



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DE TORRAÇÃO DO CACAU NO  
TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO  
CHOCOLATE.**

**TANISA ANDRADE ARAÚJO DE SOUZA**

Salvador- BA

2017

**TANISA ANDRADE ARAÚJO DE SOUZA**

**INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DE TORRAÇÃO DO CACAU NO  
TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO  
CHOCOLATE.**

**Orientador:** Dr. Sérgio Eduardo Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal da Bahia em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Salvador – BA

2017

Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA

Souza, Tanisa Andrade Araújo de  
Influência do tempo e temperatura de torração do cacau no  
teor de compostos bioativos e atividade antioxidante do  
chocolate. / Tanisa Andrade Araújo de Souza. -- Salvador, 2017.  
81 f. : il

Orientadora: Sérgio Eduardo Soares.  
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência  
de Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de  
Farmácia, 2017.

1. Chocolate. 2. FRAP. 3. DPPH. 4. Fenólicos. 5.  
Metilxantinas. I. Eduardo Soares, Sérgio. II. Título.



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

## TERMO DE APROVAÇÃO

TANISA ANDRADE ARAÚJO DE SOUZA

### INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DE TORRAÇÃO DO CACAU NO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CHOCOLATE

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 31 de maio de 2017.

#### BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Sérgio Eduardo Soares  
Universidade Federal da Bahia  
Orientador

---

Drª. Eliete da Silva Bispo  
Universidade Federal da Bahia

---

Dr. Leonardo Fonseca Maciel  
Universidade Federal da Bahia

*"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."*

(Charles Chaplin)

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por me dar força e coragem para superar todas as dificuldades.

À minha família, em especial aos meus pais, a minha segunda mãe, Jubiraci Pires, a minha bisavó Arlinda Viena (in memoriam), a minha avó Bernadete Martins e aos meus irmãos, pelo apoio e torcida.

Às minhas amigas de vida, Carine, Ana Luiza, Elane, Dulce e Tatiane, por dividir alegrias e tristezas.

Aos amigos que fiz nesta trajetória, Ana Cláudia, Joelza, Rosemary, Hebe, Fabiana, Gabriela, Rafaela, Túlio e Ismara, pelo apoio, companheirismo e momentos de distração.

Ao laboratório LAPAAC por acolher o projeto de pesquisa e desenvolvimento do trabalho e em especial aos colegas de laboratório Mariana, Tássia e Leonardo, pela compreensão e disposição em ajudar.

Ao Laboratório LAPESCA pelo auxílio nas análises, em especial Carolina Oliveira pela atenção e ajuda.

A aluna de IC, Lorena Melo pela prestatividade e colaboração com o projeto.

À professora Dr<sup>a</sup>. Eliete Bispo pelas contribuições desde antes de ingressar no mestrado que muito serviu para a realização desse sonho.

Ao professor Dr. Sérgio Soares, pela orientação na pesquisa realizada, pela compreensão, paciência, apoio e ensinamentos.

À FAPESB pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal da Bahia e todos os professores dessa instituição que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho e com a minha formação.

Obrigada!

SOUZA, Tanisa Andrade Araújo de. Influência do tempo e temperatura de torração do cacau no teor de compostos bioativos e atividade antioxidante no chocolate. 81f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2017.

## RESUMO

O cacau é um fruto muito apreciado, pois a partir de suas sementes é obtido um dos alimentos mais conhecidos: o chocolate. Seu sabor e suas características nutricionais são condicionados não apenas a atributos genéticos do cacauzeiro, mas também as modificações que ocorrem durante seu beneficiamento. A torração é uma das etapas do processamento do chocolate que afeta suas características sensoriais e nutricionais. Sob este contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a influência do tempo e temperatura de torração nos teores de compostos fenólicos, metilxantinas e atividade antioxidante em chocolates. A metodologia do estudo abrangeu a extração dos compostos fenólicos e metilxantinas, onde a quantificação de fenólicos totais foi realizada por Folin-Ciocalteu; sua identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e determinação de atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. A amostra que apresentou maior quantidade de fenólicos totais foi submetida às condições de  $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $t = 20$  minutos (C1). Os tratamentos submetidos à torração de  $80^{\circ}\text{C}$  por 20 e 40 minutos (amostras C1 e C2), apresentaram diferença significativa na atividade antioxidante pelo método DPPH. Enquanto que os tratamentos submetidos à torração a  $80^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos (amostra C2) apresentou diferença significativa das demais amostras pelo método antioxidante FRAP. Para a Superfície de Resposta, estes resultados foram diferentes estatisticamente, sofreram influência do tempo e temperatura nos dois métodos antioxidantes, mas não houve diferença significativa para todas as condições do processo de torração. Os compostos bioativos alcançaram diferença estatística significativa, mas a influência dos parâmetros não foi para todas as amostras e todos os compostos. O teor de Catequina sofreu influência do tempo e temperatura e apresentou valores menores comparados à Epicatequina, enquanto que a Teobromina apresentou maiores valores em relação à Cafeína e sofreu influência do tempo e da temperatura. Estes resultados demonstram que amostras de chocolates submetidos a diferentes tempos e temperaturas de torração podem apresentar influência nos compostos bioativos e na atividade antioxidante dos chocolates.

**Palavras-chave:** *Chocolate, FRAP, DPPH, fenólicos, metilxantinas.*

SOUZA, Tanisa Andrade Araújo de. Influence of the time and temperature of cocoa torration in the content of bioative compounds and antioxidant activity in chocolate. 81f. 2017. Dissertation (Master of Science in Food Science) - Federal University of Bahia, Faculty of Pharmacy, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

Cocoa is a very appreciated fruit, because from its seeds is obtained one of the best known foods: chocolate. Its flavor and nutritional characteristics are conditioned not only by the genetic attributes of cacao, but also the modifications that occur during its processing. Roasting is one of the stages of chocolate processing that affects its sensory and nutritional characteristics. In this context, the objective of this study was to verify the influence of roasting time and temperature on the levels of phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in chocolates. The methodology of the study included the extraction of phenolic compounds and methylxanthines, where the quantification of total phenolics was performed by Folin-Ciocalteu; its identification and quantification by high performance liquid chromatography (HPLC) and determination of antioxidant activity by DPPH and FRAP methods. The sample with the highest amount of total phenolics was submitted to conditions of  $T = 80^{\circ} \text{C}$  and  $t = 20$  minutes (C1). The treatments submitted to roasting at  $80^{\circ}\text{C}$  for 20 and 40 minutes (samples C1 and C2) presented a significant difference in antioxidant activity by the DPPH method. While the treatments submitted to roasting at  $80^{\circ}\text{C}$  for 40 minutes (sample C2) presented a significant difference of the other samples by the FRAP antioxidant method. For the Response Surface, these results were statistically different, influenced by time and temperature in the two antioxidant methods, but there was no significant difference for all conditions of the roasting process. Bioactive compounds achieved a statistically significant difference, but the influence of the parameters was not for all samples and all compounds. Catechin content was influenced by time and temperature and presented lower values compared to Epicatechin, whereas Theobromine had higher values in relation to Caffeine and was influenced by time and temperature. These results demonstrate that samples of chocolates submitted to different roasting times and temperatures may influence the bioactive compounds and the antioxidant activity of chocolates.

**Keywords:** *Chocolate, FRAP, DPPH, phenolics, methylxanthine*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cacaueiro .....	18
<b>Figura 2.</b> Variedades do cacaueiro.....	20
<b>Figura 3.</b> Corte transversal de um fruto do cacau expondo seu interior.....	21
<b>Figura 4.</b> Corte longitudinal de semente de cacau Trinitário e Criollo.....	22
<b>Figura 5.</b> Produção de cacau em toneladas no mundo.....	23
<b>Figura 6.</b> Produção de cacau em toneladas no Brasil.....	24
<b>Figura 7.</b> Microrregião cacaueira na Bahia.....	26
<b>Figura 8.</b> Fluxograma do processamento das sementes do cacau até a concepção dos liquors.....	28
<b>Figura 9.</b> Fluxograma das etapas do processamento secundário do cacau.....	30
<b>Figura 10.</b> Amêndoas de cacau no equipamento de torração.....	33
<b>Figura 11.</b> Principais polifenóis encontrados nas sementes de cacau.....	36
<b>Figura 12.</b> Estrutura química da Catequina.....	38
<b>Figura 13.</b> Estrutura química da Epicatequina.....	39
<b>Figura 14.</b> Estrutura química da Teobromina.....	41
<b>Figura 15.</b> Estrutura química da Cafeína.....	42
<b>Figura 16.</b> Formas radical e não radical do DPPH.....	46
<b>Figura 17.</b> Reação de oxidação-redução da tripiridiltriazina férrica a tripiridiltriazina ferrosa.....	47
<b>Figura 18.</b> Superfície de resposta para as atividades antioxidantes em função do efeito do tempo e temperatura de torração sobre os chocolates.....	59
<b>Figura 19.</b> Superfície de resposta dos compostos fenólicos e metilxantinas em função do efeito do tempo e temperatura de torração sobre os chocolates.....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ensaio das amostras e suas variáveis independentes de tempo (t) e temperatura (T).....	51
<b>Tabela 2.</b> Níveis de variações das variáveis independentes.....	51
<b>Tabela 3.</b> Composição dos fenólicos totais, atividade antioxidante, compostos fenólicos e metilxantinas dos chocolates de acordo as condições de torração submetidas.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Fase A
AA	Antioxidante
Aam	Absorbância amostra
Ac	Absorbância controle
AH	Antioxidante
ANOVA	Análise de Variância
ASSISTAT	Assistência Estatística
B	Fase B
BR	Brasil
C	Coluna
cm	Centímetro
Cu	Cobre
°C	Grau Celsius
CEPLAC	Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira.
CE	Concentração Eficiente
CI	Concentração Inibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FAOSTAT	Food and Agricultural Organization Statistical
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
Fe	Ferro
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto Férrico
FGV	Fundação Getulio Vargas.
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
g	Grama
GAE	Ácido gálico
H	Hidrogênio

HCl	Ácido clorídrico
HDL	High Density Lipoproteins
H <sub>2</sub> O	Água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICCO	Organización Internacional del Cacao
Kg	Quilograma
Km	Quilômetro
LDL	Low Density Lipoproteins
m	Massa
min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Massa Molar
MO	Missouri
µmol	Micromol
µM	Micromolar
µL	Microlitro
µg	Micrograma
mm	milímetro
nm	Nanômetro
OK	Oklahoma
pH	Potencial Hidrogeniônico
R	Radicalar
rpm	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Temperatura
TE	Trolox equivalents
t	Tempo
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta visível
v	Volume

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. Objetivo Geral .....	16
2.2. Objetivos Específicos .....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
3.1. Cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L) .....	17
3.1.1. Origem e generalidades .....	17
3.1.2. O fruto e suas variedades.....	19
3.1.3. O cacau no Brasil e no mundo.....	22
3.2. Beneficiamento do cacau .....	27
3.2.1. Pré-processamento do cacau .....	28
3.2.2. Processamento do chocolate .....	30
3.2.2.1. Torração .....	31
3.3. Compostos bioativos do cacau .....	33
3.3.1. Compostos Fenólicos (Polifenóis).....	35
3.3.1.1. Catequina .....	38
3.3.1.2. Epicatequina .....	39
3.3.2. Metilxantinas .....	40
3.3.2.1. Teobromina .....	41
3.3.2.2. Cafeína.....	41
3.3.3. Compostos bioativos e a torração .....	42
3.4. Atividade antioxidante do cacau e chocolate .....	43
3.4.1. Métodos de análise antioxidantes .....	44
3.4.1.1. DPPH .....	45
3.4.1.2. FRAP .....	47
3.5. Determinação e quantificação de compostos bioativos do cacau.....	48
3.5.1. CLAE.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	50
4.1. Chocolates.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2. Torração das amêndoas.....	50
4.3. Produção dos chocolates.....	50
4.4. Desenho experimental.....	50

<b>4.5. Elaboração dos extratos .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.1. Fenólicos totais.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6. Determinação da atividade antioxidante .....</b>	<b>52</b>
<b>4.6.1. Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) .....</b>	<b>52</b>
<b>4.6.2. Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) .....</b>	<b>53</b>
<b>4.7. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas.....</b>	<b>53</b>
<b>4.8. Análise estatística .....</b>	<b>54</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1. Fenólicos totais e Atividade antioxidante .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O chocolate, produto originado do aproveitamento de sementes do cacau, tornou-se notável por suas características sensoriais peculiares, sua capacidade antioxidante e possíveis efeitos benéficos à saúde humana. Cultivado em regiões tropicais, suas variedades genéticas e modificações decorrentes do seu processamento podem alterar o produto final.

A torração, uma das etapas de processo de produção do chocolate, é essencial para se adquirir as características de qualidade no produto (LOPES et al., 2003). No entanto, diversos fatores interferem nas condições de torração, como a procedência e o tipo da amêndoa, o tempo de colheita, os tratamentos anteriores à torração, além da umidade e do tamanho das amêndoas ou dos *nibs* (BRITO, 2000; LOPES et al., 2003).

Os compostos fenólicos ou polifenóis ocorrem em frutas, vegetais, sementes, flores, bebidas e alguns alimentos industrializados (BRAVO, 1998). Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau são das classes dos taninos e dos flavonóides (WOLLGAST e ANKLAM, 2000). No entanto, nesta etapa perde-se, pelo menos, 50% dos flavonóides existentes no cacau (PAOLETTI et al., 2012; LEITE et al., 2013; CRUZ et al., 2015).

A atividade antioxidante do chocolate é reconhecida através dos flavonóides que neutralizam os radicais livres e inibem as enzimas responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio. Entre os flavonóides presentes no cacau e no chocolate, a (+)-catequina e a (-)-epicatequina são mais abundantes e os principais representantes. A (-)-epicatequina tem sido citada como o principal flavanol monomérico do cacau, representando aproximadamente 35% do conteúdo total dos fenólicos (WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

As metilxantinas, como teobromina e cafeína, são compostos bioativos encontrados nas sementes de cacau, caracterizadas como alcalóides purínicos e consideradas substâncias estimulantes. (BRUINSMA e TAREN, 1999). Os benefícios atribuídos ao alto conteúdo fenólico e outros compostos bioativos do cacau e chocolates culminam em um interesse particular sobre estes alimentos, dos pontos de vista nutricional e farmacológico, tornando crescente o interesse nas atividades biológicas a eles associados (VISIOLI et al., 2009).

Portanto, o objetivo deste estudo foi examinar a influência do tempo e temperatura de torração de cacau nos teores de compostos fenólicos, metilxantinas e atividade antioxidante em chocolates produzidos na região sul da Bahia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Verificar a influência do tempo e temperatura de torração nos teores de compostos fenólicos, metilxantinas e atividade antioxidante em chocolates produzidos na região sul da Bahia.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Identificar e quantificar os compostos fenólicos nas amostras de chocolate em diferentes tempos e temperatura de torração;
- Identificar e quantificar as metilxantinas nas amostras de chocolate em diferentes tempos e temperatura de torração;
- Determinar a atividade antioxidante pelo método DPPH nestas amostras;
- Determinar a atividade antioxidante através do método FRAP nestas amostras;
- Correlacionar os dados obtidos e verificar a influência do tempo e temperatura de torração destes chocolates.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Cacau (*Theobroma cacao* L)

##### 3.1.1. Origem e generalidades

O cacauéiro é originário das florestas equatoriais - fixadas na região do Equador, onde as temperaturas são elevadas e quase invariáveis - da América do Sul, entre elas a Amazônia, especificamente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, devido a sua necessidade de climas quentes e úmidos. Entretanto, seu cultivo se deu primeiramente na América Central, e também desenvolveu-se nas terras baixas do México, na América do Norte (BATISTA, VIERO, 2012; LOPES et al., 2011; EFRAIM, 2009).

Esta planta era nomeada pelos astecas e outros grupos de língua nahuatl de “cacaohoaquahuitl”, os seus frutos de “cachocentli” e suas sementes de “cacaoatl”, nome empregado hoje em dia para a espécie (LOPES et al., 2011). Estes povos a utilizavam sob a forma de bebida, a qual após a colonização, principalmente espanhola, espalhou-se pela Europa e, posteriormente, pelos Estados Unidos (BATISTA e VIERO, 2012).

Desta forma, o gênero *Theobroma* que pertence à ordem Malvales, da família *Malvaceae*, e da espécie *Theobroma cacao* L., passou a ser denominado por Lineu em 1737 e foi constituído alimento dos deuses, em menção à origem divina atribuída ao cacauéiro pelos povos mesoamericanos (LOPES et al, 2011; EFRAIM, 2009). São conhecidas 22 espécies pertencentes ao gênero *Theobroma*, entre elas a *Theobroma cacao*, à qual suas sementes são utilizadas de maneira econômica. (SODRÉ, 2007).

O cacau é uma planta que necessita de umidade, tanto do ar quanto do solo; imprescindível para a criação de ambiente sombreado, necessário para a vida saudável das fazendas e uma boa produção; de temperaturas médias anuais entre 25°C e 27°C, não tolerando temperaturas inferiores a 15°C; umidade relativa do ar, em média, a maior de 88% em junho e a menor, 85%, em janeiro, para o perfeito desenvolvimento dos frutos (ROCHA, 2008).

Para plantio do cacau são imprescindíveis chuvas regulares, temperatura média de 25°C e precipitação anual entre 1500 e 2000 mm, e o solo deve ser profundo e fértil (MARTINI, 2004). Este deve ser argilo-arenoso, que se diferencia por possuir grãos de argila que ficam unidos entre si retendo sais minerais e água, fatores essenciais para o desenvolvimento vegetal. Além do mais, o solo deve ser bem aerado (para promover a

renovação do ar), propiciar a absorção de nutrientes por parte das raízes da árvore e ter uma apropriada quantidade de matéria orgânica, o que já é provido pelas folhas derrubadas pelas árvores de grande tamanho nas proximidades do cacauzeiro (ROCHA, 2008).

Na figura 1 é mostrada a árvore do cacau que chega a ter de 5 a 10 metros de altura e seus primeiros frutos são colhidos cerca de 5 anos após a plantação (MARTINI, 2004). É constituída por folhas finas de tamanho próximo a 40 cm, com tronco de coloração escura, do qual geram os frutos, possui flores com cinco pétalas, sendo sua reprodução secundária à polinização feita por insetos (entomofilia) (SILVA NETO et al., 2001). Em cada árvore de cacau podem nascer 35.000 e 116.000 flores ao ano, onde menos de 5% são polinizadas e menos de 1% reproduzem uma fruta madura (PAOLETTI et al., 2012). Sendo assim, sua produção anual gera em torno de 0,5 a 2 kg de sementes, já fermentadas e secas, por árvore (BELITZ e GROSCH, 1999; ICCO, 2015).

A frutificação do cacauzeiro começa em torno dos três anos e produz consideravelmente a partir dos oito, trazendo produção satisfatória até os trinta anos. Porém, em condições extraordinárias, pode produzir até cinquenta anos, e viver mais de cem (LAJUS, 1982; ELKON, 2004). E apesar de instituir-se monocultura, não degrada o solo, pois o cacauzeiro necessita da sombra das árvores para dar frutos. Desta maneira para a produção do cacau não se pode retirar a mata e isso evita o desmatamento e a degradação do solo (ALMEIDA e RIGOLIN, 2007).

