os aminoácidos foram detectados no chocolate, e seus conteúdos aumentaram após a digestão *in vitro*. Apesar de a bioacessibilidade liberar componentes da matriz e influenciar no teor total destes, os teores individuais podem variar dependendo da composição da amostra, isto porque mudança na composição afeta a extração e liberação de compostos bioativos da matriz do chocolate, o que por sua vez tem impacto em sua bioacessibilidade (POLIŃSKI *et al.*, 2021)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da relevância para a qualidade do chocolate, a fermentação do cacau ainda é um processo artesanal demorado que necessita de bastante conhecimento e habilidade para a produção de cacau com qualidade. Além disso, as mudanças provocadas durante a fermentação, embora vantajosa em relação a alguns aspectos como cor e sabor, pode ser prejudicial para outros, como diminuição dos níveis de compostos fenólicos e menor atividade antioxidante. Este estudo fornece, pela primeira vez, informações sobre a redução do tempo de fermentação, para produzir um chocolate com características funcionais e sensoriais, o que pode ser vantajoso para a indústria do chocolate. Também fornece informações sobre o perfil e níveis de aminas no chocolate contendo diferentes proporções de cacau subfermentado e seu impacto na bioacessibilidade de aminas de uma matriz complexa.

Além disso, pode promover possíveis intervenções tecnológicas para o processamento de fermentação do cacau e produção do chocolate, visando a melhoria da qualidade do cacau produzido nas fazendas, local que inicia as etapas primordiais para uma matéria prima de boa qualidade que, influenciando diretamente na melhoria da qualidade sensorial e funcional do chocolate a ser processado e modulando o perfil dos principais compostos presentes na matriz. A avaliação *in vitro* é relevante, de modo que os compostos, embora detectadas por métodos analíticos como livres, podem se comportar de maneira diferente devido as

condições físico-químicas que são submetidas no processo gastrointestinal, podendo assim permanecer ou não disponíveis para absorção do organismo, e na maioria das vezes os teores totais disponíveis são em quantidades superiores que os métodos analíticos vistos, conforme discutidos na literatura, entretanto se observados individualmente pode ser variável de acordo com as condições e fases submetidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB (Associação Brasileira das Indústrias de Chocolate, Amendoim e Balas), 2019.

Disponível em: <http://www.abicab.org.br/paginas/chocolate/mercado-2019/>. Acesso em: 20 abr 2021.

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.

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. England: Wiley-Blackwell, p. 21. 2010.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A. Cocoa fermentation: Chocolate flavour quality. **Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food**, p. 457-468, 2010.

ALVAREZ, M. A.; MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in food science & technology**, v. 39, n. 2, p. 146-155, 2014.

AGLAWÉ, M. M. *et al.* Agmatine improves the behavioral and cognitive impairments associated with chronic gestational ethanol exposure in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 167, p. 37-47, 2021.

ANLI, R. E.; BAYRAM, M. Biogenic amines in wines. **Food Reviews International**, v. 25, n. 1, p. 86-102, 2008.

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.

BARBIERI, Federica *et al.* Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. **Foods**, v. 8, n. 1, p. 17, 2019.

BARIŠIĆ, V. *et al.* The chemistry behind chocolate production. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3163, 2019.

BARRIOS, M.; OROZCO, L. C.; STASHENKO, E. E. Cocoa ingestion protects plasma lipids in healthy males against ex vivo oxidative conditions: A randomized clinical trial. **Clinical nutrition ESPEN**, v. 26, p. 1-7, 2018.

BECKETT, S. Chocolate manufacture. In: **Science and technology of enrobed and filled chocolate, confectionery and bakery products**. Woodhead Publishing, 2009. p. 11-28.

BECKETT, S. T.; FOWLER, M. S.; ZIEGLER, G. R. (Ed.). **Beckett's industrial chocolate manufacture and use**. John Wiley & Sons, 2017.

BEG, Mohd Shavez *et al.* Status, supply chain and processing of cocoa-A review. **Trends in food science & technology**, v. 66, p. 108-116, 2017.

BILGE, S. S. *et al.* Neuroprotective action of agmatine in rotenone-induced model of Parkinson's disease: Role of BDNF/cREB and ERK pathway. **Behavioural Brain Research**, v. 392, p. 112692, 2020.

BJARNASON, I. T.; SHERWOOD, R. A. Clinical biochemistry of the gastrointestinal tract. **Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects**. 3rd ed. Churchill

Livingstone, London: UK, p. 214-30, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visa Legis. Resolução. *RDC n.264, de 22 de setembro de 2005*. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chocolate e Chocolate Branco. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Decreto nº 46, de 7 de junho de 2012. Acordo Internacional do Cacau (AICACAU/2010). Diário Oficial da União, Brasília, abril .2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 57, de 12 de novembro de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa do Cacau. Diário Oficial da União, Brasília, 13 de novembro de 2008. Seção I, p.2, 2008.

Britannica Academic, Encyclopædia Britannica. *Chocolate*. 22Apr.2016. Disponível em:academic-eb-britannica.ez10.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/chocolate/82278. Acesso 4 May. 2019.

CAPORASO, Nicola *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.

CASAL, Susana *et al.* Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6188-6192, 2004.

CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), 2018. Disponível em: http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm. Acesso em 20 jan 2020

CODEX ALIMENTARIUS. Standard for chocolate and chocolate products. CODEX STAN 87 – 1981. Rev. 1, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codex-alimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&urlpdf>. Acesso em: 19 jan 2020.

COHEN, K. de O.; JACKIX, M.; DE SOUSA, M. V. Otimização do processo de temperagem de produto análogo de chocolate ao leite elaborado com amêndoas de cacau e de cupuaçu. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2004.

CRAFACK, M. *et al.* Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 1, p. 103-116, 2013.

DA SILVA OLIVEIRA, C. *et al.* Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, 2011.

DALA-PAULA, B. M.; MARIA DE FÁTIMA, V. Starling; GLORIA, M. B. A. Vegetables consumed in Brazilian cuisine as sources of bioactive amines. **Food Bioscience**, v. 40, p. 100856, 2021.

DALA-PAULA, B. M. *et al.* *In vitro* bioaccessibility of amino acids and bioactive amines in 70% cocoa dark chocolate: What you eat and what you get. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128397, 2021

DE ANDRADE, A. B. *et al.* Influence of under-fermented cocoa mass in chocolate production: Sensory acceptance and volatile profile characterization during the processing. **LWT – Food Science and Technology**, v. 149, p.112048, 2021.

DE MELLO, D. R. Resolução-RDC N 264, De 22 De Setembro De 2005.

DEL ROSARIO BRUNETTO, M. *et al.* Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 459-467, 2007.

DEUS, V. L. *et al.* Influence of cocoa clones on the quality and functional properties of chocolate–Nitrogenous compounds. **LWT**, v. 134, p. 110202, 2020.

DEUS, V. L. *et al.* Understanding amino acids and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 97, p. 103776, 2021.

DO CARMO BRITO, B. N. *et al.* Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food chemistry**, v. 228, p. 484-490, 2017.

EFRAIM, P. *et al.* Estudo para minimizar as perdas de flavonoides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate. 2004..

EFRAIM, P. *et al.* Influence Of Cocoa Beans Fermentation And Drying On The Polyphenol Content And Sensory Acceptance [influência Da Fermentação E Secagem De Amêndoas De Cacau No Teor De Compostos Fenólicos E Na Aceitação Sensorial]. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **Efsa Journal**, v. 9, n. 10, p. 2393, 2011.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Data Production and Trade. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/>. Acesso em: 31 dez. 2020.

FERREIRA, A. C. R. *et al.* Guia de beneficiamento de cacau de qualidade. **Instituto Cabruca. Ilhéus, Bahia**, 2013.

GLORIA, M. B. A.; ENGESETH, N. J. Bioactive amines. **Handbook of food science, technology and engineering**. Boca Raton: **Taylor and Francis**, v. 4, 2005.

GU, Jingsi *et al.* Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during the fermentation processing of stinky tofu. **Food Research International**, v. 111, p. 689-698, 2018.

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-Food Science and Technology**, v. 66, p. 252-259, 2016.

GUTIÉRREZ, T.; PÉREZ, E. Significant quality factors in the chocolate processing: Cocoa post harvest, and in its manufacture. **Cocoa by products technology, rheology, styling, and nutrition**, v. 1, 2015.

GUTIÉRREZ, T. J. State-of-the-art chocolate manufacture: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 1313-1344, 2017.

HANCOCK, B. L.; FOWLER, M. S. Cocoa bean production and transport. In: **Industrial chocolate manufacture and use**. Springer, Boston, MA, 1994. p. 8-24.

HAO, Y.; SUN, B. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during fermentation of farmhouse sauce from Northeast China. **Food Control**, v. 108, p. 106861, 2020.

HELENO, S. A. *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 475-481, 2015.

ICCO International Cocoa Organization), Produção Mundial de cacau. Disponível em: <http://www.icco.org/>. Acesso em fev. 2015. ICCO, 2013

JEON, A. R.; LEE, J. H.; MAH, J. H. Biogenic amine formation and bacterial contribution in Cheonggukjang, a Korean traditional fermented soybean food. **LWT**, v. 92, p. 282-289, 2018.

KALACĚ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27-39, 2014.

KREIBICH, H. H. *et al.* Qualidade e segurança das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e seus produtos com relação aos contaminantes biológicos e a descontaminação de fungos toxigênicos com ozônio gasoso. 2016.

LATORRE-MORATALLA, M. L. *et al.* Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. **Food and Chemical Toxicology**, v. 99, p. 78-85, 2017.

LEAL, J. B. **Diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) resistentes à vassoura-de-bruxa com base em marcadores RAPD e microssatélites**. 2004. Tese de Doutorado. M. Sc. Thesis. Ilhéus-BA (Brazil), Universidade Estadual de Santa Cruz.

LEITE, P. B. Caracterização de chocolates provenientes de cultivares de cacau *Theobroma cacao* L resistentes a vassoura de bruxa. 2012. 170p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. Salvador – BA. 2012.

LIANG, J. *et al.* Effects of different co-cultures on the amino acid availability, biogenic amine concentrations and protein metabolism of fermented sufu and their

relationships. **LWT**, v. 113, p. 108323, 2019.

LIMA, A.C.S *et al.* *In vitro* bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, p.142-147, 2014

MAJCHERCZYK, J.; SURÓWKA, K.. Effects of onion or caraway on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation and refrigerated storage. **Food chemistry**, v. 298, p. 125083, 2019.

MARTINI, S.; CONTE, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after *in vitro* gastro-intestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 424–436, 2018

MARTINS, J.M. *et al.* Melhoria da Qualidade de Cacau. Ilhéus. **CEPLAC/CENEX**. 48p. 2011

MEDINA, M. Á. *et al.* Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 23-59, 2003.

MELO, T. S., *et al.* Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during the fermentation process. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 1947-1957, 2021.

MINIFIE, B. **Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology**. Springer Science & Business Media, 2012.

