



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

MARGARIDA LINS DA CRUZ

**Estudo da influência da mistura de cacau com diferentes níveis de fermentação nos teores de compostos bioativos e na atividade antioxidante dos chocolates produzidos**

Salvador

2020

MARGARIDA LINS DA CRUZ

**Estudo da influência da mistura de cacau com diferentes níveis de fermentação nos teores de compostos bioativos e na atividade antioxidante dos chocolates produzidos**

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

Orientadora: Dra. Eliete da Silva Bispo.

Salvador

2020

Cruz, Margarida Lins da.

Estudo da influência da mistura de cacau com diferentes níveis de fermentação nos teores de compostos bioativos e na atividade antioxidante dos chocolates produzidos / Margarida Lins da Cruz. - 2020.

91 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Eliete da Silva Bispo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2020.

1. Alimentos - Análise. 2. Cacau. 3. Compostos bioativos. I. Bispo, Eliete da Silva. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 641.3  
CDU - 641.1



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



## TERMO DE APROVAÇÃO

MARGARIDA LINS DA CRUZ

### ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MISTURA DE CACAU COM DIFERENTES NÍVEIS DE FERMENTAÇÃO NOS TEORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS CHOCOLATES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 14 de agosto de 2020.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr<sup>a</sup>. Eliete da Silva Bispo  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora

---

Dr. Leonardo Fonseca Maciel  
Universidade Federal da Bahia

---

Dr. Sérgio Eduardo Soares  
Universidade Federal da Bahia

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus e ao Mestre Jesus pela vida e por todas as bênçãos. À minha família, principalmente aos meus pais Ana Angélica e Gilson, meus irmãos, Gilsana e Marcelino, e minha cunhada, Janes, por todo amor, apoio e força que têm me dado nessa trajetória. Tudo que eu sou e tudo que consegui realizar, eu devo a vocês.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliete da Silva Bispo, obrigada pela confiança, paciência, pelo incentivo, apoio, por compartilhar seu conhecimento e pela amizade. Sou muito grata por todos os seus ensinamentos que foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

A Dr. Leonardo Fonseca Maciel, pela paciência, colaboração e pela amizade.

Aos professores Dr. Sérgio Eduardo Soares e Dra. Carolina Oliveira de Souza que compuseram a minha Banca de Qualificação, pela leitura atenta do trabalho e pelas valiosas contribuições.

À Fazenda Riachuelo, em nome do Sr. Raimundo Mororó, pelo acolhimento e aprendizado, e pelo fornecimento de amostras para a condução deste estudo. E ao Sr. João Tavares, sou grata pelo fornecimento de matéria-prima para realizar esse estudo.

À Aurora, pela companhia, amizade e parceria neste projeto. E às alunas de TCC e iniciação científica, Rafaela e Izabel, muito obrigada pelo auxílio e pela amizade.

A Dr. Denilson Assis, grata pelo auxílio no planejamento estatístico deste trabalho.

A toda turma de 2018.1, obrigada pela convivência e amizade, em especial aos amigos Madian, Josevania, Camilla, Iuri, Rafael, Karina e Janaína.

A Ivo, Thâmilla, Luiz Jonatan, Pedro, Thamires Melo e Lucimara pelas ajudas concedidas.

Aos laboratórios LAPAAC, LAPESCA, Tecnologia de Alimentos, Farmacotécnica, Instrumentais Multiuso I e II, Físico-Química Multiuso e os seus colaboradores pelo suporte e pela ajuda com as análises realizadas durante o projeto.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho.

E finalmente à Universidade Federal da Bahia (UFBA), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAli) e a todos os professores, pela oportunidade e pelos ensinamentos nesses dois anos, que deram suporte ao desenvolvimento das atividades acadêmicas importantes para a minha formação. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo suporte financeiro no projeto de pesquisa.

## RESUMO

O cacau, principal matéria-prima do chocolate, possui diversos compostos fenólicos e metilxantinas que podem contribuir para a prevenção de doenças crônicas. O objetivo desse estudo foi verificar a influência da adição de amêndoas de cacau subfermentadas em relação ao teor de compostos bioativos e às propriedades antioxidantes nos chocolates produzidos. Empregou-se o planejamento simplex, com diferentes proporções de amêndoas fermentadas até 48 e 144h, para produzir os chocolates com 66,3% de teor de cacau. Os dois tipos de amêndoas, os nibs e os chocolates foram avaliados quanto a sua composição físico-química, através de análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídios, teste de corte, índice de fermentação, compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, identificação e quantificação de compostos fenólicos, metilxantinas e da atividade antioxidante. As determinações foram em triplicata e os testes foram o Teste T e o Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo os resultados submetidos à Análise de Variância (ANOVA). Os resultados demonstraram que a composição físico-química foi distinta entre as amêndoas e os chocolates. Observou-se uma variação de compostos bioativos, sendo encontrado maiores concentrações nas amostras com maiores proporções de amêndoas subfermentadas. Os ensaios C1 e C3 se destacaram entre os chocolates por possuírem maiores concentrações de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, teobromina, catequina, epicatequina e cafeína. A quantificação dos compostos bioativos identificou a teobromina como o principal componente e os métodos das atividades antioxidantes se correlacionaram perfeitamente com os resultados dos compostos bioativos monoméricos. Por isso, esse estudo comprovou que o uso das amêndoas subfermentadas na produção de chocolates favoreceu no aumento de compostos bioativos, possibilitando na elevação da potencialidade funcional dos chocolates produzidos.

**Palavras-chave:** Amêndoas fermentadas, amêndoas subfermentadas, fenólicos, flavonoides.

## ABSTRACT

Cocoa, the main raw material for chocolate, has several phenolic compounds and methylxanthines that can contribute to the prevention of chronic diseases. The objective of this study was to verify the influence of the addition of subfermented cocoa beans in relation to the content of bioactive compounds and antioxidant properties in the chocolates produced. Simplex planning was used, with different proportions of fermented beans until 48 and 144h, to produce chocolates with 66.3% cocoa content. The two types of cocoa beans, nibs and chocolates were evaluated for their physical-chemical composition, through analysis of moisture, ash, proteins and lipids, cutting test, fermentation index, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, identification and quantification of phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity. The determinations were made in triplicate and the tests were the T Test and the Tukey Test ( $P < 0.05$ ), the results being submitted to Analysis of Variance (ANOVA). The results showed that the physical-chemical composition was different between cocoa beans and chocolates. A variation of bioactive compounds was observed, with higher concentrations found in samples with higher proportions of subfermented beans. Tests C1 and C3 stood out among chocolates because they have higher concentrations of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, theobromine, catechin, epicatechin and caffeine. The quantification of bioactive compounds identified theobromine as the main component and the methods of antioxidant activities correlated perfectly with the results of monomeric bioactive compounds. For this reason, this study proved that the use of subfermented beans in the production of chocolates favored the increase in bioactive compounds, enabling the increase in the functional potential of the chocolates produced.

**Keywords:** Fermented cocoa beans, subfermented cocoa beans, phenolic, flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Classificação de polifenóis.....	6
Figura 2. Sequência de etapas no pré-processamento do cacau. ....	11
Figura 3. Cocho de fermentação com massa de cacau antes de cobrir com folhas de bananeira .....	12
Figura 4. Sequência de processamentos do cacau (cacau em pó, manteiga de cacau e chocolate).....	16

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição em compostos fenólicos do cacau.....	8
Tabela 2. Tolerância de defeitos, expressa em % e respectivo enquadramento do produto.....	17
Tabela 3. Matriz do planejamento simplex com valores reais das variáveis .....	21
Tabela 4: Análises físico-químicas nas amêndoas e nos chocolates.....	23

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Matriz do planejamento simplex com valores reais das variáveis .....	47
Tabela 2. Teste de corte e índice de fermentação realizados nas amêndoas fermentadas até 48 e 144 horas.....	52
Tabela 3. Teores de compostos bioativos e atividades antioxidantes em amêndoas de cacau fermentadas e secas, nibs e chocolates .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CUPRAC	Capacidade antioxidante de redução do cobre
DPPH	1,1- difenil-2-picrilhidrazil
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
g	Gramma
IF	Índice de Fermentação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramma
mL	Miligramma
mm	Milímetro
°C	Grau Celsius
UFBA	Universidade Federal da Bahia
µg	Microgramma
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Objetivos.....	3
2.1.  Objetivo Geral.....	3
2.2.  Objetivos Específicos.....	3

### CAPÍTULO I

3.  Revisão de literatura.....	5
3.1.  Aspectos gerais sobre polifenóis e metilxantinas do cacau .....	5
3.2.  Aspectos gerais do cacau e seu processamento .....	9
3.2.1.  Pré-processamento do cacau.....	11
3.2.2.  Colheita e abertura dos frutos.....	11
3.2.3.  Fermentação.....	12
3.2.4.  Secagem e armazenamento.....	14
3.2.5.  Processamento do cacau .....	15
3.2.6.  Seleção das amêndoas .....	16
3.2.7.  Torrefação, descascamento, moagem e obtenção da massa de cacau.....	17
3.2.8.  Processamento de chocolate .....	18
4.  Material e Métodos.....	20
4.1.  Material .....	20
4.2.  Torrefação .....	20
4.3.  Proporção das misturas para produção dos chocolates .....	21
4.4.  Análises físico-químicas .....	21
4.5.  Análise estatística.....	22
5.  Resultados e Discussão .....	22
6.  Conclusão.....	23
7.  Referências.....	23

### CAPÍTULO II

1.  Resumo.....	41
2.  Introdução.....	42
3.  Material e Métodos.....	44

3.1.	Material .....	<b>SUMÁRIO</b> .....	44
3.2.	Teste de Corte .....		45
3.3.	Desengorduramento das amostras.....		45
3.4.	Índice de fermentação (IF).....		46
3.5.	Torrefação .....		46
3.6.	Proporção das misturas de nibs para produção dos chocolates.....		46
3.7.	Produção dos chocolates .....		47
3.8.	Preparação dos extratos fenólicos .....		47
3.9.	Determinação de compostos fenólicos.....		48
3.10.	Determinação de flavonoides totais .....		48
3.11.	Determinação de antocianinas totais .....		48
3.12.	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos e metilxantinas por HPLC 49		
3.13.	Análise da atividade antioxidante pelo método DPPH.....		49
3.14.	Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP .....		50
3.15.	Análise da atividade antioxidante pelo método CUPRAC.....		50
3.16.	Análise estatística .....		51
4.	Resultados e Discussão .....		51
4.1.	Teste de corte e índice de fermentação (IF) .....		51
4.2.	Compostos fenólicos, flavonoides totais, antocianinas totais, quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas por HPLC e atividades antioxidantes por DPPH, FRAP e CUPRAC.....		54
4.2.1.	Compostos fenólicos.....		54
4.2.2.	Flavonoides Totais.....		56
4.2.3.	Antocianinas Totais .....		56
4.2.4.	Quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas por HPLC.....		56
4.2.5.	Atividade antioxidante pelo método de DPPH.....		59
4.2.6.	Atividade antioxidante pelo método de FRAP .....		60
4.2.7.	Atividade antioxidante pelo método de CUPRAC .....		60
5.	Conclusão.....		61
6.	Agradecimentos.....		61
7.	Referências.....		62

## 1.Introdução

A procura por alimentos que beneficiam a saúde cresceu em muitas partes do mundo, juntamente com os aumentos dos gastos nos cuidados de saúde, da expectativa de vida e do desejo por uma maior qualidade de vida (OZEN et al., 2012). O consumo de frutas e vegetais na dieta tem sido cada vez mais recomendado devido à presença de componentes importantes ao corpo humano, como sais minerais, fibras, vitaminas e compostos fenólicos. De fato, um grande conjunto de evidências apoia a ingestão alimentar de compostos fenólicos, particularmente de flavonoides que podem ser amplamente encontrados em amêndoas de cacau, sendo capazes de exercer alguns efeitos vasculares benéficos, reduzindo o risco de morbidade cardiovascular e contribuindo para a prevenção de outras doenças crônicas (FERRI et al., 2015; GRASSI et al., 2009; GRASSI et al., 2013).

O cacau é reconhecido como uma rica fonte de compostos fenólicos (10 a 12% em peso seco). Os principais polifenóis presentes neste fruto são flavanóis monoméricos como (-)-epicatequina, (+)-catequina e procianidinas. Além disso, o cacau contém outros polifenóis em pequenas quantidades (luteolina, apigenina, naringenina, quercetina, isoquercitrina, entre outros) e metilxantinas, principalmente teobromina e cafeína. Entretanto, a quantidade desses compostos depende em grande parte da origem e dos métodos de processamento das amêndoas de cacau (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 2005; MARTÍN; RAMOS, 2017).

As etapas de pré-processamento das amêndoas de cacau incluem a abertura e remoção das sementes e polpa do fruto, fermentação e secagem. As amêndoas são torradas, descascadas e moídas para obtenção da massa de cacau. É possível obter a partir da massa de cacau, o cacau em pó e a manteiga de cacau, que são outros ingredientes do chocolate, de bebidas de cacau, sorvetes e produtos de panificação (BEG, et al., 2017). A fermentação e a torrefação são processos que afetam a concentração de polifenóis e a atividade antioxidante das amêndoas, mas são necessários para desenvolver características organolépticas desejáveis para produzir chocolate e outros produtos de cacau (ACULEY et al. 2010; SUAZO et al., 2014).

Os compostos fenólicos têm sido estudados há várias décadas devido à influência negativa que exercem no sabor, conferindo o amargor e a adstringência verificados em produtos com elevados teores desses compostos (FORSYTH; QUESNEL, 1957; ROHAN; CONNELL, 1964; CROSS, VILLENEUVE; VINCENT, 1982; BRITO, 2000; SOARES, 2001), em contrapartida, descobertas mais recentes sobre seus efeitos benéficos à saúde humana têm provocado interesse em mantê-los durante o processamento dos produtos obtidos do cacau, sem prejuízo do sabor (KEALEY et al., 1998; KEALEY et al., 2004; EFRAIM, 2004; RIZO, 2006).

Diante desse contexto, estudos sobre o uso de amêndoas subfermentadas na formulação de chocolates podem contribuir com o aumento do teor de compostos bioativos e, conseqüentemente, trazer mais benefícios à saúde humana. Dessa forma, os chocolates produzidos a partir da mistura de amêndoas subfermentadas e fermentadas podem resultar no recebimento de um produto com fatores positivos no valor nutricional e de saúde.

## **2.Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Verificar a influência da adição de nibs de amêndoas de cacau subfermentadas em relação ao teor de compostos bioativos e às propriedades antioxidantes nos chocolates produzidos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Realizar análises de teste de corte e índice de fermentação nas amêndoas de cacau;

Produzir os chocolates com diferentes proporções de nibs de amêndoas subfermentadas e fermentadas;

Realizar análises físico-químicas;

Identificar e quantificar os compostos fenólicos e metilxantinas;

Extrair e quantificar antocianinas;

Determinar as atividades antioxidantes.

# **CAPÍTULO I**

## **Revisão de literatura e análises físico-químicas**

### **3.Revisão de literatura**

#### **3.1. Aspectos gerais sobre polifenóis e metilxantinas do cacau**

A saúde está se tornando um valor pessoal e social cada vez mais importante. Devido aos custos associados à medicina curativa, a prevenção de doenças é muito importante. Uma proporção substancial de problemas de saúde pode ser evitada por um estilo de vida mais saudável. Além da atividade física, a nutrição adequada é um aspecto essencial para influenciar na saúde de uma pessoa (ALTGELD et al., 2006). O papel dos alimentos excede isso a muitas outras funções que contribuem para a saúde e o bem-estar, por exemplo, efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e imunomoduladores (CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020). Os consumidores começaram a entender que suas escolhas alimentares podem ter consequências para sua saúde e estão prestando mais atenção aos benefícios de saúde dos alimentos para manter um estilo de vida saudável (CHRYSOCHOU, 2010).

As atividades funcionais de alimentos saudáveis provêm dos inúmeros compostos bioativos que eles contêm, como ácidos graxos poliinsaturados, peptídeos bioativos e compostos fenólicos (DALIRI et al., 2019). Os compostos fenólicos estão presentes naturalmente nas plantas e são reconhecidos como compostos úteis na alimentação humana (XIE et al. 2012). Podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades de fenol existentes na molécula. Esses compostos possuem ação antioxidante através de diversos mecanismos, entre eles incluem-se a capacidade para a remoção de radicais livres e a inibição da formação de espécies reativas durante o curso normal do metabolismo, prevenindo a ocorrência de danos nos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e consequentes lesões celulares e morte (NEVES, 2015; Zhang et al., 2008). Além disso, os polifenóis possuem a capacidade de diminuir o risco de algumas doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (VAUZOUR et al., 2010). Os polifenóis podem ser encontrados em várias atividades biológicas, incluindo agentes antialérgicos, antivirais, antibacterianos, agentes antifúngicos, anticâncer e prevenção de várias doenças (GOTHAI et al., 2016). Legumes, frutas, grãos integrais e bebidas, como chá e chocolate, são fontes ricas de polifenóis (KHAN et al., 2020; TSAO, 2010).

Os polifenóis são divididos em grupos (Figura 1) pelo número de anéis fenólicos e pelos elementos estruturais que ligam os anéis, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (BUTTERFIELD et al., 2002).

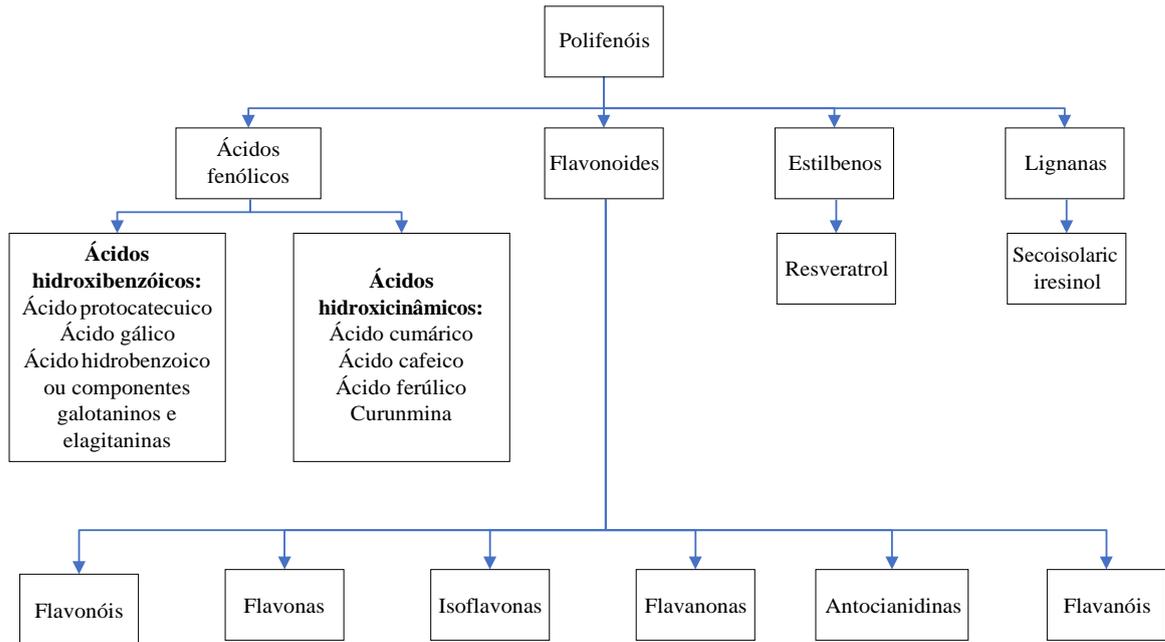


Figura 1. Classificação de polifenóis. Fonte: KHAN et al., 2020.

Os flavonoides são um grupo de polifenóis com várias subclasses: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis. Essas subclasses têm uma estrutura básica comum feita de 15 carbonos com uma ponte de três carbonos conectando dois anéis aromáticos na configuração C6-C3-C6. Os flavonoides têm propriedades anti-inflamatórias através de diferentes mecanismos, como inibição de enzimas reguladoras e fatores de transcrição, que têm um papel importante no controle de mediadores envolvidos na inflamação. Eles também são potentes antioxidantes capazes de eliminar os radicais livres e diminuir sua formação. Conseqüentemente, os flavonoides têm um profundo impacto em várias células imunes e mecanismos imunes importantes nos processos inflamatórios (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

Juntamente com os flavonoides, os ácidos fenólicos são outro grupo importante dividido em ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. O ácido gálico é uma estrutura relativamente simples, também conhecida como ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico. Estruturalmente, o ácido gálico contém grupos hidroxila e um grupo ácido carboxílico em sua estrutura, ele também não confere sabor adstringente porque não forma complexos com proteínas (ASIF et al., 2016). Entre os derivados do ácido hidroxicinâmico têm ácido p-cumárico como estrutura básica que é formada por um anel aromático com uma substituição hidroxila e um ácido propenóico (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; LORENZO; MUNEKATA, 2016).