**Figura 1.** Cacauzeiro.



**Fonte:** CEPLAC, 2011.

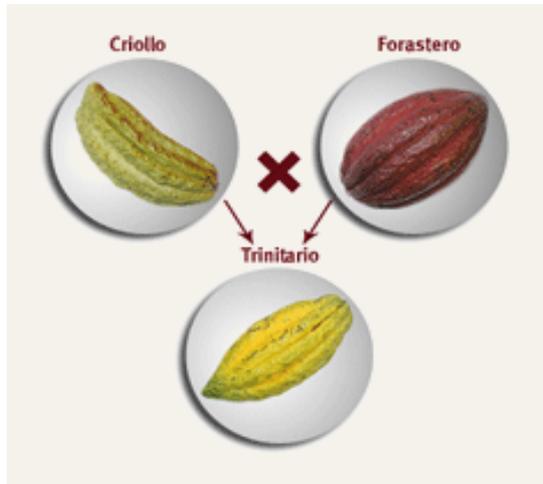
O cacau tornou-se um fruto muito conhecido devido ao bom emprego de suas sementes (amêndoas) para produção de manteiga de cacau e chocolate. Contudo, o sabor de seus produtos depende não apenas das características genéticas do cacauíeiro (variedade), como também das modificações que ocorrem durante seu processamento (ALVES, 2002; BECKETT, 1994).

O símbolo da modernização da cacauicultura está no uso da matéria-prima, das técnicas e na uniformização da produção. A atividade cacauíeira é caracterizada pela lavoura, pela indústria processadora e chocolateira, sendo distinguida pela separação intensa entre o setor primário e o setor industrial, não existe, portanto conexão intersetorial; desta forma os produtores rurais não estão submetidos diretamente às empresas processadoras. A industrialização do cacau é um dos setores mais ativos da atividade cacauíeira e um dos mais importantes do mundo, mas é controlado por poucas empresas em todo mercado internacional (ALMEIDA, 2008).

### **3.1.2. O fruto e suas variedades**

Existem três tipos principais de variedades de cacauíeiro: *Criollo*, *Forastero* e *Trinitário*, representadas na Figura 2. A maioria do cacau comercializado mundialmente é do tipo *Forastero*, muito prolífero e resistente, participa de cerca de 95% da produção mundial de grãos de cacau; o *Criollo* proporciona sementes de cacau muito aromáticas, mas devido à sua sensibilidade perante as mudanças de climas, é muito propício a doenças e pragas, fazendo com que o seu rendimento seja muito baixo; o tipo *Trinitario* decorre da hibridização entre *Forastero* e *Criollo*. As variedades *Trinitário* e *Criollo* geram um chocolate apontado com qualidade excelente, suave aroma e sabor (ALVES, 2002; BECKETT, 2009).

**Figura 2.** Variedades do cacauero



**Fonte:** Luker Food Ingredients. Disponível em <http://avabayat.com/Products/CasaLuker/index.html>

A variedade *Criollo* é uma planta suavemente colorida e com uma noz de caráter mole que se sobressai pela alta peculiaridade de suas sementes, embora tenha pouca robustez e baixo rendimento. As sementes são grandes, abauladas e de secção transversal arredondada; seus cotilédones podem ser brancos ou cor-de-rosa, bem pálido na semente fresca, originando um produto bem pouco adstringente (DE ZAAN, 1993; DIMICK, 1986). A casca do fruto é mole, de superfície áspera e com 5 sulcos bem distinguidos. O tempo de fermentação após colheita é pequeno e na maioria das vezes não dura mais que um dia. Hoje em dia, o cultivo desta espécie de cacau corresponde uma percentagem bastante pequena da produção mundial de cacau. Exemplos de cacau *Criollo*: alguns dos tipos cultivados na Venezuela, no Caribe e na Papua-Nova Guiné (VERÍSSIMO, 2012).

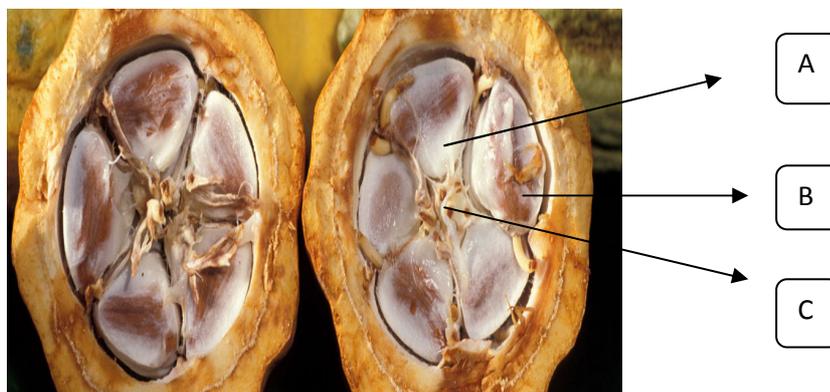
O cacau *Forastero* reproduz a maior percentagem de cultivo a nível mundial, em média 95%, isto porque é uma planta vigorosa de cor castanha escura e usualmente possibilita grandes produções. As sementes do seu fruto são achatadas, com os cotilédones pigmentados de diversas nuances de roxo nas sementes frescas, originando um produto que pode ser adstringente ao adverso ao cacau *Criollo* (DIMICK, 1986; DE ZAAN, 1993). O seu pericarpo é diferente do cacau *Criollo*, pois não é rugoso e não apresenta sulcos tão salientes. O tempo de fermentação pode variar de poucos dias a uma semana ou mais. A maior parte da produção mundial de cacau incide sobre o tipo *Forastero*, mais especificamente no subtipo denominado *Amelonado*. A planta *Forastero* é notória pela sua habilidade em resistir a condições climáticas mais ríspidas e também por proporcionar um maior teor de gordura, ao contrário do cacau *Criollo* que é conhecido pelas suas peculiares de sabor (DE ZAAN, 1993).

Enquanto isso, o cacau *Trinitário* é comercialmente conhecido como “fine cocoa” e é produzido em Granada, Jamaica, Trinidad e Tobago, Colômbia, Venezuela e América Central. Este foi gerado em consequência do cruzamento entre o cacau *Forastero* e o *Criollo*. Este tipo de cacau é mais persistente e fértil que o cacau *Criollo*, no entanto possui atributos inferiores. Possui características muito variáveis como: a cor dos cotilédones, o tamanho e a forma da semente, as propriedades da casca do fruto e a adstringência, todavia a cor varia entre branco e roxo (DIMICK, 1986; VERÍSSIMO, 2012).

A depender do genótipo do fruto de cacau ele pode possuir cores e formas diferentes e o tamanho pode variar entre os 15 cm e 30 cm de comprimento. Um fruto do cacau pode conter 50 sementes que estão atreladas a uma placenta e cercadas por uma polpa que contém cerca de 10,0-13,0% de açúcar, 1,0% pectinas e 1,0-2,0% de ácido cítrico (PAOLETTI et al., 2012). As sementes podem representar entre 13,5 e 29% do peso do fruto (SILVA, 2000; MATTIETTO, 2001).

A estruturação interna do fruto do cacau, exposta da Figura 3, é motivada pela espécie, as circunstâncias agrônômicas e sua linhagem. A propósito de alcançar o sabor de chocolate pretendido, as sementes e a polpa têm de ser separadas e tratadas posteriormente (PAOLETTI et al., 2012). O cotilédone e um pequeno gérmen de planta embrionária são recobertos por um envoltório nomeado testa, e a semente é coberta por uma polpa branca com tonalidade rosada, mucilaginosa e doce (BATALHA, 2009; BECKETT, 1994). A testa secreta a mucilagem e opera como meio de condução entre os cotilédones e a polpa mucilaginosa (SILVA, 2000; MATTIETTO, 2001).

**Figura 3.** Corte transversal de um fruto do cacau expondo seu interior. A: Polpa mucilaginosa; B: Cotilédone; C: Placenta



**Fonte:** Correio Gourm@nd. Disponível em

[http://correiogourmand.com.br/info\\_03\\_dicionarios\\_gastronomicos\\_alimentos\\_frutas\\_cacau.htm](http://correiogourmand.com.br/info_03_dicionarios_gastronomicos_alimentos_frutas_cacau.htm)

O cotilédone contém células que apresentam reservas protéicas, lipídicas, amido e células polifenólicas. No tecido fresco preponderam células contendo glóbulos lipídicos que recobrem a face interna da membrana celular. As células polifenólicas dispõem de um amplo e único vacúolo cheio de polifenóis que são responsáveis pela tonalidade dos cotilédones. Este vacúolo é lisado durante o método fermentativo (MATTIETTO, 2001; URBANSKI, 1992).

As sementes podem medir de 2 a 3 cm de comprimento e apresentam polpa, testa e cotilédones. A figura 4 representa o corte longitudinal de sementes de cacau. A composição média das sementes de cacau, em matéria seca é de 40,0-60,0% de manteiga de cacau, 10,0-15,0% de proteínas, 6,0% de amido, entre 0,9-1,4% de teobromina e 0,2% de cafeína (porém a espécie *Criollo* pode conter até 1,3%) e 5,0-9,0% flavonóides (PAOLETTI et al., 2012).

**Figura 4.** Corte longitudinal de semente de cacau Trinitário e Criollo. A: Casca; B: Gérmen ou embrião; C: Cotilédone.



**Fonte:** Costa Rica. Disponível em <https://www.costarica.com/blog/day-9-chocolate-dreams/>

### 3.1.3. O cacau no Brasil e no mundo

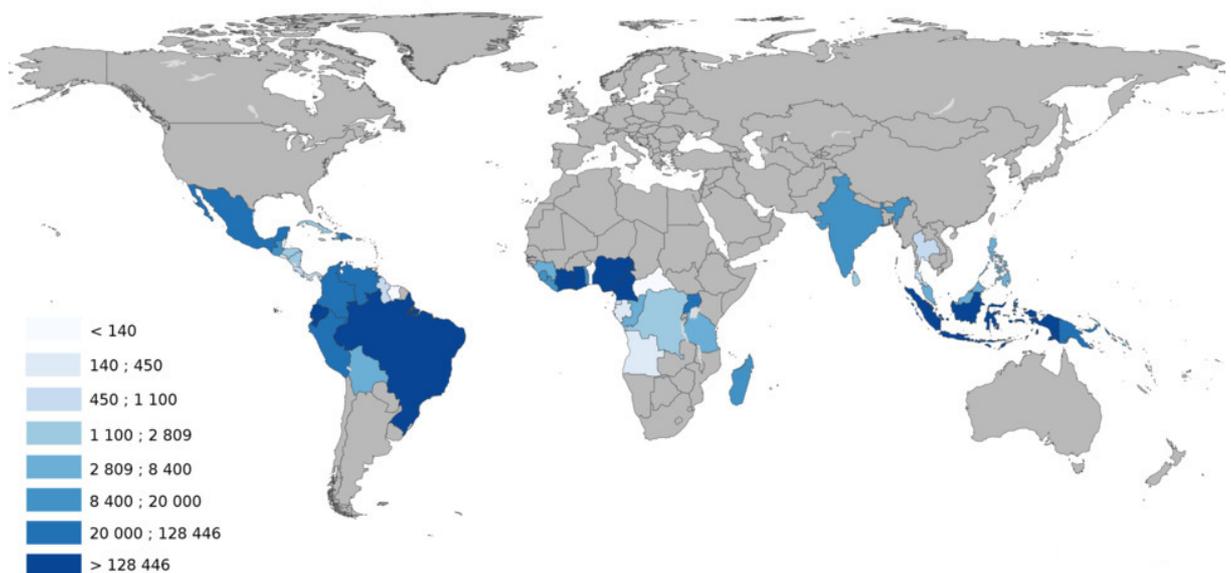
A atividade cacauera está relacionada, de modo geral, às etapas de produção do cacau, a começar do preparo da terra, implantação da cultura até a produção do cacau em amêndoas

secas; comércio relacionado com a compra e venda de amêndoas secas e deslocamento até as indústrias de transformação; técnica e melhoramento nas indústrias de modificação do cacau; comercialização dos subprodutos das amêndoas (GOMES et al., 2015).

O cacau e seus subprodutos como o chocolate são largamente consumidos em diversos países e culturas, a exemplo da população holandesa, onde o chocolate fornece até 20% do total de flavonóides em adultos, e em crianças, a percentagem é ainda maior (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 2005). O chocolate é considerado o terceiro maior contribuinte de antioxidantes à dieta americana com 100-107 mg / dia (frutos 255 mg / dia, legumes 233 mg / dia) (VINSON et al., 2006).

A figura 5 representa a produção mundial de cacau em 2013. Conforme dados da ICCO (International Cocoa Organization), os maiores produtores mundiais de cacau são a Costa do Marfim com 1.242 mil toneladas na safra 2009/10, seguida por Gana (632 mil toneladas), Indonésia (550 mil toneladas), Nigéria (240 mil toneladas), Camarões (205 mil toneladas), Brasil (161 mil toneladas), Equador (160 mil toneladas) e Papua Nova Guiné (50 mil toneladas) (ICCO, 2015). Em 2010/2011 a maior produtividade da safra foi de 4,3 milhões de toneladas de amêndoas de cacau. A receita anual prevista, em 2012, com o comércio de cacau, foi de US\$ 4 bilhões e em 2013 a produção de cacau foi de 8,2 milhões de hectares (ICCO (2015).

**Figura 5.** Produção de cacau em toneladas no mundo.



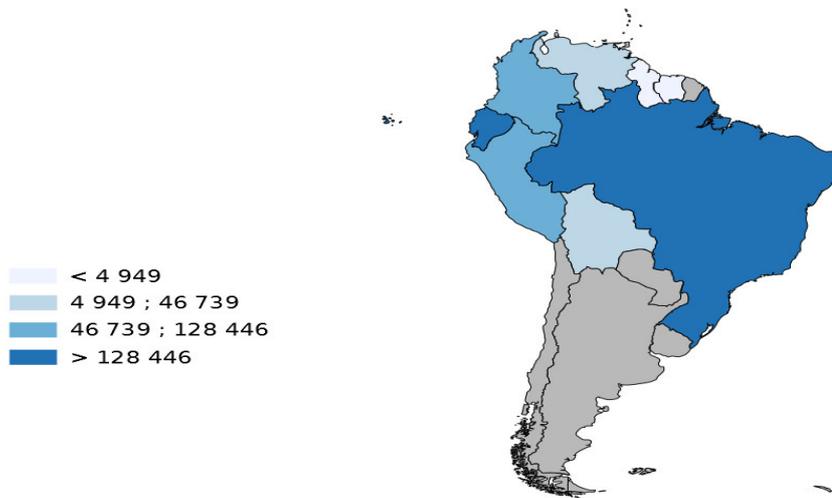
**Fonte:** FAO, 2013.

Todavia, deve-se destacar que o custo médio do cacau na bolsa de Nova York, em 2010, para o acordo com entrega em maio de 2011, foi de US\$ 2.942/tonelada, levando a acreditar em cifras do comércio mundial de amêndoas de cacau em torno de US\$12,5 bilhões (MARQUES, 2015). Na Figura 6 encontra-se a produção de cacau em toneladas no Brasil no ano de 2013. O maior requerente dos ingredientes de cacau, o comércio mundial de chocolates, obteve receitas de US\$ 117 bilhões em 2014, conforme a consultoria KPMG (2014).

O Brasil ocupava o 2º lugar do ranking de produção mundial até a década de 80 e caiu para o 4º lugar, devido a: diminuição da área de plantio e da norma tecnológica adotada, a propagação da doença conhecida como “vassoura de bruxa” nas plantações do principal estado produtor, a Bahia (ALMEIDA et al., 2001). Com isso, na década de 90 o Brasil passou de exportador de cacau em amêndoas a importador do produto (FGV/EMBRAPA, 2003).

Em 2010 o Brasil foi considerado 5º produtor de cacau do mundo, sendo cerca de 90% de todo o cacau brasileiro exportado (CEPLAC, 2010). Em 2011, a produção anual de cacau no Brasil foi de 248.165 mil toneladas e em 2012 obteve 232.849 mil toneladas, segundo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Com o panorama de crises e decaimento da produtividade cacauzeira no Brasil, o país passou a ser o sexto maior produtor de amêndoas de cacau do mundo, com participação de 5% na produção no ano de 2011 de acordo com dados da FAO (2013). Em 2016, de acordo com o IBGE (2017), a produção de amêndoas de cacau foi de 214.741 mil toneladas e a previsão para 2017 é de 274.874 mil toneladas, com uma variação percentual positiva na estimativa de produção em relação ao ano anterior de 28%.

**Figura 6.** Produção de cacau em toneladas no Brasil.



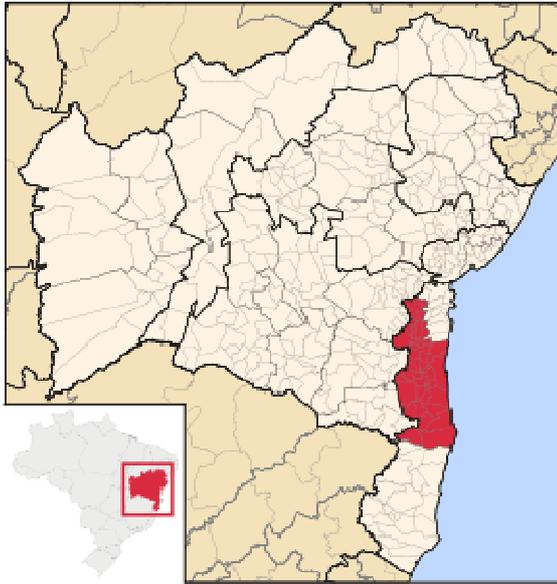
**Fonte:** FAO, 2013.

No Brasil, os estados que predominam como produtores de cacau são: Bahia, Amazonas, Pará, Espírito Santo, Rondônia e Mato Grosso; estados que tiveram e tem altos e baixos na produção e exportação desse produto agrícola. No Sul da Bahia em particular, principal área produtora do Estado e do país, esta região experimentou uma fase muito próspera, que foi da segunda metade da década de 1970 até meados da década de 1980, onde após este período entrou numa condição de grandes dificuldades. Instalou-se uma crise aguda no início dos anos de 1990 que foi reflexo de diversos fatores entre eles: baixa de preços do produto, política cambial e, em particular, a doença denominada “vassoura-de-bruxa” (*Monillioptora perniciosa*), que atacou as plantações de cacau da região (ROCHA, 2008).

A região Sul da Bahia, denominada “Região Cacaueira” representada na Figura 7, é onde se concentra a produção de cacau no estado, onde possui 89 municípios, cerca de 90.000 km<sup>2</sup> e 2 milhões de habitantes, centralizada pelas cidades de Ilhéus e Itabuna, é motivador de cerca de 95% da produção brasileira, ficando o Espírito Santo com 3,5% e a Amazônia em 1,5% (CEPLAC, 2010). Com a organização e evolução da lavoura cacaueira da região Sul da Bahia, esta passou a ser vista como um “Eldorado” a partir do final do século XIX e início do XX. Conseqüentemente, inúmeras pessoas chegavam de diversas partes do país, sobretudo de Sergipe, seduzidos pela fama de riqueza imputada à “árvore dos frutos de ouro”. O cacau é

um símbolo regional de grande relevância, por ter sido o produto agrícola mais importante do Sul da Bahia chegando a compor, geográfica e economicamente, em sua zona de atuação, uma *microrregião cacauera* (ROCHA, 2008).

**Figura 7.** Microrregião cacauera na Bahia.



**Fonte:** Wikipédia. Disponível em:

[https://pt.wikipedia.org/wiki/Microrregi%C3%A3o\\_de\\_Ilh%C3%A9us-Itabuna](https://pt.wikipedia.org/wiki/Microrregi%C3%A3o_de_Ilh%C3%A9us-Itabuna)

O cacau foi introduzido no litoral, em Canavieiras, que na época fazia parte de Ilhéus e foi a primeira área a cultivá-lo em 1746, porém, a atual área do município de Ilhéus que se estabeleceu como eixo da região cacauera. Levando a expansão da cultura para o interior, em uma disputa pelas melhores terras. Surgindo a partir daí, diversas cidades em função dessa cultura (ROCHA, 2008).