MOHAMMED, G. I. *et al.* A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 84-94, 2016.

MUÑOZ-ESPARZA, N.C *et al.* Polyamines in food. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 108, 2019.

NELSON, R.B. Atemperadoras, baños, equipos de moldeo y de enfriamiento. **In: Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Editado por Beckett, 22.ed. España: Acibia, S.A, 1994. p.193-252, 1994

OETTERER, M. *et al.* Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 1-50, 2006.

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**, v. 122, p. 108977, 2020.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007

PAZ-YÉPEZ, C. *et al.* Lipids digestibility and polyphenols release under *in vitro* digestion of

dark, milk and white chocolate. **Journal of functional foods**, v. 52, p. 196-203, 2019.

PEIXOTO, R. R. A *et al.* Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 41-47, 2016.

PRETI, Raffaella; RAPA, Mattia; VINCI, Giuliana. Effect of steaming and boiling on the antioxidant properties and biogenic amines content in green bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties of different colours. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017.

PEREIRA, I. O. Viabilidade da utilização da casca de cacau como combustível no aquecimento de ar para secagem de amêndoas de cacau. 2013.

POLIŃSKI, S. *et al.* Physicochemical, Antioxidant, Microstructural Properties and Bioaccessibility of Dark Chocolate with Plant Extracts. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5523, 2021..

REHEM, B. C. Respostas fisiológicas de clones de *Theobroma cacao* L. ao alagamento do substrato. **Maestria, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus, Bahia, Brasil**, 2006.

RESTUCCIA, D. *et al.* Determination of biogenic amine profiles in conventional and organic cocoa-based products. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 7, p. 1156-1163, 2015.

RODRIGUES, D. B. *et al.* Comparison of two static *in vitro* digestion methods for screening the bioaccessibility of carotenoids in fruits, vegetables, and animal products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 51, p. 11220-11228, 2017.

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines and their importance in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213–231, 1996.

SCHWAN, R. F; PEREIRA, G.V.M.; FLEET, G. H. Microbial activities during cocoa fermentation. **Cocoa and coffee fermentations**. v.13, p. 129-192, 2014.

SPIZZIRRI, U. G. *et al.* Biogenic amines, phenolic, and aroma-related compounds of unroasted and roasted cocoa beans with different origin. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 306, 2019.

TAKSANDE, B. G. *et al.* Agmatine attenuates hyperactivity and weight loss associated with activity-based anorexia in female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 132, p. 136-141, 2015.

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

TOGNON, A. L. **Quantificação e avaliação da bioaccessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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.

URBAŃSKA, B. *et al.* Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 10, p. 2101-2112, 2019.

VADODARIA, Krishna C. *et al.* Serotonin in psychiatry: in vitro disease modeling using patient-derived neurons. **Cell and tissue research**, v. 371, n. 1, p. 161-170, 2018.

VEGA, C.; KWIK-URIBE, C. Theobroma cacao— An introduction to the plant, its composition, uses, and health benefits. In: **Cocoa butter and related compounds**. AOCS Press, p. 35-62, 2012.

ZUGAIB, A.C.C.; BARRETO, R.C.S. Mercado Internacional de Cacau: previsão da demanda, oferta e preços. **Revista Bahia Agrícola**, 2014.

ZHAO, J. *et al.* Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 72-87, 2014.

YILMAZ, Cemile; GÖKMEN, Vural. Neuroactive compounds in foods: Occurrence, mechanism and potential health effects. **Food Research International**, v. 128, p. 108744, 2020.

Capítulo II

Manuscrito: Bioaccessibility of bioactive amines in dark chocolates made with different 2 proportions of under-fermented and fermented cocoa beans

1 **Bioaccessibility of bioactive amines in dark chocolates made with**
2 **different proportions of under-fermented and fermented cocoa beans**

3

4 Geisiane Santos Silva^a, Bruno M. Dala-Paula^b, Eliete S. Bispo^{a*}, Maria Beatriz A. Gloria^{c*}

5

6 ^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 40170-115, Brasil

7 ^b Laboratório de Nutrição Experimental, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de
8 Alfenas, Alfenas, MG, 37130-000, Brasil

9 ^c LBqA and LCQ, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av.
10 Presidente Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil

11

12

13 **Corresponding authors:*

14 Maria Beatriz A. Gloria: mbeatriz.gloria@gmail.com (phone: 55 31 999531703)

15 Eliete S. Bispo: eliete.bispo@gmail.com

16

17 **Abstract**

18

19 The objective of this study was to investigate the influence of under-fermented – UF
20 (48h) cocoa (0-65%) on bioactive amines in chocolate and their *in vitro* bioaccessibility.

21 The same eight amines were found in two groups regarding total contents [A-0 & 20%
22 UF (34 mg/kg) and B-35 to 65% UF (17 mg/kg)]. Low levels of amines were present in
23 the oral phase, representing free amines. Gastric digestion was effective in releasing
24 tyramine, serotonin and agmatine (A), spermidine (A) and phenylethylamine from
25 conjugates. Intestinal digestion was efficient in releasing putrescine, cadaverine,
26 histamine and spermidine (B). Tyramine and phenylethylamine showed highest
27 bioaccessibility, which was not affected by the addition of UF cocoa. Agmatine and
28 serotonin had lowest bioaccessibility, and were present only in A. By adding different
29 proportions of UF cocoa during chocolate production, the levels and bioaccessibility of
30 amines can be modulated as well as their binding to conjugates.

31

32

33 **Keywords:** Cocoa fermentation; Spermidine; Histamine; Chocolate; Serotonin; *In vitro*
34 digestion.

35

36 1. Introduction

37

38 Chocolate, as well as other products derived from the processing of cocoa
39 (*Theobroma cacao* L.), are widely consumed and enjoyed worldwide due to their
40 sensory characteristics (Muñoz; Cortina; Vaillant, & Parra, 2020). In addition, cocoa
41 beans can contribute to human nutrition and health by providing energy, nutrients
42 (lipids, polysaccharides, amino acids, fibers and minerals) (Oracz, Nebesny,
43 Źyźelewicz, Budryn, & Luzak, 2019) and health promoting polyphenolic and
44 nitrogenous compounds (Yilmaz & Gökmen, 2020). Several studies are available
45 regarding the cardiovascular health benefits, antioxidant protection, and help in
46 cholesterol balance associated with polyphenolic compounds (Ebaditabar, Djafarian,
47 Saedifard, & Shab-Bidar, 2020; Darand, Oghaz, Hadi, Atefi, & Amani, 2021). There is
48 also information on the anti-inflammatory and hypoglycemic properties of
49 methylxanthine from cocoa products (Sarriá, Gomez-Juaristi, Cordero, Bravo, & Briz,
50 2020). The bioaccessibility and bioavailability of these compounds has also been a
51 matter of studies (Gültekin-Özğüven, Berktaş, & Özçelik, 2016; Oracz et al., 2019;
52 Sarriá et al., 2020).

53 Bioactive amines like spermidine, phenylethylamine, serotonin, tryptamine,
54 histamine and tyramine are also present in cocoa and chocolate (Deus, Bispo, Franca, &
55 Gloria, 2020; 2021; Dala-Paula, Deus, Tavano, & Gloria, 2021). These compounds can
56 contribute to human health by cardiovascular protection, antioxidant and anti-aging
57 activities (Eisenberg et al., 2016; Muñoz-Esparza, Latorre-Moratalla, Comas-Basté,
58 Toro-Funes, Veciana-Nogués, & Vidal-Carou, 2019; Liang et al., 2021) and mood

59 modulation (Yilmaz & Gökmen, 2020). It is important to observe that some of the
60 health promoting properties attributed to amines are the same as those reported for the
61 polyphenolic compounds; thereby, it is possible that amines are responsible or
62 contribute with important health promoting roles attributed to chocolate. Bioactive
63 amines are present in cocoa and chocolate (Restuccia, Spizzirri, Puoci, & Picci, 2015;
64 Restuccia, Spizzirri, Luca, Parisi, & Picci, 2016; Spizzirri, Ieri, Campo, Paolino,
65 Restuccia, & Romani, 2019; Dala-Paula et al., 2021; Delgado-Ospina, Di Mattia,
66 Paparella, Mastrocola, Martuscelli, & Chaves-Lopez, 2020; Delgado-Ospina et al.,
67 2021; Deus et al., 2020; 2021). In addition, during *in vitro* digestion of chocolate there
68 is further release of amines from conjugated forms, with other cocoa components, such
69 as nucleic acids, phospholipids, phenolic acid, lignin, protein and polysaccharides due
70 to enzyme activity, changes in pH and ionic strength (Dala-Paula et al., 2021).

71 The levels of bioactive compounds in cocoa and chocolate can be affected by
72 several factors, including variety, geographical origin, edaphoclimatic conditions,
73 agricultural practices (conventional or organic), pre-processing (harvest of the fruits,
74 removal of pulp and seeds, fermentation and drying) and processing (roasting, refining,
75 conching, tempering, and crystallizing) steps (Restuccia et al., 2015; Spizzirri et al.,
76 2019; De Andrade et al., 2021; Delgado-Ospina et al., 2021; Deus et al., 2021).
77 Fermentation is one of the most critical steps determining the quality of cocoa
78 (Ouattara, Ouattara, Droux, Reverchon, Nasser, & Niamke, 2017; Muñoz, Cortina,
79 Vaillant, & Parra, 2019; De Andrade et al., 2021). During fermentation, there is a
80 succession of microbial and enzymatic reactions resulting in free amino acids, peptides,
81 and reducing sugars which, upon Maillard reaction during roasting, are essential for the
82 generation of the desirable aroma, flavor and color (Muñoz et al., 2019; Chagas Junior,

83 Ferreira; & Lopes, 2021a; De Andrade et al., 2021). There is production of lactic and
84 acetic acids increasing acidity and, concomitantly, decrease in pH (Melo, Pires,
85 Engelmann, Monteiro, Maciel, & Bispo, 2021). In addition, there is reduction in
86 phenolic compounds resulting in lower bitterness and astringency – in the first 48 h
87 fermentation, there is 30% loss of polyphenolic compounds reaching 90% reduction at
88 the end of the process (144 h) (De Andrade et al., 2021). Furthermore, there is a change
89 in the profile and levels of some bioactive amines, the levels of phenylethylamine
90 increase whereas the levels of spermidine, serotonin, tryptamine, and tyramine decrease
91 (Deus et al., 2021).