Entre os estilbenos, o resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) contribui para o potencial antioxidante do vinho tinto e, portanto, pode desempenhar um papel na prevenção de doenças cardiovasculares humanas (FRÉMONT, 2000). Imran et al. (2015) abordam que o secoisolariciresinol diglucosídeo é a principal lignana na linhaça e tem papel preventivo contra alguns tipos de câncer (mama, pulmão e cólon). E a atividade anticarcinogênica está associada à inibição de enzimas envolvidas na carcinogênese.

A quantidade e qualidade de polifenóis em alimentos vegetais podem variar significativamente de acordo com diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos, como genética e cultivar, composição do solo e condições de crescimento, estado de maturidade e condições pós-colheita, entre outros (JAFFERY et al., 2003). A alta capacidade antioxidante faz dos polifenóis uma parte importante do mecanismo de defesa inato de uma planta, com sua síntese estimulada sob condições de estresse, como alterações de temperatura, exposição aos raios UV e ataques de pragas (DIXON; PAIVA, 1995; FALLER; FIALHO, 2010).

De fato, um grande conjunto de evidências apoia a ingestão alimentar de compostos fenólicos, particularmente de flavonoides que podem ser amplamente encontrados em amêndoas de cacau, sendo capazes de exercer alguns efeitos vasculares benéficos, reduzindo o risco de morbidade cardiovascular e contribuindo para a prevenção de outras doenças crônicas (FERRI et al., 2015; GRASSI et al., 2009; GRASSI et al., 2013).

Dessa maneira, as amêndoas de cacau e seus produtos são conhecidos pelo alto conteúdo de (+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidinas. Além disso, o cacau contém outros polifenóis em pequenas quantidades (luteolina, apigenina, naringenina, quercetina, isoquercitrina, entre outros) e metilxantinas, principalmente teobromina e cafeína. Entretanto, a quantidade desses compostos depende em grande parte da origem e dos métodos de processamento das amêndoas de cacau (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 2005; MARTÍN; RAMOS, 2016). O processamento envolve muitas etapas, incluindo fermentação, secagem, moagem, torrefação, alcalinização, conchagem, que afetam a composição dos polifenóis (WOLLGAST; ANKLAM, 2000). No entanto, mesmo o conteúdo reduzido de polifenóis no cacau processado permanece alto em comparação com outras frutas e seus produtos (CROZIER et al., 2011; KOSINSKA; ANDLAUER, 2012). Os compostos fenólicos no cacau podem ser observados na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1. Composição em compostos fenólicos do cacau.

<b>Grupo fenólico</b>	<b>Compostos fenólicos</b>
Taninos condensados (Procianidinas)	Procianidina B1 (epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina)
	Procianidina B2 (epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina)
	Procianidina B2 <i>O</i> -galato (epicatequina-3- <i>O</i> -galato-(4 $\beta$ →8)-epicatequina)
	Procianidina B2 3,3-di- <i>O</i> -galato (epicatequina-3- <i>O</i> -galato-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-3- <i>O</i> -galato)
	Procianidina B3 (catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina)
	Procianidina B4 (catequina-(4 $\alpha$ →8)-epicatequina)
	Procianidina B4 <i>O</i> -galato (catequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-3- <i>O</i> -galato)
	Procianidina C1 (epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina) Procianidina D (epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina)
Flavanóis	(-)-epicatequina (+)-catequina
Flavonas	Luteolina-7- <i>O</i> -glucosídeo
	Luteolina-8- <i>C</i> -glucosídeo
	Luteolina-6- <i>C</i> -glucosídeo
	Apigenina-8- <i>C</i> -glucosídeo
	Apigenina-6- <i>C</i> -glucosídeo
Flavanonas	Naringenina
	Prunina (naringenina-7- <i>O</i> -glucosídeo)
	Hesperidina Eriodictiol
Flavonóis	Quercetina
	Quercetina-3- <i>O</i> -arabinósido
	Isoquercitrina (Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo) Quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo
Antocianidinas	3- $\alpha$ -L-arabinosidilcianidina
	3- $\beta$ -D-arabinosidilcianidina
	3- $\beta$ -D-galactosidilcianidina
Ácidos fenólicos	Ácido vanílico
	ácido siríngico
	ácido clorogênico
	ácido clorético
	ácido cumárico
	ácido caféico
	ácido ferúlico
ácido fenilacético	

Fonte: MARTÍN; RAMOS, 2016.

Até agora, muitos estudos foram realizados sobre os efeitos da ingestão de chocolate no sistema cardiovascular, na pele, nas concentrações de colesterol e na liberação de neurotransmissores anandamida e serotonina, e nas propriedades relacionadas à saúde do chocolate intenso de alta qualidade, contendo teobromina e cafeína (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 2005; KATZ et al., 2011). Alguns estudos mostraram que os flavonoides absorvidos interagem diretamente com vários alvos celulares e moleculares no cérebro, exercendo efeitos antioxidantes e melhoram o tecido e a função do cérebro nas regiões implicadas, principalmente em aprendizado, memória e cognição (ANDRÉS-LACUEVA et al., 2005; PASSAMONTI et al., 2005; SOKOLOV et al., 2013; VAUZOUR et al., 2008).

Entre os flavonóis do cacau, a epicatequina possuem excelente atividade antioxidante. Em um estudo com pacientes diabéticos, Mellor et al. (2010) mostraram que a ingestão de um chocolate com alto teor de polifenóis, fornecendo 50 mg de epicatequinas durante 8 semanas, foi eficaz na melhoria do perfil de colesterol aterosclerótico sem afetar o peso corporal, a resistência à insulina, a pressão arterial ou o controle glicêmico.

O cacau e os produtos de cacau também são ricos em metilxantinas, como cafeína e teobromina, que representam mais de 99% dos alcaloides presentes nas amêndoas de cacau. A quantidade de teobromina e cafeína pode variar e depende fortemente do genótipo, maturidade e grau de fermentação da amêndoa. As metilxantinas também contribuem para o amargor típico de produtos à base de cacau e também afetam a palatabilidade desses produtos. Elas são compostos bioativos que afetam fisiologicamente os sistemas nervoso central, cardiovascular, gastrointestinal, respiratório e renal do corpo e, portanto, podem melhorar seu desempenho físico e intelectual (RÝDLOVÁ et al., 2020).

A cafeína é muito consumida no mundo e seu consumo traz efeitos benéficos nos sistemas endócrino, neuronal, renal e respiratório (DALY, 2007). Efeitos neuroprotetores contra as doenças de Alzheimer e Parkinson, bem como aumento do estado de alerta e sensação de bem-estar ou até possível atividade anticâncer foram descritos para a cafeína, embora o alto consumo também tenha sido associado a efeitos negativos, como agitação, hipertensão ou insônia (PORKKA-HEISKANEN; ZITTING; WIGREN, 2013). A teobromina tem efeitos semelhantes aos da cafeína, melhorando o estado de alerta sem induzir batimentos cardíacos ou hipertensão irregulares (MITCHELL et al., 2011), também tendo efeitos relaxantes nos músculos diurético e brônquico (DE SENA et al., 2011; MARTÍNEZ-LÓPEZ et al. 2014).

### **3.2. Aspectos gerais do cacau e seu processamento**

O cacauzeiro é uma planta da família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L., originada na Bacia Amazônica e cultivada nas regiões tropicais do mundo (ALVES, 2002). As sementes do cacau destacam-se como principal produto do fruto, em termos econômicos, representando cerca de 10% do seu peso. Após seu beneficiamento originam diversos produtos, como por exemplo, a massa (liquor), a manteiga de cacau, os chocolates, aromas naturais e extratos com fins farmacêuticos, sendo que sua maior aplicação está na fabricação do chocolate (DRUMMOND, 1998; LECUMBERRI et al., 2007).

O fruto é um importante *commodity* global e, de acordo com a Organização Internacional do Cacau (ICCO), a produção global em 2016 foi de 3.971 mil toneladas,

resultando em um *déficit* de 197.000 toneladas na demanda global (ICCO, 2017). Uma vez que até 95% da produção global de cacau é proveniente de pequenas propriedades, mas a demanda global de cacau deve aumentar de 4,1 milhões, em 2016, para 4,7 milhões de toneladas até 2020 (ABDULAI et al., 2018).

As condições ideais para o cultivo do cacau são temperaturas médias de 25 °C, chuvas regulares com precipitação anual de 1500 a 2500 mm (AFOAKWA, 2010; KIM; LEE; LEE, 2011). O solo deve ser profundo e fértil, que pode causar maior susceptibilidade a pragas e fungos. E o cacauzeiro pode atingir entre 5 a 10 metros de altura (MARTINI, 2004; BATALHA, 2009; BECKETT, 1994). É uma planta perene, visto que seu ciclo produtivo pode ultrapassar os 100 anos, e seus primeiros frutos são colhidos cerca de 5 anos após a plantação, atingindo plena produtividade aos 12 e produz, em média, até 35 anos. A época de colheita é variável nas zonas cacauzeiras (OETTERER, 2006). Para fins de comercialização, a colheita de cacau na Bahia é dividida em dois períodos, a safra principal, que vai de outubro a abril e a safra temporã, entre maio a setembro (MELÉNDEZ, 2017).

As amêndoas de cacau e seus produtos são alimentos muito nutritivos para todas as categorias de pessoas, são ricos em proteínas, vitaminas, carboidratos, minerais, lipídios e importante fonte de polifenóis com atividade antioxidante comparativamente maior do que chás e vinhos tintos (TEYE et al., 2020). Martins (2007) aborda que o tamanho do fruto varia conforme a espécie, variedade, solo, clima e qualidade da árvore, e medem de 12 a 20 cm, pesando entre 300 e 600 g. O fruto é composto por casca, polpa e sementes, sendo que cada fruto contém entre 20 e 50 sementes e a casca representa 75% do total (OETTERER, 2006; AFOAKWA, 2010).

Os dois principais tipos de cacau, de acordo com suas características morfológicas e origens geográficas, são o *Criollo* e o *Forastero*. O primeiro possui sementes grandes e cotilédones de coloração branca ou violeta clara, após processamento originam produtos com sabor suave e frutado. O segundo, *Forastero*, é caracterizado por possuir sementes intensamente pigmentadas e seus produtos possuem sabor mais intenso, amargo e adstringente (MOTAMAYOR et al., 2008; BECKETT, 2009). O tipo Trinitário é resultante da hibridização dos grupos anteriores, sendo que os cotilédones das sementes podem apresentar coloração variando de branca à violeta-pálida (PIRES, 2003; MOTAMAYOR et al., 2008). Sementes de cacau do grupo *Forastero* contêm de 30 a 60% mais compostos fenólicos que as do grupo *Criollo* (KEALEY et al., 1998; BRITO, 2000). Isso possivelmente se relaciona ao maior amargor e à adstringência verificados em produtos derivados de cacau *Forastero*, em comparação com produtos derivados de cacau *Criollo* (EFRAIM et al., 2011). Devido ao

surgimento de doenças, como a vassoura-de-bruxa foram introduzidas espécies híbridas, as quais além da resistência à doenças apresentam perfis químicos e sensoriais diferenciados dos cultivares de origem (ALEXANDRE et al., 2000; NIEMENAK et al., 2006; OFORI et al., 2016).

### 3.2.1. Pré-processamento do cacau

Vários produtos podem ser obtidos com o cacau, como o liquor de cacau, cacau em pó, manteiga de cacau e chocolate. No entanto, antes que as amêndoas possam ser comercializadas para a produção destes produtos, elas precisam passar por um processamento pós-colheita (Figura 2), que inclui as etapas de abertura dos frutos e remoção das sementes, fermentação e secagem (BEG et al., 2017).

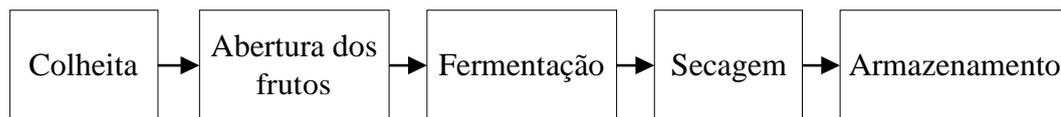


Figura 2. Sequência de etapas no pré-processamento do cacau.

Fatores como a variedade do cacau, manejo agrônômico, fatores do solo, condições climáticas e a tecnologia pós-colheita influenciam diretamente na qualidade das amêndoas de cacau. Portanto, é necessária a avaliação dos parâmetros físicos, químicos e organolépticos para determinar essa qualidade (BRUNETTO et al., 2007).

### 3.2.2. Colheita e abertura dos frutos

Segundo Beg et al. (2017), os frutos maduros podem ser encontrados nas árvores de cacau ao longo do ano, mas alguns países têm duas épocas de alta produção por ano. Mudanças nas condições ambientais podem afetar a colheita, a produtividade e o rendimento da colheita. Sendo que a colheita é feita manualmente, através de um facas ou ferramentas de cabo longo, e deve ser efetuada quando os frutos apresentarem ponto ideal de maturação, pois apenas os frutos maduros possuem açúcar e outros substratos em quantidade adequada para uma boa fermentação (LOPES, 2000). A depender da variedade, esses frutos maduros apresentam uma coloração da casca diferenciada (CRUZ, 2012). A abertura dos frutos é feita manualmente com

facas para a separação da casca e das sementes com polpa, que segue diretamente para a fermentação (SERRA, 2004; FERREIRA et al., 2013).

### 3.2.3. Fermentação

As sementes e polpa podem ser fermentadas em caixas de madeira, cestas ou em montes com pilhas cobertas com folhas de bananeira (BEG et al., 2017). No Brasil, ocorre tradicionalmente em caixas de madeira (Figura 3), que são os chamados cochos de fermentação (FERREIRA et al., 2013). Nesses cochos, a massa de cacau é revolvida de uma caixa para outra com auxílio de pás. Durante o processo de fermentação, a massa é coberta com folhas de bananeira para reduzir as perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial (WOOD; LASS, 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004; OETTERER, 2006; PONTILLON, 2009; DE VUYST et al., 2010).



Figura 3. Cocho de fermentação com massa de cacau antes de cobrir com folhas de bananeira.

Durante a fermentação, vários microrganismos são responsáveis pelas alterações físico-químicas que ocorrem na polpa e no interior da semente (BATISTA et al., 2016). A contaminação da polpa ocorre quando o fruto é aberto com facas, introduzindo-se uma grande variedade de microrganismos, muitos dos quais subsequentemente contribuem para a fermentação. Os microrganismos fermentadores são transferidos para as sementes através principalmente das mãos dos trabalhadores, facas, cestos utilizados para transporte e mucilagem seca presente nas caixas, remanescente de fermentações anteriores (SCHWAN; WHEALS, 2004; NIELSEN et al., 2007).

Nesta etapa, inicialmente há o predomínio de leveduras, em seguida, há sequência das bactérias lácticas, das bactérias acéticas e depois dos bacilos aeróbios formadores de esporos (CRAFAK et al., 2013; BATISTA et al., 2015; ARDHANA; FLEET, 2003 , GARCIA-ARMISEN et al., 2010 , LIMA et al., 2011 , SCHWAN; WHEALS, 2004). A fase inicial da fermentação é dominada por leveduras e bactérias lácticas, que crescem no ambiente rico em açúcar, ácido (pH em torno de 3,5) e anaeróbico, e declinam após 48 horas de fermentação (PEREIRA et al., 2012). As leveduras convertem os açúcares da polpa em etanol e dióxido de carbono. O etanol produzido acaba inibindo o crescimento desses microrganismos após um determinado ponto (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004; CRUZ et al., 2013). Há a liberação das enzimas de degradação da polpa, fazendo com que o líquido exsudado seja drenado, permitindo que o ar adentre na massa fermentada (OETTERER, 2006; LIMA, 2010). Em no máximo 24 horas, as leveduras consomem todo oxigênio presente na massa que está fermentando, criando assim condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias (THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001).

Esta fase inicial é exotérmica, com um aumento na temperatura da massa de cacau que varia de 35 a 40 °C (JESPERSEN et al., 2005; FERRÃO, 2007). Geralmente, a partir do segundo dia até o final do processo se realiza o revolvimento da massa a fim de controlar o nível de acidez e temperatura (para que não ultrapasse 45 °C), de forma a não inativar as enzimas endógenas necessárias no desenvolvimento do aroma e sabor dos produtos derivados de cacau (OETTERER, 2006).

As bactérias estão presentes desde o início da fermentação, mas só se tornam dominantes entre 48 e 96h. Bactérias lácticas são responsáveis pela conversão de alguns ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, em ácido láctico (BATISTA et al., 2016). Por não ser volátil, o ácido láctico é um dos grandes responsáveis pela acidez das amêndoas. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50° C. Nessa fase, há uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor das sementes (FERREIRA et al., 2013).

O etanol formado inicialmente pelas leveduras é oxidado em ácido acético pelas bactérias acéticas (CAMU et al., 2007; NIELSEN et al., 2007). O etanol e o ácido acético se difundem nas amêndoas, sendo que juntamente com a temperatura elevada, são responsáveis por matar o gérmen, quebrar a parede celular e causar a liberação de enzimas endógenas importantes para a formação de precursores de sabor, como aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores (CRAFAK et al., 2013). As sementes passam a se denominar amêndoas devido à perda da germinação.

Na fermentação os compostos fenólicos se oxidam ao entrar em contato com a polifenoloxidase e glicosidases presentes nas sementes, assim causando a redução da adstringência e amargor, formando complexos com proteínas e peptídeos. A cor muda de púrpura para marrom nos cotilédones, com o aumento da concentração de ácido acético e oxidação das antocianinas. (CRUZ, 2002; BECKETT, 2009). Segundo Brito (2000), citado por Efraim et al. (2010), durante a etapa de fermentação, o teor de polifenóis totais diminui cerca de 70% e o teor de epicatequina, composto fenólico do grupo dos flavanóis, diminui cerca de 90%.

Tempos de fermentação mais longos facilitam a proliferação de bactérias formadoras de esporos e fungos filamentosos, produzindo metabólitos com influência negativa no sabor da amêndoa e, portanto, na sua qualidade (MEGIAS-PEREZ et al., 2020; SCHWAN; WHEALS, 2004).

#### **3.2.4. Secagem e armazenamento**

Durante o processo de secagem há continuação das reações de oxidação, pela enzima polifenoloxidase, assim permitindo a redução do amargor, da adstringência e da acidez das amêndoas, além do escurecimento dos cotilédones. Nesse processo, as amêndoas atingem a umidade necessária para o armazenamento (BECKETT, 2009).

De acordo com Crespo (1985), citado por Efraim et al. (2010), esta etapa deve ser conduzida para evitar o desenvolvimento de fungos que podem conferir sabor desagradável ao produto final ou produzir toxinas prejudiciais à saúde. No entanto, não deve ser efetuada muito rápida, utilizando temperaturas elevadas, para evitar a migração de manteiga de cacau para a testa (película que envolve a amêndoa) e afetar o desenvolvimento do sabor característico de chocolate. A secagem deve proceder até o teor de umidade das amêndoas máximo de 8% nas amêndoas de cacau (BRASIL, 2008). Teores mais elevados de umidade podem favorecer ao crescimento de fungos no armazenamento e transporte (OETTERER, 2006; ANKLAM; WOLLGAST, 2000a).

A secagem pode ser natural ou artificial, a primeira é realizada ao sol, sendo uma operação simples e bastante utilizada em fazendas cacaeiras. A secagem natural ocorre em barcaças, onde as amêndoas são dispostas em uma plataforma de madeira, e neste processo as amêndoas são revolvidas regularmente para propiciar uniformização e redução da umidade e para a remoção de compostos indesejáveis formados durante a fermentação, como o ácido acético (AMIGO et al., 2017; EFRAIM et al., 2010). No entanto, a secagem artificial é utilizada

em lugares onde a colheita coincide com épocas chuvosas. A temperatura e a umidade relativa do ar devem ser controladas durante a secagem, pois temperaturas elevadas contribuem para a oxidação de polifenóis nas amêndoas de cacau, causando a redução destes (KYI et al., 2005).