No mercado externo o Brasil passa a ganhar destaque a partir do século XXI: da participação nos mercados de qualidade do cacau e chocolate, com a produção e importância do cacau fino e de aroma brasileiro, através de atuações e premiações em eventos internacionais a exemplo do Salão de Chocolate de Paris e a consolidação de sociedades com notáveis chocolateiros do mercado “gourmet” mundial. Fixou-se também nos mercados de qualidades do cacau com as certificações: orgânicos, sustentáveis (Fair for Life e Rainforest Alliance) – a partir do ano de 2004 e da Identificação de Procedência do Cacau de Linhares – Espírito Santo em 2012 (ESTIVAL, 2013).

Atualmente, a agroindústria do cacau enfrenta novos desafios pautados na ampliação da produtividade, inovação e qualidade, face ao crescimento e variabilidade das demandas dos

mercados consumidores globais de chocolates e produtos à base de cacau (manteiga de cacau e pó de cacau) (ESTIVAL e LAGINESTRA, 2015). De acordo com o IBGE (2017), a produção de amêndoas de cacau na Bahia em 2016 foi de 116.122 mil toneladas, enquanto que em janeiro de 2017 essa produção já chegava a 145.772 mil toneladas, com uma variação positiva em torno de 25,5%.

### **3.2. Beneficiamento do cacau**

O beneficiamento das sementes do cacau tem vasta importância social, econômica e ambiental no planeta. Como resultado deste benefício, espera-se o provimento dos ingredientes para a fabricação de chocolates. (SANTOS, 2016). A modificação das sementes do cacau ocasiona variados produtos semimanufaturados como: o chocolate em pó, a massa de cacau e a manteiga de cacau; além de artigos manufaturados como o próprio chocolate (DRUMMOND, 1998).

Sendo o chocolate o principal produto obtido a partir do cacau, este é um dos alimentos mais contemplados mundialmente (EFRAIM et al., 2009) que compõe-se de uma mistura da massa de cacau, manteiga de cacau e açúcar, acrescida de aromatizantes e emulsificantes (LIMA, 2010).

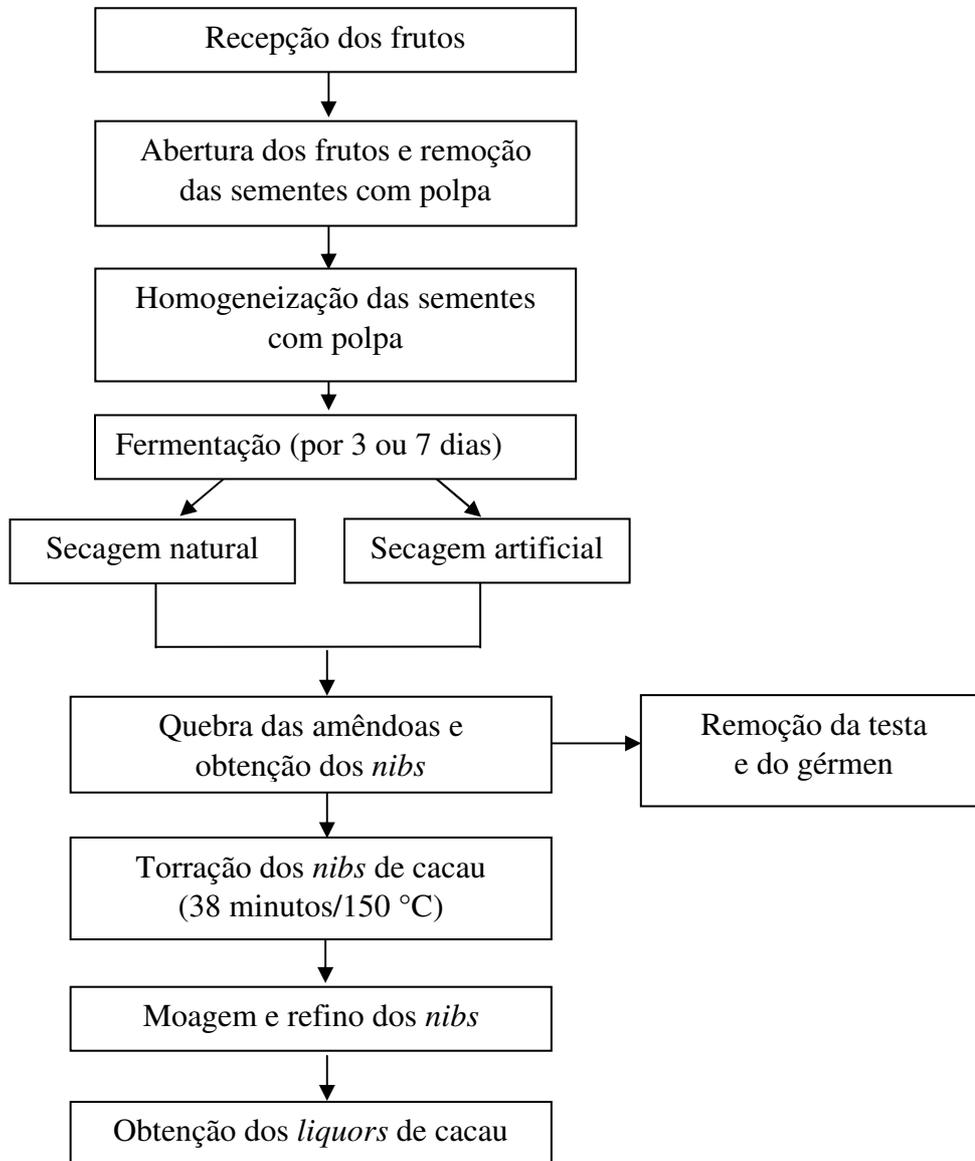
O beneficiamento do cacau é conduzido a começar da colheita, seguido pela quebra, limpeza, fermentação e secagem. As amêndoas são depositadas no cocho (caixas de madeira com divisórias utilizadas para revolver as amêndoas) para fermentar, em uma média de seis a oito dias. Após fermentadas são movidas para a barcaça (lastro fixo com cobertura móvel usada para secagem natural) onde ficam em torno de oito a doze dias conforme a temperatura. Todo este procedimento de beneficiamento do produto deve ser seguido rigorosamente, para se conseguir excelentes amêndoas que darão procedência a um chocolate de bons atributos (MARTINS, et al., 2012; SILVA et al., 2009).

A origem e as características das amêndoas de cacau determinam os predicados do produto final, que irá atender a demanda de consumidores que buscam qualidade nos chocolates, entre eles: saudabilidade, segurança alimentar, maior conteúdo de cacau, maior concentração de flavonóides, origem orgânica e sustentável, entre outras condições dos mercados de qualidade do segmento (ESTIVAL e LAGINESTRA, 2015).

A tecnologia de colheita e pós-colheita do cacau é de enorme acuidade para se reunirem as características que fazem do chocolate um produto tão desejado (OETTERER, REGINATO-

D'ARCE e SPOTO 2006); as quais estão demonstradas na Figura 8 através de um fluxograma do processamento das sementes do cacau até a concepção dos *liquors*.

**Figura 8.** Fluxograma do processamento das sementes do cacau até a concepção dos *liquors*.



**Fonte:** Efraim et al, 2010. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612010000500022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000500022).

### 3.2.1. Pré-processamento do cacau

As etapas de pré-processamento do cacau (colheita do fruto, quebra, retirada das sementes, fermentação e secagem das amêndoas) são importantes na garantia da qualidade das amêndoas, de acordo com Santos et al. (2000) e Lagunes-Galvez et al. (2007), e nas palavras

de Oetterer, Reginato-D'arce e Spoto (2006), reúnem as características que fazem do chocolate um produto tão admirado.

Previamente o fruto é colhido com podões e aglomerados no chão para serem abertos (OETTERER, REGINATO-D'ARCE e SPOTO, 2006). O intervalo entre a colheita e a quebra não deve exceder cinco dias, pois objetiva diminuir problemas de germinação e queda de rentabilidade (MI, 2005). A casca é separada e o material interno (amêndoas e polpa) é posto em caixas de madeira para serem encaminhados à cura (OETTERER, REGINATO-D'ARCE e SPOTO, 2006). Neste procedimento as caixas são cobertas com folhas de bananeiras para diminuir prejuízos de calor e impedir a desidratação da camada superficial (BEGIATO et al., 2009).

A cura é a etapa inicial do tratamento do cacau que torna o fruto um produto de valor para a comercialização. Desta maneira, a separação da semente e da polpa para obter a amêndoa seca proporciona características e constituição diferentes da semente fresca (BASTOS, 2003; NACHTIGALL, 1999).

O tratamento das sementes de cacau começa na colheita dos frutos maduros, pois considera-se que tem resultados favoráveis nas características e sabor dos grãos durante a fermentação e processamento posterior (AFOAKWA, 2010). As sementes serão modificadas, isto é, será retirado o tegumento (casca) e germe para adquirir as amêndoas que são matéria prima para aquisição de pasta de cacau, manteiga de cacau, cacau em pó e por fim chocolate (OETTERER, REGINATO-D'ARCE e SPOTO, 2006; PONTILLON, 2009).

As amêndoas e a polpa que estarão dentro das caixas de madeira seguirão com o processo de fermentação, que a princípio provoca o inchaço das amêndoas. Estas logo perdem água e adstringência, tendo a coloração marrom escura pela transformação dos polifenóis em função da acidez gerada pela alteração de pH. O processo total é concluído por volta de seis e oito dias e não apenas facilita a separação da polpa e da amêndoa, como também a altera produzindo os precursores do sabor e do aroma típicos almejados. Ao fim da fermentação, as amêndoas possuem um teor de umidade de 50% a 60% (OETTERER; REGINATO-D'ARCE e SPOTO; 2006).

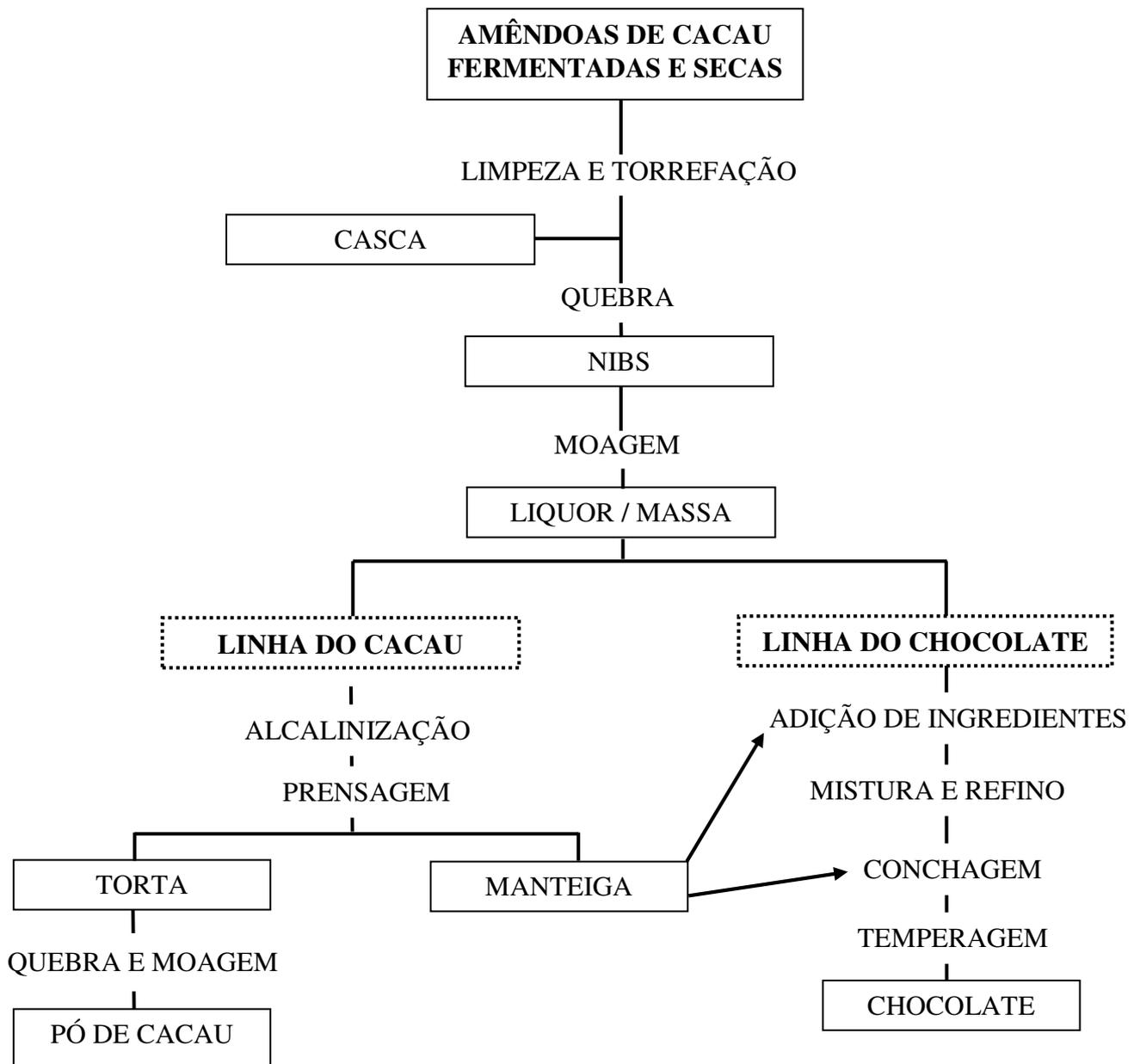
A etapa subsequente, denominada como secagem, exhibe uma grande quantidade de reações químicas que ocorre consolidando a cor marrom do cacau e deixando-o com mínima umidade para o armazenamento. A secagem ocorre em barcaças, onde as amêndoas ficam espalhadas sobre o lastro e ficam expostos ao sol. Existem enzimas que atuam no interior das amêndoas e originam as reações químicas de cura que diminuem a acidez, originando o sabor,

aroma e cor particulares do chocolate. Este processo dura entre oito a doze dias ocasionando um produto com umidade final de cerca de 7% (BECKETT, 1994).

### 3.2.2. Processamento do chocolate

O processamento, representado na Figura 9, é a fase consecutiva que compreende o fornecimento das principais matérias-primas: liquor, manteiga e pó de cacau, e a fabricação propriamente dita do chocolate e produtos achocolatados, ocorrendo a partir das amêndoas previamente torradas (BECKETT, 1994; SANTOS et al., 2000).

**Figura 9.** Fluxograma das etapas do processamento secundário do cacau.



**Fonte:** Efraim et al., 2010.

No processamento industrial do cacau a princípio ocorre a retirada de impurezas (fibras, insetos, pedras, metais, etc.) que podem possivelmente aparecer nos lotes de amêndoas de cacau a serem processadas e que podem intervir nas fases seguintes (MINIFIE, 1999; FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008).

A maioria das impurezas é dura e podem acarretar danos aos equipamentos utilizados para moagem das amêndoas, além disso, contaminantes orgânicos irão inflamar durante a torração, liberando vapores que poderão causar interferência negativa no sabor do cacau. Na limpeza são aplicados diferentes métodos, como emprego de magnetos, ventilação e vibração (FERRÃO, 2002; BECKETT, 2008). Após a retirada das impurezas as amêndoas de cacau são conduzidas para a etapa de tratamento térmico (COPETTI, 2009).

O progresso do aroma do chocolate é motivado pela composição genética das sementes, processamento pós-colheita (fermentação e secagem), torração e conchagem. O sabor de chocolate é concebido na etapa de fermentação e torração (POSSIGNOLO, 2010). Esse sabor característico é alcançado apenas de sementes fermentadas, secas e torradas de *Theobroma cacao L.*, não podendo ser substanciado artificialmente (VOIGT e BIEHL, 1995).

Com todo este processo, o chocolate é o produto fabricado através da mistura de derivados de cacau, massa (ou pasta ou *liquor*) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25 % ( $\text{g}/100^{-1} \text{g}$ ) de sólidos totais de cacau. O chocolate pode conter recheio, cobertura, formato e consistência diversos. Já o chocolate branco é adquirido a partir da combinação de manteiga de cacau com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 20% ( $\text{g}/100^{-1} \text{g}$ ) de sólidos totais de manteiga de cacau e apresenta recheio, cobertura, formato e consistência múltiplos (BRASIL, 2005).

### **3.2.2.1. Torração**

As amêndoas são submetidas à torração, para prosseguir a desenvolvimento do sabor de cacau original, que existe sob a forma de precursores de sabor gerados durante os processos de fermentação e secagem dos grãos (AFOAKWA, 2010). Nesta fase ocorre um tratamento térmico fundamental no processamento de chocolate e suas condições irão depender de aspectos como: espécie do cacau, origem, tipo e tamanho das amêndoas ou *nibs*, período de colheita, procedimentos anteriores à torração, umidade e atributos de sabor desejados. Assim, em ótimas condições, haverá a máxima evolução da capacidade aromática

da amêndoa. Neste procedimento térmico ocorrem os seguintes fenômenos: perda do conteúdo de água; redução dos ácidos voláteis indesejáveis (sobretudo acético); inativação de enzimas que podem danificar a gordura; desenvolvimento de aromas desejáveis por meio da reação de Maillard seguido dos precursores compostos na etapa de fermentação e o incremento da coloração típica do chocolate (BRITO, 2000; LOPES, GARCÍA, VASCONCELOS, 2003; EFRAIM, 2004).

Em função dos fenômenos que ocorrem durante a torração esta etapa é essencial para se adquirir as características de qualidade de chocolates ou de seus análogos (LOPES, GARCÍA e VASCONCELOS, 2003) e pode ser realizada nas amêndoas ou nos *nibs* (COHEN, JACKIX e SOUSA, 2004). Sendo o método de torração por convecção o mais comumente aplicado, os grãos de cacau cru são submetidos a um fluxo forçado de ar quente. Concomitante, a literatura indica o processamento térmico de grãos de cacau no intervalo de temperatura entre 130 e 150 ° C e para o tempo entre 15 e 45 min (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009; KRYSIAK, 2002; MINIFIE, 1999; NEBESNY e RUTKOWSKI, 1998). No entanto, no que diz respeito às reações químicas envolvidas na torração, estas são comprometidas pelos parâmetros de tempo e temperatura, e fatores como pH, umidade e lipídios totais (EFRAIM et al., 2011).

O processo de torração (Figura 10), além de fornecer novos compostos voláteis de aromas específicos, por meio da pirólise de açúcares, também gera perda de compostos secundários que afetam o sabor final do chocolate. (NAZARUDDIN et al. 2000). Pensando nisto, Paoletti et al. (2012) diz que é imprescindível ter vigilância exclusiva à relação tempo/temperatura apropriados, pois nesta etapa pode perde-se, no mínimo, 50% dos flavonóides presentes no cacau. Portanto, conforme Minifie (1999), a torração é uma etapa profundamente importante na tecnologia do processamento do cacau e fabricação do chocolate, e que deve-se seguir diferentes associações de tempo e temperatura conforme os atributos sensoriais e tecnológicos que se almeja obter no produto final.

**Figura 10.** Amêndoas de cacau no equipamento de torração.



**Fonte:** Prazeres da mesa. Disponível em: [http://prazeresdamesa.uol.com.br/simples-uma-  
virgula/](http://prazeresdamesa.uol.com.br/simples-uma-<br/>virgula/)

A torração se realiza em duas etapas: a primeira é a secagem, que interfere diretamente na condição aromática, e indiretamente, nas reações sequentes que apenas se alcançam em meios com baixa atividade de água; e durante a segunda fase se define o sabor (RAMLI et al., 2006). O valor da torração na tecnologia de fabricação de chocolate está conexo aos seguintes fatores: constituição do sabor e diminuição da microbiota bacteriana contida na matéria-prima durante o método fermentativo e o armazenamento (PEREGO et al., 2004). Outro objetivo da torração é secar satisfatoriamente os nibs, permitindo que eles possam ser moídos (PONTILLON, 2009). Além disso, o resultado do calor nos precursores do sabor de chocolate, contidos no cacau após a fermentação e secagem, é de catalisador, concedendo o sabor característico do chocolate (OETTERER, REGINATO-D'ARCE e SPOTO 2006).