92 Despite its relevance to cocoa quality, fermentation is still an artisanal process
93 undertaken naturally in cocoa farms using wooden boxes covered with banana leaves
94 and burlap, in a lengthy process (ca. 6 days), which can be a burden to cocoa
95 production. Furthermore, the changes brought about during fermentation, although
96 advantageous regarding some aspects (color, flavor and some bioactive compounds) can
97 be detrimental to others, such as decreased levels of phenolic compounds and lower
98 antioxidant activity (Melo et al., 2021). In this context, it would be interesting if one
99 could optimize the final composition and characteristics of the chocolate by using
100 different proportions of partially (under-fermented) and fully fermented cocoa.
101 According to De Andrade et al. (2021), by using increased proportions (0 to 80%) of
102 under-fermented (48 h fermentation) with fermented (144 h) cocoa for chocolate, it was
103 possible to increase phenolic compounds and bitterness and to improve the antioxidant
104 activity of the chocolate. However, sensory evaluation studies indicated that the use of
105 under-fermented cocoa was limited to 65% due to consumers acceptance (De Andrade

106 et al., 2021). No information is available regarding the influence of these changes on
107 the levels and bioaccessibility of bioactive amines in chocolate.

108 In this context, the objective of this study was to investigate the influence of the
109 use of different proportions of under-fermented in fermented cocoa on the profile and
110 levels of bioactive amines in the chocolate. In addition, the influence of the
111 composition of the chocolates on the *in vitro* oral, gastric and intestinal bioaccessibility
112 of amines was also investigated.

113

114 **2. Materials and Methods**

115

116 **2.1. Reagents and samples**

117

118 Analytical grade reagents were used, except HPLC solvents which were LC
119 grade. Ultra-pure water was from Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, USA).
120 Organic and aqueous solvents for HPLC analysis were filtered using HAWP and
121 HVWP membranes, respectively (0.45 µm, Millipore Corp., Milford, MA, USA).
122 Alpha-amylase (Sigma A-3176); bile salts (Sigma B-8756); pancreatin and pepsin from
123 porcine gastric mucosa (Sigma P-3292 and P-7012, respectively); and bioactive amine
124 standards (spermidine trihydrochloride, agmatine sulfate, putrescine dihydrochloride,
125 cadaverine dihydrochloride, histamine dihydrochloride, serotonin hydrochloride,
126 tryptamine hydrochloride, tyramine hydrochloride, 2-phenylethylamine hydrochloride)
127 were from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

128 The cocoa used as raw material was obtained from a farm located in the South of
129 Bahia, Brazil (14°41'96 "S and 39°12'109"W). The fermentation, drying and roasting
130 steps were also undertaken at the same farm under traditional commercial conditions.

131

132 **2.2. Cocoa fermentation**

133 Spontaneous commercial cocoa fermentations were performed at the farm
134 (Southern Bahia, Brazil, 14°41'96" S and 39°12'109" W), following standard protocols.
135 Immediately after harvest, the fruits of multivarietal cocoa were cut open (stainless steel
136 knives), and the beans and pulp (~40 kg), without the peel and placenta, were placed in
137 50×40×70 cm wooden boxes, with 1 cm diameter holes at each 5 cm. The boxes were
138 covered with banana leaves and burlap. Fermentation was carried out under two
139 different conditions: partial fermentation (48 h) – under-fermented and full fermentation
140 (144 h) – fermented. The average local daily temperature during fermentation varied
141 from 22.3 to 29.6 °C. From 48 h fermentation on, the seeds were mixed at 24 h
142 intervals to allow aeration and to homogenize fermentation of the mass. The fermented
143 cocoa from the different treatments were sun dried on stainless steel trays for 5 to 7 days
144 until moisture content of ~8 g/100 g (Melo et al., 2021). The fermented and dried cocoa
145 were cleaned and roasted in a forced air circulation oven using perforated trays (DeLeo
146 drying oven, model A35EAF8, Porto Alegre, RS, Brazil) at 120 °C for 25 minutes.
147 Then, the roasted beans were crushed in a manual press with wooden roll to remove the
148 peel and germ and obtain the cocoa nibs used for chocolate making. The samples were
149 frozen and stored under vacuum at -18 °C. The experiment was performed in triplicate.

150

151 2.3. Chocolate processing

152 Five different chocolates were made using two independent variables,
 153 corresponding to the percentages of under-fermented (48 h fermentation) and fully
 154 fermented (144 h fermentation) cocoa. The proportions of under-fermented cocoa used
 155 to make the dark chocolate ranged from 0% to 65% (Table 1), chosen based on
 156 consumer acceptance by sensory analysis (De Andrade et al., 2021).

157 **Table 1**

158 Chocolates made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented
 159 (144 h) cocoa beans

160

Chocolates	Cocoa nibs (%) from fermentations	
	Under-fermented (48 h)	Fermented (144 h)
C1	0	100
C2	20	80
C3	35	65
C4	50	50
C5	65	35

161

162 The chocolates were produced at the Chocolate Technology and Analysis
 163 laboratories from Faculdade de Farmácia, UFBA. Dark chocolate (66.3% cocoa) was
 164 formulated using the following ingredients: cocoa mass (61.0 g/100 g), commercial
 165 refined sugar (33.35 g/100 g), cocoa butter (5.3 g/100 g) and soy lecithin (0.35 g/100 g).
 166 The cocoa was mixed and ground in a processor (BL480BR30 NutriNinja, HAI XIN
 167 Technology, Shezhen, China) to produce the cocoa mass. Then, they were transferred
 168 to a stone mill (Melanger Spectra 11, Hillsborough Township, NJ, USA), along with the
 169 other ingredients (sugar, lecithin, cocoa butter) for conching and refining for 24 h.

170 Afterwards, the chocolate was tempered on marble surface (~32 °C) for the formation of
171 stable fat crystals, and it was immediately molded, using polyethylene molds, into 7 g
172 bars. The chocolates were refrigerated, wrapped, and stored at -18 °C until analysis.
173 The samples were analyzed for free bioactive amines and submitted to *in vitro*
174 bioaccessibility studies.

175

176 **2.4. Determination of free bioactive amines by HPLC**

177

178 Free bioactive amines were extracted from 5 g ground chocolate samples by
179 three successive extractions with 7 mL 5% trichloroacetic acid (TCA) followed by
180 stirring for 5 min, and centrifugation at 11,180 x g at 4 °C/10 min. The supernatants
181 were collected into a 25 mL volumetric flask (Deus et al., 2020). The fractions resulting
182 from the *in vitro* digestions were analyzed directly. The separation and quantification of
183 nine free bioactive amines (tyramine, putrescine, cadaverine, histamine, serotonin,
184 agmatine, spermidine, tryptamine and phenylethylamine) were performed by HPLC
185 using a LC-10 AD system connected to a RF-551 spectrofluorimetric detector operating
186 at 340 and 445 nm of excitation and emission, respectively, and a CBM-10 AD
187 controller (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). A μ Bondapak C18 column (300 x 3.9 mm
188 i.d., 10 μ m) was used. The mobile phases used were: (i) 0.2 M sodium acetate buffer
189 and 10 mM sodium salt of 1-octane sulfonic acid, pH adjusted to 4.9 with glacial acetic
190 acid; and (ii) acetonitrile (flow rate of 0.8 mL/min) and the gradient used for phase (ii)
191 was 13 min at 11%, 19 min at 30%, 24 min at 11%, and 45 min at 11%. Detection was
192 performed after post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde (OPA). The

193 derivatizing solution consisted of 1.5 mL Brij-35, 1.5 mL mercaptoethanol and 0.32 g
194 OPA in 500 mL solution of 25 g boric acid and 22 g KOH (pH 10.5) and was delivered
195 at 0.4 mL/min. The column was kept at 23 ± 1 °C. The amines were identified based on
196 retention times and the identity was confirmed by addition of the suspected amine to the
197 sample. Quantification was possible by area interpolation in an external standard curve
198 constructed with the eight investigated amines at nine different concentrations, three
199 repetitions each ($r^2 \geq 0.998$) (Chagas Junior, Ferreira, Gloria, Martins, & Lopes, 2021b).

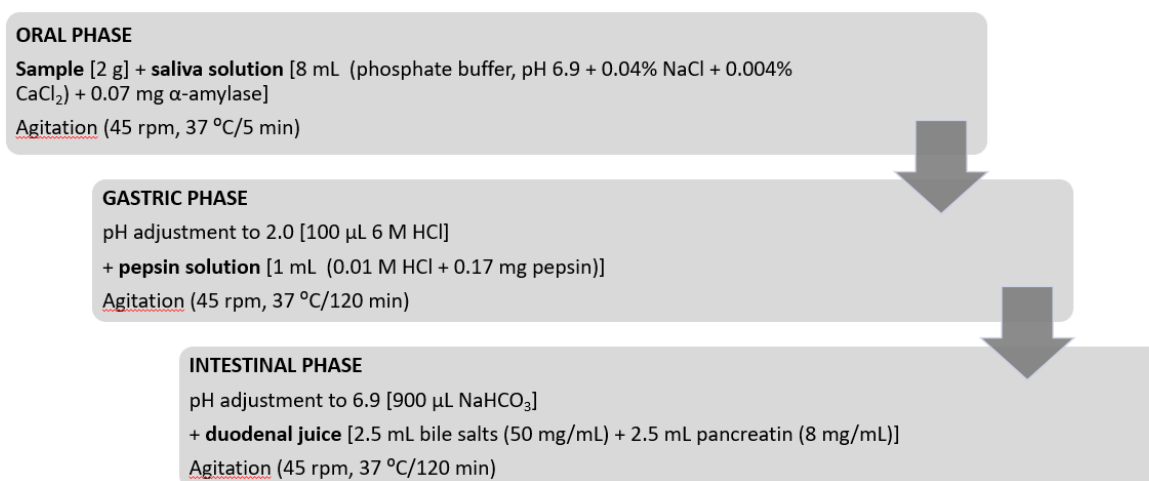
200

201 **2.5. *In vitro* bioaccessibility of amines in chocolates**

202

203 Gastrointestinal digestion was performed as described by Dala-Paula et al.
204 (2021). The protocol simulated three stages of the digestive process: oral, oral+gastric,
205 and oral+gastric+intestinal, as described in Fig.1. Briefly, in the oral phase, the
206 chocolate was grated to decrease particles' size simulating chewing. Chocolate (2.0 g)
207 was mixed in a centrifuge tube with 8 mL of saliva solution [(phosphate buffer solution
208 (0.04% NaCl and 0.004% CaCl₂, pH 6.9) prepared with 0.07 mg α -amylase (30 U/mg)].
209 The mixture was shaken (45 rpm) in an incubator at 37° C for 5 min. For the gastric
210 phase (oral+gastric digestion), the solution from the oral phase was adjusted to pH 2.0
211 (100 μ L 6 M HCl) and mixed with 0.17 mg pepsin (2188 U/mg) in 1.0 mL 0.01 N HCl.
212 The mixture was shaken (45 rpm) in an incubator at 37 °C for 2 h. For the intestinal
213 phase (oral+gastric+intestinal digestions), the solution from the gastric digestion was
214 adjusted to pH 6.5 with 900 μ L saturated NaHCO₃ solution and mixed with 5 mL
215 duodenal juice (2.5 mL bile salt solution (50 mg/mL) and 2.5 mL pancreatin solution (8

216 mg/mL). This mixture was shaken (45 rpm) in an incubator at 37 °C for 2 h. Prior to
 217 the removal of samples for the oral and the oral+gastric phases, the enzymatic reactions
 218 were interrupted by adjusting the pH to 2.0 and 6.5, respectively. The interruption of
 219 the enzymatic reaction at the end of the oral+gastric+intestinal phase was performed by
 220 immersion of the test tube in an ice bath. The resulting mixtures from each phase were
 221 centrifuged at 7,000 x g at 4 °C (MOD 280R, FANEN Excelsa 4, São Paulo, SP, Brazil)
 222 for 10 min. Then the supernatants were collected, filtered, and stored in Eppendorf type
 223 tubes at -80 °C until the analyses for bioactive amines. The digestion protocol was
 224 performed in duplicate for each phase and the samples were filtered through 0.45 µm
 225 membrane, prior to HPLC analysis.