Teh et al., (2015) abordam que a temperatura de secagem superior a 60 °C resulta em produto seco com qualidade de sabor inferior. E a secagem ao sol é amplamente conhecida como o melhor método para o desenvolvimento de aromas, mas apresenta várias desvantagens, como longo tempo de secagem, condições de trabalho intensas e imprevisíveis.

Durante a secagem, a diminuição do teor de polifenóis é atribuída ao escurecimento enzimático causado pela enzima polifenoloxidase, que encontra condições ideais para sua atividade nessa etapa. Posteriormente, o escurecimento não enzimático ocorre decorrente da polimerização de quinonas formadas durante a fermentação e da acumulação de compostos insolúveis (BRITO, 2000).

De acordo com Martins et al. (2012), o objetivo do armazenamento é preservar a qualidade do cacau seco por até 90 dias. Após esse período, pode ocorrer a proliferação de fungos, ataque de insetos e roedores. O armazém deve ser arejado, com presença de luz, sempre limpo e livre de produtos químicos ou orgânicos que possam transferir para as amêndoas odores estranhos.

### **3.2.5. Processamento do cacau**

A matéria-prima mais importante na obtenção do chocolate é chamada de massa de cacau ou liquor e consiste em um líquido viscoso, obtido após a fermentação, secagem, torrefação e moagem das amêndoas de cacau. Do liquor são obtidos a manteiga de cacau e o pó de cacau, principais ingredientes na formulação do chocolate (KOBBLITZ, 2011). As etapas de processamento do cacau estão apresentadas na Figura 4, a seguir.

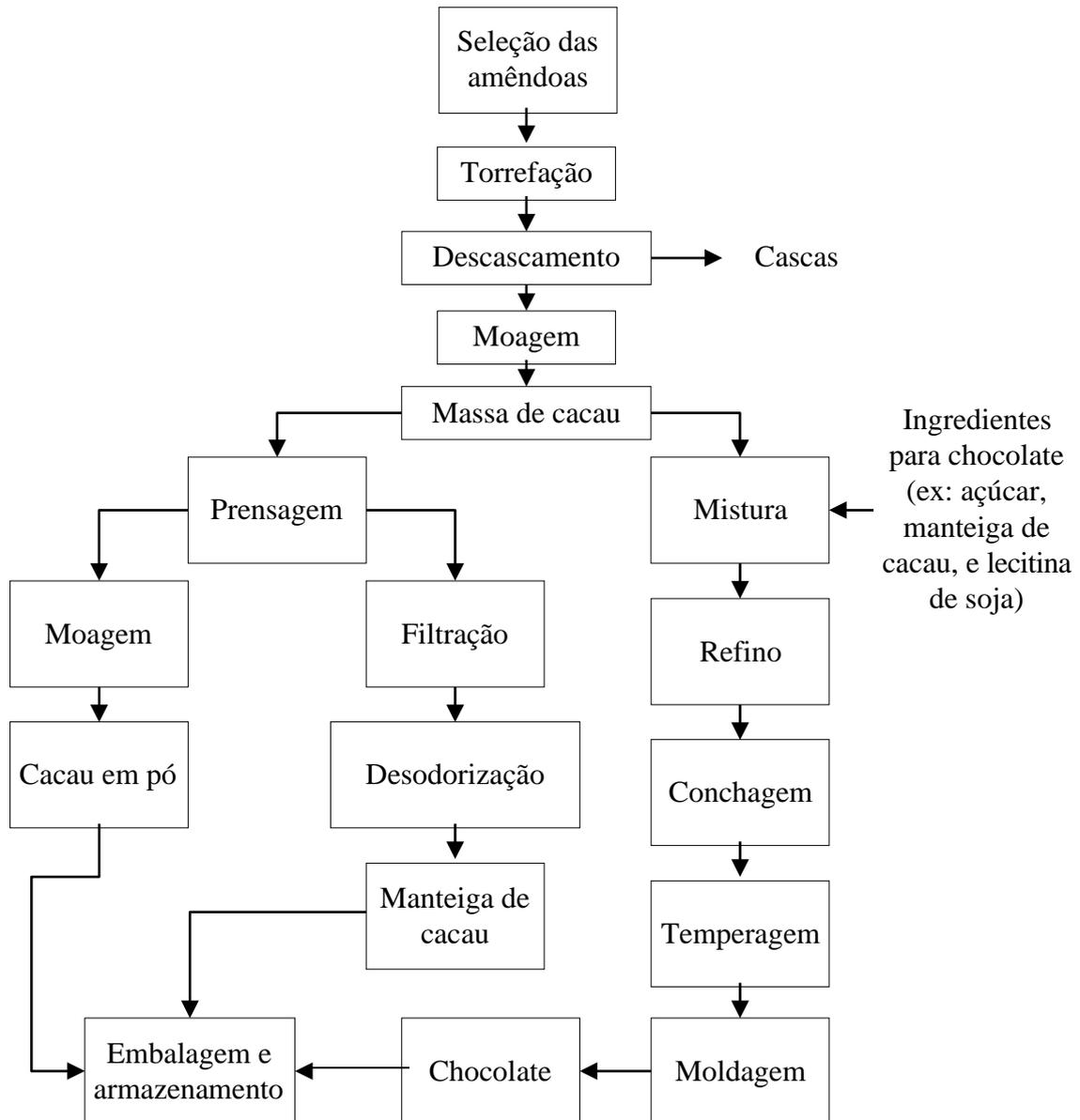


Figura 4. Sequência de processamentos do cacau (cacau em pó, manteiga de cacau e chocolate).

### 3.2.6. Seleção das amêndoas

No Brasil, a Instrução Normativa n° 38, de 23 de junho de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece o padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, modo de apresentação e rotulagem de amêndoas de cacau (BRASIL, 2008). As amêndoas passam pelo teste de corte e são classificadas em tipos de acordo com os percentuais de tolerância de defeitos mencionados na regulamentação, como amêndoas com odor de fumaça, germinadas, mofadas, entre outros. Se

as amêndoas não se enquadram nas classificações Tipo I, II ou III, podem ser classificadas como Fora do Tipo, conforme é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Tolerância de defeitos, expressa em % e respectivo enquadramento do produto.

Enquadramento do Produto	Defeitos					
	Mofadas	Fumaça	Danificadas por Insetos	Ardósia	Germinadas	Achatadas
Tipo I	De 0 até 4,0 %	De 0 até 1,0%	De 0 até 4,0%	De 0 até 5,0%	De 0 até 5,0%	De 0 até 5,0%
Tipo II	Acima de 4,0% até 6,0%	Acima de 1,0% até 4,0%	Acima de 4,0% até 6,0%	Acima de 5,0% até 10,0%	Acima de 5,0% até 6,0%	Acima de 5,0% até 6,0%
Tipo III	Acima de 6,0% até 12,0%	Acima de 4,0% até 6,0%	Acima de 6,0% até 8,0%	Acima de 10,0% até 15,0%	Acima de 6,0% até 7,0%	Acima de 6,0% até 7,0%
Fora de Tipo	Acima de 12,0% até 25,0%	Acima de 6,0%	Acima de 8,0%	Acima de 15,0%	Acima de 7,0%	Acima de 7,0%

Fonte: Instrução Normativa n° 38, de 23 de junho de 2008, MAPA.

De acordo com Ferreira et al. (2013), os critérios de qualidade das amêndoas de cacau são amêndoas completamente fermentadas e secas, livres de fumaça e odores anormais ou estranhos, livres de qualquer evidência de adulteração, de dimensões uniformes, isentos de matérias estranhas e livres de grãos quebrados, fragmentados e com pedaços de casca. A mudança na cor da amêndoa de cacau durante a fermentação é avaliada pelo método de teste de corte para determinar o grau de fermentação, avaliar a cor interna, os defeitos e classificar o tipo de amêndoa (ACULEY et al., 2010; SANTOS; PALMEIRA; JESUS, 2019; BRASIL, 2008). Além da coloração, a quantidade de compartimentações presentes nos cotilédones pode avaliar o grau de fermentação, por isso, quanto mais compartimentado, melhor será a amêndoa fermentada (CONCEX, 1988).

### 3.2.7. Torrefação, descascamento, moagem e obtenção da massa de cacau

A torrefação é uma operação que produz aroma suave, textura e cor marrom característica de amêndoas torradas. A temperatura e o tempo do processo variam de acordo com fatores como equipamento utilizado, origem e período de colheita do cacau, umidade e sabor desejados nos produtos finais (NASCIMENTO et al., 2012; SCHWAN; WHEALS, 2004). Podem ser empregadas as temperaturas entre 110 e 140 °C (BECKETT, 2008). Durante este tratamento térmico há o escurecimento não enzimático (NEB), pela reação de *Maillard* (MR), mas este escurecimento envolve não apenas a redução de açúcar e aminoácidos, como

também compostos carbonílicos de ácidos orgânicos ou resultante da oxidação lipídica (HIDALGO; ZAMORA, 2000; PIVA et al., 2008). Melanoidinas de alto peso molecular são produzidas no final da reação de *Maillard*, elas possuem atividade antioxidante e também são responsáveis pela formação da cor e envolvidos nas propriedades sensoriais (sabor, sabor e textura) dos alimentos (MORALES et al., 2012, SACCHETTI et al., 2016).

Durante a torrefação, as amêndoas perdem água e traços de ácido acético por evaporação. As amêndoas geralmente são trituradas e se obtém os nibs de cacau, após a retirada das cascas, que podem ser separadas por peneiramentos sucessivos, através de sistemas de ventilação e sucção. Os nibs são desintegrados no processo de moagem, formando uma pasta quase líquida chamada de massa ou liquor de cacau. Esta massa possui elevado teor de gordura, que pode conter no mínimo 50% de manteiga de cacau (BASTOS, 2003). A partir da prensagem da massa, esta é transformada em manteiga de cacau e torta de cacau (KREIBICH, 2016).

A manteiga de cacau é extraída por prensas hidráulicas e, em seguida, é filtrada, centrifugada e desodorizada (OETTERER, 2006). E na indústria de chocolates, a manteiga de cacau é uma matéria-prima de custo elevado e a torta de cacau é o outro produto resultante após a prensagem, que pode ser utilizada para a produção de chocolate em pó, utilizado no preparo de bebidas e demais produtos de confeitaria (KREIBICH, 2016).

### **3.2.8. Processamento de chocolate**

O chocolate é um produto obtido a partir das amêndoas de cacau e na formulação, os principais ingredientes são a massa de cacau, manteiga de cacau, açúcar e lecitina como emulsificante. No entanto, existe uma grande diversidade de produtos disponíveis no mercado como resultado da incorporação de outros ingredientes às formulações, como nozes, frutas ou cereais. As principais categorias de chocolate comercial são os de chocolate intenso, ao leite e branco, diferindo nos conteúdos de massa de cacau, leite e manteiga de cacau (TORRES-MORENO et al., 2015).

Depois de adicionar os ingredientes em um misturador, a mistura de chocolate é refinada por moinhos de pedra para reduzir o tamanho das partículas e conferir uma textura mais suave ao produto (GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN et al., 2016). A conhagem é a etapa que emprega tratamento térmico e a mistura é submetida à agitação e cisalhamento por várias horas, sob temperaturas controladas, geralmente entre 50 °C e 70 °C. O tempo de processamento depende do tipo de equipamento e da umidade e sabor desejados no chocolate (BECKETT, 2008; NASCIMENTO et al., 2012). Durante a concha, o nível de umidade é reduzido, alguns ácidos

voláteis, como o ácido acético, devido à fermentação do cacau, são removidos e as superfícies de todas as partículas sólidas são cobertas com gordura. A massa fluida homogênea e em pasta é obtida pela adição de mais manteiga de cacau, além de emulsificantes (TOKER; PALABIYIK; KONAR, 2019).

Prawira e Barringer (2009) investigaram o efeito da formulação de chocolate ao leite e do tempo de conchagem nas preferências dos consumidores. Eles relataram que o longo tempo de concha causava a baixa percepção do tamanho das partículas e os chocolates mais brilhantes, que eram os preferidos pelos consumidores. Em relação à composição dos compostos fenólicos, alguns autores relataram que a conchagem diminui a concentração de polifenóis (DIMICK; HOSKIN, 1981, TOKER et al., 2019; SULISTYOWATI; MISNAWI, 2008). De Mattia et al. (2014) determinaram mudanças na composição dos compostos fenólicos e, dependendo do tempo e condições de conchagem, eles relataram que a quantidade de monômeros fenólicos era maior em chocolates que passaram pela conchagem em tempo mais curto.

Antes da fase de embalagem, o chocolate é temperado e moldado. Durante esses processos, as combinações de tempo-temperatura são função do tipo de formulação e do objetivo final de toda a cadeia de processamento. Dependendo da composição de triglicerídeos da manteiga de cacau adicionada, são possíveis seis formas diferentes de cristalização. Após uma fase de pré-cristalização de apenas uma pequena porção dos triglicerídeos, na qual um número limitado de pequenos núcleos cristaliza, todo o conteúdo lipídico se reúne em torno desses núcleos, cristalizando na forma correta. Esse processo permite que o fabricante obtenha a textura desejada do produto final, o que é muito importante para sua palatabilidade e conformidade final. Em seguida, o produto temperado é colocado em moldes, onde é modelado na forma desejada, em seguida, é resfriado e embalado (ASCRIZZI et al., 2017).

## **4. Material e Métodos**

### **4.2. Material**

As amêndoas de cacau multivarietais foram provenientes de uma fazenda localizada entre as cidades de Ilhéus e Uruçuca, no sul da Bahia, Brasil. A colheita dos frutos foi realizada obedecendo o ponto de maturação. Estes foram abertos manualmente com facão e as sementes com polpa foram submetidas imediatamente à fermentação. O processo fermentativo foi realizado na própria fazenda produtora de cacau, seguindo procedimento adotado pelo produtor. A fermentação foi realizada em cochos de madeira, de dimensões 60 cm x 70 cm x 60 cm, e no fundo com furos de 1 cm de diâmetro a cada 5 cm. A operação foi produzida em dois lotes de 40 kg de sementes com polpa, cada sob as seguintes condições:

- Fermentação até 48 horas para obtenção de amêndoas parcialmente fermentadas (subfermentadas);

- Fermentação completa até 144 horas para obtenção de amêndoas fermentadas.

As amêndoas de cada lote foram secas ao sol, em mesas de aço inox, durante 5 a 7 dias, até umidade final menor que 8%. As amostras das amêndoas subfermentadas (até 48 horas de fermentação) e fermentadas (até 144 horas de fermentação) foram transportadas para a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, onde foram estocadas em freezer, a -18 °C, até realização das análises. Os dois tipos de amêndoas de cacau secas foram torrados, retirou-se as testas e obteve-se os nibs. Neste capítulo, realizou-se as análises físico-químicas (umidade, cinzas, proteínas e lipídios) nas amêndoas fermentadas e secas e em todos os ensaios de chocolates, em triplicata.

### **4.3. Torrefação**

As amêndoas fermentadas e secas foram distribuídas em bandejas perfuradas e submetidas à torrefação em estufa de circulação forçada (DeLeo, tipo A35EAF8, número 0612), a 120 °C, por 25 min. Em seguida, os nibs foram obtidos após descascamento manual, sendo armazenados em embalagem à vácuo e sob congelamento, a -18 °C, até o momento de produção dos ensaios de chocolate.

#### 4.4. Proporção das misturas para produção dos chocolates

As misturas de nibs de cacau foram desenvolvidas empregando o planejamento simplex, com dois fatores, sendo as variáveis independentes X1, correspondendo à porcentagem de nibs de cacau subfermentado, e X2, correspondendo à porcentagem de nibs de cacau fermentado, conforme a Tabela 3. Os níveis foram de 20% a 80% e os ensaios 5, 6 e 7 representam os pontos centrais do planejamento.

Tabela 3. Matriz do planejamento simplex com valores reais das variáveis.

Ensaio	X1 (%)	X2 (%)
1	80	20
2	20	80
3	65	35
4	35	65
5 (pc)	50	50
6 (pc)	50	50
7 (pc)	50	50

Legenda: X<sub>1</sub>: Nibs de amêndoas subfermentadas; X<sub>2</sub>: Nibs de amêndoas fermentadas; pc: Pontos centrais.

Todos os chocolates produzidos continham 66,3% de teor de cacau na formulação. Também houve produção de um ensaio controle, que foi formulado com 100% de nibs de amêndoas fermentadas. Sendo que cada ensaio foi produzido com 61,00% de mistura de nibs, 5,30% de manteiga de cacau, 33,35% de açúcar e 0,35% de lecitina de soja. Cada ingrediente foi adicionado nesta ordem ao moinho de pedra (Melanger Spectra 11) que realizou o refino e a conchagem por 24h. Após este período, metade da mistura foi despejada em superfície de mármore para iniciar a etapa de temperagem, que causa a formação de cristais estáveis de gordura e uma superfície de brilho no chocolate, onde consistiu em mesclar a mistura, com auxílio de espátulas, até resfriar a 28 °C. Em seguida, despejou-se a outra metade da mistura e realizou-se uma mistura das massas com diferentes temperaturas, em movimento rápido e circular, afim de atingir a cristalização da gordura na temperatura de 32°C. Imediatamente, o chocolate foi moldado em fôrmas e mantidos sob refrigeração, a 8 °C, por 2h, para serem embalados em papel alumínio e, em seguida, armazenados sob refrigeração, a 8 °C, até o momento das análises.

#### **4.5. Análises físico-químicas**

As análises de umidade, cinzas, lipídios e proteínas (com fator de conversão 6,25) foram realizadas seguindo as respectivas metodologias 012/IV, 018/IV, 032/IV e 036/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008) nas amêndoas fermentadas até 48 e 144 horas e nos ensaios de chocolates. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.6. Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e as análises estatísticas foram feitas com o Software Statistical 8.0 (STATOSOFT<sup>®</sup>, USA, 2007). Na comparação entre as médias, os testes utilizados foram o Teste T e o Teste de Tukey. Neste último, os resultados foram submetidos à análise de variância usando one-way (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, com significância de 95% ( $P < 0,05$ ).

### **5. Resultados e Discussão**

Os resultados referentes aos teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídios das amêndoas de cacau e dos chocolates elaborados estão expressos na Tabela 4. Entre as amêndoas de cacau (A48h e A144h), não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nas análises de umidade e lipídios. E entre os ensaios de chocolates, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos ensaios C5, C6 e C7, dado que ambos têm mesmas proporções de nibs das amêndoas fermentadas até 48h e 144h.