### **3.3. Compostos bioativos do cacau**

O chocolate foi enaltecido durante séculos pelas suas competências medicinais, embora místicas. Todavia, no início do século XXI, passou a ser comercializado somente como um alimento saboroso (PAOLETTI et al., 2012). Posteriormente, Waterhouse et al. (1996) afirmaram que o cacau e chocolate comerciais eram uma fonte de polifenóis, especialmente os flavonóides, como a catequina, epicatequina e procianidinas; e que estes compostos agem

consideravelmente na proteção contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo esta oxidação a responsável central pela aterosclerose (FERNÁNDEZ-MURGA et al., 2011).

Os compostos fenólicos achados nas sementes de cacau estão nas classes dos taninos e dos flavonóides; eles ficam armazenados nas células de pigmento dos cotilédones ligados aos ácidos graxos saturados e os monoinsaturados. (WOLLGAST e ANKLAM, 2000; MAO, 2000). Juntamente com outros elementos de reserva, como as metilxantinas (MARTINI et al., 2008; BECKETT, 2009), a exemplo da teobromina e cafeína, que são alcalóides que têm efeito estimulante no Sistema Nervoso Central (BRUINSMA e TAREN, 1999). Sendo que o sabor amargo do cacau está primeiro conexo com os alcalóides purínicos teobromina e cafeína, e segundo com as substâncias fenólicas (EFRAIM, 2004).

A semente de cacau exhibe quantidade expressiva de compostos bioativos, entre eles os polifenóis (compostos fenólicos) com provados benefícios clínicos e experimentais na integridade vascular e antioxidante. Entre esses polifenóis estão as procianidinas (KEEN, 2005). Sendo elas formadas a partir da condensação de unidades individuais de catequinas ou epicatequinas, chamadas monômeros; por isso, são também conhecidas como taninos condensados (PASCUAL-TERESA, SANTOS-BUELGA e RIVAS-GONZALO, 2000).

Zumbé (1998) e Brito (2000) afirmaram que as sementes de cacau possuem de 6 a 8% de compostos fenólicos, em peso seco, sendo 60% (+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidinas. No entanto, para Nazaruddin et al. (2006) as sementes de cacau não fermentadas contêm 1187mg/100<sup>-1</sup>g de epicatequina, enquanto que as sementes de cacau fermentado contêm simplesmente 985mg/100<sup>-1</sup>g. Já para Sarmento (2007) outras pesquisas têm apontado que em plantas como cacau encontra-se uma grande quantidade de polifenóis em suas folhas e a concentração destes compostos pode variar de 3% em sementes fermentadas e torradas até 13% em sementes que não serão submetidas aos processos de fermentação e torrefação. Enquanto que para Rimbach et al. (2009) os flavonóides correspondem cerca de 6-8% da matéria seca e massa de cacau frescos.

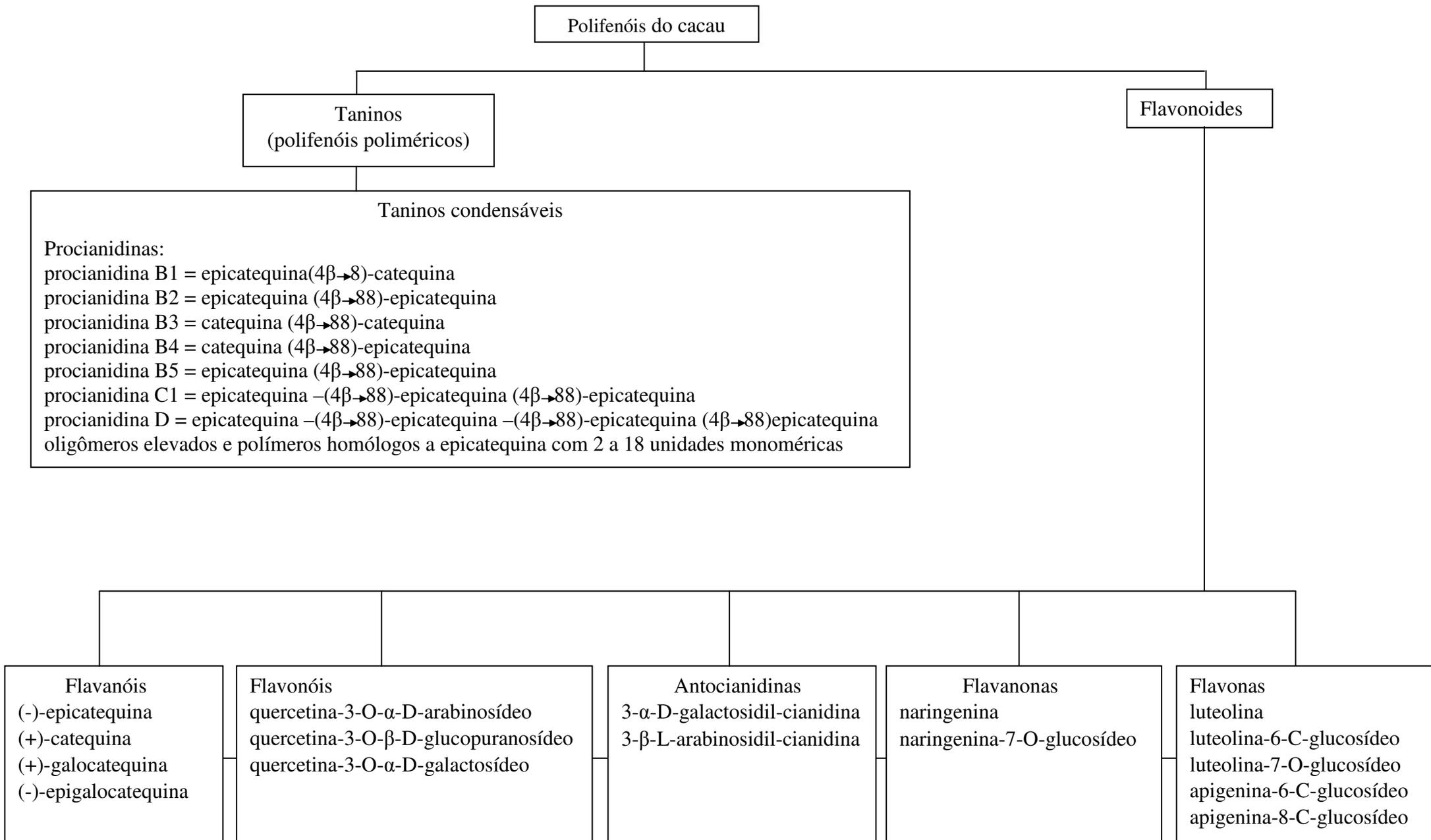
No entanto, apesar do alto conteúdo de compostos bioativos (polifenólicos) presentes nas sementes de cacau e seus derivados, essa quantidade pode variar conforme os tipos de cacau, seus cultivares e classificação geográfica ao longo da zona equatorial, além dos processos de modificação genética do cacau (BELSCAK, et al., 2009; EGAN, et al., 2010; OTHMAN, et al., 2010).

### 3.3.1. Compostos Fenólicos (Polifenóis)

Os compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, são relevantes para atividades antioxidantes e funções protetoras contra o risco de doenças causadas pelo estresse oxidativo (MACIEL et al., 2011). Em função disto, diversos estudos atribuem ao cacau benefícios à saúde devido ao consumo de compostos fenólicos (polifenóis) presentes. Compostos que tem conquistado muita atenção devido a sua habilidade antioxidante e suas possíveis consequências benéficas à saúde humana, por exemplo, no tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias. Entre os polifenóis, estão os monoméricos, flavanóis, catequina e epicatequina, tal como oligoméricos e poliméricos ou procianidinas de proantocianidina, que apontam elevada capacidade antioxidante. Estes podem ser divididos em no mínimo 10 diferentes categorias, em concordância com sua estrutura fundamental, sendo os flavonóides uma das mais relevantes (OLIVEIRA, 2005; RIMBACH et al., 2009; WOLLGAST e ANKLAM, 2000; ADAMSON et al., 1999; EFRAIM et al., 2006).

A família dos compostos fenólicos, largamente distribuídos na natureza, é encontrada geralmente em todo o reino vegetal (SOARES, 2002). Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau estão relacionados na Figura 11, sendo subdividido em taninos e flavonóides. Os flavonóides abrangem: flavanóis, flavonóis, antocianinas, flavonas e flavanonas. Destes compostos, os flavanóis são os mais abundantes, sendo a (+)-catequina e a (-)-epicatequina os principais representantes (CRUZ, 2012).

**Figura 11.** Principais polifenóis encontrados nas sementes de cacau.



**Fonte:** Porter et al. (1991); Sanbongi et al. (1998); Sanchez- Rabaneda et al. (2003); Counet et al. (2006), citado por EFRAIM (2011).

A quantidade de polifenóis presentes nas sementes do cacau é sempre superior às quantidades em artigos a base de cacau (como o chocolate), os quais são preparados por técnicas que abrangem a fermentação, secagem e torrefação; com isso, 60% dos polifenóis encontrados nas sementes de cacau são do grupo das catequinas, epicatequinas e procianidinas. (SARMENTO, 2007). Oliveira et al. (2011) comprovaram a existência de variabilidade no conteúdo compostos fenólicos nas amostras provenientes de diferentes sistemas de cultivo. Onde nibs orgânicos tiveram maior teor de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante em comparação com amêndoas não fermentadas, fermentadas e convencional. Os níveis mais baixos foram observados em líquido convencional, a principal matéria-prima para o chocolate.

Entre os efeitos que a ingestão de chocolate com elevadas doses de flavonóis promove estão: o aumento dos níveis de óxido nítrico, avaliado como um dos principais combustíveis para a saúde dos nossos vasos sanguíneos; diminuição da associação das plaquetas, atuação igual à da aspirina; aumento dos níveis do HDL entre outras ações antioxidantes; atenuação de marcadores de inflamação (VICENTIM e MARCELLINO; 2012).

Contudo os teores de polifenóis em cacau são variáveis, podendo ocorrer segundo: a procedência geográfica, a diversidade da planta, o clima, o tipo de solo e a lavoura (fatores agronômicos e ambientais). No caso do chocolate, além dos fatores relacionados à sua matéria-prima, as diferentes etapas da transformação também causam influência nas quantidades de polifenóis dos produtos finais (condições de processo) (RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2010).

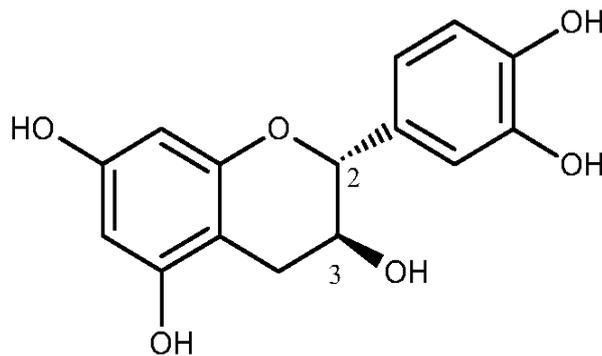
Portanto, a destruição dos compostos fenólicos simplesmente presentes nas sementes ocorre sobretudo nas etapas desempenhadas no desenvolvimento do sabor de chocolate, as quais favorecem a redução da adstringência e do amargor. E os polifenóis, responsáveis pela capacidade antioxidante do cacau, são radicalmente reduzidos durante a fermentação e torração das sementes, fases que abrangem complexas reações ou uma expressiva variação do pH (EFRAIM, 2011). Sendo a torração uma das etapas da pós-colheita que comprometem a qualidade dos produtos adquiridos através do cacau, em função disto, gradativamente, desenvolvem-se métodos de seleção e/ou processamento de sementes de cacau para melhor aplicação de seus componentes e derivados (LAGUNES-GALVEZ et al., 2007).

### 3.3.1.1. Catequina

Entre os compostos fenólicos existentes nas sementes de cacau, em torno de 60% destes equivalem a catequina, que tem sido estudada em relação a diversas vantagens à saúde, como elevada atividade antioxidante (STEINBERG et al., 2003). E segundo Arts (1999), um chocolate amargo comercial possui 53,5mg/100<sup>-1</sup>g de catequina e um ao leite tem 15,9 mg/100<sup>-1</sup>g. Assim sendo, o autor completa que o chocolate e produtos a base de cacau são uma adequada fonte de antioxidantes.

Na Figura 12 está representada a estrutura química da catequina que pertence ao grupo dos flavanóis, sendo um 3- flavanol e possui um anel heterocíclico saturado (CABRITA, RICARDO-DA-SILVA e LAUREANO, 2003).

**Figura 12.** Estrutura química da catequina.



**Fonte:** Aloha Sushi. Disponível em: <http://alohasushimd.com/sobre/32>

Os radicais livres podem atrair vários mediadores inflamatórios que colaboram para uma resposta inflamatória geral e uma danificação do tecido. Os grupos das flavonas e dos flavonóis, que abrangem as catequinas, parecem ser os mais influentes na proteção do corpo contra as espécies reativas de oxigênio que acarretam lesões às células e tecidos. (NIJVELDT, 2001).

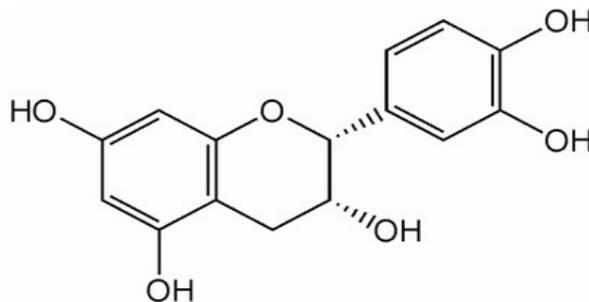
Cruz et al. (2012), também avaliou a catequina e verificou sua drástica perda durante o processamento de cacau para a elaboração de chocolate e a diferença entre cultivares. Sendo que os compostos estudados em diferentes cultivares de cacau têm comportamento divergente durante a fermentação e secagem.

### 3.3.1.2. Epicatequina

A epicatequina, representada na Figura 13, é um fundamental flavonol monomérico do cacau que retrata em torno de 35 % do conteúdo total das substâncias fenólicas e produz adições à saúde como o papel antioxidante (WOLLGAST; ANKLAN, 2000; AMORES; JIMÉNEZ, 2007; ARAUJO, 2013). Este flavonóide apresenta não somente o efeito antioxidante direto; ele é capaz de poupar outros antioxidantes como as vitaminas C e E, a baixas concentrações, como 1  $\mu\text{M}$  de epicatequina que já são satisfatórios na proteção de oxidação das vitaminas C e E (KENN, 2001). Juntamente, outra ação deste componente ativo do cacau é o bom efeito à saúde vascular (SCHROETER et al., 2006).

Em diferentes etapas do pré-processamento e processamento do chocolate, este pode ter alteração nos seus compostos bioativos. No caso da catequina, Deus (2015), verificou que durante a secagem do cacau há uma redução de seus conteúdos e suas propriedades antioxidantes e que esta redução não está apenas relacionado à redução do teor dos compostos fenólicos e das metilxantinas, podendo ser também referente à interações entre os compostos bioativos reduzindo assim as suas características.

**Figura 13.** Estrutura química da epicatequina.



**Fonte:** Wikiwand. Disponível em: <http://www.wikiwand.com/pt/Flavan-3-ol>.

Sementes de cacau não fermentadas, in natura, apresentam conteúdos de epicatequina 20 vezes mais altos do que a catequina (KWIK-URIBE, 2005). Estas proporções em diferentes variedades diversa entre 34,65 e 43,27 mg / g em amostra desengordurada (FORSYTH e QUESNEL, 1957). A depender do local de produção do cacau, o teor de epicatequina pode variar; por exemplo, relatam um conteúdo mínimo de 2,66 mg / g em sementes de cacau da Jamaica e um máximo de 16,52 mg / g em sementes na Costa Rica (WOLLGAST e ANKLAM, 2000; KIM e KEENEY, 1984). Essas quantidades alteram através do processo de fermentação e secagem (KIM e KEENEY, 1984).

Assim, segundo Efraim et al. (2010), durante a etapa de fermentação, o teor de polifenóis totais diminui cerca de 70 %, enquanto que o de epicatequina diminui ao redor de 90 %. A epicatequina é melhor absorvida do que a catequina (HOLT et al., 2002; STEINBERG et al., 2002) provavelmente em função de diferenças estereoquímicas que resultam em distintos graus de hidrofobicidade (KEEN et al., 2005). Sendo este o principal monômero de flavanol analisado no plasma após o consumo do chocolate rico no cacau (SERAFINI et al., 2003; REIN et al., 2000). Ela que representa o principal mediador dos efeitos benéficos do flavanol do cacau sobre a função vascular (SCHROETER et al., 2006).

### 3.3.2. Metilxantinas

As metilxantinas abrangem um grupo de substâncias localizadas na natureza, sobretudo no chá, café e cacau (PAUWELS et al., 2001) e são caracterizadas como alcalóides purínicos e considerados elementos estimulantes (MEDEIROS e LANNES, 2009). Em conformidade com Matissek (1997) as razões de interesse neste grupo são: contribuição com o sabor amargo do chocolate, junto aos compostos desenvolvidos durante a torrefação e ajuda nos parâmetros de qualidade, pois afirmam a presença de cacau.

Sendo este um grupo de compostos biologicamente ativos; é presumível que cada um destes compostos apresente efeitos fisiológicos similares no corpo, incluindo: o estímulo do sistema nervoso central (SNC), do músculo cardíaco e do músculo-esquelético; além de efeitos diuréticos. Entretanto, a sua atuação difere muito em cada parte do corpo, assim como de indivíduo para indivíduo (BECKETT, 2009).

Os alcalóides teobromina e cafeína pertencem à família das purinas e equivalem a mais de 99 % dos alcalóides contidos na amêndoa do cacau (AMORES et al., 2009). Os teores destes compostos têm sido apontados desde o ano de 1937, e alguns resultados de pesquisas indicam que estes teores continuam constantes mesmo após as amêndoas serem beneficiadas, com teores em torno de 2 a 3 % de teobromina e 0,2 % de cafeína (KNAPP, 1937; PICKENHAGEN et al., 1975). Já para Rozin et al. (1991) no cacau e no chocolate prevalece a teobromina mas o percentual é um pouco menor (teores adjuntos a 1,89%), em consecutivo a cafeína com 0,23%.

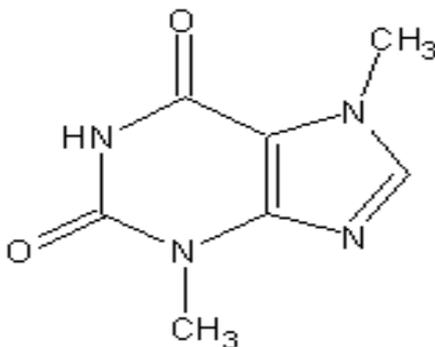
Hasing (2004) fez uma relação teobromina/cafeína e localizou o que se segue (valores segundo os grupos genéticos de cacauzeiros): 15-10 (Forasteiro), 10-5 (Trinitário) e 2-1 (Criolo). Atestando o que disse Wakao anteriormente (2002) sobre os teores finais de

teobromina e cafeína está relacionado com o genótipo de cacau. Além disso, para ele também se relaciona com o grau de maturidade das amêndoas e o nível de fermentação.