226

227 **Fig. 1.** Schematic representation of *in vitro* gastrointestinal digestion phases: oral, gastric and
 228 intestinal of chocolates made with different proportions of under-fermented (48 h) and
 229 fermented (144 h) cocoa beans.

230 **Source:** Dala-Paula et al. (2021).

231

232 2.6. Statistical analysis

233

234 The results were submitted to analyses of variance and the means were compared
235 by the Tukey test at 5% significance (Minitab® 16.2.3). Two multivariate exploratory
236 techniques, Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis
237 (HCA), were applied for characterization of the *in vitro* digestion phases and the
238 respective original chocolates (Minitab® 16.2.3).

239

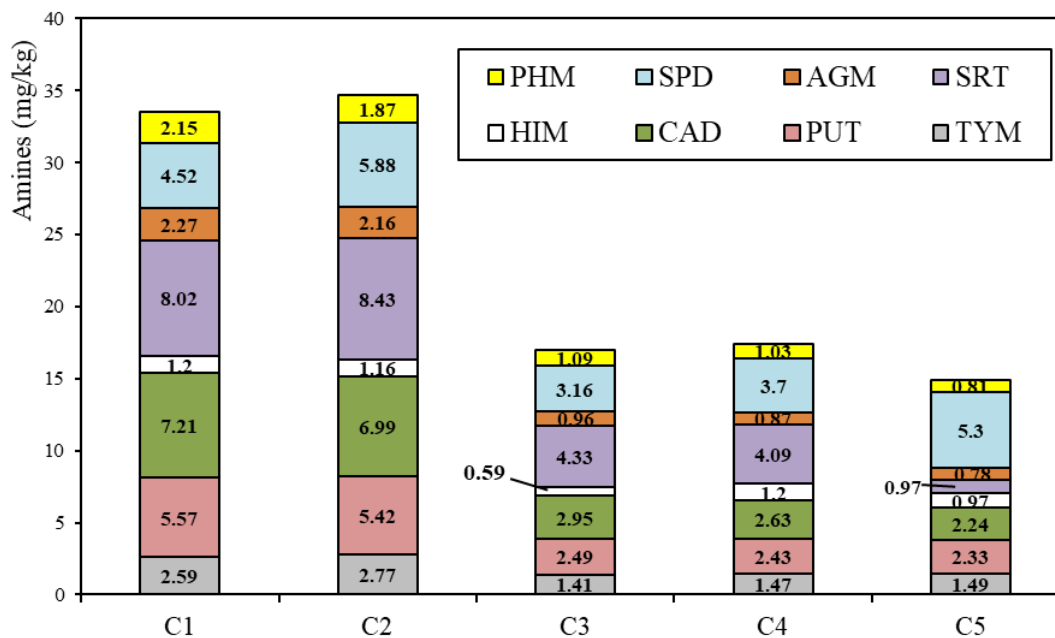
240 **3. Results and Discussion**

241

242 **3.1. Free bioactive amines in chocolate made with fully fermented cocoa**

243

244 Eight of the nine amines investigated were detected in the 66.3% cocoa chocolate
245 produced with fully fermented cocoa, except for tryptamine, as indicated in Fig. 2. All
246 these amines have been reported previously in 70% cocoa chocolates made with
247 different cocoa cultivars grown at the same farm in Bahia, Brazil (Deus et al., 2020).
248 But only five of them, cadaverine, phenylethylamine, putrescine, spermidine and
249 tyramine were detected in commercial Brazilian 70% cocoa chocolate (Dala-Paula et
250 al., 2021).



251

252 **Fig. 2.** Levels of free bioactive amines in chocolates made with different proportions of under-
 253 fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans. TYM-tyramine; PUT-putrescine; CAD-
 254 cadaverine; HIM-histamine; SRT-serotonin; AGM-agmatine; SPD-spermidine; PHM-
 255 phenylethylamine. Proportion of nibs fermented for 48 h and 144 h: C1-0% and 100%; C2-20%
 256 and 80%; C3-35% and 65%; C4-50% and 50%; C5-65% and 35%, respectively.

257

258 The total level of amines found in the chocolate made with fully fermented
 259 cocoa – control treatment (C1) – was 33.43 mg/kg, which is lower than values reported
 260 for Brazilian commercial 70% cocoa chocolate with 86.7 mg/kg (Dala-Paula et al.,
 261 2021) and for commercial 60 and 70% dark chocolates – 46.3 to 62.0 mg/kg (Restuccia
 262 et al., 2016). However, the total levels were similar or higher compared to Brazilian
 263 monoclinal chocolates from cocoa clones cultivated at the same farm – 9.10 to 32.47
 264 mg/kg (Deus et al., 2020); and higher than organic-fair trade 70% dark chocolates made
 265 with Dominican Republic and Ecuador cocoas – 0.4 to 14.7 mg/kg (Restuccia et al.,
 266 2016).

267

268 The chocolate was characterized by the predominance of serotonin (23.9%) and
 cadaverine (21.5%), followed by putrescine (16.6%), spermidine (13.5%), tyramine

269 (7.7%), agmatine (6.8%), phenylethylamine (6.4%) and histamine (3.6%). This profile
270 is different from that of Brazilian commercial 70% cocoa chocolate, in which the
271 polyamines (spermidine and spermine) were prevalent (22%), followed by 2-
272 phenylethylamine, cadaverine and putrescine (~15%) (Dala-Paula et al., 2021) and also
273 from chocolates made with different Brazilian cocoa clones (Deus et al., 2020).
274 Therefore, these results reinforce the influence of cocoa cultivar and processing on the
275 levels and profile of amines in the chocolate (Oracz & Nebesny, 2014; Restuccia et al.,
276 2016; Deus et al., 2020).

277

278 **3.2. Bioactive amines in chocolates made with different proportions of under-** 279 **fermented cocoa**

280

281 When comparing the profile and levels of amines in the chocolates made with
282 different proportions of under-fermented and fermented cocoa, the same types of amines
283 were found in all treatments (C1 – C5). However, the total levels of amine varied
284 significantly ($p \leq 0.05$) among them (14.9 to 34.7 mg/kg), with higher levels (>30 mg/kg)
285 for C1 and C2, which had 100% and 80% fully fermented cocoa (0 and 20% under-
286 fermented cocoa), respectively. Chocolate from the other treatments (C3 to C5) had
287 levels lower than 18 mg/kg. Based on these results, by using 0% to 20% under-
288 fermented cocoa, there would be no effect on total amines levels. In a similar way, the
289 use of 35 to 65% under-fermented cocoa in chocolate resulted in similar total levels of
290 amines. The impact of fermentation on amines in cocoa is expected as the conditions
291 prevalent during fermentation, e.g, proteolysis with liberation of amino acids and the

292 presence of microorganisms with amino acid decarboxylase activity, are conducive to
293 amines production (Do Carmo Brito, Chisté, Pena, Gloria, & Lopes, 2017; Delgado-
294 Ospina et al., 2021; Chagas Junior et al., 2021b; Deus et al., 2021).

295 Although there was no difference in total amines between the two groups (C1 &
296 C2 and C3 & C4 & C5), differences were observed in the prevalence of amines among
297 treatments. In C1, C2, C3 and C4 there was predominance of serotonin (~24%),
298 whereas in C5 the prevalent amine (35.6%) was spermidine. Cadaverine was the
299 second prevalent amine in C1 and C2 (~20%), spermidine in C3 and C4 (18.6 and
300 21.2%, respectively) and putrescine in C5 (15.6%). These results indicate that by using
301 different percentages of under-fermented cocoa, one can affect the levels and proportion
302 of bioactive amines in chocolate. Considering that the presence of serotonin and
303 spermidine are desirable in chocolate, all formulations such as except C5 can result in
304 chocolates rich in both amines.

305 Serotonin contents ranged from 0.97 to 8.43 mg/kg, with the highest values in
306 C2 and C1. Significant levels of this amine in cocoa and chocolate are relevant as it is
307 associated with the sensations of pleasure and well-being (Yilmaz & Gökmen, 2020).
308 The changes observed for serotonin are different from those reported by Deus et al.
309 (2021), who observed degradation of this amine during fermentation (144 h). However,
310 it is well known that the profile of amines during cocoa fermentation can be affected by
311 various factors, such as, cocoa variety, microbial flora, temperature, aeration (oxygen
312 concentration) and pH. Phenylethylamine, another neuroactive amine, promotes the
313 release of catecholamines, contributing to human health with cognitive, executive
314 functions, and attention-related processes (Yilmaz & Gökmen, 2020). The highest

315 phenylethylamine levels were found in C1 and C2; therefore, chocolates with a higher
316 proportion of fully fermented cocoa.

317 The highest putrescine and cadaverine contents were also found in the
318 chocolates produced with a higher proportion of fully fermented cocoa. And according
319 to Deus et al. (2021) initial cocoa putrescine levels (~1.62 mg/kg) remained constant up
320 to 144 h fermentation but did not detect cadaverine in any samples. Putrescine can be
321 formed from the decarboxylation of ornithine or deimination of agmatine, whereas
322 cadaverine is formed from the decarboxylation of lysine, which can be brought about by
323 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* (Ouattara et al., 2017; Barbieri et al., 2019),
324 *Candida parapsilosis*, *Hydropichia burtonii*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*,
325 *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon asahii* var. *asahii* and *Wickerharmomyces*
326 *anomalus* (Delgado-Ospina et al., 2021). These microorganisms were identified during
327 cocoa fermentation or processing. High levels of putrescine and cadaverine are not
328 desirable in food since these amines, at specific concentrations, can impart a putrid
329 flavor (Gloria, 2005; Dala-Paula, Starling, & Gloria, 2021).

330 On the other hand, the addition of under-fermented cocoa did not affect the
331 levels of spermidine in chocolate, considering that the highest values were observed in
332 C5 and C2. According to Do Carmo Brito et al. (2017) and Deus et al. (2021), the
333 changes on spermidine during fermentation did not follow a standard pattern. However,
334 the presence of this polyamine is relevant as it is involved in growth, renewal, cellular
335 metabolism (Gloria, 2005; Muñoz-Esparza et al., 2019). In addition, it has antioxidant
336 activity, which could contribute to the stability of the chocolate and also to human
337 health (Muñoz-Esparza et al., 2019). Its intake has been associated with the prevention

338 of cardiovascular disease, reduced mortality rate and anti-aging (Eisenberg et al., 2016;
339 Muñoz-Esparza et al., 2019; Liang et al., 2021).