Tabela 4: Análises físico-químicas nas amêndoas e nos chocolates

Ensaio	Proporção de nibs (%)		Análises físico-químicas (%)			
	48h	144h	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios
A48h	-	-	7,75 <sup>A</sup> ± 0,37	3,82 <sup>A</sup> ± 0,05	16,05 <sup>A</sup> ± 0,40	45,57 <sup>A</sup> ± 1,70
A144h	-	-	7,74 <sup>A</sup> ± 0,25	2,78 <sup>B</sup> ± 0,06	14,71 <sup>B</sup> ± 0,20	45,18 <sup>A</sup> ± 1,77
C1	80	20	3,33 <sup>ab</sup> ± 0,13	1,60 <sup>a</sup> ± 0,03	9,67 <sup>ab</sup> ± 0,17	39,55 <sup>a</sup> ± 2,25
C2	20	80	3,38 <sup>ab</sup> ± 0,12	1,50 <sup>ab</sup> ± 0,03	8,92 <sup>d</sup> ± 0,13	33,46 <sup>b</sup> ± 0,20
C3	65	35	3,16 <sup>b</sup> ± 0,05	1,57 <sup>ab</sup> ± 0,00	9,87 <sup>a</sup> ± 0,20	38,19 <sup>ab</sup> ± 0,93
C4	35	65	3,10 <sup>b</sup> ± 0,04	1,45 <sup>b</sup> ± 0,04	8,94 <sup>cd</sup> ± 0,23	34,69 <sup>ab</sup> ± 0,24
C5	50	50	3,24 <sup>b</sup> ± 0,08	1,53 <sup>ab</sup> ± 0,07	9,43 <sup>abc</sup> ± 0,22	38,44 <sup>ab</sup> ± 0,51
C6	50	50	3,31 <sup>ab</sup> ± 0,12	1,49 <sup>ab</sup> ± 0,03	9,51 <sup>ab</sup> ± 0,25	36,69 <sup>ab</sup> ± 0,78
C7	50	50	3,14 <sup>b</sup> ± 0,15	1,49 <sup>ab</sup> ± 0,03	9,29 <sup>bcd</sup> ± 0,03	34,45 <sup>ab</sup> ± 0,21
CC	-	100	3,34 <sup>ab</sup> ± 0,09	1,46 <sup>b</sup> ± 0,03	8,87 <sup>d</sup> ± 0,22	33,35 <sup>b</sup> ± 1,66

Legenda: A48h: amêndoas fermentadas até 48h e secas; A144h: amêndoas fermentadas até 144h e secas; C1: Chocolate do ensaio 1; C2: Chocolate do ensaio 2; C3: Chocolate do ensaio 3; C4: Chocolate do ensaio 4; C5: Chocolate do ensaio 5; C6: Chocolate do ensaio 6; C7: Chocolate do ensaio 7; CC: Chocolate do ensaio controle; Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna dos resultados de A48h e A144h indicam diferenças estatísticas significantes para o Teste T ( $p < 0,05$ ); Diferentes letras minúsculas na mesma coluna dos resultados de ensaios de chocolates indicam diferenças estatísticas significantes para o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com Efraim et al. (2010), a secagem ao sol é uma operação simples e bastante utilizada nas fazendas cacauceiras, que favorece a redução da umidade para não propiciar o desenvolvimento de fungos produtores de toxinas nas amêndoas de cacau. O teor de umidade das amêndoas de cacau secas (A48h e A144h), na Tabela 4, enquadram-se no percentual da Instrução Normativa n° 38, de 23 de junho de 2008, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008), a qual estabelece percentual máximo de 8,00% de umidade. Além disso, valores similares foram encontrados por Gouvêa et al. (2015) que analisaram amêndoas de cacau secas ao sol de diferentes variedades, provenientes de fazendas do sul da Bahia, em épocas distintas de colheita. Os valores encontrados pelos autores variaram de 7,05 a 10,72%, sendo que a única amostra com resultado mais elevado, 10,72%, apresentou desenvolvimento de fungos e no seu período de coleta houve maior predominância de chuvas na região, contribuindo para uma umidade maior.

A umidade variou de 3,10 a 3,58% entre os ensaios de chocolates e foram resultados superiores aos encontrados por Lubas et al. (2016), que avaliaram chocolates intensos com variadas proporções de amêndoas de baru (*Dipteryx alata* Vog.), e encontraram valores de 1,215 a 1,771% de umidade. Assim como, Salvi (2018) avaliou chocolates tradicionais e diet, e obteve uma faixa de 1,46 a 2,40%. Os resultados elevados de umidade podem ser devido ao armazenamento sob refrigeração, a 8 °C, onde os chocolates absorveram a umidade do ambiente. Svanberg et al. (2011) abordam que a umidade interage com as partículas sólidas

desnatadas, como as de açúcar e cacau, fazendo com que elas se dissolvam ou inchem, o que também afeta a textura da parte externa do chocolate e o recheio.

Nas análises de cinzas e proteínas revelou-se que os resultados das amêndoas A48h foram superiores em relação às amêndoas A144h. Os teores de cinzas das amêndoas A48h e A144h foram de 3,82 e 2,78%, respectivamente, sendo similares aos resultados obtidos por Afoakwa et al. (2013), que encontraram teores de 2,9 a 3,5% para amêndoas não fermentadas e de 2,3 a 2,9% para amêndoas fermentadas de Gana. Os resultados de proteínas das amêndoas A48h (16,05%) e A144h (14,71%) foram inferiores aos encontrados pelos mesmos autores, de 19,7 a 21,6% para as amêndoas não fermentadas e de 17,6 a 18,8% para as amêndoas fermentadas. Entretanto, Afoakwa et al. (2015) encontraram resultados de proteínas similares aos das amêndoas A48h e A144h, de 15,4% para amêndoas de cacau secas ao sol em 7 dias e de 14,5% para amêndoas secas ao sol em 10 dias. Afoakwa et al. (2013) também abordaram que houve redução dos teores de cinzas e proteínas após a fermentação das amêndoas. As diminuições observadas no conteúdo de proteínas com a fermentação do cacau podem ser devidas à quebra de proteínas durante os processos de fermentação e secagem, ocorrida em parte devido à hidrólise em aminoácidos e peptídeos e em parte por conversão em formas insolúveis pela ação dos polifenóis, bem como perdas por difusão (AFOAKWA et al. 2008; AFOAKWA; PATERSON, 2010). E entre os chocolates verificou-se que os ensaios C1 e C3, com maiores proporções de nibs das amêndoas A48h, obtiveram resultados maiores de cinzas e proteínas, principalmente em relação aos ensaios C4, C2 e CC, com menores proporções de nibs de amêndoas A48h nas composições. Na Tabela 4, os teores de cinzas obtidos foram de 1,45 a 1,60%, sendo resultados similares aos encontrados por Chire-Fajardo et al. (2017), que variaram de 1,25 a 2,29%, em amostras de chocolates de variadas marcas comercializadas no Peru. Entre as proteínas, Roda e Lambri (2019) encontram um teor de 7,20% para chocolate com 56% de cacau, resultado bastante similar aos resultados observados na Tabela 4.

Os lipídios, na Tabela 4, entre as amêndoas A48h e A144h não tiveram diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ), com valores de 48,57 e 45,18%, respectivamente. Estes resultados foram similares aos obtidos por Gu et al. (2013), que variou de 39,24 a 53,67% em amêndoas de cacau fermentadas e secas de diferentes origens geográficas (Papua Nova Guiné, Indonésia e China). Estes mesmos autores relataram que os lipídios são o principal componente das amêndoas de cacau, compreendendo entre 53% a 58% do peso seco do cotilédone, entretanto, os valores variam de acordo com as amostras, origens geográficas e clima. Os lipídios nos ensaios de chocolates variaram de 33,35 a 39,55%. Uma diferença de 18,48% entre os ensaios controle (CC) e o ensaio com maior proporção de nibs de amêndoas fermentadas até 48h (C1). Foram

resultados semelhantes aos encontrados por Vasquez et al. (2019), que variaram de 34,8 a 44,3% de lipídios em chocolates comerciais de 41 a 73,5% de conteúdo de cacau.

## 6. Conclusão

Este estudo evidenciou que nas análises físico-químicas, os teores de umidade das amêndoas estavam condizentes com a legislação brasileira, entretanto os teores dos chocolates obtiveram valores elevados a outros estudos devido à absorção de umidade durante o armazenamento sob refrigeração. Os resultados mostraram que o tempo de fermentação das amêndoas de cacau influenciou no perfil de cinzas, proteínas e lipídios das amêndoas de cacau e entre os chocolates. Sendo encontrados teores mais elevados nos ensaios com maiores proporções de nibs de amêndoas fermentadas até 48h.

## 7. Referências

ABDULAI, I.; VAAST, P.; HOFFMANN, M. P.; ASSARE, R.; JASSOGNE, L.; ASTEN, P. V.; RÖTTER, R. P.; GRAEFE, S. Cocoa agroforestry is less resilient to sub-optimal and extreme climate than cocoa in full sun. **Global Change Biology**, v. 24, ed. 1, pag. 273-286, jan. 2018.

ACULEY, P. C.; SNITKJAER, P.; OWUSU, M.; BASSOMPIERE, M.; TAKRAMA, J.; NORGAARD, L.; PETERSEN, M. A.; NIELSEN, D. S. Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics, **Journal of Food Science**, v. 75, ed. 6, S300-7, ago. 2010.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavour formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 48, pág. 840–857, 2008.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A. Cocoa fermentation: chocolate flavour quality. Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food. **Taylor & Francis Publishing Inc.**, Oxford, U.K, pág. 457–468, 2010.

AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; TAKRAMA, J. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. **J Food Sci Technol**, v. 50, pág. 1097–1105, 2013.

AFOAKWA, E. O.; KONGOR, J. E.; BUDU, A. S.; MENSAH-BROWN, H.; TAKRAMA, J. F. Changes in some biochemical qualities during drying of pulp pre-conditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 15, n. 1, 9651+, 2015.

ALEXANDRE, R. et al. Caracterização de Frutos de Clones de Cacaueiro na Região Litorânea de São Matheus, ES. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 8, p. 785 - 790, 2015.

ALTGELD, T. Mehr Prävention und Gesundheitsförderung kann nur vor Ort realisiert werden. **Präv Gesundheitsf**, v. 1, pag.24–32, 2006.

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 237-43, 2002.

AMIGO, F. V.; LIMA, G. P.; SALES, J. H.; ESTIVAL, K. G. Inovação tecnológica na secagem do cacau: Um estudo de viabilidade econômica e barreira de entrada. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 4, 2017.

ANDRÉS-LACUEVA, C.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R. L.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; JOSEPH, J. A. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. **Nutr. Neurosci.**, v. 8, pag. 111-120, 2005.

ASCRIZZI, R.; FLAMINI, G; TESSIERI, C; PISTELLI, L. From the raw seed to chocolate: Volatile profile of *Blanco de Criollo* in different phases of the processing chain. **Microchemical Journal**, v. 133, pag. 474-479, jul. 2017.

ASIF, A.; FAROOQ, U.; AKRAM, K.; HAYAT, Z; SHAFI, A.; SARFRAZ, F.; SIDHU, M. A. I.; REHMAN, H.; AFTAB, S. Therapeutic potentials of bioactive compounds from mango fruit

wastes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, pag. 102-112, jul. 2016.

BECKETT, S. T. *The Science of Chocolate*. **Royal Society of Chemistry**, ed. 2, Cambridge, 2008, 234 p.

BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 4. ed. London: Wiley-Blackwell. 2009. 720 p.

BEG, M. S.; AHMAD, S.; JAN, K.; BASHIR, K. Status, supply chain and processing of cocoa – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, pag. 108-116, ago. 2017.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BRUNETTO, M. R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A., GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. 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, p. 459–467, 2007.

BUTTERFIELD, D. A.; CASTEGNA, A.; POCERNICH, C. B.; DRAKE, J.; SCAPAGNINI, G.; CALABRESE, V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, ed. 8, pag. 444-461, 2002.

CARR, M. K. V.; LOCKWOOD, G. The water relations and irrigation requirements of cocoa (*Theobroma Cacao* L.): A review. **Experimental Agriculture**, v. 47, pag. 653–676, 2011.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, ed. 1, pag. 223S-229S, 2005.

CHIRE-FAJARDO, G. C.; VALDIVIA-ARRUNATEGUI, R. A.; ORIHUELA-RIVERA, C. A.; UREÑA- PERALTA, M. O. Avaliação da qualidade física e físico-química dos principais

chocolates comercializados no Peru. **Acta Agron.**, Palmira, v. 66, n. 2, p. 164-171, junho de 2017.

CHRYSOCHOU, P. Food health branding: the role of marketing mix elements and public discourse in conveying a healthy brand image. **Journal of Marketing Communications**, v. 16, N° 1-2, pag. 69-85, 2010.

CHUGH, B.; KAMAL-ELDIN, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, v. 32, pag. 76-82, abril 2020.

COE, S.D.C.; COE, M.D. *The True History of Chocolate*, Thames & Hudson Ltd, London, UK (2007).

CROSS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J. C. Recherche d'un índice de fermentation du cacao. **Café, Cacao Thé**, v. 16, n. 2, p. 109-13, 1982.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, ed. 8, pag. 1001-1043, 2009.

CROZIER, S.; PRESTON, A.; HURST, J.; PAYNE, M.; MANN, J.; HAINLY, L. Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. **Chemistry Central Journal**, v. 5, p. 5, 2011.

CRUZ, M.D.L.; WHITKUS, R.; GÓMEZ-POMPA, A.; MOTA-BRAVO, L. Origins of cacao cultivation. **Nature**, 375, pp. 542-543, 1995.

DALIRI, Eric Banan-Mwine; CHOI, Sun-Il; CHO, Bong-Yeon; JO, Hyeon Yeong; KIM, Se-Hun; CHELLIAH, Ramachandran; RUBAD, Momna; KIM, Joong-Hark; OH, Hyun-Taek; LEE, Ok-Hwan; OH, Deog-Hwan; Biological activities of a garlic-*Cirsium setidens* Nakai blend fermented with *Leuconostoc mesenteroides*. **Food Science & Nutrition**, v. 7, ed. 6, pag. 2024-2032, jun. 2019.

DALY, J. W. Caffeine and analogues: Biomedical impact. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, pag. 2153-2169, 2007.

DE SENA, A. R.; Aparecida de Assis, S.; Branco, A. Analysis of theobromine and related compounds by reversed phase High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection: An update (1992–2011). **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, pag. 413-423, 2011.

DI MATTIA, C.; MARTUSCELLI, M.; SACCHETTI, G.; BAHAYDT, B.; MATSROCOLA, D.; PITTIA, P. Effect of different conching processes on procyanidins content and antioxidant properties of chocolate. **Food Research International**, v. 63, pag. 367-372, 2014.

DIMICK, P. S.; HOSKIN, J. M. Chemico-physical aspects of chocolate processing- a review. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 14, ed. 4, pag. 269-282, 1981.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, pag. 1085-1097, 1995.

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

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, Jul-Set. 2011.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, ed. 6, pag. 561-568, set. 2010.

FERREIRA, A. C. R.; AHNERT, D.; NETO, B. A. M.; MELLO, D. L. N. Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade. Instituto Cabruca. Ilhéus, Bahia, 2013, 52p.

FERRI, C.; DESIDERI, G.; FERRI, L.; PROIETTI, I.; DI AGOSTINO, I.; MARTELLA, L.; MAI, F.; DI GIOSIA, P.; GRASSI, D. Cocoa, blood pressure, and cardiovascular health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, ed. 45, pag. 9901-9909, 2015.

FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. Cocoa glycosidase and color changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, n. 9, p. 505-9, 1957.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, ed. 8, pag 663-673, jan. 2000.

GOTHAI, S.; GANESAN, P.; PARK, S.-Y.; FAKURAZI, S.; CHOI, D.-K.; ARULSELVAN, P. Natural phyto-bioactive compounds for the treatment of type 2 diabetes: Inflammation as a target. **Nutrients**, v. 8, ed. 8, p. 461, 2016.

GOUVÊA, A. A. L.; DANTAS, E. A.; LEAL, I. L.; MACHADO, B. A. S. Caracterização de amêndoas de cacau coletadas em diferentes períodos de colheita. In: WORKSHOP DE PESQUISA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO - PTI, 5., SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - SIINTEC, 1., 2015, Salvador. Anais... Salvador: SENAI/CIMATEC, 2015. p. 103-110.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; CROCE, G.; TIBERTI, S.; AGGIO, A.; FERRI, C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, ed. 10, pag. 1072– 1084, 2009.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; DI GIOSIA, P.; DE FEO, M.; FELLINI, E.; CHELI, P.; FERRI, L.; FERRI, C. Tea, flavonoids, and cardiovascular health: endothelial protection, **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, ed. 6, pag. 1660S– 1666S, 2013.

GU, F. ; TAN, L. ; WU, H. ; FANG, Y. ; XU, F. ; CHU, Z. ; WANG, Q. Comparação de grãos de cacau da China, Indonésia e Papua Nova Guiné. **Foods**, v. 2 , pag. 183-197, 2013.

GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M.; BERKTAŞ, İJLAL; ÖZÇELİK, BERAAT. 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, pag. 252-259, mar. 2016.

HIDALGO, F.J.; ZAMORA, R. The role of lipids in non-enzymatic browning. **Grasas Aceites**, v. 51, pag. 35-49, 2000.

ICCO (2017). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLIII – No. 2 – Cocoa year 2016/2017. Acesso em 20 mar. 2020. Disponível em: <https://www.icco.org/about-us/icco-news/380-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics-november-2017.html>.

IMRAN, M.; AHMAD, N.; ANJUM, F. M.; KHAN, M. K.; MUSHTAQ, Z.; NADEEM, M. Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. **Nutrition Journal**, v. 14, ed. 1, jul. 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 4. ed. 1. ed. Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020p.

JAFFERY, E. H.; BROWN, A. F.; KURILICH, A. C.; KEEK, A. S.; MATUSHESKI, N.; KLEIN, B. P. Variation in content of bioactive components in broccoli. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, pag. 323-330, 2003.

KATZ, D. L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxid. Redox Signal**, v. 15, pag. 2779-2811, 2011.

KEALEY, K. S.; SNYDER, R. M., ROMANCZYK, L. J.; HAMMERSTONE, J. F.; BUCK, M. M.; CIPOLLA, G. G. Method for producing fat and/or solids from beans and compositions containing polyphenols. **US Patent Application** 2004/0058022, Mars Incorporated, USA, 2004.

KEALEY, K. S.; SNYDER, R. M.; ROMANCZYK, L. J.; GEYER, H. M.; MEYERS, M. E.; WHITHCARE, E. J.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. **Cocoa Components, Edible**

**Products Having Enhanced Polyphenol Content, Methods of Making Same and Medical Uses.** WO n. PI 98/09533. 1998.

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

KHAN, M.; LIU, H.; WANG, J.; SUN, B. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advanced glycation end products: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 130, 108933, abril 2020.

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

KOSINSKA, A.; ANDLAUER, W. Cocoa polyphenols are absorbed in Caco-2 cell model of intestinal epithelium. **Food Chemistry**, v. 135, ed. 3, pag. 999-1005, dez. 2012.

KREIBICH, H. H. **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. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis, Santa Catarina, 168 p., 2016.

KYI, T. M.; DAUD, W. R. W.; MOHAMMAD, A. B.; WAHID SAMSUDIN, M.; KADHUM, A. A. H.; TALIB, M. Z. M. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 40, pag. 323-331, 2005.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TORNERO, A. Health effects of cocoa flavonoids. **Food Sci Tech Int**, v. 11, pag. 159-176, 2005.

LECUMBERRI, E.; MATEOS, R.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; RUPÉREZ, P.; GOYAA, L.; BRAVO, L. Dietary fiber composition, antioxidant capacity and physicochemical properties of

a fiber rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 104, p. 948-54, 2007.

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E. S. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, ed. 8, pag. 709-719, ago. 2016.

LUBAS, C. C. S.; CÂNDIDO, C. J.; SOUZA, S. V. S.; GUIMARÃES, R. C. A. Qualidade nutricional de barras de chocolate adicionadas de castanhas de baru. **Multitemas**, Campo Grande, MS, v. 21, n. 49, p. 181-192, jan./jun. 2016.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, 125124, nov. 2019.

MANACH, C.; DONOVAN, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radical Research**, v. 38, ed. 8, pag. 771-785, 2004.

MARTÍN, M. A.; RAMOS, S. Cocoa polyphenols in oxidative stress: Potential health implications. **Journal of Functional Foods**, v. 27, pag. 570-588, dez. 2016.

MARTÍN, M. A.; RAMOS, S. Health beneficial effects of cocoa phenolic compounds: a mini-review. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, pag 20-25, abr. 2017.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SARRIÁ, B; GÓMEZ-JUARISTI, M.; GOYA, L.; MATEOS, R.; BRAVO-CLEMENTE, L. Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. **Food Research International**, v. 63, parte C, pag. 446-455, set. 2014.

MARTINS, J. M.; SANTOS, J. H. F.; SILVA, W. S. DA; SILVA, V. B.; ARRUDA, J. A. P. DE; NASCIMENTO, J. A. R.; DORTAS, L. C.; FREITAS, A. J. A.; RAMOS, A. A. Melhoria da Qualidade do Cacau. Ilhéus. CEPLAC/CENEX. 2012, 45p.