### 3.3.2.1. Teobromina

A teobromina (3,7-dimetilxantina) é uma base purínica, cristalizável em forma de agulhas brancas, volátil a 290 °C e solúvel em álcool e água quente (AQUARONE et al., 2001) e pode ser observada na Figura 14. Sendo que sua solubilidade em água aumenta à medida que aumenta a temperatura (BEAUDOIN e GRAHAM, 2011). Este composto é o alcalóide próprio das amêndoas de cacau, e também é significativo para no aspecto bioquímico e sensorial do chocolate (ARAUJO, 2014), além de ter ação diurética (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

**Figura 14.** Estrutura química da Teobromina.



**Fonte:** Psicofarmacos. Disponível em:

<http://www.psicofarmacos.info/?contenido=drogas&farma=chocolate>

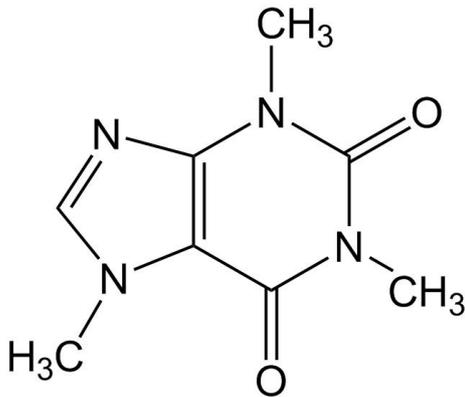
Dentre as variedades do cacau, o grupo Forasteiro possui um maior teor de teobromina do que o grupo do cacau Crioulo (AMORES et al., 2009). Contudo a teobromina que proporciona um efeito menos estimulante que a cafeína, aciona a produção de serotonina no organismo, notória pela ação calmante (PASCHOAL e KALLUF, 2009; CRUZ, 2012).

### 3.3.2.2. Cafeína

A cafeína é um alcalóide determinado como 1,3,7-trimetilxantina, ou seja, uma xantina trimetilada, cuja estrutura possui um esqueleto de purina, à qual é apresentada na Figura 15. Ela é vista em produtos vegetais, especialmente no cacau e é um dos alcalóides com ação biológica mais consumidos no mundo. (ALTIMARI, CYRINO e ZUCAS, 2000; DE MARIA e MOREIRA, 2007). É um composto que possui nitrogênio e apresenta

propriedades básicas. E quimicamente, eles são análogos a purinas, xantinas e ácido úrico, que são grupos metabolicamente significativos. (BRENELLI, 2003; TAVARES e SAKATA, 2012).

**Figura 15.** Estrutura química da cafeína.



**Fonte:** Infoescola. Disponível em: <http://www.infoescola.com/drogas/cafeina/>

Este composto é de grande uso, o qual ocorre através de chás, café, bebidas energéticas e de fármacos, como antigripais; sendo amplamente estudado no contexto da saúde humana (DE MARIA e MOREIRA, 2007; MEDEIROS e LANNES, 2009; ARAUJO, 2013; ARAUJO, 2014). E seus efeitos fisiológicos incluem: estimulação do sistema nervoso central (aumentando a capacidade de alerta e melhorando o desempenho de atividades que exijam vigilância), dos músculos cardíacos, do sistema respiratório e da secreção de ácido gástrico; é considerada como um diurético fraco e relaxante muscular. (DE MARIA e MOREIRA, 2007).

### 3.3.3. Compostos bioativos e a torração

Ao longo das etapas de produção do chocolate são originados não somente os precursores do sabor peculiar dos produtos de cacau, como também compostos que não serão mais transformados e que irão colaborar com esse sabor (EFRAIM et al., 2010). Estes compostos que são os fenólicos ou polifenóis ocorrem em frutas, vegetais, sementes, flores, bebidas e alguns alimentos industrializados (BRAVO, 1998); são reduzidos por difusão ou por oxidação nos passos do processamento do cacau (NASCIMENTO e ARRIECHE, 2015). A influência dos métodos de produção começa na exploração com procedimentos pós-colheita, como fermentação e secagem, e continua no processamento do chocolate (LEITE, BISPO e SANTANA, 2013).

Entre as etapas, a torração é um passo expressivo no processamento de grãos de cacau. O aquecimento implica na constituição de características vantajosas para as amêndoas, por exemplo, gosto, cor, textura. Todavia, estas alterações positivas podem advir de reações que diminuem o teor de compostos bioativos, particularmente os polifenóis. Consequentemente é importante apurar as condições adequadas desta técnica (tempo, temperatura, umidade e vazão de ar), assim como a qualidade dos grãos. (ŻYŻELEWICZ et al., 2016). A torração provoca a formação da cor marrom, aroma suave e textura de amêndoas torradas (KRYSIK, 2006), além de interferir na capacidade dos polifenóis em interagir com a proteína, causando uma diminuição da adstringência (MISNAWI, JAMILAH, e NAZAMID, 2005).

Segundo Krysiak (2006, 2011) o impacto da torração dá indícios da qualidade dos produtos do cacau, portanto deve ser estudada levando em consideração a influência dos parâmetros do processo. As condições do processo de torração afetam a constância dos polifenóis contidos em grãos de cacau (ŻYŻELEWICZ, 2016). Este passo importante no tratamento térmico do cacau leva a perdas e modificações de flavanol, especialmente a epimerização de (-) - epicatequina para (-) - catequina. (KOTHE, ZIMMERMANN e GALENSA, 2013).

### **3.4. Atividade antioxidante do cacau e chocolate**

Os antioxidantes são compostos que bloqueiam ou retardam os processos oxidativos. O estresse oxidativo é ocasionado pelo excesso de radicais livres, devido ao estilo de vida e circunstâncias patológicas (GENOVESE e LANNES, 2009). Acredita-se que certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, tal como diabetes e doenças reumáticas sejam originados ou acelerados por estresse oxidativo. Por isso compostos naturais com habilidade antioxidante vem sendo largamente reconhecida nos últimos anos. (WEISBURGER e WILLIAMS, 2000).

Assim, entre estes compostos naturais com domínios antioxidantes, estão os polifenóis, avaliados por muito tempo como não nutritivos (EFRAIM et al., 2006). O cacau, principal componente do chocolate, é rico em flavonóides. Este é um grupo de antioxidantes que pertence a vasta e distinta classe de fitoquímicos denominados polifenóis. Em função disto, pesquisas tem ratificado que o chocolate pode ser um alimento muito favorável, que deve ser inserido, em quantidades apropriadas, ao cardápio diário (RICHTER e LANNES; 2007).

O cacau, rico em flavonóides, foi submetido a diversos estudos que ratificaram os efeitos positivos destes compostos sobre o Sistema Nervoso Central após gatilhos de dano

celular. Entre estes estudos, RAMIRO-PUIG et al. (2009) constatou que este efeito está provavelmente ligado à capacidade antioxidante de extratos de flavonóides e a (-) – epicatequina, relacionando o efeito neuro protetor com estes compostos.

Conseqüentemente o chocolate, produzido através do cacau, possui atuação antioxidante e é através dos flavonóides que é atribuída a sua capacidade de neutralizar os radicais livres e inibir as enzimas responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio. As moléculas dos polifenóis podem se comportar como antioxidantes primários, restringindo diretamente o desenvolvimento de radicais livres, podem regenerar ou manter  $\alpha$ -tocoferol e outros antioxidantes por doação de hidrogênio para os radicais  $\alpha$ -tocoferil, ou podem funcionar como quelantes de metais de transição como o  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , envolvidos na formação de radicais livres (ZHU, 2002).

Pesquisas realizadas *in vivo* em humanos demonstraram que as catequinas foram causadores do aumento da ação antioxidante, diminuição de malonaldeído e peróxido lipídico no plasma, acréscimo das concentrações de ascorbato no plasma, redução da absorção de ferro não-heme e ampliação da resistência do LDL-colesterol à oxidação (WILLIAMSON e MANACH, 2005). Contudo, apesar da complexa mistura de polifenóis no cacau, de acordo com Ramiro-Puig (2009) seu efeito antioxidante parece estar associado também à presença de (-) - Epicatequina em humanos.

Dessa maneira, devido à evidência de que os polifenóis podem operar como potenciais antioxidantes, exercer um importante papel na redução do risco ou retardo do desenvolvimento de doenças, como as cardiovasculares, câncer e outras relacionadas à idade; e além disso, modular processos biológicos essenciais em mamíferos *in vivo*; as áreas de nutrição e medicina têm tido um especial interesse nestes compostos (MURPHY, 2003; NESTEL, 2001). Em função disto, cada vez mais se têm desenvolvido métodos de seleção e/ou processamento dos grãos de cacau, para produzir componentes do cacau ou do chocolate com níveis aumentados de polifenóis (WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

#### **3.4.1. Métodos de análise antioxidantes**

Os métodos antioxidantes podem ser dispostos em duas categorias: métodos diretos (experimentos baseados em estudos de cinética química) e métodos indiretos (experimentos mediados pela transferência de elétrons) (HUANG, OU e PRIOR, 2005). Podendo ser empregados tanto *in vitro* quanto *in vivo* (FUNAGOSHI, 2012). Os testes *in vitro* são considerados relevantes ferramentas que auxiliam na procura por conteúdos bioativos,

igualmente na escolha de matéria-prima para estudo. Ao mesmo tempo têm demonstrado a significância de dietas ricas em frutas e vegetais, confirmando a presença de substâncias antioxidantes, as quais intervêm no combate aos radicais livres (ALVES et al., 2010).

Várias técnicas têm sido usadas para designar a atividade antioxidante *in vitro* possibilitando uma célere seleção de substâncias e/ou misturas com potencialidade na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Em meio a estes métodos sobressaem-se a técnica de seqüestro de radicais livres, tais como DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006), método baseado na transferência do átomo de hidrogênio e elétrons (FUNAGOSHI, 2012) e fundamentado no descoramento de uma solução combinada por radicais estáveis DPPH de cor violeta quando adicionado a substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (HUANG,OU e PRIOR, 2005; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995). E o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) que é fundamentado no sistema de transferência de elétrons (RUFINO et al., 2006).

#### **3.4.1.1. DPPH**

A análise de DPPH é um dos métodos indiretos mais antigos para se definir a atividade antioxidante, sendo indicado primeiramente em 1950 para se encontrar os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Anos depois foi calculado para estabelecer o potencial antioxidante de compostos fenólicos separados e alimentos, igualmente a amostras biologicamente significativas (ROGINSKY e LISSI, 2005). Este método tem a particularidade de não envolver circunstâncias drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA, RODRIGUES e CAMPOS, 1999) e pode reagir com compostos fenólicos, tal como com ácidos aromáticos possuindo apenas um grupamento (SANTOS et al., 2007).

O DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) é um radical livre estável que apresenta um electrão de valência não emparelhado em um átomo de ponte de nitrogênio (EKLUND et al., 2005) e a retirada deste radical é o fundamento deste ensaio antioxidante (ALMA et al., 2003; KARIOTI et al., 2004; KORDALI et al., 2005). O processo de bloqueio de radicais DPPH embasa-se na transferência de elétrons de um componente antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA, 2006). Este método que reduz o radical DPPH, fixa um H (removido do antioxidante em estudo) e promove redução da absorbância (VIEIRA et al., 2011).

Este ensaio é considerado de pré-formulação e se caracteriza por ser o mais popular entre as análises de antioxidantes, principalmente por ser um teste rápido e de alta

sensibilidade (MOON e SHIBAMOTO, 2009). Estes procedimentos empregam quantidades expressivas de reagentes, padrões e amostras, e oferecem entraves em relação ao número de análises simultâneas que podem ser desempenhadas (DUARTE-ALMEIDA, 2006). A luz, o oxigênio e o pH da combinação reacional também comprometem a absorbância de DPPH (OZCELIK, LEE e MIN, 2003).

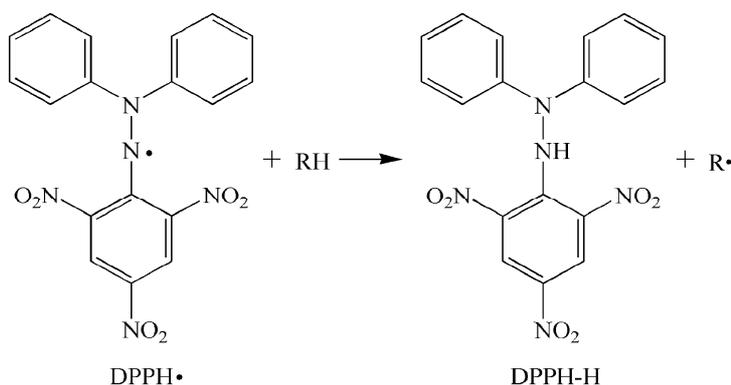
O radical DPPH é estável à temperatura ambiente (HUANG, OU e PRIOR, 2005) e ao sofrer redução, perde sua coloração (de violeta a amarelo-pálido), cuja alteração é medida no aparelho espectrofotômetro a 517 nm, possibilitando a mensuração da habilidade antioxidante de uma determinada substância (FUNAGOSHI, 2012). A estabilidade da molécula de DPPH é devido ao transporte do elétron desemparelhado por toda a molécula, à qual atribui a esta molécula a coloração violeta. Ao acrescentar uma substância que atua como doador de átomos de hidrogênio a uma solução de DPPH, a hidrazina é alcançada, o que assinala a mudança simultânea na coloração (ALVES et al., 2010).

A força do sinal do radical DPPH é contrariamente relativa à concentração do antioxidante examinado e o tempo de reação (CHEN et al., 2000). E por atuação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R.) (Figura 17), a formação do difenil-picril-hidrazina através do DPPH, irá produzir a coloração amarela e causará desaparecimento da absorção, podendo ser controlada pelo decréscimo da absorbância. Através dos resultados alcançados define-se a porcentagem da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH restante no meio reacional. (BORGES et al., 2011).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) condiz com a quantia de DPPH usada pelo antioxidante, da qual a porção de antioxidante indispensável para diminuir o acúmulo inicial de DPPH em 50% é nomeada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Então quanto maior o gasto de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua ação antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Os radicais livres de DPPH apresentam cor roxa, a princípio por terem elétron livre, e perdem esta cor quando um radical hidrogênio ofertado por uma molécula antioxidante repercute com a molécula de DPPH, atenuando-se, assim, a absorbância. A estabilidade do DPPH está também relacionada com a baixa taxa de degradação e reação com a maioria dos compostos. Portanto, somente reagentes redutivos potentes são aptos a reagir com estes radicais estáveis em maneira estequiométrica. A baixa absorbância sugere atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS et al., 2007).

**Figura 16.** Formas radicalar e não radicalar do DPPH.

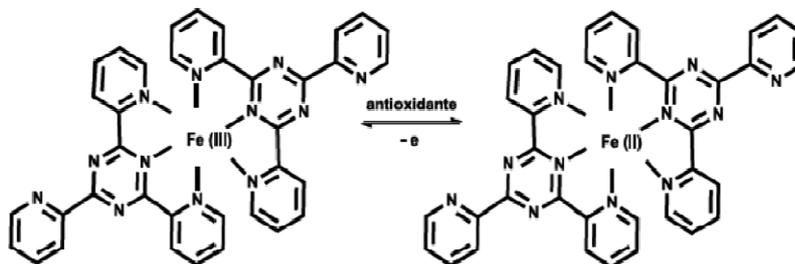


**Fonte:** Wang et al, 2016. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/nj/c5nj03233d>.

### 3.4.1.2. FRAP

O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ou capacidade de redução do íon férrico, é fundamentada no sistema de transferência de elétrons, e considera a capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo ferritripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$  -TPTZ) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$  -TPTZ) (Figura 18), em pH ácido, na presença de um antioxidante. O complexo  $\text{Fe}^{2+}$  -TPTZ apresenta uma cor azul intensa e pode ser analisado em espectrofotômetro a 595 nm (RUFINO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2008; NIKI, 2010).

**Figura 17.** Reação de oxidação-redução da tripiridiltriazina férrica a tripiridiltriazina ferrosa.



**Fonte:** Huang, Ou e Prior (2005).

O experimento FRAP pode ser visto como simples, rápido, de baixo custo e robusto, além de não exigir aparelhamento especial, podendo empregar processos automáticos, semiautomáticos ou manuais e os resultados são reprodutíveis (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005; NIKI, 2010). Pulido, Bravo e Sauro-Calixto (2000) expõem o método como uma opção

desenvolvida para definir a diminuição do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Este pode ser administrado não apenas para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, como para o estudo do efeito antioxidante de substâncias puras, com saldos confrontáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas.

### **3.5. Determinação e quantificação de compostos bioativos do cacau**

#### **3.5.1. CLAE**

A cromatografia líquida de alta eficiência é o nome genérico empregado para referir qualquer procedimento de cromatografia em que a fase móvel é um líquido (FERREIRA, 2013). A cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência trabalham do mesmo jeito, mas a velocidade, eficiência, sensibilidade e facilidade do procedimento da cromatografia líquida de alta eficiência é muito superior (WESTON e BROWN, 1997). Entre os múltiplos métodos disponíveis, a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) é a favorita para a separação e quantificação de polifenóis em frutos (SAKAKIBARA et al., 2003). Esta metodologia não é recente, as suas condições fundamentais foram constituídas por Martin e Synge em 1941, mas apenas de muitos anos pra cá a sua concretização experimental se foi estabelecendo e espalhando (VITAL, 2002).

Com o progresso da cromatografia em coluna, desenvolveu-se o uso de suportes com partículas menores encarregados por uma perfeita eficiência e como tal tornou-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, a partir daí produziu-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (FERREIRA, 2013). Que se destaca na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras de diferentes naturezas, como em alimentos e fármacos (RIBANI et al., 2004).

A cromatografia tem a finalidade de separar especificamente os inúmeros constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificar, quantificar ou obter a substância pura para os mais variados fins. A separação ocorre por meio da migração da amostra através de uma fase estacionária mediado por um fluido, ou seja, a fase móvel (ARGENTON, 2010). Os componentes são separados pelo enchimento da coluna e são detectados à saída da coluna por um detector (WESTON e BROWN, 1997). A fase estacionária relaciona-se à coluna cromatográfica, que é um cilindro inflexível (geralmente de aço ou vidro) que em seu interior se encontra um material de enchimento constituído por pequenas partículas (CHUST, 1990).

Ao injetar a amostra no aparelho cromatográfico, os elementos da amostra se difundem entre as duas fases e percorrem mais lentamente que a fase móvel em função do efeito retardante da fase estacionária. Os componentes da amostra se disseminam entre as duas fases e são conduzidos pela coluna cromatográfica (ARGENTON, 2010). A coluna é onde se dá o processo de separação dos componentes da amostra, sendo sem dúvida o constituinte mais importante e mais crítico de um sistema cromatográfico. (CHUST, 1990). A estabilização de distribuição define a velocidade com a qual cada elemento migra por meio do sistema. (CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA IV REGIÃO-SP, 2010). A separação ocorre porque, em ótimas condições, cada elemento de uma mistura irá interagir física e quimicamente com as duas fases de modo distinto em relação aos outros elementos da mistura (FERREIRA, 2013).

Diferentes fases móveis estão acessíveis para o exame das combinações fenólicas como: antocianinas, procianidinas, flavononas e flavonóis, flavonas e ácidos fenólicos (GÓMEZ-ALFONSO, SALVADOR e FREGAPANE, 2002; SENTER, ROBERTSON e MEREDITH, 1989). E a inserção de colunas de fase reversa na CLAE tem notadamente enfatizado a separação de distintos grupos de combinações fenólicas (SILVA et al., 1990; TARNAWSKI et al., 2006).

Os componentes da amostra, de acordo com suas diferenças estruturais moleculares e grupos funcionais, apresentam diferentes medidas de afinidade com as fases móvel e estacionária conforme suas velocidades de migração igualmente distintas. Assim a substância com maior afinidade com a coluna é aquela que elui por último e opostamente, a substância que elui em primeiro lugar será a de menor afinidade com a fase estacionária. Consentida a separação cromatográfica, esta é visualizada num cromatograma pelo surgimento de vários picos; e a identificação dos compostos pretendidos é, geralmente, obtida através do tempo de retenção (CHUST, 1990; VITAL, 2002). Este tempo de retenção é o tempo necessário para um determinado composto passar através da coluna para o detector e é medido a partir do momento em que a amostra é injetada para o ponto no qual o visor apresenta uma altura de pico máximo para esse composto; sendo que os compostos têm diferentes tempos de retenção (CLARK et al., 2007).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Chocolates

Foram analisadas amostras de chocolates provenientes de um *blend* de variedades de amêndoas de cacau, fermentadas e secas, com tamanhos definidos como grandes e médios (safra 2012). As tecnologias de colheita e pós-colheita aplicadas ao beneficiamento do cacau ocorreram na Fazenda Riachuelo, localizada no município de Ilhéus, região cacauceira no sul do estado da Bahia.