340 Agmatine, which is seldom investigated in chocolate, was detected in every
341 sample, with the highest levels in C1 and C2. Therefore, higher percentage of fully
342 fermented beans contributed to its accumulation in the chocolates. Agmatine is
343 synthesized from the decarboxylation of the amino acid L-arginine and has several
344 physiological and pharmacological functions, such as: antidepressant effect, anti-
345 inflammatory, positive relationship with memory health, improvement of anxiety
346 symptoms, antioxidant action and neuroprotective properties (Aglawe, Kale,
347 Rahangdale, Kotagale, Umekar, & Taksande, 2021).

348 However, the accumulation of some amines can cause adverse effects to human
349 health. Histamine at high levels can cause headaches, low blood pressure, nausea, and
350 heart palpitations; whereas tyramine can increase blood pressure and can also be
351 associated with migraine episodes in susceptible individuals (EFSA, 2011; Delgado-
352 Ospina et al., 2021). The highest tyramine levels were found in C1 and C2, while those
353 of histamine in C4 and C1. Therefore, higher proportions of fully fermented cocoa
354 contributed to increased tyramine levels, whereas no specific pattern could be observed
355 for histamine. Anyhow, the levels of tyramine and histamine found in the chocolates
356 are below the no adverse effect level (NOAEL) established for healthy individuals
357 (EFSA, 2011). However, individuals under treatment with monoaminoxidase inhibitor
358 drugs can be at risk with the ingestion of tyramine. In addition, individuals susceptible
359 to diet-induced migraines must avoid food containing tyramine (Ruiz-Capillas &
360 Herrero, 2019). In a similar way, individuals with histamine sensitivity, must not be
361 exposed to histamine.

362 Based on these results, the addition of under-fermented cocoa (0 to 65%) during
363 chocolate production did not affect the types of amines detected. It provided two
364 distinct groups based on total amine levels – C1 and C2 with high levels (~30 mg/kg)
365 and C3, C4 and C5 with lower levels (~16 mg/kg). By increasing the proportion of
366 under-fermented cocoa (C3 – C4), there were significant decreases on the levels of
367 agmatine, tyramine, putrescine, cadaverine and phenylethylamine. The addition of 65%
368 under-fermented cocoa caused a decrease on serotonin and spermidine levels in the
369 chocolate. Based on these results, by adding under-fermented cocoa to fully fermented
370 cocoa during chocolate making, one can modulate the profile and levels of most amines.

371 These same samples were also analyzed regarding other parameters, and it is
372 interesting to observe that, the quantification of total phenolic compounds (Folin-
373 Ciocateau method) in these same samples indicated that C1 (0% under-fermented
374 cocoa) had 9.17 ± 0.23 mg epicatechin equivalent (Epi)/g. When increased proportions
375 of under-fermented cocoa were used, there were significant successive increases on total
376 phenolic compounds reaching 20.27 ± 0.34 mg Epi/g when 65% under-fermented cocoa
377 was used (unpublished data).

378

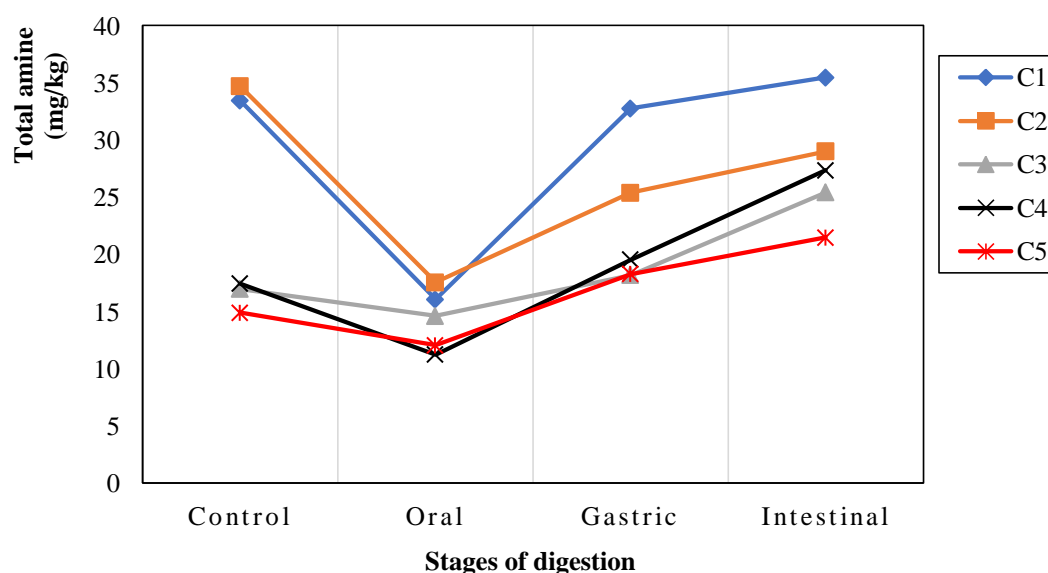
379 **3.3. *In vitro* bioaccessibility**

380

381 Bioaccessibility refers to the amount of a food component that is released from
382 the matrix in the gastrointestinal tract and is available for absorption, which can be
383 affected by the composition of the matrix (Oracz et al., 2019). In this context, it is
384 likely that by changing the composition of the chocolate by using different proportions

385 of under-fermented cocoa long with the fully fermented, bioaccessibility can be
 386 affected. Therefore, the five different chocolates were submitted to oral, gastric and
 387 intestinal *in vitro* digestion and the final solutions were analyzed for free bioactive
 388 amines.

389 According to Fig. 3, the total levels of amines varied throughout digestion, with
 390 the highest levels observed after the intestinal phase. The total levels increased after
 391 intestinal digestion for formulations C4, C3 and C5, equivalent to 1.57, 1.50 and 1.44
 392 times, respectively, when compared to the chocolates prior to digestion. On the other
 393 hand, the total amine content of C1 was similar to that before *in vitro* digestion (1.06
 394 times) and C2, showed approximately 16% reduction (0.84 times) in total amine
 395 content.



396

397 **Fig. 3.** Changes on the levels of total free bioactive amines during oral, gastric and intestinal
 398 stages of *in vitro* gastrointestinal digestion of chocolate made with different proportions of
 399 under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans.

400 Based on these results, the free amines present in chocolates C1 and C2
 401 (extracted with 5% TCA) were totally available after intestinal digestion, with minor

402 loss in C2. Whereas samples with higher proportion of under-fermented cocoa – C3,
403 C4 and C5, which had 35, 50 and 65% under-fermented cocoa, respectively, had, after
404 intestinal digestion 50% more free amines compared to 5% TCA extracts from original
405 chocolates. This result suggests that, by using 35 to 65% under-fermented cocoa, other
406 components with the ability to bind to amines could be present in the matrix and could
407 hinder its extraction from the chocolate as free amines.

408 According to the literature, amines in foods can be free or conjugated with other
409 compounds, including phenolic compounds (polyphenols, flavonoids, anthocyanins,
410 lignin) and proteins (Casal, Mendes, Alves, Alves, Oliveira, & Ferreira., 2004; Barišić
411 et al., 2020; Godočiková et al., 2020; Yilmaz & Gökmen, 2020). The levels of protein
412 in the different chocolates (C1 – C5) are the same (unpublished data), which is expected
413 since the same amount of cocoa and ingredients was used in all treatments. In addition,
414 changes in proteins resulting from hydrolysis during fermentation, would not be
415 detected by the methods used for analysis (Kjeldahl) as it quantifies total nitrogen).

416 The levels of total phenolic compounds were significantly different among
417 treatments, varying from 9.17 mg Epi/g in C1 up to 20.27 mg Epi/g in C5 (unpublished
418 data). In fact, the higher the proportion of under-fermented cocoa, the higher would be
419 the levels of phenolic compounds in the chocolate. This is so because throughout
420 fermentation, there is a significant decrease in phenolic compounds, including
421 flavonoids, anthocyanins, epicatechin, and catechin (Casal et al., 2004; Melo et al.,
422 2021). When considering the ratio of bioactive amines per total phenolic compounds
423 found in the samples – (amines/phenolics)x100, values of 3.7, 3.1, 1.2, 1.1 and 0.7 were
424 found for C1, C2, C3, C4 and C5, respectively. Based on these values and
425 bioaccessibility results, it is likely that when the ratio is similar or greater than 3.0, the

426 amines would be in the free form (and, thereby, available for extraction by TCA),
427 whereas, when the ratio is similar or lower than 1.2, some amines would be bound, and
428 they would not be completely extracted by TCA, but they would be available for
429 intestinal absorption.

430 When considering the influence of *in vitro* digestion on individual amines (Table
431 2), it can be observed that tyramine, putrescine, cadaverine, spermidine, and
432 phenylethylamine were found in all samples throughout the three stages of the
433 simulated digestion. Serotonin and agmatine were not detected after the oral (C-O) and
434 the gastric (C-G) digestion phases for C3, C4, and C5, which had lower total levels of
435 amines. On the other hand, histamine was only detected in the original chocolates
436 (before digestion) and after the intestinal phase. Similar behavior was reported by Dala-
437 Paula et al. (2021) regarding histamine, which was only detected at the end of the
438 intestinal digestion (C-I) of the chocolate. Because they did not detect histamine in the
439 chocolate before simulated digestion, the authors hypothesized that the occurrence of
440 this amine was related to the action of pancreatic enzymes to the sample.