- MARTINS, RENATA. DOSSIÊ TÉCNICO: Processamento de chocolate. REDETEC – Rede de tecnologia do Rio de Janeiro, 2007.
- MELLOR, D. D.; SATHYAPALAN, T.; KILPATRICK, E. S.; BECKETT, S.; ATKIN, S. L. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in type 2 diabetes patients. **Diabetic Medicine**, v. 27, pág. 1318-1321, 2010.
- MITCHELL, E. S.; SLETTENAAR, M., MEER, N.; TRANSLER, C.; JANS, L.; QUADT, F. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. **Physiology & Behaviour**, v. 104, pag. 816-822, 2011.
- MORALES, J.F.; SOMOZA, V.; FOGLIANO, V. Physiological relevance of dietary melanoidins. **Amino Acids**, v. 42, pag. 1097-1109, 2012.
- MOTAMAYOR, J. C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J. W. S.; LOOR, R.; KUHN, D. N. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). **PLoS ONE**, Chicago, v. 10, n. 3, 2008.
- NASCIMENTO, M. D.; BRUM, D. M.; PENA, P. O.; BERTO, M. I.; EFRAIM, P. Inactivation of *Salmonella* during cocoa roasting and chocolate conching. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, ed. 3, pag. 225-229, out. 2012.
- NEVES, P. D. O. **Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 93 p, 2015.
- NIEMENAK, N. et al. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6, p. 612-619, 2006.
- OFORI, A. et al. Genetic variation for vigour and yield of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in Ghana. **Scientia Horticulturae**, v. 213, p. 287–293, 2016.

OZEN, A. E.; PONS, A.; TUR, J. A. Worldwide consumption of functional foods: A systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 70, ed. 8, pag. 472– 481, 2012.

PAPALEXANDRATOU, Z.; KAASIK, K.; KAUFFMANN, L. V.; SKORSTENGAARD, A.; BOUILLON, G.; ESPENSEN, J. L.; HANSEN, L. H.; JAKOBSEN, R. R.; BLENNOW, A.; KRYCH, L.; CASTRO-MEJÍA, J. L.; NIELSEN, D. S. Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 304, pag. 106-118, set. 2019.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. Fast access of some grape pigments to the brain. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, pag. 7029-7034, 2005.

PEREIRA, G. V. M.; PEDROZO, M. G. C.; RAMOS, M. C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and Physicochemical Characterization of Small-Scale Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains to Develop a Defined Starter Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, ed. 15, pag. 5395-5405, jul. 2012.

PIRES, J. L. **Avaliação Quantitativa e Molecular de Germoplasma para o Melhoramento de Cacaueiro com Ênfase na Produtividade, Qualidade dos Frutos e Resistência à Doenças. 2003.** 226 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PIVA, A.; DI MATTIA, C.; NERI, L.; DIMITRI, G.; CHIARINI, M.; SACCHETTI, G. Heat-induced chemical, physical and functional changes during grape must cooking. **Food Chemistry**, v. 106, pag. 1057-1065, 2008.

PORKKA-HEISKANEN, T.; ZITTING, K. M.; WIGREN, H. K. Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances. **Acta Physiologica**, v. 208, ed. 4, pag. 311-328, 2013.

PRAKASH, M.; BASAVARAJ, B. V.; MURTHY, K. N. C. Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, pag. 14-24, jan. 2019.

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

RIZO, D. C. Barry Callebaut confirma el poder de los polifenoles en el chocolate. **Dulcelandia**, v. 65, n. 789, p. 33-7, 2006.

RODA, A.; LAMBRI, M. Changes in Antioxidants and Sensory Properties of Italian Chocolates and Related Ingredients Under Controlled Conditions During an Eighteen-Month Storage Period. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 2719, 2019.

ROHAN, T. A.; CONNEL, M. The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of Food Science**, v. 29, n. 4, p. 460-3, 1964.

RÝDLOVÁ, L.; PRCHALOVÁ, J.; ŠKORPILOVÁ, T.; ROHLÍK, B.; ČÍŽKOVÁ, H.; RAJCHL, A. Evaluation of cocoa products quality and authenticity by DART/TOF-MS. **International Journal of Mass Spectrometry**, 116358, mai. 2020.

SACCHETTI, G.; IOANNONE, F.; DE GREGORIO, M.; DI MATTIA, C.; SERAFINI, M.; MASTROCOLA, D. Non enzymatic browning during cocoa roasting as affected by processing time and temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 169, pag. 44-52, jan. 2016.

SAKHAROV, I. Y.; ARDILA, G. B. Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. **Food Chemistry**, v. 65, pag. 51-54, 1999.

SALVI, Letícia de Freitas. **Avaliação sensorial e físico-química de chocolates tipos tradicional e diet**. 2018. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, pag. 1-17, 2004.

SERAFINI, M.; BUGIANESI, R.; MAIANI, G.; VALTUENA, S.; DE SANTIS, S.; CROZIER, A. Plasma antioxidants from chocolate. **Nature**, v. 424, ed. 6952, pag. 1013–1013, 2003.

SOARES, M. S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através de ação enzimática durante a fermentação**. 2001. 107f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SOKOLOV, A. N.; PAVLOVA, M. A.; KLOSTERHALFEN, S.; ENCK, P. Chocolate and the brain: Neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, ed. 10, parte 2, pag. 2445-2453, dez. 2013.

SUAZO, Y.; DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I. Effect of Fermentation and Roasting on the Phenolic Concentration and Antioxidant Activity of Cocoa from Nicaragua. **Journal of Food Quality**, v. 37, ed. 1, pag. 50-56, fev. 2014.

SULISTYOWATI, M.; MISNAWI, J. Effects of alkali concentration and conching temperature on antioxidant activity and physical properties of chocolate. **International Food Research Journal**, v. 15, pag. 297-304, 2008.

SVANBERG, L., AHRNÉ, L., LORÉN, N. e WINDHAB, E. A method to assess changes in mechanical properties of chocolate confectionery systems subjected to moisture and fat migration during storage. **Journal of Texture Studies**, v. 43, pag. 106-114, 2012.

TEH, Q. T. M.; TAN, G. L. Y.; LOO, S. M.; AZHAR, F. Z.; MENON, A. S. HII, C. L. The Drying Kinetics and Polyphenol Degradation of Cocoa Beans. **Journal of Food Process and Engineering**, v. 39, ed. 5, pag 484-491, out. 2016.

TEYE, E.; ANVIDOHO, E.; AGBEMAFLE, R.; SAM-AMOA, L. K.; ELLIOT, C. Cocoa bean and cocoa bean products quality evaluation by NIR spectroscopy and chemometrics: A review. **Infrared Physics & Technology**, v. 104, 103127, jan. 2020.

TOKER, O. S.; PALABIYIK, I.; KONAR, N. Chocolate quality and conching. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, pag. 446-453, set. 2019.

- TORRES-MORENO, M.; TORRESCASANA, E.; SALAS-SALVADÓ, J.; BLANCH, C. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. **Food Chemistry**, v. 166, pag. 125-132, jan. 2015.
- TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, ed. 12, pag. 1231-1246, 2010.
- VÁSQUEZ, C.; HENRÍQUEZ, G.; LÓPEZ, J. V.; PENOTT-CHANG, E. K.; SANDOVAL, A. J.; MÜLLER, A. J. The effect of composition on the rheological behavior of commercial chocolates. **LWT**, v. 111, pág. 744-750, ago. 2019.
- VAUZOUR, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; CORONA, G.; ORUNA-CONCHA, M. J.; SPENCER, J. P. Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**, v. 2, ed. 11, pag. 1106-1131, 2010.
- VAUZOUR, D.; VAFEIADOU, K.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; RENDEIRO, C.; SPENCER, J. P. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. **Genes Nutr.**, v. 3, pag. 115-126, 2008.
- WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, pag. 423-447, 2000.
- XIE, Y.; CHEN, X. Structures required of polyphenols for inhibiting advanced glycation end products formation. **Current drug metabolism**, v. 14, ed. 4, pag. 414-431, 2013.
- XIE, Y.; XIAO, J.; KAI, G.; CHEN, X. Glycation of plasma proteins in type II diabetes lowers the non-covalent interaction affinities for dietary polyphenols. **Integrative Biology**, v. 4, ed. 5, pag. 502-507, 2012.

**CAPÍTULO II****Influência da mistura de nibs de cacau com diferentes níveis de fermentação nas propriedades antioxidantes de chocolates**

## **Influência da mistura de nibs de cacau com diferentes níveis de fermentação nas propriedades antioxidantes de chocolates**

**Margarida Lins da Cruz<sup>1\*</sup>, Aurora Britto de Andrade<sup>1</sup>, Pedro Paulo Lordelo Guimarães Tavares<sup>1</sup>, Leonardo Fonseca Maciel<sup>1</sup>, Eliete da Silva Bispo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Bairro Ondina, CEP: 40171-970, Salvador, Bahia, Brasil. \*margaridalinss@gmail.com

### **1. Resumo**

A busca por alimentos com alegação de propriedade funcional tem aumentado devido à crescente conscientização do consumidor sobre a relação entre dieta e saúde, sendo que o cacau, principal matéria-prima do chocolate, possui uma variedade de compostos bioativos que podem ajudar a diminuir o risco de doenças devido à sua atividade antioxidante. Neste sentido, empregou-se o planejamento simplex, com diferentes proporções de amêndoas fermentadas até 48 e 144h, para produzir os chocolates com 66,3% de teor de cacau. Avaliou-se os teores de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, teobromina, epicatequina, catequina e cafeína (HPLC-UV-Vis) e atividades antioxidantes por DPPH, FRAP e CUPRAC nas amêndoas de cacau subfermentadas e fermentadas, nibs e chocolates. Entre os ensaios analisados observou-se uma variação de compostos bioativos, sendo encontrado maiores concentrações nas amostras com maiores proporções de amêndoas subfermentadas. A quantificação por HPLC identificou a teobromina como o principal componente entre todos os ensaios estudados. Assim como, entre os métodos das atividades antioxidantes, todos os métodos se correlacionaram perfeitamente com os resultados dos compostos bioativos monoméricos. Por isso, esse estudo comprovou que o uso das amêndoas subfermentadas na produção de chocolates favoreceu no aumento de compostos bioativos, possibilitando na elevação da potencialidade funcional dos chocolates produzidos.

Palavras-chave: Amêndoas fermentadas, amêndoas subfermentadas, fenólicos, flavonoides.

## 2. Introdução

Os alimentos que ingerimos desempenham um papel importante na capacidade de manter em equilíbrio a saúde física, mental, emocional e psicológica. Além disso, a conscientização do conteúdo de nosso consumo é o primeiro passo para uma dieta mais saudável e, portanto, um corpo mais saudável (BISHT, 2020). Por isso, têm aumentado o consumo de alimentos com alegação funcional devido à crescente conscientização do consumidor sobre a relação entre dieta e saúde (CHENG et al., 2018). Alimentos como vegetais, frutas e grãos integrais são ricos em compostos fitoquímicos, como os compostos fenólicos que podem fornecer benefícios à saúde além do valor nutricional básico (XU et al., 2019; AKHTAR et al., 2011; ALU'DATT et al., 2012; BALESTRA et al. 2011; SEIDEL et al. 2007).

Os compostos fenólicos de plantas têm sido extensivamente estudados devido às suas atividades bioativas, como as propriedades antioxidantes, e os seus potenciais benefícios à saúde, como efeitos protetores contra o câncer e doenças cardiovasculares (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015; LI et al. 2020; ZHENG; WANG, 2001; DERAKHSHAN et al., 2018; QIN et al. 2019). Há evidências crescentes de que o consumo de uma variedade de compostos fenólicos presentes nos alimentos pode diminuir o risco destas doenças devido à sua atividade antioxidante (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Assim, o cacau (*Theobroma cacao*) é um fruto que contém muitos compostos bioativos, principalmente metilxantinas (como teobromina e cafeína) e compostos fenólicos não flavonoides e flavonoides, principalmente da subfamília flavanol, incluindo (-)-epicatequina, catequinas e procianidinas (BARRIOS et al., 2018). Estes compostos possuem propriedades antioxidantes e são considerados como tendo potenciais efeitos benéficos à saúde, e atuam principalmente na prevenção de doenças humanas crônicas, incluindo câncer, obesidade, diabetes e doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (KATZ et al., 2011). Entretanto, o conteúdo fenólico das amêndoas de cacau cruas difere substancialmente do cacau torrado, cacau em pó, liquor de cacau ou chocolate (JOLIC, et al., 2011). Além disso, a concentração depende da variedade das amêndoas de cacau (genótipo), grau de maturação, processamento e armazenamento (NAZARUDDIN, et al., 2006). Cada etapa do processamento do cacau modifica sua composição química (AFOAKWA et al., 2008), sendo a fermentação considerada uma das principais etapas que afetam o conteúdo fenólico, e as sementes podem ser fermentadas sob uma variedade de condições, dependendo das características de sabor desejadas do produto final (COOPER et al., 2007).

As sementes do cacau são as principais matérias-primas para a produção de chocolate e durante a fermentação, estas são expostas à ação de vários microrganismos e enzimas sobre carboidratos, proteínas, lipídios e compostos fenólicos, que podem determinar a qualidade dos produtos à base de chocolate e cacau (BRITO, et al. 2017; SCHWAN; WHEALS, 2004). Os compostos fenólicos podem ser perdidos das sementes de cacau durante a fermentação por lixiviação com o exsudato de fermentação e também devido à atividade da polifenoloxidase, que pode ser facilmente percebida pelo aspecto marrom das amêndoas de cacau fermentadas (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; CAMU et al., 2008; LUNA et al., 2002; BRITO, et al. 2017).

A influência da fermentação no teor de compostos fenólicos de amêndoas de cacau foi estudada por Efraim et al. (2010), sendo que após os primeiros 3 dias de fermentação, houve uma diminuição de 35% no conteúdo fenólico e, após 7 dias de fermentação, apenas manteve-se 45% do conteúdo fenólico original. Na etapa de secagem, as amêndoas são secas ao sol ou artificialmente, dependendo do clima das áreas de cultivo, e a perda de polifenóis continua principalmente quando os grãos são secos artificialmente (EFRAIM et al., 2010; SUAZO, et al., 2014). As etapas de torrefação e conchagem envolvem altas temperaturas que garantem a oxidação e polimerização de polifenóis, degradação de proteínas, reações de *Maillard*, evaporação de compostos indesejáveis e, ao mesmo tempo, o desenvolvimento de compostos desejáveis que impactam favoravelmente no sabor do produto acabado (OWUSU et al., 2013).

Até o momento ainda não foram produzidos chocolates com massa de cacau de diferentes períodos de fermentação e para abordar essa lacuna, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da adição de diferentes proporções de nibs de amêndoas de cacau subfermentadas nos teores de compostos bioativos e nas propriedades antioxidantes dos chocolates produzidos.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material

As amêndoas de cacau multivarietais foram provenientes de uma fazenda localizada entre as cidades de Ilhéus e Uruçuca, no sul da Bahia, Brasil (latitude 14° 42' 59.0" S e longitude 39° 11' 56.4" W). A colheita dos frutos foi realizada obedecendo o ponto de maturação. Estes foram abertos manualmente e as sementes com polpa foram submetidas imediatamente à fermentação. O processo fermentativo foi realizado na própria fazenda produtora de cacau, seguindo procedimento adotado pelo produtor. A fermentação foi realizada em cochos de madeira, de dimensões 60 cm x 70 cm x 60 cm, com furos no fundo de 1 cm de diâmetro a cada 5 cm. A operação foi produzida em dois lotes de 40 kg de sementes com polpa, sob as seguintes condições:

- Fermentação até 48 horas;
- Fermentação até 144 horas.

No estudo de Melo et al. (2020) verificou-se que com 48h de fermentação observou-se elevadas concentrações de compostos bioativos. Durante a fase inicial da fermentação há predominância de leveduras e bactérias lácticas, que prosperam em ambiente rico em açúcar, ácido e anaeróbico. Após 48h há o aumento da temperatura e da acidez da massa de cacau, causando a morte do embrião da semente, que perde a capacidade de germinar e, conseqüentemente, ocorre a liberação de enzimas endógenas importantes para a formação de precursores de sabor, como aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores (CRAFAK et al., 2013). Por outro lado, a partir deste período ocorre a diminuição do conteúdo fenólico total principalmente pela degradação dos flavanois, procianidinas e antocianinas devido à oxidação enzimática (ORACZ et al., 2015). Para a formação destes precursores de aroma no chocolate, o período de 48h seria um momento adequado para interromper a fermentação e, por isso, utilizou-se estas amêndoas como matéria-prima na produção dos chocolates com maiores teores de compostos bioativos.

Após a fermentação, as amêndoas de cada lote foram secas ao sol, em mesas de aço inox, durante 5 a 7 dias, até umidade final menor que 8%. As amostras das amêndoas subfermentadas (até 48 horas de fermentação) e fermentadas (até 144 horas de fermentação) foram transportadas para a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, onde

foram estocadas em freezer, a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até realização das análises. Após a classificação pelo teste de corte, as amêndoas secas foram torradas ( $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 25 min) e as testas foram retiradas para obtenção dos nibs.

Neste estudo, todas as análises foram elaboradas em triplicata. As análises de teste de corte e índice de fermentação foram feitas somente nas amêndoas fermentadas e secas. E para todas as amostras estudadas (amêndoas fermentadas e secas, nibs e chocolates) foram realizados os procedimentos de desengorduramento, preparo dos extratos fenólicos, determinações dos teores de compostos fenólicos, flavonoides totais, antocianinas totais, identificação e quantificação por HPLC de compostos fenólicos e metilxantinas e determinações das atividades antioxidantes (DPPH, FRAP e CUPRAC).

### **3.2. Teste de Corte**

Após as etapas de fermentação e secagem, uma quantidade de cem amêndoas foram coletadas aleatoriamente do lote de cada ensaio e submetidas ao teste de corte. Este teste foi realizado através do corte em seção longitudinal para avaliar os defeitos de cada amêndoa de acordo com a coloração do cotilédone e o grau de fermentação. Os resultados do teste de corte foram expressos em porcentagem e a classificação das amêndoas foi avaliada de acordo com a Instrução Normativa n° 38, de 23 de junho de 2008, do MAPA (BRASIL, 2008), que define o padrão oficial da amêndoa de cacau, considerando seus requisitos de identidade e qualidade, amostragem, apresentação, marcação e rotulagem, nos aspectos referentes à classificação do produto.

### **3.3. Desengorduramento das amostras**

As análises de compostos bioativos são influenciadas pela natureza do composto, do método de extração empregado, do tamanho da amostra, do tempo e das condições de estocagem, do padrão utilizado e a presença de interferentes tais como gorduras, ceras, terpenos e clorofilas (ANGELO; JORGE, 2007). Por isso foi realizado o desengorduramento das amostras de acordo com a metodologia de Oliveira et al. (2011). Para o procedimento, 2 g de amostra foi pesado em tubo de falcon de 15 mL, em seguida, adicionou-se 6 mL de éter de petróleo, agitou-se por 5 min em vórtex (Phoemix, modelo AP-56), centrifugou-se (Mikro 220R, Lettich zenthifugen) a 6000 rpm, a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  e por 25 min. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se mais 6 mL de éter de petróleo e repetiu-se o procedimento mais cinco vezes. Cada

amostra foi armazenada sob congelamento, a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em tubos de eppendorfs, até momento de preparo dos extratos fenólicos para as análises. As amostras desengorduradas de amêndoas de cacau fermentadas e secas, nibs e chocolates foram utilizadas na análise de índice de fermentação e no preparo dos extratos fenólicos.

### 3.4. Índice de fermentação (IF)

Esta análise foi utilizada de acordo com a metodologia de Gourieva e Tserrevitinov (1979), com algumas modificações. Neste procedimento, adicionou-se 10 mL de solução de metanol:HCl (97:3, v/v) a 20 mg de amêndoas de cacau desengorduradas. Em seguida, homogeneizou-se em vórtex por um minuto e armazenou-se sob refrigeração, a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de 18 a 20 horas. Logo após, filtrou-se a amostra com papel de filtro (Qualy 11,0 J.Prolab) e realizou-se as leituras em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51) nas absorvâncias de 460 nm e 530 nm com a solução filtrada. Os IFs foram obtidos através da razão entre as leituras de absorvâncias de 460 e 530 nm, conforme a Equação 1, abaixo.

$$\text{IF} = \frac{\text{Absorvância a } 460 \text{ nm}}{\text{Absorvância a } 530 \text{ nm}} \text{(Equação 1)}$$

### 3.5. Torrefação

As amêndoas fermentadas e secas foram distribuídas em bandejas perfuradas e submetidas à torrefação em estufa de circulação forçada (DeLeo, tipo A35EAF8, número 0612), a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 25 min. Em seguida, os nibs foram obtidos após descascamento manual, sendo armazenados em embalagem à vácuo e sob congelamento, a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento de produção dos ensaios de chocolate.