### 4.2. Torração das amêndoas

A torração foi realizada na Fazenda em lotes de  $16 \text{ kg} \pm 1 \text{ kg}$  de sementes de cacau fermentadas e secas; onde foi usado um torrador elétrico rotativo Jaf Inox (Tambaú, São Paulo), com capacidade para 30 kg, equipado com controle de temperatura, com precisão de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Após a torração, as amêndoas de cacau foram imediatamente arrefecidas, colocadas em embalagens plásticas de polietileno de alta densidade, hermeticamente fechados a vácuo (500 g) e armazenados em temperatura de  $20^\circ\text{C}$ .

### 4.3. Produção dos chocolates

Os chocolates foram processados numa linha de equipamentos com capacidade para processamento de 10 kg de chocolate. As formulações do chocolate foram de 70% de cacau e realizou-se para cada lote a partir da massa de cacau (3,15 kg), manteiga de cacau (0,35 kg), lecitina de soja (0,02 kg) e açúcar refinado (1,48 kg). Não foi adicionado leite.

### 4.4. Desenho experimental

Através da Metodologia de Superfície de Resposta, de acordo com Rodrigues e Lemma (2009), foi elaborado o desenho experimental. Foram instituídos fatores de maior influência sobre o processo fundamentado em dados da literatura e em testes preliminares. Aplicou-se um Planejamento Fatorial Completo  $3^2$  com 3 pontos centrais, totalizando 9 ensaios para avaliação dos efeitos das variáveis, tempo e temperatura de torração.

As faixas de interesse experimental (níveis) estabelecidas para cada um dos fatores foram:

□ Tempo: 20 – 40 – 60 minutos;

□ Temperatura: 80° - 120° - 160°C.

Na Tabela 1 apresentam-se os valores correlativos aos diferentes níveis das variáveis independentes. Na Tabela 2 estão valores codificados e reais das 2 variáveis independentes utilizadas no esboço estatístico do experimento.

**Tabela 1** – Ensaio das amostras e suas variáveis independentes de tempo (t) e temperatura (T).

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	20	80
2	40	80
3	60	80
4	20	120
5	40	120
6	60	120
7	20	160
8	40	160
9	60	160

**Fonte:** Autor (2017).

**Tabela 2**- Níveis de variações das variáveis independentes

Níveis codificados	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
-1	20	80
0	40	120
1	60	160

**Fonte:** Autor (2017)

#### 4.5. Elaboração dos extratos

As amostras foram previamente desengorduradas com éter de petróleo na proporção 1:3 (amostra:solvente) durante 30 minutos por cinco vezes em agitador magnético, seguido de 15 minutos na centrífuga, de acordo com Fantozzi e Montedoro (1978). As amostras foram secas em capela de exaustão e reservadas. A partir das amostras desengorduradas seguiu-se o procedimento de acordo Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Foram pesadas 5g das amostras em um erlenmeyer de 125 mL, adicionado 20 mL de metanol e 5 mL de água

destilada, agitado durante 60 minutos no agitador magnético à temperatura ambiente. Após este processo, esse sistema foi levado à centrifuga a 5.000 rpm durante 15 minutos à temperatura de 20°C, o sobrenadante foi ajustado para um balão de 25 mL com água destilada e transferido para um frasco âmbar de 30 mL e armazenado sob refrigeração a 4° C.

#### **4.5.1. Fenólicos Totais**

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada por Folin-Ciocalteu, método que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm, conforme descrito por Singleton e Rossi (1965). Foi preparada a reação contendo uma alíquota de 0,5 mL do extrato fenólico, 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu 10% e 2.0 mL de carbonato de sódio 7.5 %. A mistura foi incubada ao abrigo da luz durante 1 hora, posteriormente, a absorbância foi medida a 760 nm usando-se o branco como referência em espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-M51, marca Bel Photonics. A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos das amostras foi realizada em triplicata. A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com catequina.

#### **4.6. Determinação da atividade antioxidante**

##### **4.6.1. Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil)**

O método do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), seguiu o procedimento descrito por Vinson et al. (2001). Para avaliar a atividade antioxidante, 0,1 mL dos extratos obtidos na concentração de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> foram submetidos a reação com 3,9 mL do radical DPPH em solução de 0,004% (m/v) ao abrigo da luz. A redução do radical DPPH foi medida através da monitorização contínua da absorbância a 517nm contra o declínio do branco, utilizando um espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-M51, marca Bel Photonics por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. A diminuição da absorbância das amostras ( $A_{am}$ ) foi calculada em comparação com a diminuição da absorbância do controle ( $A_c$ ) e expressa como porcentagem da atividade antioxidante segundo a equação abaixo:

$$\% AA = ((A_c - A_{am}) / A_c) \times 100$$

A atividade antioxidante de cada amostra (IC50) foi então avaliada com a concentração final em µg mL<sup>-1</sup> de extrato presente na cubeta, necessário para a diminuição inicial da concentração de DPPH a 50%.O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.6.2. Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O poder de redução, pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), foi avaliado de acordo com metodologia descrita por Pulido et al. (2000), com algumas modificações. O reagente de FRAP foi preparado da seguinte forma: 2,5 mL de uma solução 10 mM TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine) em HCl 40 mM foram adicionados a 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 25 mL de tampão acetato 0.3 mM, pH 3.6. Para a avaliação da atividade antioxidante, 3mL do reagente FRAP preparado previamente, foi misturado com 50 $\mu\text{L}$  da amostra. As amostras foram homogeneizadas e incubadas à 37°C, por 30 minutos e a leitura realizada a 593 nm em espectrofotômetro UV modelo SP-220, marca Biospectro. Uma solução de sulfato ferroso foi utilizada como padrão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g.

#### 4.7. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas

Para encontrar resultados que demonstrassem quantitativamente e qualitativamente os compostos fenólicos achados nas amostras de cacau, foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência segundo o método descrito por Maciel et al. (2017) adaptado. Vinte microlitros de cada amostra foram analisadas pelo sistema de HPLC (Perkin Elmer, Modelo Flexar acoplado a um detector UV/VIS) e coluna C-18 (250 x 4,6 milímetros / 5 $\mu$ ). A coluna foi mantida a 30°C em todas as análises e os comprimentos de onda utilizados para detecção foram 280 nm. Os padrões utilizados para este estudo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.) foram: Compostos fenólicos (Catequina e Epicatequina) e Metilxantinas (Teobromina e Cafeína). Isocrático: 24 minutos. As soluções padrões de Catequina e Epicatequina foram preparadas em metanol, Cafeína preparada em água ultrapura e Teobromina em metanol: água ultrapura (80:20 v/v) e as curvas de calibração foram obtidas a partir de injeções em triplicata de oito concentrações (2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ -1000  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

Na análise em CLAE, os compostos fenólicos são identificados comparando o tempo de retenção com os dos padrões puros. As fases móveis utilizadas foram (A:B 85:15 v/v) água acidificada com ácido fosfórico 0,05% (A) e metanol:acetonitrila (proporção 2:4 v/v) (B) isocrático com fluxo 0,4  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

#### 4.8. Análise estatística

Os resultados foram submetidos estatisticamente ao teste de Tukey, ao nível de 5% de significância realizado com o programa ASSISTAT (versão 7.7 beta, 2016, Paraíba, BR), com subsequente análise de variância (ANOVA) e construção dos gráficos das superfícies de resposta, realizados com programa STATISTICA (versão 7, Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Fenólicos Totais e Atividade antioxidante

De acordo com dados descritos na Tabela 3, a amostra que apresentou maior quantidade de fenólicos totais foi submetida às condições de  $T = 80\text{ °C}$  e  $t = 20$  minutos (C1). Ao analisar os grupos através das temperaturas verifica-se que nas condições de  $160\text{ °C}$  para os tempos observados não houve diferença significativa, enquanto que para  $T = 80\text{ °C}$  e  $120\text{ °C}$  houve diferença significativa entre as amostras analisadas.

A amostra de chocolate C1 apresentou maior teor de compostos fenólicos que as outras amostras e este resultado são devido à condição de torração à qual foi submetida. Isto porque, de acordo com Efraim (2010), perdas consideráveis ainda podem ser ponderadas em etapas posteriores a fermentação, principalmente na torração, onde tempo e temperatura de torra, são inversamente proporcionais a teores de polifenóis totais. Contudo, o chocolate submetido a maior tempo e temperatura de torração teve sua capacidade antioxidante reduzida; da mesma forma Jolic et al. (2011) e Gültekin-Ozğüven et al. (2016) observaram em seus ensaios, mesmo em condições diferentes deste estudo.

Os resultados de fenólicos totais obtidos no presente estudo ( $11,28 - 20,84\text{ mg/g}^{-1}$ ) encontram-se dentro da faixa de valores encontrados por Hu et al. (2016) no Canadá, que ao analisar o conteúdo fenólico de chocolate contendo diferentes quantidades de cacau (35-100%), encontrou valores  $2.60-48.49\text{ mg GAE/g}$ ; diferente do estudo dos valores encontrados por Batista et al. (2016) no Brasil, que variou de  $11,35 - 65,24\text{ mg GAE/g}$ , onde margem inferior deste estudo diverge. Isto pode ser explicado devido ao fato de que durante o processo de torração, as condições como tempo e temperatura afetam a estabilidade fenólica assim como as características do sabor do chocolate (ORACZ, NEBESNY e ZYZELEWICZ, 2014).

Os valores de fenólicos totais para o tratamento de  $160\text{ °C}$  foram maiores em todos os tempos comparados ao tratamento de  $120\text{ °C}$  em todos os tempos. Estes resultados podem ser explicados pela falta de seletividade do reagente de Folin-Ciocalteu (ESCARPA e

GONZALEZ, 2001), que reage não apenas com fenóis, mas também com outros compostos redutores como carotenóides, aminoácidos, açúcares e vitamina C (VINSON et al, 2001).

A atividade antioxidante das nove amostras de chocolate, sob diferentes condições de torração, foi avaliada através dos testes de DPPH e FRAP. O DPPH mede a capacidade de sequestro de radicais livres, enquanto que o FRAP mede a habilidade que uma amostra tem de reduzir metais.

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras em ambos os métodos. Assim, na Tabela 3, pode-se observar que para a temperatura de 80°C nos tempos de 20,40 e 60 minutos esta diferença está presente e apresenta comportamentos semelhantes de acordo com o tratamento estatístico. Desta forma nota-se que o tempo interfere na capacidade antioxidante.

O método DPPH é simples e rápido, mas apresenta dificuldade de avaliação de atividade de antioxidantes hidrofílicos, posto que o radical é dissolvido em solventes orgânicos e não em meio aquoso (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A atividade antioxidante frente ao radical DPPH foi determinada por IC50, ou seja, a concentração de amostra necessária para inibir 50% da atividade máxima do radical livre. Os valores das IC50 entre os chocolates variam de 25,57 a 53,89  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , com valores de temperatura entre 80°C e 160°C neste estudo.

Arlorio et al. (2008) realizou estudo sobre o impacto da torração na atividade antioxidante em diferentes variedades de cacau e encontrou valores entre 26,54 a 34,76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , com valores de temperatura abaixo de 100°C; neste estudo para a temperatura de 80°C foram encontrados valores entre 25,57 e 34,34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que apresentam-se dentro da faixa de valores encontrados no estudo de Arlorio et al. (2008), mas provavelmente se diferem devido aos diferentes tempos (20,40 e 60 minutos) aplicados neste estudo, apresentando uma diferença significativa.

**Tabela 3.** Composição dos fenólicos totais, atividade antioxidante, compostos fenólicos e metilxantinas dos chocolates de acordo as condições de torração submetidas.

Condições de torração dos chocolates	Fenólicos totais	Atividade antioxidante	Fenólicos			Metilxantinas	
	(mg/g <sup>-1</sup> )	IC50 DPPH	( $\mu\text{mol Fe}^{++} \cdot \text{g}^{-1}$ ) FRAP	( $\mu\text{g/g}$ ) Catequina	Epicatequina	( $\mu\text{g/g}$ ) Teobromina	Cafeína
C1(T = 80 °C, t = 20 min)	20,84±2,85 <sup>a</sup>	25,57±2,06 <sup>b</sup>	156,38±2,01 <sup>b</sup>	34,36±2,16 <sup>a</sup>	68,74± 3,93 <sup>a</sup>	143,15± 6,78 <sup>a</sup>	69,19± 1,35 <sup>a</sup>
C2 (T = 80 °C, t = 40 min)	17,63±1,38 <sup>a</sup>	30,85±0,24 <sup>ab</sup>	144,15±3,23 <sup>ab</sup>	25,43 ±2,35 <sup>b</sup>	68,36± 4,97 <sup>a</sup>	56,21± 7,77 <sup>b</sup>	68,20± 3,12 <sup>a</sup>
C3 (T = 80 °C, t = 60 min)	10,18±2,34 <sup>b</sup>	34,34±6,84 <sup>a</sup>	138,22±5,60 <sup>a</sup>	25,86± 2,85 <sup>b</sup>	67,08±0,98 <sup>a</sup>	48,72± 2,39 <sup>b</sup>	64,55± 2,99 <sup>a</sup>
C4 (T = 120 °C, t = 20 min)	16,72±2,34 <sup>a</sup>	31,17±1,84 <sup>a</sup>	141,30±1,74 <sup>b</sup>	58,89± 7,79 <sup>a</sup>	67,50± 1,14 <sup>a</sup>	156,02± 20,11 <sup>a</sup>	44,86± 6,71 <sup>b</sup>
C5 (T = 120 °C, t = 40 min)	11,47±0,66 <sup>b</sup>	31,14±3,29 <sup>a</sup>	136,17±3,15 <sup>a</sup>	33,65± 0,42 <sup>b</sup>	62,63± 5,64 <sup>a</sup>	123,59± 0,63 <sup>a</sup>	27,89± 8,90 <sup>a</sup>
C6 (T = 120 °C, t = 60 min)	11,28±1,30 <sup>b</sup>	31,43±1,46 <sup>a</sup>	130,60±0,96 <sup>a</sup>	30,44± 0,17 <sup>b</sup>	44,51± 3,09 <sup>b</sup>	89,55± 4,67 <sup>a</sup>	25,04± 4,44 <sup>a</sup>
C7 (T = 160 °C, t = 20 min)	17,89±3,40 <sup>a</sup>	44,58±7,95 <sup>a</sup>	130,85±6,83 <sup>a</sup>	45,60± 2,14 <sup>a</sup>	85,78± 1,23 <sup>a</sup>	111,67± 3,46 <sup>ab</sup>	49,25± 4,05 <sup>b</sup>
C8 (T = 160 °C, t = 40 min)	17,34±1,24 <sup>a</sup>	44,76±6,70 <sup>a</sup>	126,33±5,20 <sup>a</sup>	42,41± 4,44 <sup>a</sup>	85,60± 2,32 <sup>a</sup>	90,33± 4,04 <sup>b</sup>	34,07± 2,22 <sup>a</sup>
C9 (T = 160 °C, t = 60 min)	14,75±2,85 <sup>a</sup>	53,89±17,47 <sup>a</sup>	116,34±8,31 <sup>b</sup>	50,28± 6,24 <sup>a</sup>	82,77± 1,62 <sup>a</sup>	126,20± 5,14 <sup>a</sup>	27,53± 3,72 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas representam diferenças não significativas entre as amostras, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ (IC50);  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g de fruta ( $\mu\text{mol Fe}^{++} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

A atividade antioxidante observada através do método de DPPH sob condições de torração de tempo 120°C e 160°C, não apresentaram diferença significativa dentro dos tempos estabelecidos. No entanto, observa-se que à medida que a temperatura aumenta, aumentam-se os valores de DPPH, que demonstra uma diminuição na atividade antioxidante, uma vez que neste método, quanto menor o valor encontrado, maior a atividade antioxidante presente naquela amostra.

A qualidade dos grãos de cacau também influencia as condições de torração e conseqüentemente a capacidade antioxidante após a submissão deste tratamento. Leite et al. (2013), realizaram estudo sobre atividade antioxidante em chocolates provenientes de cultivares resistentes à “vassoura de bruxa” e não resistentes à doença e encontraram na análise de DPPH, valores que variaram de  $15.15 \pm 1.88$  a  $20.47 \pm 1.86$ , diferentemente deste estudo onde foram encontrados valores superiores, sendo a amostra C1 o chocolate que demonstrou maior efeito antioxidante  $25,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (submetido ao tratamento de 80°C-20 min), fato já esperado pela menor exposição ao calor, tanto em intensidade quanto pelo tempo.

Os resultados da análise de FRAP diferem entre si para as temperaturas submetidas, e observa-se que para a temperatura de 80°C apresentam diferença em tempos distintos, enquanto que nas temperaturas seguintes não houve diferença significativa em todos os tempos. No entanto neste método, os maiores valores foram encontrados para a temperatura de 80°C, demonstrando assim maior atividade antioxidante, isto porque neste método a atividade antioxidante é proporcional ao valor de FRAP encontrado.

Comparando estes resultados com o estudo de Todorovic et al. (2015), que analisou chocolates de diferentes marcas e teores de cacau 65 e 70% e encontrou valores entre 130,3 e 151,4  $\mu\text{M TE/g}$ , este estudo apresenta valores que se diferem. No entanto a margem superior apresenta valores próximos aos destes autores (116,34 – 156,38  $\mu\text{mol Fe}^{++}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Sendo que a margem inferior apresenta valores distantes e este fato pode ser atribuído a diferente tempo e temperatura imputados ao processo de torração. Contudo, o tratamento C6 (T = 120 °C, t = 60 min) apresentou valor semelhante ao valor inferior (130,60  $\mu\text{mol Fe}^{++}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de Todorovic et al. (2015).