Table 2

Contents of free bioactive amines in chocolate and solutions from the oral (O), gastric (G) and intestinal (I) *in vitro* digestion phases of chocolates made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans

Sample/ Phase	Free bioactive amines (mg/kg)							
	SPD	PUT	CAD	HIM	SRT	AGM	TYM	PHM
Chocolate								
C1	4.52±0.48 ^{ghi}	5.57±0.47 ^a	7.21±0.60 ^a	1.20±0.12 ^{abc}	8.02±0.65 ^{ab}	2.27±0.21 ^a	2.59±0.13 ^{fg}	2.15±0.14 ^{efg}
C2	5.88±0.02 ^{cdef}	5.42±0.39 ^a	6.99±0.28 ^a	1.16±0.10 ^{abc}	8.43±0.82 ^a	2.16±0.23 ^a	2.77±0.32 ^{efg}	1.87±0.10 ^{fg}
C3	3.16±0.05 ^j	2.49±0.03 ^{de}	2.95±0.09 ^{ghij}	0.59±0.01 ^e	4.33±0.18 ^e	0.96±0.03 ^b	1.41±0.05 ^g	1.09±0.02 ^{hi}
C4	3.70±0.07 ^{hij}	2.43±0.24 ^{de}	2.63±0.07 ^{ghij}	1.20±0.01 ^{abc}	4.09±0.08 ^e	0.87±0.01 ^b	1.47±0.08 ^g	1.03±0.01 ^{hi}
C5	5.30±0.10 ^{defg}	2.33±0.01 ^e	2.24±0.02 ^{ij}	0.97±0.02 ^{cd}	0.97±0.02 ^{fg}	0.78±0.01 ^{bc}	1.49±0.03 ^g	0.81±0.01 ⁱ
Oral								
C-O1	4.50±0.21 ^{ghi}	2.52±0.61 ^{cde}	3.85±0.29 ^{def}	nd	1.54±0.08 ^f	0.37±0.04 ^e	1.68±0.13 ^g	1.61±0.04 ^{gh}
C-O2	6.91±0.80 ^{bc}	2.33±0.17 ^e	2.08±0.01 ^j	nd	3.50±0.61 ^e	0.44±0.02 ^{de}	1.32±0.14 ^g	0.98±0.04 ^{hi}
C-O3	4.98±0.41 ^{defgh}	2.64±0.09 ^{cde}	3.68±0.01 ^{defg}	nd	nd	nd	1.38±0.09 ^g	1.94±0.11 ^{fg}
C-O4	3.44±0.65 ^{ij}	2.06±0.01 ^e	2.56±0.03 ^{hij}	nd	nd	nd	1.37±0.01 ^g	1.80±0.05 ^{fg}
C-O5	4.57±0.60 ^{fghi}	2.70±0.16 ^{cde}	2.57±0.03 ^{hij}	nd	nd	nd	1.19±0.05 ^g	1.03±0.01 ^{hi}
Gastric								
C-G1	8.68±0.39 ^a	3.18±0.02 ^{cde}	3.99±0.30 ^{cdef}	nd	6.01±0.53 ^{cd}	0.47±0.17 ^{cde}	5.69±0.39 ^{abcd}	3.38±0.20 ^{ab}
C-G2	6.81±0.17 ^{bc}	2.66±0.15 ^{cde}	3.22±0.12 ^{fghi}	nd	4.92±0.07 ^{de}	0.45±0.01 ^{de}	4.38±0.06 ^{cdef}	2.95±0.01 ^{bcd}
C-G3	4.05±0.01 ^{ghij}	3.20±0.11 ^{cde}	4.65±0.69 ^{bcd}	nd	nd	nd	3.85±0.06 ^{def}	2.45±0.01 ^{cdef}
C-G4	6.30±0.01 ^{cd}	2.47±0.51 ^{de}	3.14±0.23 ^{fghij}	nd	nd	nd	4.81±0.01 ^{bcde}	2.83±0.01 ^{bcd}
C-G5	4.57±0.00 ^{fghi}	3.64±0.26 ^{bcd}	5.05±0.01 ^{bc}	nd	nd	nd	3.06±0.69 ^{efg}	1.96±0.01 ^{fg}
Intestinal								
C-I1	4.95±0.22 ^{efgh}	4.65±0.48 ^{ab}	5.49±0.28 ^b	1.29±0.17 ^{ab}	6.82±1.02 ^{bc}	0.70±0.06 ^{bcd}	7.63±1.28 ^a	4.01±0.14 ^a
C-I2	6.72±0.02 ^{bc}	3.16±0.04 ^{cde}	3.56±0.02 ^{defgh}	1.21±0.01 ^{abc}	4.11±0.04 ^e	0.66±0.01 ^{bcd}	6.61±0.83 ^{ab}	2.97±0.05 ^{bcd}
C-I3	7.81±0.10 ^{ab}	3.76±0.11 ^{bc}	3.48±0.25 ^{efgh}	1.31±0.04 ^a	nd	nd	5.96±1.41 ^{abc}	3.08±0.07 ^{bc}
C-I4	6.75±0.18 ^{bc}	4.59±0.03 ^{ab}	4.59±0.41 ^{bcd}	0.87±0.03 ^d	nd	nd	7.32±0.05 ^a	3.23±0.30 ^b
C-I5	5.94±0.07 ^{cde}	3.68±0.68 ^{bcd}	4.42±0.03 ^{bcd}	1.05±0.13 ^{bcd}	nd	nd	4.06±0.38 ^{cdef}	2.32±0.62 ^{def}

SPD-spermidine; AGM-agmatine; PUT-putrescine; CAD-cadaverine; HIM-histamine; TYM-tyramine; PHM-phenylethylamine; SRT-serotonin. Proportion of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa, respectively: C1-0% and 100%; C2-20% and 80%; C3-35% and 65%; C4-50% and 50%; C5-65% and 35%. Mean values ± standard deviations with different letters in the same columns are significantly different (Tukey test, $p \leq 0.05$).

441 3.3.1. *Oral phase*

442 In general, after oral digestion (Table 2), bioaccessibility was similar for
443 tyramine, spermidine and phenylethylamines, for which, the levels were similar to those
444 initially present in all chocolate formulations. Histamine was not detected in any
445 sample, suggesting that this amine is present in chocolate in a conjugated form and that
446 oral conditions (saliva: α -amylase and pH 6.9) were not able to extract them from the
447 matrix. The behavior observed for the other amines varied depending on the chocolate
448 formulation, e.g., the proportion of under-fermented samples. For the diamines
449 putrescine and cadaverine, lower levels, compared to the original chocolate, were
450 detected for treatments C1 and C2 (higher proportions of fully fermented cocoa);
451 whereas similar levels were found for the chocolates with higher amounts of under-
452 fermented cocoa. The levels of serotonin and agmatine found after oral digestion were
453 lower compared to the original samples and they were not detected in the samples with
454 higher proportion of under-fermented cocoa.

455 Based on these results, oral digestion conditions, make available in chocolate
456 only some of the amines present in chocolate (5% TCA extraction), with lower levels of
457 putrescine, cadaverine, serotonin and agmatine. The last two amines were not even
458 detected in the samples with higher proportion of under-fermented cocoa.

459

460 3.3.2. *Gastric phase*

461 After gastric digestion, there was a significant increase on the levels of the
462 aromatic amines – tyramine and phenylethylamines for all samples, making more of
463 them available compared to initial levels (Table 2). Histamine was not detected in any

464 sample, suggesting that this amine is present in chocolate in a conjugated form and that
465 even digestive conditions (pepsin and pH 2.0) were not able to extract them from the
466 matrix. The availability of the other amines depended on the proportion of under-
467 fermented cocoa in the chocolate. Spermidine levels were higher compared to original
468 levels for chocolates with lower proportion of under-fermented cocoa. The diamines
469 putrescine and cadaverine, were detected at lower levels compared to the original
470 chocolate, but similar to oral results for treatments C1 and C2 (higher proportions of
471 fully fermented cocoa); whereas similar levels were found for the chocolates with
472 higher amounts of under-fermented cocoa. No change was observed for spermidine in
473 the samples with higher proportions of under-fermented cocoa. The levels of serotonin
474 found after gastric digestion were lower compared to the original samples C1 and C2
475 (lower under-fermented cocoa) but higher compared to oral results. The levels of
476 agmatine found after gastric digestion were lower compared to the original samples and
477 similar to oral results for samples with lower proportion of under-fermented cocoa. But
478 serotonin and agmatine were not detected after gastric digestion of chocolate samples
479 with higher proportion of under-fermented cocoa, corroborating with the results
480 described by Dala-Paula et al. (2021) in 70% chocolate. The release of the amines in
481 this digestion phase is probably due to pepsin activity on chocolate protein, as well as to
482 the pH change, which could enhance breakdown of conjugated forms of amines (Casal
483 et al., 2004).

484 Based on these results, gastric digestion (pepsin and pH 2.0) was able to release
485 tyramine and phenylethylamine from chocolate samples, irrespective of the amount of
486 under-fermented cocoa used during processing. Furthermore, it released serotonin and

487 spermidine, in special for samples with lower proportion of under-fermented cocoa.
488 However, it did not affect the release of the other amines in a significant way.

489

490 **3.3.3. *Intestinal phase***

491 During intestinal digestion, total amine levels increased for all chocolate
492 formulations compared to the previous phases (oral and gastric) (Table 2). The levels of
493 phenylethylamine were higher compared to initial chocolate levels, but similar to levels
494 after gastric digestion, suggesting that intestinal digestion did not affect
495 phenylethylamine levels. Putrescine and cadaverine levels were higher compared to
496 those from gastric digestion. However, when comparing results with initial levels in the
497 chocolates, higher levels were observed for samples containing higher proportions of
498 under-fermented cocoa; whereas in samples with a lower proportion of under-
499 fermented, similar levels were found for putrescine, but lower for cadaverine.
500 Spermidine levels, after intestinal digestion were similar to initial chocolate levels for
501 C1 and C2 (lower under-fermented) but higher for C3, C4 and C5 (higher under-
502 fermented). In this way, when a higher proportion of under-fermented cocoa was used,
503 spermidine which was present in conjugated form became available after intestinal
504 digestion. Serotonin and agmatine were only detected in the samples with a lower
505 proportion of under-fermented cocoa (C1 and C2). The levels of these amines were not
506 affected by the intestinal phase. Tyramine levels were higher after intestinal digestion
507 (4.06 to 7.63 mg/kg) compared to initial chocolate levels (1.41 to 2.77 mg/kg), and also
508 compared to samples after gastric digestion (3.06 to 5.69 mg/kg). This result suggests
509 tyramine is released from conjugates under both gastric and intestinal digestions.

510 Histamine, which was not detected after the other digestions (oral and gastric), was
511 detected (0.87 to 1.31 mg/kg) at levels similar to those found in the original chocolate
512 (0.59 to 1.20 mg/kg). Based on this result, histamine was only released from conjugates
513 after intestinal digestion (pancreatin and bile salts, pH 6.9). It is known that histamine
514 and tyramine, at high levels can cause adverse effects on human health (EFSA, 2011).
515 However, despite the increase in total levels during the digestion process, in the
516 intestinal phase, these values do not compromise the health of the consumer, since they
517 do not reach the maximum limits observed (NOAEL) for healthy individuals.

518 Studies regarding the bioaccessibility of amines are scarce and considering the
519 specificities of a complex matrix like chocolate, even harder to find; however, the
520 release of free bioactive amines from dark chocolate after gastric and intestinal
521 digestions, corroborates with findings by Dala-Paula et al. (2021). The increase in total
522 amines after these phases can be explained by the breakdown of conjugated forms of the
523 amines by the conditions available (e.g., pepsin solution, pH 2.0; and bile salts and
524 pancreatin, respectively for gastric and intestinal). In this way, the release of tyramine,
525 serotonin, spermidine (lower % under-fermented) agmatine and phenylethylamine from
526 conjugated forms were most significant during gastric digestion, whereas putrescine,
527 cadaverine, histamine and spermidine (higher % under-fermented) were most significant
528 during intestinal digestion. Therefore, the specificity of the digestive enzymes
529 associated with each phase may affect amine availability. During digestion, there is
530 breakdown of proteins which is initiated in the stomach by pepsin and HCl, and still
531 occurs in the intestinal phase due to the action of pancreatic proteases (Kulp, Fortson,
532 Knize, & Felton, 2003), both being important for the bioaccessibility of the amines. It
533 is likely that the conditions prevalent during digestion, also allow liberation of amines

534 conjugated with proteins and also with phenolic compounds. Furthermore, the
535 increased pH (6.9) in this phase and the high Na⁺ content in the simulated duodenal
536 juice, can affect electrostatic interaction between amines and their conjugates,
537 contributing to their release (Dala-Paula et al., 2021).