### 3.6. Proporção das misturas de nibs para produção dos chocolates

As misturas de nibs de cacau foram desenvolvidas empregando um planejamento simplex, com dois fatores, sendo as variáveis independentes  $X_1$ , correspondendo à porcentagem de nibs de amêndoas de cacau fermentadas até 48h, e  $X_2$ , correspondendo à porcentagem de nibs de amêndoas de cacau fermentadas até 144h. Os níveis variaram de 20% a 80%, totalizando 7 ensaios com 3 pontos centrais (Tabela 1).

Tabela 1. Matriz do planejamento simplex com valores reais das variáveis.

Ensaio	X <sub>1</sub> (%)	X <sub>2</sub> (%)
1	80	20
2	20	80
3	65	35
4	35	65
5 (pc)	50	50
6 (pc)	50	50
7 (pc)	50	50

Legenda: X<sub>1</sub>: Nibs de amêndoas subfermentadas; X<sub>2</sub>: Nibs de amêndoas fermentadas; pc: Pontos centrais.

### 3.7. Produção dos chocolates

Todos os chocolates produzidos continham 66,3% de teor de cacau na formulação, devido a soma das porcentagens de nibs e manteiga de cacau, e um ensaio controle foi formulado com 100% de nibs de amêndoas fermentadas. Foram produzidos 2 kg de cada ensaio com 61,00% de mistura de nibs, 5,30% de manteiga de cacau, 33,35% de açúcar e 0,35% de lecitina de soja. Cada ingrediente foi adicionado nesta ordem ao moinho de pedra (Melanger Spectra 11) que realizou o refino e a conchagem por 24h. Após este período, metade da mistura foi despejada em superfície de mármore para iniciar a etapa de temperagem, para a formação de cristais estáveis de gordura que contribuem para uma superfície de brilho e resistência mecânica suficiente para gerar uma quebra ruidosa (*snap*) no chocolate. Esta etapa consistiu em mesclar a mistura, com auxílio de espátulas, até 28 °C, em seguida, despejou-se a outra metade da mistura e agitou-se até que a temperatura atingisse 32 °C. Imediatamente, o chocolate foi moldado em fôrmas de acrílico, com moldes de barras de 7 g de peso cada, e mantidos sob refrigeração, a 8 °C, por 2h, para serem embalados em papel alumínio e, em seguida, armazenados sob refrigeração, a 8 °C, até o momento das análises.

### 3.8. Preparação dos extratos fenólicos

A metodologia foi de acordo com Oliveira et al. (2011), onde 10 mL de solução de metanol (80%) foi adicionado a tubo de falcon contendo 100 mg de amostra desengordurada. Em seguida, homogeneizou-se cada tubo de amostra em vórtex (Phoemix, model AP-56), por

5 min, e centrifugou-se (Mikro 220R, Lettich zenthifugen) a 6000 rpm, a 22 °C e por 25 min. O sobrenadante foi recolhido para frasco âmbar e utilizado para as análises logo em seguida.

### **3.9. Determinação de compostos fenólicos**

A análise dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, descrito por Swain e Hillis (1959). No qual, 20 µL de extrato fenólico, 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% e 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% foram misturados. Após duas horas, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51), a 760 nm. Para quantificação foi utilizada uma curva de calibração de epicatequina (Sigma-Aldrich, de 0,06 a 1,00 mg.mL<sup>-1</sup>). Os compostos fenólicos foram expressos em miligrama equivalente de epicatequina por grama de amostra (mgEPI.g<sup>-1</sup>).

### **3.10. Determinação de flavonoides totais**

Os flavonoides totais foram quantificados segundo a metodologia de Lee et al. (2003), na qual, 4 mL de água destilada, 20 µL de extrato fenólico e 0,3 mL de solução de nitrito de sódio 5% foram homogeneizados em tubo de ensaio. Após 5 min, adicionou-se 0,3 mL de solução de cloreto de alumínio 10%. Em seguida, após 1 min, adicionou-se 2 mL de solução de hidróxido de sódio 1 M e 3,38 mL de água destilada. As absorbâncias foram medidas a 510 nm em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51). Para quantificação foi utilizada uma curva de calibração de epicatequina (Sigma-Aldrich, de 0,06 a 1,00 mg.mL<sup>-1</sup>). Os flavonoides totais foram expressos em miligrama equivalente de epicatequina por grama de amostra (mgEPI.g<sup>-1</sup>).

### **3.11. Determinação de antocianinas totais**

Esta determinação foi realizada de acordo com Fuleki e Francis (1968), sendo que 4 mL de solução de metanol 95%:HCl 1,5 N (85:15, v/v) foram adicionados a tubo de falcon com 0,1 g de amostra desengordurada e homogeneizados em vórtex (Phoemix, model AP-56), por 2 min. Em seguida, os tubos foram armazenados sob refrigeração, a temperatura de 8 °C, por 18 a 20 horas, protegidos da exposição à luz. Após este período, a mistura foi filtrada em papel de filtro (Qualy 11.0 J.Prolab). A solução filtrada foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com a solução de metanol 95%:HCl 1,5 N (85:15, v/v) e deixado em

repouso por 90 min, sob proteção da exposição à luz. As antocianinas totais (AT) foram quantificadas por espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51), a 535 nm. A quantificação foi realizada conforme a Equação 2:

$$AT \text{ (mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}\text{)} = \frac{A \times fd \times 100}{\epsilon} \text{ (Equação 2)}$$

Onde: AT = antocianinas totais; A = absorvância a 535 nm; fd = fator de diluição;  $\epsilon$  = absorvância molar a 535 nm (98,2).

### 3.12. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos e metilxantinas por HPLC

A quantificação dos compostos fenólicos monoméricos (catequina e epicatequina) e metilxantinas (cafeína e teobromina) foi realizada de acordo com o método descrito por Maciel, Felício e Hirooka (2017), com algumas adaptações. Vinte microlitros de extrato fenólico de cada amostra foram analisados pelo sistema HPLC (Perkin Elmer Modelo Flexar) acoplado a um detector UV/VIS e coluna C-18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m). A coluna foi mantida a 35 °C em todas as análises e o comprimento de onda utilizado para a detecção foi 275 nm, com um tempo total de execução de 45 minutos. Na análise por HPLC, os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os padrões puros, da Sigma-Aldrich, de teobromina (0,098 – 250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), catequina (0,781 – 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), epicatequina (3,125 – 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e cafeína (5 – 35  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). A fase móvel utilizada foi (A): água acidificada com ácido fosfórico a 0,1% e (B): metanol:acetonitrila (1:2 v/v), no modo isocrático (83:17 v/v), com fluxo de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>.

### 3.13. Análise da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizado conforme metodologia de Vinson et al. (2006), onde foram preparados extratos metanólicos na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Um volume de 0,1 mL de extrato foi submetido à reação com 4 mL de solução de DPPH a 0,004% (p/v). Após 30 min, na ausência de luz, mediu-se as absorvâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51). A capacidade de sequestrar o radical livre foi expressa como porcentagem de inibição da oxidação do radical e calculada de acordo com a Equação 3, abaixo.

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{dpph} - A_{extr}}{A_{dpph}} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

Sendo que  $A_{DPPH}$  corresponde à absorvância da solução de DPPH e  $A_{extr}$  é a absorvância da amostra em solução. O  $A_{extr}$  foi calculado como a diferença entre as absorvâncias da solução da amostra e do branco. A atividade antioxidante de cada amostra ( $IC_{50}$ ) é definida como a concentração final, em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do extrato seco presente na cubeta, necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%, que foi calculada conforme a Equação 4, a seguir.

$$IC_{50} (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{50 \times CR}{\% \text{ inibição}} \times 1000 \text{ (Equação 4)}$$

Onde: CR representa a concentração real da cubeta de  $0,025 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 3.14. Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP

Este método avalia a capacidade antioxidante do ferro através da mudança de cor, mediante a redução de  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ , de coloração azul clara, para  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$ , de coloração azul escura, conforme metodologia descrita por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000), com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado por mistura de tampão acetato 0,3 M (pH=3,6) em HCl 40 mM e  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM, na proporção 10:1:1. Assim, 90  $\mu\text{L}$  de cada extrato metanólico (6,25; 12,5 e 25  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP foram adicionados ao tubo de ensaio, homogeneizados e mantidos em banho-maria (Fisatom, 553) a 37 °C, por 30 min. A leitura da absorvância foi realizada a 595 nm, em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51). O potencial antioxidante da amostra foi determinado com base em uma curva-padrão de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), de 0,50 a 2,0  $\text{mM}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em amostras de  $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot 100\text{g}^{-1}$ .

### 3.15. Análise da atividade antioxidante pelo método CUPRAC

A análise da atividade antioxidante pela redução de cobre nos extratos metanólicos foi elaborada de acordo com Apak et al. (2008), com algumas modificações. Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL de solução aquosa de cloreto de cobre (II)  $1 \times 10^{-2}$  M, 1 mL de solução metanólica de neocuproína  $7,5 \times 10^{-3}$  M e 1 mL de tampão acetato de amônio 1 M, a pH 7,0. Esta mistura foi agitada, em seguida, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do extrato fenólico e 1 mL de água destilada. Após 30 min, a absorvância a 450 nm foi medida em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51). A curva analítica foi preparada com epicatequina (3,46 - 26,67

$\mu\text{M.L}^{-1}$ ) e o resultado expresso em mg de epicatequina equivalente por g de amostra ( $\text{mgEPI.g}^{-1}$ ).

### **3.16. Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e as análises estatísticas foram feitas com o Software Statistical 8.0 (STATOSOFT<sup>®</sup>, USA, 2007). Na comparação entre as médias, os testes utilizados foram o Teste T e o Teste de Tukey. Neste último, os resultados foram submetidos à análise de variância usando one-way (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, com significância de 95% ( $P < 0,05$ ).

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Teste de corte e índice de fermentação (IF)**

Durante a fermentação e a secagem, o teor de polifenóis diminui à medida que alguns se difundem nas amêndoas, enquanto outros são oxidados e polimerizam em compostos insolúveis de alto peso molecular (taninos) (PETTIPHER, 1986; WOLLGAST, ANKLAM, 2000). Isso leva a mudanças na cor interna das amêndoas de cacau secas, da cor cinza escuro da amêndoa não fermentada, passando pela cor púrpura profunda das amêndoas subfermentadas para a cor marrom da amêndoa totalmente fermentada (PETTIPHER, 1986; WOLLGAST; ANKLAM, 2000). A mudança na cor da amêndoa de cacau durante a fermentação é explorada no método simples de teste de corte para determinar o grau de fermentação, avaliar a cor interna, os defeitos apresentados (como amêndoas ardósias, achatadas, geminadas, mofadas, entre outros) e classificar o tipo de amêndoa (ACULEY et al., 2010; SANTOS; PALMEIRA; JESUS, 2019; BRASIL, 2008).

Na avaliação do aroma das amêndoas, após o corte longitudinal, revelou a ausência de odores estranhos, como o odor de fumaça, para todos os experimentos, além da ausência de amêndoas mofadas, germinadas e danificadas por insetos, (Tabela 2). A partir dos dados apresentados é possível observar que o aumento do período de fermentação favoreceu o surgimento de amêndoas de colorações marrom (34%) e marrom/violeta (47%) e o aumento de 68% (nas amêndoas 48h) para 92% (nas amêndoas 144h) do número de cotilédones bem compartimentados, indicando assim, uma boa fermentação para as amêndoas fermentadas até 144h. A compartimentação é um dos indicadores da ocorrência de importantes reações

bioquímicas durante a fermentação e secagem, como a ruptura das membranas celulares e o contato de substâncias que antes encontravam-se separadas (EFRAIM et al., 2010). Além disso, as amêndoas 48h apresentaram 78% de amêndoas ardósias, o que as classifica como amêndoas Fora do Tipo, segundo a qualificação da Instrução Normativa n° 38, de 2008 (BRASIL, 2008), que enquadra desta maneira as amêndoas que apresentarem um percentual acima de 15% de ardósia no experimento. Por outro lado, as amêndoas fermentadas até 144h foram classificadas como Tipo I, por apresentarem defeitos de amêndoas mofadas, ardósias, germinadas e achatadas com percentuais inferiores a 4%, 5%, 5% e 5%, respectivamente (BRASIL, 2008). As características da amêndoa ardósia incluem cotilédone emborrachado, cor enegrecida e resistência ao corte, a amêndoa violeta ocorre quando a fermentação termina prematuramente e a amêndoa totalmente marrom é bem fermentada (GUEHI et al., 2010).

Tabela 2. Teste de corte e índice de fermentação realizados nas amêndoas fermentadas até 48 e 144 horas.

Defeitos	Amêndoas 48h	Amêndoas 144h
Marrom (%)	0 ± 0,0 <sup>a</sup>	34 ± 8,38 <sup>b</sup>
Violeta (%)	18 ± 1,70 <sup>a</sup>	16 ± 0,94 <sup>a</sup>
Marrom/Violeta (%)	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	47 ± 8,65 <sup>b</sup>
Branca (%)	4 ± 1,25 <sup>a</sup>	1 ± 1,25 <sup>a</sup>
Ardósia (%)	78 ± 1,25 <sup>a</sup>	0 ± 0,00 <sup>b</sup>
Achatada (%)	1 ± 0,82 <sup>a</sup>	0 ± 0,47 <sup>a</sup>
Quebrada (%)	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	1 ± 0,82 <sup>a</sup>
Mofada (%)	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	0 ± 0,00 <sup>a</sup>
Germinada (%)	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	0 ± 0,00 <sup>a</sup>
Odor de fumaça (%)	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	0 ± 0,00 <sup>a</sup>
Danificadas por insetos (%)	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	0 ± 0,00 <sup>a</sup>
N° amêndoas compartimentadas	68 ± 8,38 <sup>a</sup>	92 ± 2,36 <sup>b</sup>
N° amêndoas não compartimentadas	32 ± 8,38 <sup>a</sup>	8 ± 2,36 <sup>b</sup>
Peso médio de cada amêndoa (g)	1,20 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,03 <sup>b</sup>
Índice de fermentação (IF)	0,395 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,130 ± 0,02 <sup>b</sup>

Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças estatísticas significantes para o Teste T ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a Resolução nº 161 do Conselho Nacional de Comércio Exterior (CONCEX, 1988), as amêndoas de cacau são consideradas bem fermentadas quando apresentam cotilédones de cor marrom e consideradas não fermentadas quando apresentam coloração violeta a roxa por grande parte de seu comprimento. Além da coloração, o que diferencia a amêndoa bem fermentada da não fermentada é a quantidade de sulcos ou compartimentações presentes em seus cotilédones, por isso, quanto mais compartimentado, melhor será a amêndoa fermentada.

A Tabela 2 também mostra os resultados médios de índice de fermentação (IF) nos dois diferentes períodos de fermentação, com valores de 0,395 e 1,130 para as amêndoas 48h e 144h, respectivamente. Os resultados mostraram que um tempo maior de fermentação causa o aumento do IF, sendo que em amêndoas não fermentadas há maior quantidade dos pigmentos de coloração vermelha a roxa e com o avanço da fermentação há a oxidação desses pigmentos podendo contribuir para o desenvolvimento de pigmentos marrons (SHAHIR; DIMICK, 1986; MAMOT, 1989; MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003). O desaparecimento da cor púrpura pode ser explicado pela hidrólise das antocianinas, que ocorre principalmente entre o primeiro e o terceiro dia da fermentação (BRITO, 2000; CROSS; VILLENEUVE; VINCENT, 1982; AFOAKWA et al., 2012; MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003), enquanto a cor marrom resulta da oxidação de cianidinas, outros fenóis livres e complexos proteína-fenólicos (KONGOR et al., 2013; MISNAWI, 2008; NAZARUDDIN et al., 2006). Misnawi, Jamilah e Nazamid (2003) encontraram valores de índice de fermentação de 0,57 e 0,83 em amêndoas não fermentadas, 0,86 a 1,00 em amêndoas fermentadas até dois dias (parcialmente fermentadas) e 1,58 em amêndoas fermentadas até cinco dias (completamente fermentadas). De acordo com Bariah et al. (2014), amêndoas fermentadas têm valor de IF maior que 1,0, amêndoas fermentadas em excesso têm valor IF maior que 1,6 e quando as amêndoas não estão completamente fermentadas possuem o valor de IF menor que 1,00. Assim, podendo-se conferir que as amêndoas 48h podem ser consideradas como parcialmente fermentadas ou subfermentadas e as amêndoas 144h como fermentadas.

## **4.2. Compostos fenólicos, flavonoides totais, antocianinas totais, quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas por HPLC e atividades antioxidantes por DPPH, FRAP e CUPRAC**

### **4.2.1. Compostos fenólicos**

Os teores de compostos fenólicos das amêndoas subfermentadas (A48h) e fermentadas (A144h) foram de 85,53 e 20,13 mgEPI.g<sup>-1</sup>, respectivamente, na Tabela 3. O conteúdo fenólico das amêndoas de cacau decresceu a medida que avançou o tempo de fermentação, pois durante este processo, os polifenóis são oxidados e polimerizados em compostos insolúveis de alto peso molecular (taninos), o que leva a uma redução significativa de sua concentração e, assim, redução no amargor e adstringência da amêndoa de cacau (KONGOR et al., 2016). Sandhya et al. (2016) abordam em seu estudo que cerca de 80-90% dos polifenóis foram perdidos das sementes de cacau frescas durante a fermentação, tanto na fermentação natural quanto na controlada com adição de cultura microbiana. Entretanto, Pedan et al. (2018) encontraram valores entre 50,56 e 94,33 mgEPI.g<sup>-1</sup> para amêndoas de cacau fermentadas de diferentes países, que não incluíam o Brasil. Estes autores abordaram que fatores como genótipo, maturidade, baixa altitude da região de cultivo, temperatura e umidade mais altas podem ser importantes para produzir mais polifenóis.