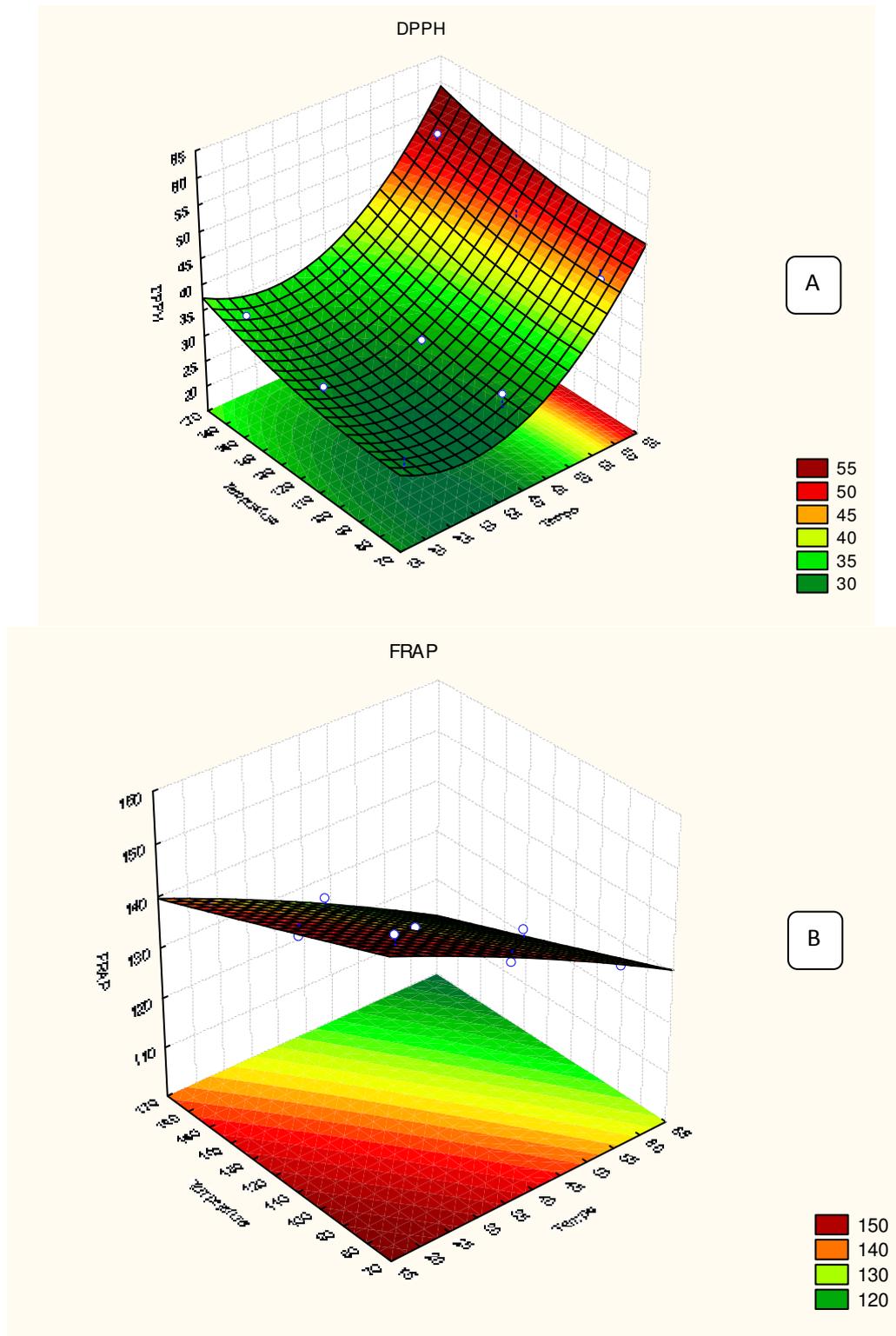
A diferença na significância para uma mesma amostra em ambos os experimentos pode estar associado ao fato dos métodos em questão possuírem diferentes formas de atuação e do perfil da substância analisada. De acordo com Gulcin (2012) valores de FRAP podem apresentar-se elevados possivelmente com relação à tendência dos polifenóis em se tornarem pró-oxidantes em algumas condições. Isto foi apontado para algumas flavonas e flavanonas, que também tiveram valores de FRAP aumentados (CAO, ALESSIO e CUTLER, 1993).

Segundo Hidalgo, Sánchez-Moreno e Pascual (2010), pode haver interações entre flavonóides, pois as relações entre estes compostos, comumente, aumentam a atividade antioxidante quando testados pelo método FRAP. Ainda que os valores alcançados de cada método evidenciem diferenças significativas, essas diferenças possivelmente poderiam ser esclarecidas com base no caráter químico e reatividade dos compostos, além da natureza dos solventes, os quais, com polaridades diferentes afeta consideravelmente atividades antioxidantes.

Ioannone et al. (2015) estudou o efeito da torração em diferentes tempos (0-62 min) e temperaturas (125, 135 e 145°C) na atividade de antioxidantes; comparando os valores de FRAP encontrados para os tempos de 20 e 40 minutos de torração destes autores (20min- 145° C-  $\pm 400\mu\text{mol}$ / 40min- 125° C-  $300\mu\text{mol}$ ) com este estudo, observa-se que os valores encontrados foram inferiores (Tabela 3), provavelmente em função da diferença de temperatura utilizada pelo mesmo tempo no processo de torração. Além disto, a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos entre os múltiplos antioxidantes que encontram-se em alimentos vegetais e produtos derivados (GARCÍA-ALONSO et al., 2004, VINSON et al., 2001).

Com o objetivo de verificar a relação existente entre uma variável de resposta de interesse e fatores do processo utilizamos a metodologia da superfície de resposta; que é uma compilação de técnicas matemáticas e estatísticas que são úteis para modelagem e análise nas aplicações em que a resposta de interesse seja influenciada por variáveis e o objetivo seja otimizar essa resposta (MONTGOMERY e RUNGER, 2008). As amostras de chocolate foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA), que foram para a avaliação da atividade antioxidante através dos métodos de DPPH E FRAP. Deste modo, fundamentado nos resultados da ANOVA foi possível construir as superfícies de respostas destes testes, os quais estão apresentados na Figura 18.

**Figura 18**–Superfície de resposta para as atividades antioxidantes em função do efeito do tempo e temperatura de torração sobre os chocolates.



Na Figura 18, no gráfico A observa-se que os maiores valores de concentrações finais em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato necessário para a diminuição inicial da concentração de DPPH a 50% está representada a partir da superfície vermelha do gráfico. A faixa vermelha representa a região ótima e a robustez do processo. Neste caso, no gráfico de DPPH a amostra submetidas à torração durante 20, 40 e 60 minutos a  $160^{\circ}\text{C}$ , que se encontra na faixa vermelha, pode ser admitida como o tratamento que mantém o processo em condição potencializada por possuir os maiores valores de DPPH. No entanto, para a análise de atividade antioxidante pelo método do radical DPPH, quanto menor o valor de IC50, maior a atividade antioxidante das amostras avaliadas, neste caso, os menores valores se encontram na região verde do gráfico. Sendo a amostra C1( $80^{\circ}\text{C}$ -20 min) a que detém o menor valor ( $25,57 \pm 2,06$ ) e possui maior poder antioxidante.

O método FRAP, é um método rápido e simples de redução do Ferro por um antioxidante em condições ácidas com sistema aquoso (MOON e SHIBAMOTO, 2009). Esta análise representada no gráfico B demonstrou sua região ótima na faixa de 150, representando uma região maior do que na análise de DPPH no gráfico A. Sendo os tratamentos na temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$  que apresentaram maior influência nos resultados obtidos através de FRAP, por apresentarem os maiores valores.

Outros estudos têm analisado a influência do tempo e temperatura na etapa de torração em chocolates, como: Rocha et al. (2016) que analisou chocolates de diferentes variedades para identificar a influência do tempo e temperatura envolvidos no processo de torração, nas características sensoriais desses chocolates. Em seu estudo, houve diferença significativa para os tratamentos submetidos à torração a  $160^{\circ}\text{C}$  por 20, 40 e 60 minutos, estes não foram bem aceitos pelos consumidores, em relação aos atributos aroma, sabor, textura e qualidade global.

Suazo et al. (2014) que realizou estudo sobre o efeito da fermentação e torração na concentração de fenólicos e atividade antioxidantes de cacau da Nicarágua. Segundo os autores, em geral, quando os grãos de cacau são submetidos à torração, há uma redução dos teores de compostos fenólicos e da atividade antioxidante, além de mudanças na cor dos grãos com o aumento de temperatura. Assim, observaram que houve diferença na atividade antioxidante, nos teores de compostos fenólicos e na tonalidade dos grãos após submeter à temperatura de  $130^{\circ}\text{C}$  durante 20, 30 e 60 minutos, concluindo que a torração tem grande impacto nas mudanças dos grãos de cacau.

Neste estudo como se constatou diferença significativa na atividade antioxidante, isso demonstra que a temperatura e o tempo de torração influenciam na atividade antioxidante. Parte dos antioxidantes do chocolate é oriundo de compostos fenólicos, portanto associando ao estudo de Rocha (2015), no que diz respeito aos atributos de aroma, sabor, textura e qualidade global, quesitos provenientes dos compostos presentes no cacau, entre eles os fenólicos; sua perda como antioxidante implica em influência na formação do perfil sensorial de aceitação de chocolates.

Os resultados do ensaio dos fenólicos totais mostraram uma forte correlação com a capacidade antioxidante. Em termos de ensaio DPPH, os valores IC50 variaram de 25,57 a 53,89 e os valores de FRAP variaram de 116,34 a 156,38, onde o chocolate submetido ao tratamento de  $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $t = 20$  minutos foi a amostra que demonstrou maior atividade antioxidante. Por fim, neste estudo para as características antioxidantes dos chocolates, houve impacto da temperatura e tempo de torração das amêndoas de cacau e influência do tempo, nos níveis estudados.

## **5.2. Identificação e quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica empregada tanto na separação quanto na quantificação de flavonóides e não flavonóides (ANGELO e JORGE, 2007; GÓMEZ-ALFONSO, SALVADOR e FREGAPANE, 2002). Através desta técnica, foram identificados e quantificados 4 (quatro) compostos bioativos, sendo eles dois compostos fenólicos e duas metilxantinas; seus conteúdos estão representados na Tabela 3.

Os dados dos compostos das nove amostras de chocolate foram analisados através do teste estatístico de Tukey. O conteúdo de fenólicos e metilxantinas apresentaram diferença significativa em pelo menos uma amostra de cada composto bioativo. Na literatura encontra-se sugestão do procedimento térmico de sementes de cacau no intervalo de temperatura entre 130 e 150 ° C e para o tempo entre 15 e 45 minutos (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009; KRYSIAK, 2006; MINIFIE, 1999). Neste estudo foram utilizadas temperaturas e tempos diferentes para verificar a influência da torração nos teores dos compostos bioativos de amostras de chocolates.

Para a catequina foi verificado que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na maioria dos ensaios, no entanto as amostras submetidas à temperatura de 160°C não apresentaram diferença entre si, mas diferiu das demais temperaturas. Observa-se que as amostra C7, C8 E

C9 apresentaram valores de catequina e epicatequina mais altos, podendo atribuir possível troca do perfil original de flavanóis monoméricos, causada, provavelmente, pela epimerização da (-)-epitecatequina à (-)-catequina. (EFRAIM et al., 2011). Já que para Kofink, Papagiannopoulos e Galensa. (2007) a epicatequina pode ser epimerizada para (-) - catequina durante a torração das sementes de cacau; influenciadas pela ação do calor. E de acordo com Jalil e Ismail (2008), a presença de peptídeos e minerais poderia sinergicamente melhorar ou reduzir as características antioxidantes do cacau e seu produtos.

Com a epicatequina a amostra C6 diferiu estatisticamente no grupo de temperatura 120°C e de todas as outras amostras. Conforme Schroeter et al. (2006), a epicatequina é o elemento ativo do cacau responsável pelos resultados favoráveis à saúde vascular a ele associados e, a quantidade de (-)-epicatequina é em torno de seis vezes maior que a de (+)-catequina no chocolate (KEEN, 2001). Neste experimento, todas as amostras apresentaram teores superiores de epicatequina comparados à catequina; no entanto, estes valores não apresentaram a proporção seis vezes maior.

Apesar dos conteúdos de catequinas serem inferiores, compostos fenólicos em adequadas concentrações tendem a agir como antioxidantes, enquanto que em concentrações em excesso, podem adquirir uma propriedade pró-oxidante, que depende também da posição e do número da hidroxila e do agrupamento de metais de transição (GALATO et al., 1999; KHAN, AHMAD e HADI, 2000).

Os teores de polifenóis localizados nos produtos de cacau podem estar associados à origem, a variedade do cacau, a parâmetros de processo e pH (EFRAIM et al., 2011). Efraim et al. (2006), Silva (2013), Leite et al. (2013) e Fernández (2016) demonstraram haver variação no teor de polifenóis em função de características genéticas e da variedade de cacau. Neste estudo foram encontrados valores de catequina (25,43 µg/g a 50,28 µg/g) próximos aos Alañón et al. (2016) que analisou este composto em 24 chocolates escuros de diferentes variedades, onde seus valores variaram de 4µg/g a 908 µg/g. E encontrou valores inferiores ao estudo de Arruda (2014) que avaliou o teor deste composto em dez chocolates comerciais de diferentes genótipos de cacau.

Cooper et al. (2007) demonstraram haver considerável variação no teor individual de polifenóis em 68 amostras de chocolate avaliadas. A amostras deste experimento tiveram valores de epicatequina que variaram de 44,51 µg/g a 85,78 µg/g, valores dentro da faixa de

algumas amostras de Hu et al. (2016) que encontraram valores de epicatequina (20 µg/g – 6.010 µg/g) em amostras de chocolate.

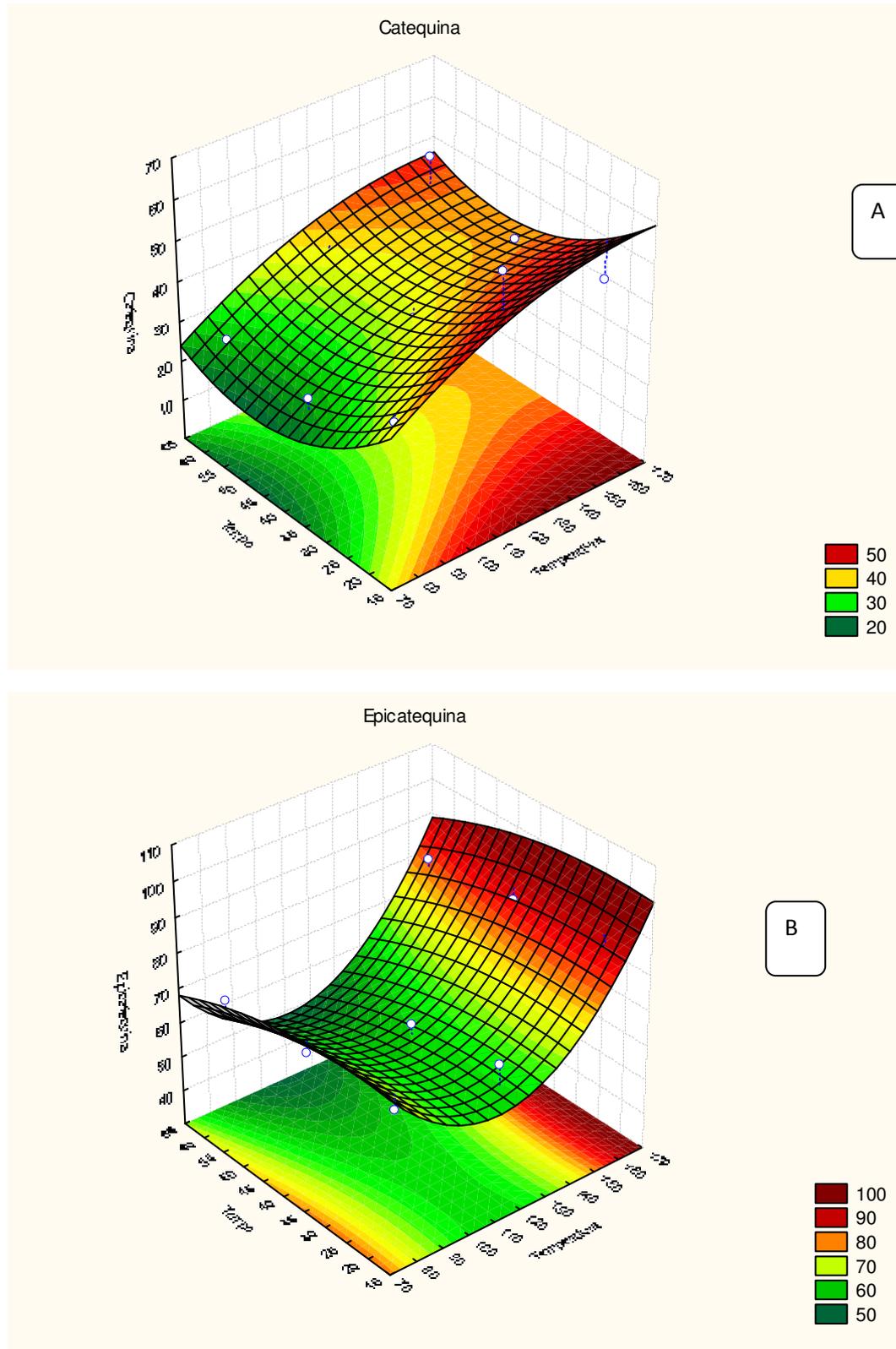
Com teobromina e cafeína a amostra C1 indicou maior quantidade destes compostos, ocasionando diferença significativa das outras amostras, exceto cafeína que no mesmo grupo de temperatura a 80°C foi estatisticamente semelhante. A teobromina é predominante no cacau e seus derivados (BEAUDOIN e GRAHAM, 2011; ARRUDA, 2014) e para Paoletti et al. (2012), o teor de teobromina no chocolate escuro é seis a sete vezes maior do que o teor em cafeína.

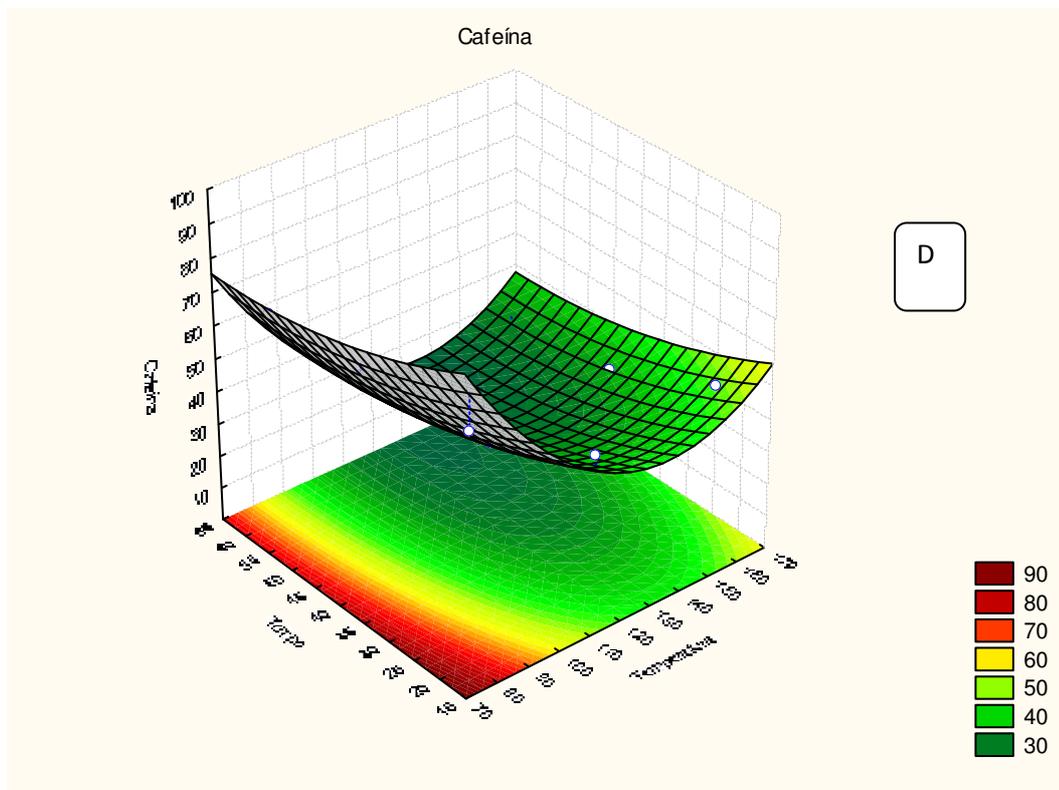
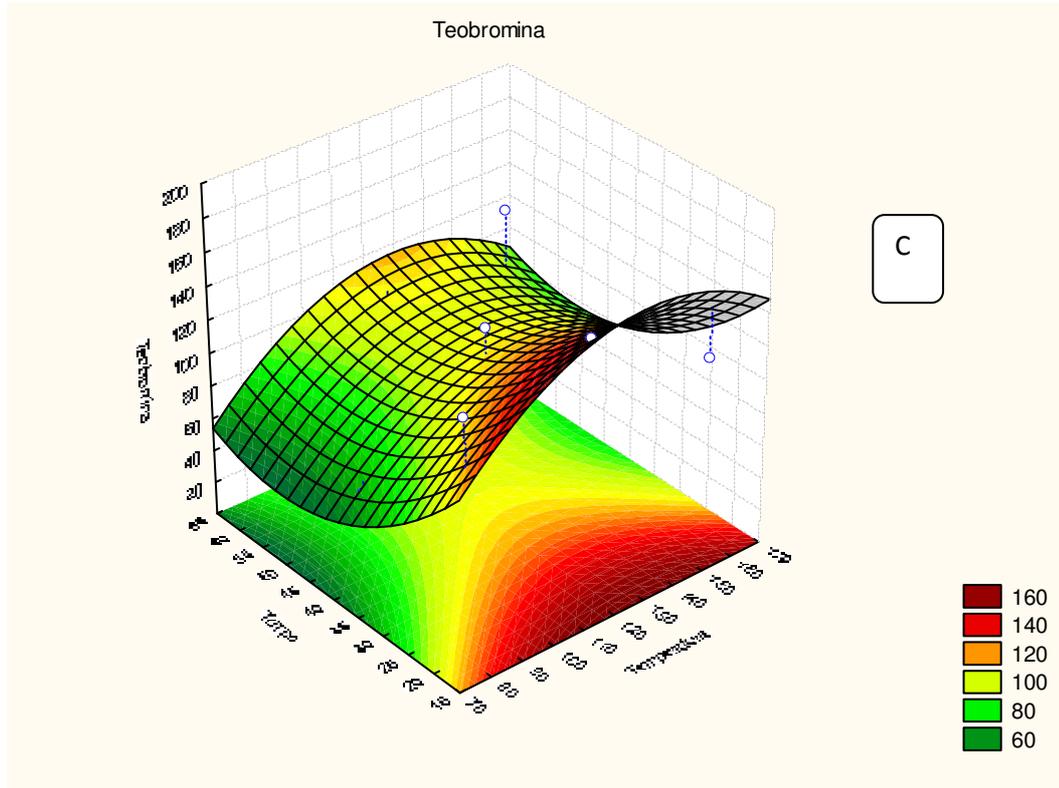
Neste estudo os conteúdos de teobromina foram maiores que os da cafeína na maioria das condições de torração às quais os chocolates foram submetidos. No entanto, nenhuma das amostras apresentou valores de teobromina entre seis a sete vezes maiores que cafeína. Todorovic et al. (2015) de teobromina superiores aos de cafeína em chocolates com 70% de cacau; no entanto, neste estudo os valores de teobromina e cafeína encontrados foram inferiores aos destes autores.