538

539 **3.3.4. Multivariate analyses**

540 Multivariate analysis of auto-scaled data of individual and total bioactive amines
541 during digestion of chocolates indicated that a two principal component (PC) model
542 explained 95.5% of the variance, total amines as the main variable (0.91) of PC1
543 (86.9%) and serotonin content as the main variable (0.70) of PC2 (8.6%) as shown in
544 Figure 4a. The formation of three groups in multivariate statistics, with 74.92% of
545 similarity, allowed samples separation through total amine contents. Three main groups
546 were differentiated based on total amines levels: the first with the highest contents,
547 formed by the chocolates with the highest proportion of fully fermented cocoa and some
548 C1 digestion stages (C-I1, C2, C1, and C-G1); followed by the second with intermediate
549 levels (C-I2, C-I4, C-I3 and C-G2), and the third one with the lowest levels (C-I5, C-
550 G4, C-G5, C-G3, C-O4, C-O5, C-O3, C5, C-O1, C3, C4, and C-O2).

551 According to PC1 loadings, total amines, serotonin and tyramine were the
552 amines most affected by *in vitro* digestion, especially in the intestinal phase. PC2
553 explained 8.6% of the variance, mainly by serotonin and negatively by tyramine,
554 spermidine and phenylethylamine (Fig. 4b and 4c). The dendrogram-HCA (Fig. 4d)
555 based on the variances and Euclidean distances between vectors confirmed PCA results,

556 reinforced the data in Table 2, demonstrating that there was no clear separation of
557 chocolates and the phases.

558

559

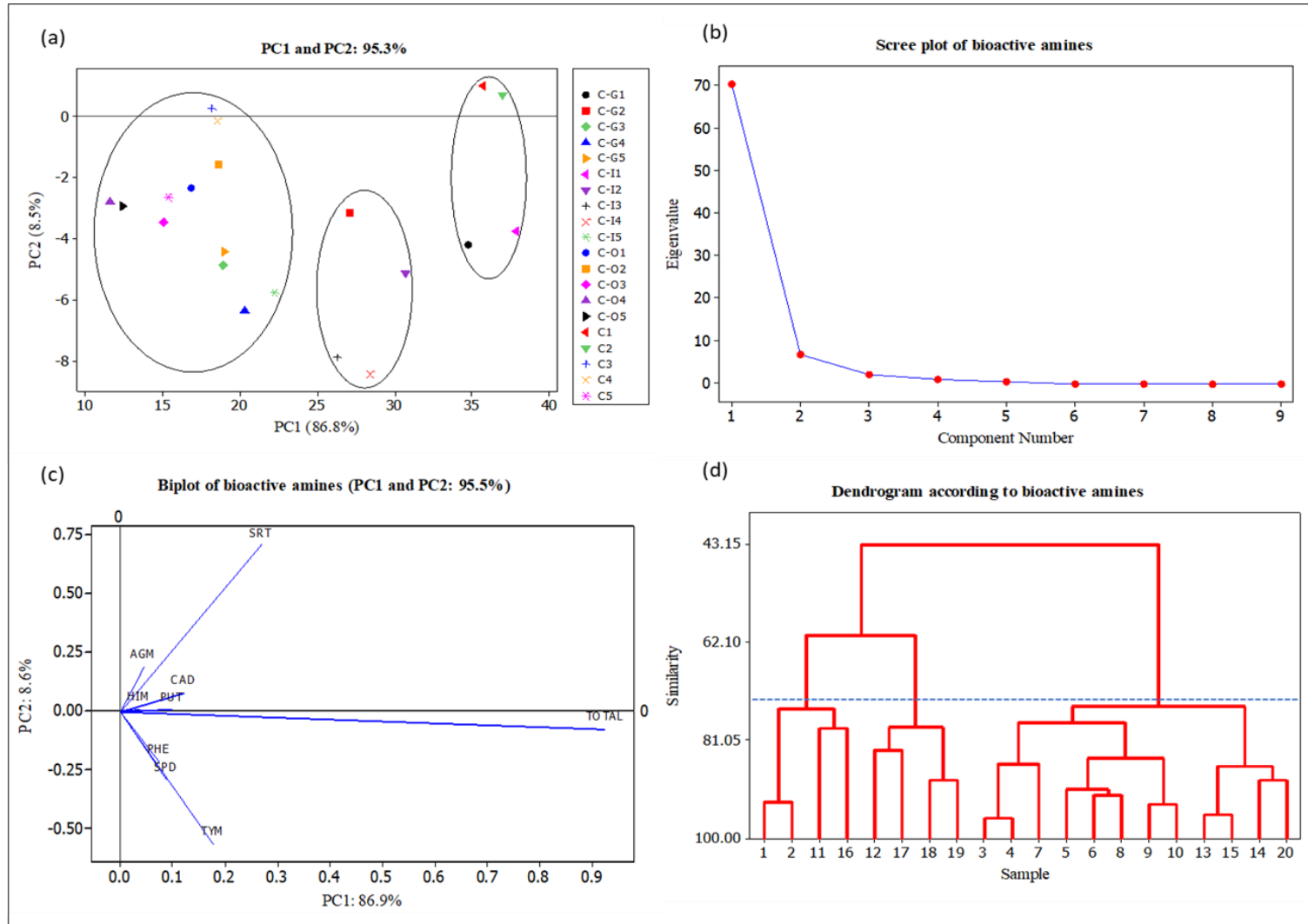


Fig. 4. Principal component analyses (PCA) and hierarchical cluster analyses (HCA) of free bioactive amines in chocolates (C) made with different proportions of under-fermented (48 h) and fermented (144 h) cocoa beans and respective digests after Oral (C-O), Oral+Gastric (C-G) and Oral+Gastric+Intestinal (C-I) *in vitro* digestions (a) PC1 and PC2 plots; (b) Biplot of bioactive amines (PC1 and PC2: 95.3 %); (c) Scree plot of bioactive amines; and (d) Dendrogram. Legend: AGM-agmatine, CAD-cadaverine, HIM-histamine, PHM-2-phenylethylamine, PUT-putrescine, SPD-spermidine, SRT-serotonin, TYM-tyramine, TOTAL-total amines.

Dendrogram observations: 1, 2, 3, 4 and 5 (C1, C2, C3 C4 and C5 chocolates); 6, 7, 8, 9 and 10 (oral phase digests: C-O1, C-O2, C-O3, C-O4 and C-O5); 11, 12, 13, 14 and 15 (gastric phase digests: C-G1, C-G2, C-G3, C-G4 and C-G5); 16, 17, 18, 19 and 20 (after intestinal phase digests: C-I1, C-I2, C-I3, C-I4 and C-I5).

560 4. Conclusion

561

562 Fermentation of cocoa results in loss of phenolics compounds and antioxidant
563 activity and in the change in the profile of bioactive amines. In addition, fermentation is
564 a lengthy process which can be a burden to cocoa processing. In this study, different
565 proportions (0, 20, 35, 50 and 65%) of under-fermented (48 h) were used along with
566 fully fermented (144) cocoa in the production of dark chocolate. Total levels of amines
567 were higher in samples with lower proportion of under-fermented cocoa – 0 and 20%
568 (~34 mg/kg) compared to those with 30 to 65% under-fermented cocoa (~17 mg/kg).
569 The same amines were detected in the chocolates, and serotonin was the prevalent
570 amine in all of them, except for the one with 65% under-fermented cocoa, in which
571 spermidine was the predominant amine. The chocolates made with lower amounts of
572 under-fermented cocoa (0 and 20%) had significant higher levels of agmatine,
573 phenylethylamines, and tyramine compared to the ones with higher amounts of under-
574 fermented cocoa. As expected, the levels of total phenolic compounds in the chocolate
575 increased significantly as the proportion of under-fermented cocoa increased.

576 During *in vitro* digestion of the different chocolates, the changes on total amines
577 could also be grouped into samples with higher (35 to 65%) and lower (0 and 20%)
578 proportions of under-fermented cocoa. In the first group, total levels were significantly
579 higher after intestinal digestion compared to the original chocolate and after oral and
580 gastric digestions. In the latter, after oral digestion, low levels of total amines were
581 found, but levels increased significantly after gastric and then after intestinal digestion.

582 After oral digestion all amines were detected at levels similar or lower than
583 levels in the original chocolate, except that serotonin and agmatine were not detected in
584 the samples with higher proportion of under fermented cocoa (30-65%) and histamine
585 was not detected in any sample. Gastric digestion was important in the release of
586 additional levels of the aromatic amines tyramine and phenylethylamine. It also allowed
587 the release of serotonin and agmatine from samples with lower proportions of under-
588 fermented cocoa; and it allowed the release of spermidine from samples with lower
589 proportions of under-fermented cocoa. Intestinal digestion was the only phase capable
590 of releasing histamine from all chocolates. It also allowed the additional release of
591 putrescine and cadaverine; and spermidine for chocolates with higher percentage of
592 under-fermented cocoa.

593 These results indicate, for the first time, that during *in vitro* digestion higher
594 amounts of some aromatic amines (tyramine and phenylethylamine) are available for
595 intestinal absorption compared with levels of free amines in the chocolate; the same
596 observed for spermidine for chocolates with higher proportion of under-fermented
597 cocoa. On the other hand, lower levels of serotonin and agmatine would be available
598 for intestinal absorption for chocolates with lower percentage of under-fermented cocoa;
599 and none for those with higher proportion of under-fermented cocoa.

600 These results are relevant in that some amines in chocolate, even though
601 detected by analytical methods as free, would not be available for intestinal absorption
602 (serotonin and agmatine for higher proportion of under-fermented cocoa; cadaverine for
603 low percent under-fermented cocoa); whereas others will be available for absorption at
604 higher amounts than analytical methods (phenylethylamine; tyramine; cadaverine and
605 spermidine for chocolate with higher levels of under-fermented cocoa). Gastric

606 digestion was relevant in the release of tyramine and phenylethylamine; and also
607 serotonin and agmatine from chocolates with lower proportion of under-fermented
608 cocoa. And intestinal digestion was relevant for the release of putrescine; cadaverine;
609 histamine; and spermidine from chocolates with higher proportion of under-fermented
610 cocoa.