Tabela 3. Teores de compostos bioativos e atividades antioxidantes em amêndoas de cacau fermentadas e secas, nibs e chocolates

Ensaio	Proporção de nibs (%)		Compostos fenólicos (mgEPI.g <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mgEPI.g <sup>-1</sup> )	Antocianinas (mg.100g <sup>-1</sup> )	Quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas por HPLC (mg.g <sup>-1</sup> )				Atividade antioxidante		
	48h	144h				Teobromina	Epicatequina	Catequina	Cafeína	DPPH IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	FRAP (µmol de Fe <sup>2+</sup> .100g <sup>-1</sup> )	CUPRAC (mgEPI.g <sup>-1</sup> )
A48h	-	-	85,53 ± 1,39 <sup>a</sup>	43,29 ± 0,69 <sup>a</sup>	292,77 ± 5,20 <sup>a</sup>	25,85 ± 0,28 <sup>a</sup>	10,33 ± 0,48 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,17 <sup>a</sup>	8,48 ± 0,10 <sup>a</sup>	23,85 <sup>a</sup> ± 0,80 <sup>a</sup>	36,17 ± 0,13 <sup>a</sup>	27,47 ± 0,04 <sup>a</sup>
A144h	-	-	20,13 ± 0,11 <sup>b</sup>	10,59 ± 0,06 <sup>b</sup>	74,64 ± 2,38 <sup>b</sup>	11,92 ± 0,49 <sup>b</sup>	3,65 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,00 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,92 ± 0,04 <sup>b</sup>	53,07 <sup>b</sup> ± 1,24 <sup>b</sup>	18,63 ± 0,13 <sup>b</sup>	14,09 ± 0,59 <sup>b</sup>
N48h	100	-	59,57 ± 1,52 <sup>A</sup>	32,05 ± 1,52 <sup>A</sup>	245,99 ± 0,37 <sup>A</sup>	16,12 ± 0,20 <sup>A</sup>	8,78 ± 0,09 <sup>A</sup>	2,64 ± 0,09 <sup>A</sup>	6,98 ± 0,07 <sup>A</sup>	25,61 ± 1,00 <sup>A</sup>	34,01 ± 0,13 <sup>A</sup>	20,62 ± 0,15 <sup>A</sup>
N144h	-	100	16,00 ± 0,11 <sup>B</sup>	8,53 ± 0,06 <sup>B</sup>	54,38 ± 0,68 <sup>B</sup>	7,93 ± 0,10 <sup>B</sup>	1,85 ± 0,05 <sup>B</sup>	1,81 ± 0,09 <sup>B</sup>	3,32 ± 0,16 <sup>B</sup>	66,92 ± 0,28 <sup>B</sup>	15,67 ± 0,29 <sup>B</sup>	7,58 ± 0,04 <sup>B</sup>
N1	80	20	68,29 ± 0,81 <sup>A</sup>	34,71 ± 0,41 <sup>A</sup>	270,10 ± 0,13 <sup>A</sup>	19,77 ± 0,45 <sup>A</sup>	9,39 ± 0,46 <sup>A</sup>	2,93 ± 0,09 <sup>A</sup>	7,11 ± 0,28 <sup>A</sup>	24,92 ± 0,49 <sup>A</sup>	34,54 ± 0,51 <sup>A</sup>	22,82 ± 0,94 <sup>A</sup>
N2	20	80	16,78 ± 0,39 <sup>D</sup>	8,94 ± 0,17 <sup>D</sup>	116,23 ± 4,42 <sup>E</sup>	9,76 ± 0,00 <sup>D</sup>	2,80 ± 0,12 <sup>E</sup>	1,90 ± 0,01 <sup>E</sup>	4,32 ± 0,03 <sup>D</sup>	63,50 ± 0,75 <sup>E</sup>	17,16 ± 0,24 <sup>D</sup>	10,42 ± 0,31 <sup>C</sup>
N3	65	35	44,67 ± 1,69 <sup>B</sup>	22,93 ± 0,81 <sup>B</sup>	225,19 ± 0,59 <sup>B</sup>	14,72 ± 0,68 <sup>B</sup>	5,63 ± 0,21 <sup>B</sup>	2,52 ± 0,08 <sup>B</sup>	5,87 ± 0,26 <sup>B</sup>	26,70 ± 0,94 <sup>AB</sup>	33,62 ± 0,16 <sup>B</sup>	19,00 ± 1,17 <sup>B</sup>
N4	35	65	18,75 ± 0,34 <sup>D</sup>	9,90 ± 0,17 <sup>D</sup>	124,64 ± 0,52 <sup>D</sup>	10,97 ± 0,16 <sup>D</sup>	3,49 ± 0,13 <sup>D</sup>	1,94 ± 0,01 <sup>E</sup>	4,60 ± 0,08 <sup>D</sup>	56,32 ± 1,96 <sup>D</sup>	16,48 ± 0,13 <sup>D</sup>	12,12 ± 0,80 <sup>C</sup>
N5	50	50	35,72 ± 0,36 <sup>C</sup>	18,29 ± 0,06 <sup>C</sup>	152,00 ± 0,67 <sup>C</sup>	13,00 ± 0,52 <sup>C</sup>	4,35 ± 0,19 <sup>C</sup>	2,37 ± 0,07 <sup>D</sup>	5,49 ± 0,06 <sup>C</sup>	31,36 ± 0,21 <sup>C</sup>	27,10 ± 0,09 <sup>C</sup>	17,30 ± 0,46 <sup>B</sup>
N6	50	50	36,18 ± 0,17 <sup>C</sup>	18,52 ± 0,17 <sup>C</sup>	150,37 ± 0,58 <sup>C</sup>	12,96 ± 0,36 <sup>C</sup>	4,30 ± 0,18 <sup>C</sup>	2,31 ± 0,01 <sup>D</sup>	5,32 ± 0,20 <sup>C</sup>	32,45 ± 0,16 <sup>C</sup>	26,73 ± 0,14 <sup>C</sup>	17,61 ± 0,37 <sup>B</sup>
N7	50	50	37,69 ± 0,39 <sup>C</sup>	18,98 ± 0,17 <sup>C</sup>	153,39 ± 0,55 <sup>C</sup>	13,29 ± 0,60 <sup>C</sup>	4,64 ± 0,15 <sup>C</sup>	2,43 ± 0,02 <sup>C</sup>	5,62 ± 0,13 <sup>BC</sup>	29,36 ± 1,14 <sup>BC</sup>	27,43 ± 0,22 <sup>C</sup>	17,70 ± 0,07 <sup>B</sup>
C1	80	20	21,09 ± 1,01 <sup>c</sup>	11,09 ± 0,51 <sup>c</sup>	107,13 ± 0,91 <sup>c</sup>	12,51 ± 0,41 <sup>c</sup>	3,92 ± 0,07 <sup>c</sup>	2,15 ± 0,10 <sup>c</sup>	5,05 ± 0,03 <sup>c</sup>	46,84 ± 1,54 <sup>c</sup>	20,65 ± 0,19 <sup>c</sup>	15,88 ± 0,94 <sup>c</sup>
C2	20	80	11,09 ± 0,06 <sup>f</sup>	6,10 ± 0,00 <sup>f</sup>	59,98 ± 1,62 <sup>f</sup>	0,99 ± 0,04 <sup>g</sup>	0,51 ± 0,02 <sup>g</sup>	1,37 ± 0,04 <sup>fg</sup>	1,88 ± 0,06 <sup>gh</sup>	144,87 ± 2,33 <sup>f</sup>	13,29 ± 0,06 <sup>f</sup>	2,87 ± 0,12 <sup>ef</sup>
C3	65	35	20,27 ± 0,34 <sup>c</sup>	10,68 ± 0,17 <sup>c</sup>	104,51 ± 1,41 <sup>c</sup>	12,50 ± 0,16 <sup>c</sup>	3,73 ± 0,13 <sup>d</sup>	2,10 ± 0,10 <sup>c</sup>	4,99 ± 0,24 <sup>c</sup>	51,21 ± 1,32 <sup>c</sup>	19,54 ± 0,23 <sup>d</sup>	15,33 ± 0,48 <sup>c</sup>
C4	35	65	13,66 ± 0,49 <sup>e</sup>	7,38 ± 0,26 <sup>e</sup>	78,72 ± 1,50 <sup>e</sup>	2,57 ± 0,06 <sup>f</sup>	0,61 ± 0,02 <sup>f</sup>	1,40 ± 0,01 <sup>f</sup>	2,01 ± 0,07 <sup>g</sup>	98,44 ± 0,56 <sup>e</sup>	13,58 ± 0,07 <sup>f</sup>	3,36 ± 0,25 <sup>e</sup>
C5	50	50	15,41 ± 0,17 <sup>d</sup>	8,25 ± 0,06 <sup>d</sup>	85,61 ± 3,07 <sup>de</sup>	6,90 ± 0,09 <sup>e</sup>	1,01 ± 0,05 <sup>e</sup>	1,58 ± 0,01 <sup>e</sup>	2,70 ± 0,08 <sup>e</sup>	80,31 ± 3,85 <sup>d</sup>	15,16 ± 0,22 <sup>e</sup>	6,02 ± 0,36 <sup>d</sup>
C6	50	50	15,73 ± 0,11 <sup>d</sup>	8,39 ± 0,06 <sup>d</sup>	83,57 ± 5,28 <sup>de</sup>	7,34 ± 0,33 <sup>de</sup>	1,03 ± 0,05 <sup>e</sup>	1,53 ± 0,01 <sup>e</sup>	2,45 ± 0,12 <sup>f</sup>	75,67 ± 3,75 <sup>d</sup>	15,07 ± 0,12 <sup>e</sup>	5,82 ± 0,25 <sup>d</sup>
C7	50	50	15,82 ± 0,06 <sup>d</sup>	8,43 ± 0,00 <sup>d</sup>	87,20 ± 0,59 <sup>d</sup>	7,73 ± 0,27 <sup>d</sup>	1,08 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,69 ± 0,01 <sup>d</sup>	3,07 ± 0,08 <sup>d</sup>	72,38 ± 1,13 <sup>d</sup>	15,31 ± 0,08 <sup>e</sup>	6,08 ± 0,31 <sup>d</sup>
CC	-	100	9,17 ± 0,23 <sup>g</sup>	5,13 ± 0,11 <sup>g</sup>	42,67 ± 1,38 <sup>g</sup>	0,45 ± 0,01 <sup>h</sup>	0,48 ± 0,02 <sup>g</sup>	1,32 ± 0,05 <sup>g</sup>	1,74 ± 0,06 <sup>h</sup>	148,25 ± 1,64 <sup>f</sup>	13,07 ± 0,12 <sup>f</sup>	1,51 ± 0,04 <sup>f</sup>

Legenda: A48h: amêndoas fermentadas até 48h e secas; A144h: amêndoas fermentadas até 144h e secas; N48h: Nibs de amêndoas fermentadas até 48h; N144h: Nibs de amêndoas fermentadas até 144h; N1: Nibs do ensaio 1; N2: Nibs do ensaio 2; N3: Nibs do ensaio 3; N4: Nibs do ensaio 4; N5: Nibs do ensaio 5; N6: Nibs do ensaio 6; N7: Nibs do ensaio 7; C1: Chocolate do ensaio 1; C2: Chocolate do ensaio 2; C3: Chocolate do ensaio 3; C4: Chocolate do ensaio 4; C5: Chocolate do ensaio 5; C6: Chocolate do ensaio 6; C7: Chocolate do ensaio 7; CC: Chocolate do ensaio controle; mgEPI: miligramas equivalentes de epicatequina. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna dos resultados de 48h e 144h indicam diferenças estatísticas significantes para o Teste T (p<0,05). Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna dos resultados de N48h e N144h indicam diferenças estatísticas significantes para o Teste T (p<0,05). Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna dos resultados de ensaios de nibs indicam diferenças estatísticas significantes para o Teste de Tukey (p<0,05). Diferentes letras minúsculas na mesma coluna dos resultados de ensaios de chocolates indicam diferenças estatísticas significantes para o Teste de Tukey (p<0,05).

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam que o processo de torrefação proporcionou a diminuição de 30,35% dos compostos fenólicos das amêndoas subfermentadas não torradas (A48h) em relação aos nibs de amêndoas de cacau subfermentadas torradas (N48h), enquanto houve um decréscimo de 20,52% das amêndoas fermentadas não torradas (A144h) em relação aos nibs de amêndoas de cacau fermentadas torradas (N144h). Stanley et al. (2018), também consideraram que a torrefação por 40 minutos e em diferentes temperaturas provoca a redução de 9,7 a 39,9% dos polifenóis totais em amêndoas de cacau. Os resultados evidenciaram que os ensaios com maiores proporções de nibs de amêndoas subfermentadas resultaram em concentrações maiores de compostos fenólicos, conforme pode ser avaliado com os ensaios N1 e N3, com 80% e 65% de nibs de amêndoas subfermentadas presentes nas amostras, respectivamente.

Quanto aos chocolates, houve uma redução de 69,12% dos compostos fenólicos entre os ensaios N1 e C1. Os ensaios C1 (21,09 mgEPI.g<sup>-1</sup>) e C3 (20,27 mgEPI.g<sup>-1</sup>) não obtiveram diferença estatística significativa e comprovaram possuir maiores teores de compostos fenólicos em comparação com os demais ensaios. Principalmente em relação ao ensaio CC (9,17 mgEPI.g<sup>-1</sup>), elaborado com somente nibs de amêndoas fermentadas, sendo a menor concentração encontrada entre os resultados. Além disso, constatou-se que os ensaios dos pontos centrais (C5, C6 e C7) não obtiveram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ), um fato esperado, pois os três foram formulados com mesmas proporções de nibs de amêndoas subfermentadas e fermentadas. Succi et al. (2017) analisaram cinco marcas diferentes de barras de chocolate intenso, contendo pelo menos 50% de cacau declarados no rótulo, e obtiveram resultados entre 10,53 a 22,23 mgEPI.g<sup>-1</sup> para compostos fenólicos.

#### **4.2.2. Flavonoides Totais**

Os dados obtidos para flavonoides totais foram de 43,29 e 10,59 mgEPI.g<sup>-1</sup> para as amêndoas subfermentadas (A48h) e fermentadas (A144h), respectivamente, um decréscimo de 75,54% entre ambos (Tabela 3). GU et al. (2013) relataram resultados próximos, de 3,50 a 12,62 mgEPI.g<sup>-1</sup>, para amêndoas de cacau fermentado trinitário. Ooi et al. (2020) relataram teores de flavonoides de 1,68 a 6,33 mg catequina.g<sup>-1</sup> em amêndoas de cacau fermentadas até 120h. Os dados obtidos para os nibs N48h e N144h foram de 32,05 e 8,53 mgEPI.g<sup>-1</sup>, respectivamente, evidenciando mais uma vez que o processo de torrefação causou uma perda no teor de flavonoides, em relação às amêndoas fermentadas e secas. Cheynier (2005) afirma que o teor de flavonoides varia em relação direta aos tempos de fermentação, secagem e torrefação. Para

os ensaios com diferentes proporções de nibs, aqueles com maiores proporções de nibs subfermentados evidenciaram possuir maiores teores de flavonoides em relação aos outros ensaios, conforme a seguinte ordem decrescente: C1, C3, C7, C6, C5, C4, C2 e CC. Em geral, durante a torrefação convencional, os polifenóis são facilmente degradados e/ou ficam ligados às estruturas poliméricas (JINAP et al., 2004). O principal fator responsável pela degradação do conteúdo total de polifenóis e flavonoides totais é a alta temperatura e o contato com o oxigênio durante o processamento térmico. Por isso, há vários relatos na literatura de que a torrefação de amêndoas de cacau provoca uma diminuição destes compostos (HURST et al., 2011; JOLIC et al., 2011).

#### **4.2.3. Antocianinas Totais**

Em relação às antocianinas, na Tabela 3, o resultado mais elevado foi encontrado para as amêndoas subfermentadas (A48h), com 292,77 mg.100g<sup>-1</sup>, em relação às amêndoas fermentadas (A144h), com 74,64 mg.100g<sup>-1</sup>. Wollgast e Anklam (2000) revisaram as alterações na composição fenólica durante o processamento do cacau e relataram que vários estudos encontraram perdas em antocianinas e outros compostos fenólicos durante a fermentação e a secagem. De acordo com Bordiga et al. (2015), apesar do menor conteúdo de antocianinas no cacau, quando comparado a outras classes de flavonoides, esse grupo é de grande interesse no desenvolvimento da cor das sementes, pois a cor violeta típica das amêndoas não fermentadas está correlacionada com a presença de antocianinas de cacau. Geralmente, antocianinas e polifenóis formam compostos que contribuem para a cor marrom característica das amêndoas torradas, como os flobafenos, e a oxidação e polimerização de polifenóis, degradação de proteínas e reações de *Maillard* produzem outros pigmentos marrons (produtos de conversão de antocianinas), típicos do cacau torrado (BORDIGA et al., 2015; NEBESNY; RUTKOWSKI, 1998). A temperatura parece ser o principal fator que afeta a coloração das amêndoas de cacau torradas, e os dados relatados na Tabela 4, entre os ensaios de nibs e entre os ensaios de chocolates, confirmam essas evidências de como a torrefação e o processamento dos chocolates determinaram uma redução nos teores de antocianinas.

#### **4.2.4. Quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas por HPLC**

Na quantificação por HPLC, dois compostos do grupo dos flavonoides e duas metilxantinas foram identificados pelo tempo de retenção por comparações cromatográficas

com padrões primários (Tabela 3). De acordo com Aprotosoiaie et al. (2016) e Oracz et al. (2015), a fermentação é o ponto crítico no processamento do cacau, que aplicado e controlado adequadamente gera precursores ou substratos de aroma (peptídeos e aminoácidos) necessários para produzir o sabor característicos do chocolate. Por outro lado, sua aplicação pode diminuir até 50% do conteúdo fenólico total principalmente pela degradação de flavan-3-ols, procianidinas e compostos de antocianinas devido à oxidação enzimática (ORACZ et al., 2015).

Entre os compostos bioativos, a catequina apresentou os menores conteúdos em relação aos outros compostos quantificados, conforme pode ser observado na Tabela 3 para as amêndoas A48h e A144h, os nibs N48h e 144h e os ensaios de nibs e de chocolate. Pois o processamento do cacau afeta favoravelmente as propriedades sensoriais do cacau e produtos derivados pela produção de compostos voláteis, mas também altera as frações de flavonoides e metilxantinas (PAYNE et al., 2010).

Para os resultados da quantificação de epicatequina, verificou-se que os maiores teores foram encontrados nos ensaios com maiores proporções de amêndoas subfermentadas, entre os grupos avaliados, como A48h (10,33 mg.g<sup>-1</sup>), N48h (8,78 mg.g<sup>-1</sup>), N1 (9,39 mg.g<sup>-1</sup>) e C1 (3,92 mg.g<sup>-1</sup>). Uma diferença bem expressiva principalmente quando compara-se o ensaio C1 ao ensaio CC (0,48 mg.g<sup>-1</sup>), que foi elaborado com somente nibs de amêndoas fermentadas. A epicatequina é considerada o principal flavonoide monomérico do cacau e está associada a vários benefícios à saúde (AMORES; JIMÉNEZ, 2007; ARAUJO et al., 2013; WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Pois é o flavanol mais abundante no cacau e representa 35% da fração polifenólica total (LACUEVA et al., 2008). Estudos têm demonstrado que procianidinas, catequinas e epicatequinas são absorvidas no intestino de animais e seres humanos, sendo a epicatequina a mais biodisponível (KEEN, 2001).

Já a teobromina reduz a pressão arterial e também é um relaxante muscular diurético e relaxante (VAN DEN BOGAARD et al. 2010; BRUINSMA; TAREN et al, 1999; MITCHELL et al. 2011). Foi o composto bioativo de maior concentração, de acordo com a Tabela 4, em relação ao seu conteúdo, pode-se destacar uma tendência ligeiramente positiva, começando das amêndoas para os nibs, seguida de uma redução acentuada nos chocolates. O aumento significativo da teobromina na massa de cacau pode estar relacionado a uma capacidade de extração aprimorada da molécula devido aos processos de refinamento e conchagem, nos quais os nibs de cacau são triturados finamente para obter uma textura homogênea (BORDIGA et al., 2015). Entre os ensaios de chocolates com os dois tipos de nibs, as concentrações variaram de

0,45 mg.g<sup>-1</sup> (CC) a 12,51 mg.g<sup>-1</sup> (C1). Tokusoglu e Ünal (2002) encontraram teores de teobromina entre 1,17 e 1,96 mg.g<sup>-1</sup>, em amostras de chocolates ao leite de diferentes marcas.

Por outro lado, o teor de cafeína foi menor em comparação a teobromina nas amostras, confirmando a tendência geral nas amêndoas de cacau (BORDIGA et al., 2015; LANGER et al., 2011; ÁLVAREZ et al., 2012). Além disso, pequenas diferenças foram destacadas das amêndoas para os nibs, mas uma redução significativa foi detectada nos chocolates. Entre os ensaios de chocolates, as concentrações variaram de 1,74 mg.g<sup>-1</sup> (CC) a 5,05 mg.g<sup>-1</sup> (C1). Entretanto, Tokusoglu e Ünal (2002) encontraram teores de cafeína bem menores, resultados entre 0,46 e 0,94 mg.g<sup>-1</sup> em amostras de chocolates ao leite de diferentes marcas. Doses moderadas de cafeína (100–150 mg) podem contribuir para aumentar o estado de alerta e estimulação, melhoram o tempo de reação em tarefas psicomotoras e também aumentam a pressão arterial (HASKELL et al., 2005; CHILDS; WIT et al., 2006; MITCHELL et al., 2011).

#### 4.2.5. Atividade antioxidante pelo método de DPPH

A atividade antioxidante por DPPH foi expressa como IC<sub>50</sub> (concentração inibitória média), sendo este o parâmetro que representa a concentração de anti-radicais capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (BORDIGA et al., 2015). Quanto menor o seu valor, maior a atividade anti-radical da amostra examinada. Na Tabela 3, o valor mais baixo de IC<sub>50</sub> foi alcançado nas amêndoas subfermentadas (A48h), com 23,85 µg.mL<sup>-1</sup>, indicando uma maior atividade anti-radical desse extrato em comparação com as amêndoas fermentadas (A144h: 57,07 µg.mL<sup>-1</sup>). Entretanto, Arlorio et al. (2008) analisaram amostras de cacau forasteiro de diferentes áreas geográficas encontraram valores menores, entre 14,986 e 30,100 µg.mL<sup>-1</sup>, para amêndoas fermentadas e secas, mostrando maiores atividades antioxidantes em comparação a este estudo. Assim como, Bordiga et al. (2015) que encontraram valores também menores, variando entre 15,2 e 19,7 µg.mL<sup>-1</sup>, para amêndoas de cacau fermentadas e secas de diferentes países, como Nigéria, Camarões, Equador, Costa do Marfim e Gana.