611 Overall, the addition of under-fermented cocoa during chocolate production,
612 could benefit the cocoa processing industry, optimizing processing time. By adding
613 under-fermented cocoa to chocolate production one can modulate the profile and levels
614 of amines in the final product. Similar results were observed for chocolates with 0%
615 (control) and 20% under-fermented cocoa. However, when adding 30 to 65% of under-
616 fermented cocoa, the availability of some amines for intestinal absorption could be
617 limited.

618

619 **Authorship Contribution Statement**

620 **Geisiane dos Santos Silva:** Conceptualization, Methodology, Research, data curation,
621 formal analysis, writing - original draft. **Bruno Martins Dala-Paula:**
622 Conceptualization, Methodology, Research, data curation, Formal analysis, Writing -
623 proofreading and editing. **Maria Beatriz A. Gloria:** Conceptualization, Methodology,
624 Writing - revision and editing, Funding acquisition, Supervision. **Eliete Silva Bispo:**
625 Conceptualization, Funding acquisition Project management.

626

627 **Declaration of Competing Interest**

628 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
629 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

630

631 **Acknowledgements**

632 The authors thank the Brazilian agencies, for financial support: Coordenação de
633 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting a Master's Degree
634 fellowship; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
635 (CNPq).

636 The authors also thank Fazenda Riachuelo and Leolinda for providing the raw material;
637 and UFBA (Salvador, BA, Brazil), LBqA, FAFAR, UFMG (Belo Horizonte, MG,
638 Brazil) and UNIFAL-MG (Alfenas, MG, Brazil) for the technical support.

639

640 **References**

641

642 Aglawe, M. M., Kale, M. B., Rahangdale, S. R., Kotagale, N. R., Umekar, M. J., & Taksande,
643 B. G. (2021). Agmatine improves the behavioral and cognitive impairments associated with
644 chronic gestational ethanol exposure in rats. *Brain Research Bulletin*, 167, 37-47.
645 <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.11.015>.

646 Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by
647 lactic acid bacteria: A review. *Foods*, 8, 1, 17. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>

648 Barišić, V., Stokanović, M.C., Flanjak, I., Doko, K., Jozinović, A., Babić, J., Šubarić, D.,
649 Miličević, B., Cindrić, I., & Ačkar, Đ. (2020). Cocoa Shell as a Step Forward to Functional

- 650 Chocolates—Bioactive Components in Chocolates with Different Composition. *Molecules*,
651 25, 5470. <https://doi.org/10.3390/molecules25225470>
- 652 Casal, S., Mendes, E., Alves, M. R., Alves, R. C., Oliveira, B. M. P. P., & Ferreira, M. A.
653 (2004). Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans. *Journal of*
654 *Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6188-6192. <https://doi.org/10.1021/jf049509u>
- 655 Chagas Junior, G. C., Ferreira, N. R., Lopes, A. S. (2021a). The microbiota diversity identified
656 during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: an overview.
657 *International Journal of Food Science and Technology*, 56, 544-552.
658 <https://doi.org/10.1111/ijfs.14740>.
- 659 Chagas Junior, G. C., Ferreira, N. R., Gloria, M. B. A., Martins, L. H. da S., Lopes, A. S.
660 (2021b). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by
661 *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*, 338, 127834.
662 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127834>.
- 663 Dala-Paula, B. M., Starling, M. F. V., & Gloria, M. B. A. (2021). Vegetables consumed in
664 Brazilian cuisine as sources of bioactive amines. *Food Bioscience*, 40, 100856.
665 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100856>
- 666 Dala-Paula, B. M., Deus, V. L., Tavano, O. L., & Gloria, M. B. A. (2021). In vitro
667 bioaccessibility of amino acids and bioactive amines in 70% cocoa dark chocolate: What you
668 eat and what you get. *Food Chemistry*, 343, 128397.
669 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128397>
- 670 Darand, M., Oghaz, M. H., Hadi, A., Atefi, M., Amani, R. (2021). The effect of cocoa/dark
671 chocolate consumption on lipid profile, and blood pressure in diabetic patients: A meta-
672 analysis of observational studies. *Phytotherapy Research*, 35, 5487-5501. [https://doi-](https://doi.org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ptr.7183)
673 [org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ptr.7183](https://doi.org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ptr.7183).

- 674 De Andrade, A. B., da Cruz, M. L., de Souza Oliveira, F. A., Soares, S. E., Druzian, J. I., de
675 Santana, L. R. R., de Souza, C. O., & da Silva Bispo, E. (2021). Influence of under-
676 fermented cocoa mass in chocolate production: Sensory acceptance and volatile profile
677 characterization during the processing. *LWT – Food Science and Technology*, *149*, 112048.
678 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112048>
- 679 Delgado-Ospina, J., Di Mattia, C. D., Paparella, A., Mastrocola, D., Martuscelli, M., & Chaves-
680 Lopez, C. (2020). Effect of fermentation, drying and roasting on biogenic amines and other
681 biocompounds in Colombian Criollo cocoa beans and shells. *Foods*, *9*(4), 520.
682 <https://doi.org/10.3390/foods9040520>
- 683 Delgado-Ospina, J., Acquaticci, L., Molina-Hernandez, J. B., Rantsiou, K., Martuscelli, M.,
684 Kamgang-Nzekoue, A. F., Vittori, S., Paparella, A., & Chaves-López, C. (2021). Exploring
685 the capability of yeasts isolated from Colombian fermented cocoa beans to form and degrade
686 biogenic amines in a lab-scale model system for cocoa fermentation. *Microorganisms*, *9*(28),
687 <https://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9010028>.
- 688 Deus, V. L., Bispo, E. S., Franca, A. S., & Gloria, M. B. A. (2020). Influence of cocoa clones
689 on the quality and functional properties of chocolate–Nitrogenous compounds. *LWT – Food
690 Science and Technology*, *134*, 110202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110202>
- 691 Deus, V. L., Bispo, E. S., Franca, A. S., & Gloria, M. B. A. (2021). Understanding amino acids
692 and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. *Journal of Food
693 Composition and Analysis*, *97*, 103776. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103776>
- 694 Do Carmo Brito, B. D. N., Chisté, R. C., da Silva Pena, R., Gloria, M. B. A., & Lopes, A. S.
695 (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by
696 fermentation. *Food Chemistry*, *228*, 484-490.
697 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>

- 698 Ebaditabar, M., Djafarian, K., Saedifard, N., Shab-Bidar, Sakineh. (2020). Effect of dark
699 chocolate on flow-mediated dilatation: Systematic review, meta-analysis, and dose-response
700 analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutritionl ESPEN*, 36, 17-27.
701 <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.10.017>.
- 702 EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control
703 of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393.
- 704 Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., ..., Madeo,
705 F. (2016). Cardioprotective and lifespan extension by the natural polyamine spermidine.
706 *Nature Medicine*, 22, 1428–1444. <https://doi.org/10.1038/nm.4222>.
- 707 Gloria, M. B. A. (2005). Bioactive amines. In: Hui, H, Nollet, L. L. *Handbook of Food Science,*
708 *Technology and Engineering*. Marcel Dekker, 4:1-35.
- 709 Godočiková, L., Ivanišová, E., Zagała, G., Noguera-Artiaga, L., Carbonell-Barrachina, Á. A.,
710 Kowalczewski, P. Ł., & Kačániová, M. (2020). Antioxidant activities and volatile flavor
711 components of selected single-origin and blend chocolates. *Molecules*, 25(16), 3648.
712 <https://doi.org/10.3390/molecules25163648>
- 713 Gültekin-Özgülven, M., Berktas, I., & Özçelik, B. (2016). Change in stability of procyanidins,
714 antioxidant capacity and in vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from
715 cocoa beans. *LWT – Food Science and Technology*, 72, 559–565.
716 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>
- 717 Kulp, K. S., Fortson, S. L., Knize, M. G., & Felton, J. S. (2003). An in vitro model system to
718 predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food and*
719 *Chemical Toxicology*, 41(12), 1701-1710. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00197-2)
- 720 Liang, Y. T., Piao, C., Beuschel, C. B., Toppe, D., Kollipara, L., ... Sigrist, S. J. (2021). eIF5A
721 hypusination, boosted by dietary spermidine, protects from premature brain aging and

- 722 mitochondrial dysfunction. *Cell Reports*, 35, 108941,
723 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108941>.
- 724 Melo, T. S., Pires, T. C., Engelmann, J. V. P., Monteiro, A. L. O., Maciel, L. F., & da Silva
725 Bispo, E. (2021). Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during
726 the fermentation process. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1947-1957.
727 <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04706-w>.
- 728 Muñoz, M. S., Cortina, J. R., Vaillant, F. E., & Parra, S. E. (2019). An overview of the physical
729 and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation.
730 *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1593-1613.
731 <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>.
- 732 Muñoz-Esparza, N. C., Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Basté, O., Toro-Funes, N., Veciana-
733 Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2019). Polyamines in food. *Frontiers in Nutrition*, 6,
734 108. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00108>
- 735 Oracz, J., & Nebesny, E. (2014). Influence of roasting conditions on the biogenic amine content
736 in cocoa beans of different *Theobroma cacao* cultivars. *Food Research International*, 55(1–
737 10), 2014.
- 738 Oracz, J., Nebesny, E., Żyżelewicz, D., Budryn, G., & Luzak, B. (2019). Bioavailability and
739 metabolism of selected cocoa bioactive compounds: A comprehensive review. *Critical*
740 *Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(12), 1847–1985.
- 741 Ouattara, H. D., Ouattara, H. G., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W., & Niamke, S. L.
742 (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: species
743 diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 11–
744 19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>

- 745 Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Puoci, F., & Picci, N. (2015). Determination of biogenic amine
746 profiles in conventional and organic cocoa-based products. *Food Additives & Contaminants:*
747 *Part A*, 32(7), 1156-1163. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1036322>
- 748 Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Luca, M. D., Parisi, O. I., & Picci, N. (2016). Biogenic amines as
749 quality marker in organic and fair-trade cocoa-based products. *Sustainability*, 8(9), 856.
750 <https://doi.org/10.3390/su8090856>
- 751 Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and
752 safety. *Foods*, 8(2), 62. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>
- 753 Sarriá, B., Gomez-Juaristi, M., López, S. M.; Cordero, J. G., Bravo, L., Briz, M. R. M. (2020).
754 Cocoa colonic phenolic metabolites are related to HDL-cholesterol raising effects and
755 methylxanthine metabolites and insoluble dietary fibre to anti-inflammatory and
756 hypoglycemic effects in humans. *PeerJ*, 17, 2020. <https://doi.org/10.7717/peerj.9953>.
- 757 Spizzirri, U. G., Ieri, F., Campo, M., Paolino, D., Restuccia, D., & Romani, A. (2019). Biogenic
758 amines, phenolic, and aroma-related compounds of unroasted and roasted cocoa beans with
759 different origin. *Foods*, 8(8), 306. <https://doi.org/10.3390/foods8080306>
- 760 Yılmaz, C., & Gökmen, V. (2020). Neuroactive compounds in foods: Occurrence, mechanism
761 and potential health effects. *Food Research International*, 128, 108744.
762 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108744>
- 763
- 764