Os resultados encontrados dos nibs N48h e N144h foram de 25,61 e 66,92 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, e os valores entre as misturas de nibs variaram de 24,92 e 63,50 µg.mL<sup>-1</sup>. Arlorio et al. (2008) obtiveram resultados para amêndoas torradas de 26,546 a 34,761 µg.mL<sup>-1</sup>. Para os ensaios de chocolates, os resultados variaram de 46,84 a 148,25 µg.mL<sup>-1</sup> para os ensaios de chocolate. Bordiga et al. (2015) obtiveram valores menores de 11,8 a 24,8 µg.mL<sup>-1</sup> para amêndoas torradas e maiores, de 175 a 240 µg.mL<sup>-1</sup>, para chocolates com 40% de cacau. Calculou-se os coeficientes de correlação entre os resultados de DPPH nos extratos metanólicos

com os resultados de teobromina ( $r = -0,885$ ), epicatequina ( $r = -0,774$ ), catequina ( $r = -0,836$ ) e cafeína ( $r = -0,875$ ), sendo correlações mais próximas a -1, indicando uma correlação negativa perfeita entre as variáveis. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Arlorio et al., (2005), Othman et al., (2007) e Belščak et al. (2009), sugerindo que a alta capacidade de eliminação do extrato de cacau pode ser atribuída a outros compostos solúveis em metanol, como as metilxantinas.

#### **4.2.6. Atividade antioxidante pelo método de FRAP**

Os dados apresentados na Tabela 3 mostram uma redução do valor de FRAP de 36,17  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100\text{g}^{-1}$  em amêndoas subfermentadas (A48h) para 18,63  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100\text{g}^{-1}$  em amêndoas fermentadas (A144h). Assim como, os resultados entre as amostras de nibs variaram entre 34,54 a 15,67  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e entre os ensaios de chocolate de 20,65 a 13,07  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Os resultados mais próximos foram relatados por Othman et al. (2010) em extratos etanólicos de amêndoas de cacau fermentadas, variando de 77,47 a 143,37  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Os coeficientes de correlação encontrados entre os resultados de teobromina ( $r = 0,883$ ), epicatequina ( $r = 0,939$ ), catequina ( $r = 0,944$ ) e cafeína ( $r = 0,923$ ) e FRAP nos extratos metanólicos foram positivos, sendo correlações mais próximas a 1, indicando uma correlação positiva perfeita entre as variáveis,

#### **4.2.7. Atividade antioxidante pelo método de CUPRAC**

Os valores obtidos para o ensaio CUPRAC, na Tabela 3, nas amêndoas subfermentadas (A48h) foi de 27,47  $\text{mgEPI} \cdot \text{g}^{-1}$ , de 14,09  $\text{mgEPI} \cdot \text{g}^{-1}$  em amêndoas fermentadas (A144h), nas amostras de nibs variaram de 7,58 a 22,82  $\text{mgEPI} \cdot \text{g}^{-1}$  e entre os ensaios de chocolate de 1,51 a 15,88  $\text{mgEPI} \cdot \text{g}^{-1}$ , sendo que menor valor encontrado foi do chocolate controle (CC), com 1,51  $\text{mgEPI} \cdot \text{g}^{-1}$ . Entretanto, não foram encontrados estudos na literatura avaliando a atividade antioxidante de amêndoas de cacau utilizando esse método. O método de CUPRAC deve ser vantajoso em relação aos ensaios FRAP e DPPH, pois, além da cinética mais rápida da química redox do cobre (II), em oposição ao íon férrico, ele também possui uma sensibilidade mais alta para medir os antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (APAK et al. , 2004; APAK et al., 2008). O método CUPRAC apresentou os maiores coeficientes de correlação baseado nos compostos monoméricos, ou seja, com  $r$  mais próximo de 1, com  $r = 0,969$  para teobromina,  $r = 0,948$  para epicatequina,  $r = 0,978$  para catequina e  $r = 0,992$  para cafeína.

## **5. Conclusão**

Os diferentes ensaios de amêndoas fermentadas e secas, nibs e chocolates foram analisados e por todos os métodos utilizados verificou-se que as amêndoas subfermentadas contribuíram para elevar as concentrações dos compostos bioativos e satisfatórios resultados das atividades antioxidantes. Essa quantificação identificou a teobromina como o principal componente entre os ensaios estudados. Assim como, principalmente, as amêndoas A48h, os nibs N48h, os ensaios de nibs N1 e N3 e de chocolates C1 e C3 apresentaram elevadas concentrações de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, teobromina, epicatequina, catequina e cafeína. Entre os métodos das atividades antioxidantes, todos os métodos se correlacionaram perfeitamente com os resultados dos compostos bioativos monoméricos. Por isso, esse estudo identificou que a utilização das amêndoas subfermentadas na formulação de chocolates incrementa consideravelmente o teor de compostos bioativos, contribuindo com a produção de chocolates com maior apelo de propriedade funcional. Estes dados podem ser objeto de interesse das indústrias de alimentos e mais estudos sobre a análise sensorial destes chocolates podem estabelecer seu potencial comercial. Portanto, atraindo a atenção dos consumidores para a aquisição de produtos genuínos e de qualidade superior, quando comparados ao chocolate comum elaborado com apenas amêndoas de cacau completamente fermentadas.

## **6. Agradecimentos**

À Fazenda Riachuelo que possibilitou a obtenção da matéria-prima e a realização das etapas de fermentação e secagem para este estudo. À FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela concessão da bolsa de estudos (n° do termo de outorga: BOL0242/2019) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro no projeto de pesquisa (n° do projeto: 4035981/2016-8).

## 7. Referências

- ACULEY, P. C.; SNITKJAER, P.; OWUSU, M.; BASSOMPIERE, M.; TAKRAMA, J.; NORGAARD, L.; PETERSEN, M. A.; NIELSEN, D. S. Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics, **Journal of Food Science**, v. 75, ed. 6, ago. 2010.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Review in Food Science Nutrition**, v. 48, pag. 840–857, 2008.
- AKHTAR, S.; ANJUM, F. M.; ANJUM, M. A. Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies. **Food Research International**, v. 44, pag. 652–659, 2011.
- ALU'DATT, M. H.; RABABAH, T.; EREIFEJ, K.; ALLI, I.; ALRABABAH, M. A.; ALMAJWAL, A.; ALHAMAD, M. N. Effects of barley flour and barley protein isolate on chemical, functional, nutritional and biological properties of Pita bread. **Food Hydrocolloids**, v. 26, pag. 135 - 143, 2012.
- ÁLVAREZ, C.; PÉREZ, E.; CROS, E. The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and (–)-epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of Criollo cocoa. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 20, pag. 307–315, 2012.
- AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. Aspectos de la calidad de cacao, INIAP (Estación Experimental Tropical Pichilingue), Quevedo, pag. 1-3, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, v. 66, n. 1, São Paulo, 2007.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 4, p. 413-19, 2008.

APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7970-81, 2004.

APROTOSOAIE, A.C.; LUCA, S.V.; MIRON, A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products-an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, pag. 73-91, 2016.

ARAUJO, Q.R.D.; GATTWARD, J.N.; ALMOOSAWI, S.; COSTASILVA, M.D.; DANTAS, P.A.; JUNIOR, Q.R. Cacao and human health: From head to foot – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n° 1, pag. 1-12, 2016.

ARDHANA, M.; FLEET, G. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, pag. 87-99, 2003.

ARLORIO, M.; COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; VARSALDI, F.; MIGLIO, G.; LOMBARDI, G.; MARTELLI, A. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. **Food Research International**, v. 38, p. 1009-14, 2005.

ARLORIO, M.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J. D.; DELGROSSO, E.; MINASSI, A.; APPENDINO, G.; MARTELLI, A. Roasting impact on the contents of clovamide (*N*-caffeoyl-*L*-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 106, ed. 3, pag. 967-975, fev. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. ed. 17, Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. v. 2. cap 30, met. 968.11, p. 4.

BALESTRA, F.; COCOS, E.; PINNAVAIA, G.; ROMANI, S. Evaluation of antioxidant, rheological and sensorial properties of wheat flour dough and bread containing ginger powder. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, pag. 700 - 705, 2011.

BARIAH, K. S.; IBRAHIM, W. A. W.; YANG, T. A. Effect of fermentation duration using shallow box on pH, equivalent percent fully Brown and flavour attributes of Malaysian cocoa beans. **Journal of Applied Science and Agriculture**, v. 9, pag. 104–108, 2014.

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, pag 1-7, ago. 2018.

BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, pag. 1101-1110, 2016.

BATISTA, N. N.; RAMOSA, C. L.; DIAS, D. R.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, ed. 1, pag. 221-227, set. 2015.

BELSCAK, A.; KOMES, D.; HORZIC, D.; GANIC, K. K.; KARLOVIC, D. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 707-16, 2009.

BISHT, I. S. Local food and healthy eating for wholesome life: some policy considerations. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. **Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials**. v. 5, pag. 422-430, 2020.

BORDIGA, M.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J. D.; MAZZA, G.; ARLORIO, M. Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate, **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, ed. 3, pag. 840-848, mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 38 de 23 de junho de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. **Diário Oficial da União**, 2008.

BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. S.; GLÓRIA, M. B. A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, v. 228, pag 484-490, ago. 2017.

BRUINSMA, K.; TAREN, D.L. Chocolate: food or drug? **J Am Diet Assoc**, v. 10, pag. 1249-1256, 1999.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, pag. 1809-1824, 2007.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; ADDO, S. K.; TAKRAMA, J. S.; BERNAERT, H.; DE VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: Influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, ed. 13, pag. 2288-2297, 2008.

CHENG, JING-RONG; LIU, XUE-MING; ZHANG, WEI; CHEN, ZHI-YI; WANG, XU-PING. Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of concentrated mulberry juice-enriched dried-minced pork slices during preparation and storage. **Food Control**, v. 89, pag. 187-195, jul. 2018.

CHEYNIER, Véronique. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, ed. 1, pag 223S–229S, jan. 2005.

CHILDS, E.; DE WIT, H. Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. **Psychopharmacology**, v. 185, pag. 514-523, 2006.

CONCEX. Conselho Nacional do Comércio Exterior. **Resolução n° 161**, Rio de Janeiro, Brasil, 1988.

COOPER, K. A.; CAMPOS-GIMENEZ, E.; JIMENEZ ALVAREZ, D. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, pag. 2841–2848, 2007.

CRAFACK, M.; MIKKELSEN, M. B.; SAERENS, S.; KNUDSEN, M.; BLENNOW, A.; LOWOR, S.; TAKRAMA, J.; SWIEGERS, J. H.; PETERSEN, G. B.; HEIMDAL, H.; NIELSEN, D. S. 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, ed. 1, pag. 103-116, out. 2013.

CROSS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J. C. Recherche d'un índice de fermentation du cacao. **Café, Cacao Thé**, v. 16, n. 2, p. 109-13, 1982.

DERAKHSHAN, Z.; FERRANTE, M.; TADI, M.; ANSARI, F.; HEYDARI, A.; HOSSEINI, M. S.; CONTI, G. O.; SADRABAD, E. K. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. **Food Chem. Toxicol.**, v. 114, pag. 108-111, 2018.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 30, Supl.1, p. 142-50, 2010.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 1, p. 72-7, 1968.

GARCIA-ARMISEN, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; HENDRYCKX, H.; CAMU, N.; VRANCKEN, G.; DE VUYST, L. Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, pag. 2281-2292, 2010.

GOURIEVA, K. B.; TSEREVINOV, O.B. Methods of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans. **USSR Patent** 64654, 1979.

GU, F.; TAN, L .; WU, H .; FANG, Y .; XU, F .; CHU, Z .; WANG, Q. Comparação de grãos de cacau da China, Indonésia e Papua Nova Guiné. **Foods**, v. 2 , pag. 183-197, 2013.

GUEHI, T.S.; DADIE, A. T.; KOFFI, K. P. B.; DABONNE, S.; BAN-KOFFI, L.; KEDJEBO, K. D.; NEMLIN, G. J. Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans, **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, ed. 2, dez. 2010.

HASKELL, C. F.; KENNEDY, D. O.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. **Psychopharmacology**, v. 179, pag. 813-825, 2005.

HURST, J. W.; KRAKE, S. H.; BERGMEIER, S. C.; PAYNE, M. J.; MILLER, K. B.; STUART, D. A. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. **Chem Cent J**, v. 5 (53), pag. 1–10, 2011.

JINAP, S. M.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. **Food Qual Prefer**, v. 15, pag. 403–409, 2004.

JOLIC, S. M.; REDOVNIKOVIC, I. R.; MARKOVIC, K.; SIPUSIC, D.I.; DELONGA, K. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in coco beans processing. **Int J Food Sci Technol**, v. 46, pag. 1793–1800, 2011.

JOLIC, S. M.; REDOVNIKOVIC, I. R.; MARKOVIC, K.; ŠIPUŠIĆ, I. I.; DELONGA, K. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing, **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, ed. 9, pag. 1793-1800, set. 2011.

KATZ, D. L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease Antioxidants Redox Signal, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, pag. 2779-2811, 2011.

- KONGOR, J. E.; HINNEH, M.; WALLE, D. V.; AFOAKWA, E. O.; BOECKX, P.; DEWETTINCK, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavor profile – A review. **Food Research International**, v. 82, pag. 44-52, abr. 2016.
- LANGER, S.; MARSHALL, L. J.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: a study of the correlation with nonfat cocoa solids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, pag. 8435–8441, 2011.
- LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7292-5, 2003.
- LI, JIAN; HUANG, SHI-YING; DENG, QIANYING; LI, GUILING; SU, GUOCHENG; LIU, JINGWEN; WANG, HUI-MIN DAVID. Extraction and characterization of phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial activities from pickled radish, **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, fev. 2020.
- LIMA, L.J.R.; ALMEIDA, M.H.; NOUT, M.J.R.; ZWIETERING, M.H. *Theobroma cacao* L., “The food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, pag. 731-761, 2011.
- LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, ed. 12, pag. 3527-3532, 2002.
- MACIEL, L. F.; FELÍCIO, A. L. S. M.; HIROOKA, E. Y. Bioactive compounds by UPLC-PDA in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the Southern region of Bahia, Brazil. **British Food Journal**, v. 119, Ed. 9, pag. 2117-27, 2017.

MAMOT, S. Some methods to determine the degree of fermentation in cocoa beans. In: CHE MAN, Y. B.; ABDUL KARIM, M. N. B.; ASBI, B. A. (ed.). **Proc. Conf. of Food Processing – Prelude to 90's**, p. 41-51, 1989.

MEGIAS-PEREZ, R.; MORENO-ZAMBRANO, M.; BEHRENDTS, B.; CORNO, M.; KUHNERT, N. Monitoring the changes in low molecular weight carbohydrates in cocoa beans during spontaneous fermentation: A chemometric and kinetic approach, **Food Research International**, v. 128, fev. 2020.

MELO, T. S.; PIRES, T. C.; ENGELMANN, J. V. P.; MONTEIRO, A. L. O.; MACIEL, L. F.; BISPO, E. S. Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during the fermentation process. **Journal of Food Science and Technology**, ago. 2020.

MISNAWI, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 38, p. 285-95, 2003.

MITCHELL, E. S.; SLETTENAAR, M.; MEER, N.; TRANSLER, C.; JANS, L.; QUADT, F., BERRY, M. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. **Physiology & Behavior**, v. 24, pags 816-822, out. 2011.

NAZARUDDIN, R., SENG, L.K., HASSAN, O. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 24, pag. 87–94, 2006.

NEBESNY, E.; RUTKOWSKI, J. The effect of roasting and secondary fermentation on cocoa bean enrichment. **Polish Journal of Food Nutrition and Science**, v. 48, pag. 437–444, 1998.

NIELSEN, D.S.; TENIOLA, O.D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, pag. 168-186, 2007.

OLIVEIRA, C. S.; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. P. S.; BISPO, E. S. Phenolic compounds,

flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, v. 113, n. 9, p. 1094-102, 2011.

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 – Food Science and Technology**, v. 122, mar. 2020.

ORACZ, J.; ZYZELEWICZ, D.; NEBESNY, E. The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region, and processing operations: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, pag. 1176-1192, 2015.

OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; ABDUL GHANI, N.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1523-30, 2007.

OTHMAN, A.; JALIL, A. M. M.; WENG, K. K.; ISMAIL, A.; ABD.GHANI, N.; ADENAN, I. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1052-9, 2010.

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

PAYNE, M. J.; HURST, W. J.; MILLER, K.; RANK, C.; STUART, D. A. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and Catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10518-27, 2010.

PEDAN, V.; WEBER, C.; DO, T.; FISCHER, N.; REICH, E.; ROHN, S. HPTLC fingerprint profile analysis of cocoa proanthocyanidins depending on origin and genotype. **Food Chemistry**, v. 267, pag. 277-287, nov. 2018.

PETTIPHER, G. L. An improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. **J Sci Food Agric**, v. 37, pag. 289–96, 1986.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-402, 2000.

QIN, F.; LU, Y.; LU, C.; LI, C.; ZHOU, Y.; SU, C.; CHEN, B.; SHEN, Y. Phenolic composition, antioxidant and antibacterial properties, and *in vitro* anti-HepG2 cell activities of wild apricot (*Armeniaca Sibirica* L. Lam) kernel skins. **Food Chem. Toxicol.**, v. 129, pag. 354-364, 2019.

SANDHYA, M. V. S.; YALLAPPA, B. S.; VARADARAJ, M. C.; PURANAİK, J.; JAGANMOHAN RAO, L.; JANARDHAN, P.; MURTHY, P. S. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, pag. 731-738, jan. 2016.

SANTOS, F. A.; PALMEIRA, E. S.; JESUS, G. J. An image dataset of cut-test-classified cocoa beans. **Journal Data in Brief**, v. 24, 103916, jun. 2019.

SCHWAN, R.F.; ROSE, A.H.; BOARD, R.G. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. **Journal of Applied Bacteriology (Supplement)**, v. 79, pag. 96S-107S, 1995.

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

SEIDEL, C.; BOEHM, V.; VOGELSANG, H.; WAGNER, A.; PERSIN, C.; GLEI, M.; JAHREIS, G. Influence of prebiotics and antioxidants in bread on the immune system, antioxidative status and antioxidative capacity in male smokers and non-smokers. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 349, 2007.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, parte B, pag. 820-897, out. 2015.

SHAHIR, S.; DIMICK, P. S. Qualitative and quantitative measurements of cocoa beans fermentation. In: DIMICK, P. S. (ed.) *Proceedings of the Cocoa Biotechnology Symposium*; Pennsylvania: Pennsylvania State University USA; 1986. p. 55-78.

STANLEY, T. H.; VAN BUITEN, C. B.; BAKER, S. A.; ELIAS, R. J.; ANANTHESWARAN, R. C.; LAMBERT, J. D. Impact of roasting on the flavan-3-ol composition, sensory-related chemistry, and in vitro pancreatic lipase inhibitory activity of cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 255, pag. 414-420, jul. 2018.

SUAZO, Y.; DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I. Effect of Fermentation and Roasting on the Phenolic Concentration and Antioxidant Activity of Cocoa from Nicaragua. **Journal of Food Quality**, v. 37, ed. 1, pag. 50-56, fev. 2014.

SUCCI, M.; TREMONTE, P.; PANNELLA, G.; TIPALDI, L.; COZZOLINO, A.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static *in vitro* digestion model. **Journal of Funcional Foods**, v. 35, pag. 60-67, ago. 2017.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of prunus domestica the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-8, 1959.

TOKUSOGLU, Ö., ÜNAL, K.M. Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. **Eur Food Res Technol**, v. 215, pag. 340–346, 2002.

VAN DEN BOGAARD, B.; DRAIJER, R.; WESTERHOF, B. E.; VAN DEN MEIRACKER, A. H.; VAN MONTFRANS, G.A.; VAN DEN BORN, B.J. Effects on peripheral and central blood pressure of cocoa with natural or high-dose theobromine: a randomized, double-blind crossover trial. **Hypertension**, v. 56, pag. 839-846, 2010.

VINSON, J. A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G. A. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an anti-atherosclerotic agent in an animal model, and significant contributor to antioxidants in

European and American diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 8071-6, 2006.

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

XU, JINGWEN; WANG, WEIQUN; LI, YONGHUI. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 52, pag. 629-639, jan. 2019.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, pag. 5165-5170, 2001.