A circunstância de oscilação nos valores dos compostos bioativos dos chocolates é em decorrência das variações de parâmetros do processo (condição de tempo e temperatura de torração), que de acordo com Wollgast e Anklam (2000) podem fornecer aos produtos de cacau diferentes graus de polifenóis. Além de que também pode ocorrer em função das distintas variedades utilizadas para a formação dos *blends*.

Na Figura 19, estão representas as superfícies de resposta dos compostos bioativos identificados. Nestas figuras é possível observar a influência efetiva do tempo e temperatura de torração sobre os chocolates. A parte vermelha do gráfico representa os maiores valores. A respeito dos compostos fenólicos, estes tiveram seus valores influenciados tanto pelo tempo quanto pela temperatura. Os comportamentos das metilxantinas foram diferentes, a teobromina sofreu maior interferência da temperatura e a cafeína sofreu maior interferência do tempo.

**Figura 19**–Superfície de resposta dos compostos fenólicos e metilxantinas em função do efeito do tempo e temperatura de torração sobre os chocolates.





A. Catequina; B. Epicatequina; C. Teobromina; D. Cafeína

Fonte: o Autor (2017)

Companhias produtoras de chocolate adquirem espécies de cacau de diversas partes do mundo e podem preparar o *liquor* de cacau de um único tipo deste fruto ou misturas distintas, obtendo *blends* com sabores peculiares (variando grãos e método de torração) para agradar o paladar de seus consumidores (RICHTER e LANNES, 2007) e o grande interesse no consumo de produtos com alto conteúdo fenólico, como o chocolate (FOLCH-CANO, et al. 2010; YILMAZ, 2006).

Durante todo o processo de fabricação do chocolate ocorrem alterações nos compostos do cacau. Este estudo ao analisar a etapa de torração confirmou estas alterações em função da influência do tempo e temperatura. No entanto, neste tratamento térmico podem ocorrer alterações nos polifenóis sob influência de outros parâmetros, como observou Żyżelewicz et al. (2016) em pesquisa sobre a interferência da temperatura, tempo de torração, vazão de ar e umidade relativa nos teores de compostos fenólicos. Estes autores observaram alteração nos compostos sendo que a perda foi menor quando as sementes foram torradas no ar com umidade relativa aumentada.

Nas etapas seguintes, como refinação e conchagem, os polifenóis e metilxantinas também pode ser alterados, onde temperaturas são alcançadas e o ar está presente (WOLLGAST e ANKLAM, 2000). Como observado por Jolic et al. (2011), os teores de catequina e epicatequina iam reduzindo quando passava pela etapa de torração, *liquor* e chocolate, nesta ordem.

Neste estudo, todos os compostos apresentaram interferência das duas variáveis (tempo e temperatura) no processo de torração. No entanto, o chocolate pode apresentar outros compostos que apontam elevada capacidade antioxidante, como: flavonóis, proantocianidina, antocianinas, entre outros, e que também podem sofrer influência do processo de torração, devendo também ser analisados.

## 6. CONCLUSÕES

Estes resultados demonstram que amostras de chocolates submetidos a diferentes tempos e temperaturas de torração podem apresentar influência na atividade antioxidante dos chocolates e nos compostos bioativos de chocolate. No entanto, a eficiência do método de análise da capacidade antioxidante deve ser levada em consideração, além de uma análise de outros compostos que apresentam comportamento antioxidante e das variedades selecionadas para o *blend*. Contudo, é insuficiente na literatura informações sobre a influência do tempo e

temperatura de torração nos compostos bioativos em chocolates e na sua atividade antioxidante. Sendo de grande importância o estudo dos conteúdos intrínsecos dos chocolates, uma vez que estes produtos são bastante consumidos em função de suas propriedades favoráveis ao organismo humano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, G. E.; LAZARUS, S. A.; MITCHELL, A. E.; PRIOR, R. L.; CAO, G.; JACOBS, P. H.; KREMERS, B. G.; HAMMERSTONE, J. F.; RUCKER, R. B.; RITTER, K. A.; SCHMITZ, H. H. HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 10, p. 4184-4188, 1999.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. England: Wiley-Blackwell, p.234, 2010.
- ALANÓN M. E.; CASTLE, S. M.; SISWANTO, P. J.; CIFUENTES-GÓMEZ, T.; SPENCER, J. P. E. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. **Food Chemistry**, v.208, p.177–184, 2016.
- ALMA, M.H.; MAVI, A. YILDIRIM, A.; DIGRAK, M.; HIRATA, T. Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, p. 1725–1729, 2003.
- ALMEIDA, L. S. **O Vale do Jiquiriçá no contexto do circuito espacial produtivo do cacau**. Salvador, 2008.
- ARGENTON, A. **Conceitos fundamentais de Cromatografia líquida de Alto Desempenho (HPLC)**. Conselho Regional de Química - IV Região (SP), 2010.
- ALMEIDA, F. A.; MASCARENHAS, CERQUEIRA, G. C.; MIDLEJ, R. R. **Estudo da Cadeia Agroindustrial do Cacau**. In: VIEIRA, Rita de Cássia Milagres Teixeira et al, Cadeias produtivas no Brasil: análise da competitividade. Brasília, FGV/EMBRAPA, p. 109-135, 2001.
- ALMEIDA, L. M. A.; RIGOLIN, T. B. **Geografia**. São Paulo, SP: Ática, 2007.
- ALTIMARI, L. R.; CYRINO, E. S.; ZUCAS, S. M.; Efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v. 14(2): p.141-58, jul./dez. 2000.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Methods for determination of *in vitro* antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciososa* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, p 70, 2002.
- 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, n. 2, 2002.

- AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. **Aspectos de localidad de cacao**. Quevedo, Ecuador: INIAP (Estación Experimental Tropical Pichilingue), 2007.
- AMORES, F.; PALACIOS, A.; JIMÉNEZ, J.; ZHANG, D. Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor oriente de la provincia de esmeraldas. Quevedo, Los Ríos, Ecuador: INIAP. p. 120- **Boletim Técnico**, p.135, 2009.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: E. Blucher, vol. 4. 2001.
- ARAUJO, Q. R. Cacao and Human Health: from Head to Foot - A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 24 ago. 2013.
- ARAUJO, Q. R. Cocoa Quality Index - a Proposal. **Food Control**, v. 46, p. 49–54, 2014.
- ARLORIO, M., LOCATELLI, M., TRAVAGLIA, F., COÏSSON, J. D., DEL GROSSO, E., MINASSI, 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, p.967–975, 2008.
- ARRUDA, C. G. de. **Caracterização de chocolate amargo e meio amargo de diferentes marcas comerciais**. 2014. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.
- ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C.; KROMHOUT, D. **Chocolate as a source of tea flavonoids**. *Lancet*. p.354-488, 1999.
- BASTOS, C. P. **Processamento de Chocolate**– Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.
- BATALHA, P. G. **Caracterização do cacau catongo de São Tomé e Príncipe**. Lisboa. 2009. Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos – Tecnologia de Produtos vegetais) Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa – Portugal, 2009.
- BATISTA, N. L.; VIERO, L. M. D. **Cacau, um dos grandes ciclos econômicos do Brasil**. In... XVI Jornada Nacional de Educação, 2012.
- BATISTA, N. N. et al. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v.90: p.313–319. 2016.
- BEAUDOIN, M. S.; GRAHAM, T. E. Methylxanthines in human health: epidemiological and experimental evidence. **Handbook of Experimental Pharmacology**. p. 509-548, 2011.
- BECKETT, S. T. The science of chocolate. 2 nd ed. **Royal Society of Chemistry**. Paperbaks: Londres, 2008.
- BECKETT, S. T. Industrial chocolate manufacture and use. 4 ed. London: **Chapman and Hall**, p.20-23, 2009
- BECKETT, S.T. Fabricación y utilización industrial del chocolate. **Zaragoza**: Editorial Acribica, p.432, 1994.
- BEGIATO, G. F.; SPERS, E. E.; CASTRO, L. T.; NEVES, M. F. Análise do sistema agroindustrial e Atratividade dos Vales do São Francisco para a cacauicultura irrigada. **Custos e agronegócio online** - v. 5, n. 3 – Set/Dez - 2009.

- BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. **Food chemistry** (4th ed.). Berlin, Germany: Springer, 1070, 2009.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2 ed. Berlin: Springer Verlag, p.702-711, 1999.
- BELSCAK, A.; KOMES, D.; HORZIC, D.; GANIC, K.; DAMIR, K. D. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. **Food Research International**, 42: 707-716, 2009.
- BORGES, L.L.; LÚCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E.F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.12; 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science Technology**, v.28: p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC n.264, de 22 de setembro de 2005. Aprova Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chocolate e Chocolate Branco. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18823&word=chocolate>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.
- BRENELLI, E. C. S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes – uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v. 26, n.1 São Paulo, jan./fev. 2003.
- BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobromacacao* L.); e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 176p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- BRUINSMA, K. K.; TAREN, D. L. Chocolate: Food or Drug? **Journal of the American Dietetic Association**, n. 99, p. 1249-1256, 1999.
- CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **I Seminário Internacional de Vitivinicultura**, p.65-66, 2003.
- CAO, G., ALESSIO, H.M. , CUTLER, R.G.. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, p.303-311, 1993.
- CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). **Indicação de variedades de cacau para cultivo comercial – Rede de avaliação de clones em larga escala**. Material cedido pela CEPLAC, 2010.
- CHEN, C.; TANG, H.; SUTCLIFFE, L. H.; BELTON, P. S.; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 48, p.5710, 2000.
- CHUST, R. B. Cromatografia de líquidos. **BOLETIM SPQ**, p.39, 1990.
- COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H.; SOUSA, M. V. Otimização do processo de temperagem de produto análogo de chocolate ao leite elaborado com amêndoas de cacau e de cupuaçu. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 115-127, 2004.

CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA- IV REGIÃO. **Guia de Laboratório para o Ensino de Química**. 2010.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian., p. 723 - 737.v.2. 2002

COOPER, K. A.; CAMPOS-GIMÉNEZ, E.; ALVAREZ, D. J.; NAGY, K.; DONOVAN, J. L.; WILLIAMSON, G. Rapid Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography Analysis of the Major Cocoa Polyphenols and Inter-relationships of Their Concentrations in Chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. p.2841–2847, 2007.

CLARK, S.; FRANCIS, P. S.; CONLAN, X. A.; BARNETT, N. W. Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after automated derivatisation with xanthidrol. **Journal of Chromatography A**. 2007.

COPETTI, M. V. **Microbiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**-Campinas, 2009.

CRUZ, J. F. M. **Caracterização das sementes de variedades de cacau (*Theobroma cacao* L.) resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2012.

CRUZ, J. F. M.; LEITE, P. B.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao* L) cultivars during fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 35, p. 279-284, 2015.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. CAFEÍNA: REVISÃO SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISE. **Química Nova**, Vol. 30, No. 1, 99-105, 2007.

DEUS, V. L. **Influência dos métodos de secagem nas propriedades antioxidantes de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Dissertação de Mestrado, 2015.

DE ZAAAN. **The cocoa manual**. Cacao De Zaan B. V., Holland. 1993.

DIMICK, P. **Proceedings of the Symposium. Cacao Biotechnology**. Department of Food Science, College of Agriculture, The Pennsylvania State University, 1986.

DRUMMOND, M.C. M. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Theobromacacao* L.). Sua qualidade nutricional a atributos sensoriais**. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.446-452, 2006.

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

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. Campinas, 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de

compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 142-150, 2011.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Teores de Compostos Fenólicos de Sementes de Cacaueiro de Diferentes Genótipos. Brazilian. **Journal Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229- 236, 2006.

EGAN, et al. **Does Dark Chocolate Have a Role in the Prevention and Management of Hypertension?** *Hypertension*, v.55(6), p.1289-1295, 2010.

EKLUND, P.C.; LANGVIK, O.K.; WARNA, J.P.; SALMI, T.O.; WILLFOR, S.M.; SJOHOLM, R.E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Organic and Biomolecular Chemistry**, p. 3336–3347, 2005.

ELKON, J. **O livro de receitas com chocolate**. Rio de Janeiro: Editora Record, p-152, 2004.

EMBRAPA- **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Alimentos MAPA, Brasília, DF, 2003.

ESCARPA, A., GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.31: p.57-139, 2001.

ESTIVAL, K. G. S.; LAGINESTRA, A. M. **A construção dos mercados de qualidade do cacau no Brasil**. In... XI CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO, agosto, 2015.

ESTIVAL, K. G. S. **Construções sociais dos mercados de qualidade do cacau no Brasil**. Tese. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. CPDA/UFRRJ. 320p. Rio de Janeiro, 2013.

FANTOZZI, P.; MONTEDORO, G. Dosage des composés phénoliques dans drupes d'olives récoltées à différents stades de maturation. **Industries alimentaires et agricoles**. p. 1335-1339, 1978.

FAOSTAT. Online database, **FAO**, Rome, 2013.

FERRÃO, J.E.M. **Cacau: Tecnologia pós-colheita**. Ligalu edições: Lisboa, 2002.

FERREIRA, A. S. **Validação da Determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. FCT-UNL, UNL.C. 2013.

FERNÁNDEZ-MURGA, L.; TARÍN, J. J.; GARCÍA-PEREZ, M. A.; CANO, A. The impact of chocolate on cardiovascular health. **Maturitas**, v. 69, p.312-21, 2011.

FERNÁNDEZ, J. Proyecto de investigación. Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli)fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido. **E Cienfuegos**, 2016.

FGV- Fundação Getúlio Vargas. The Agribusiness Magazine, **Agroanalysis**, Edição especial, Rio De Janeiro, 2003.

FOLCH-CANO, C.; JULLIAN, C.; SPEISKY, H.; OLEA-AZAR, C. Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with  $\alpha$ -cyclodextrins by ORAC assays. **Food Research International**, p.2039- 2044, 2010.

FORSYTH, W.G.C; QUESNEL, V.C. Cacau glycosidase and colour changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. London, v. 8, p. 505-509, 1957.

- FUNAGOSHI, E. **Avaliação do potencial de sistemas nanoestruturados inovadores para incorporação de cacau orgânico: estudo da estabilidade físico-química e atividade antioxidante**- Trabalho de Conclusão de Curso, 2012.
- GALATO D, GIACOMELI C, CKLESS K, SPINELLI A. Caracterização da atividade antioxidante de compostos fenólicos através de métodos eletroanalíticos. **Livro de Resumos Encontro de Química Analítica**. n.10. p.26, 1999.
- GARCÍA-ALONSO, M., RIMBACH, G., RIVAS-GONZALO, J. C., PASCUAL-TERESA, S. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A – Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3378–3384, 2004.
- GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. S. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 810-814, 2009.
- GOMES, A. S.; PIRES, M.M.; FREIRE, C. R. F. A crise da atividade cacauceira e a agroindústria do cacau no Estado da Bahia, Brasil. **Asociación Latino americana de Sociología**. Disponível em: <http://www.alasru.org/>. Acesso em 10 de agosto de 2015.
- GÓMEZ-ALFONSO, S.; SALVADOR, M. D.; FREGAPANE, J. Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.50 (23): p.6812-7, 2002.
- GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. **Food Chemistry**, v. 129, p. 366-373, 2011.
- GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: An OverView. **Archives of toxicology**, 2012.
- GÜLTEKIN-OZGÜVEN, M. et al. Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology / LWT - **Food Science and Technology**, v.66: p.252-259, 2016.
- HASING, M. H. **Estudio de lavariación en los contenidos de polifenoles y alcaloides, en almendras de cacao por efecto de los procesos de fermentación y tostado**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Farmácia), 2004.
- HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL, S. T. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, p.691–696, 2010.
- HOLT, R. R.; SCHRAMM, D. D.; KEEN, C. L.; LAZARUS, S. A.; SCHMITZ, H. H. Chocolate consumption and platelet function. **JAMA**, v.287: p.2212–3, 2002.
- HU, U et al. Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.202, p.254–261. 2016.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.

- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 29 jan. 2017.
- ICCO- International Cocoa Organization. Disponível em <http://www.icco.org>. Acesso em 28 de Outubro de 2015.
- IOANNONE, A. B , et al. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing F. **Food Chemistry**. n.174, p. 256–262, 2015.
- JALIL, A. M. M.; ISMAIL, A. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? **Molecules**, 2008.
- JOLIC, S.M.; REDOVNIKOVIC, I. R.; MARKOVIC, K., SIPUSIC, D. I.; DELONGA, K. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in coco beans processing. International. **Journal of Food Science and Technology**, p.1793–1800, 2011.
- KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L.; FLEISCHER, T. C.; SKAL TSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopii aethiopica* (Dun) A. Rich. (*Annonaceae*) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 8094–8098, 2004.
- KEEN, C. L. Chocolate: food as medicine/medicine as food. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 5, p. 436S–439, 2001.
- KEEN, C. K.; HOLT, R. R.; OTEIZA, P. I.; FRAGA, C. G.; SCHMITZ, H. H. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81: p.298S–303, 2005.
- KHAN, N. S.; AHMAD, A.; HADI, S. M. Antioxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. **Chemico-Biological Interactions**, v.125: p.177-89, 2000.
- KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 1090-1092, 1984.
- KNAPP, A. W. **Cacao Fermentation - a Critical Survey of its Scientific Aspects**. London, United Kingdom: John Bale, Sons e Curnow, 1937.
- KOFINK M, PAPAGIANNPOULOS M, GALENSA R. (-)-Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. **Molecules**. v.12: p.1274–1288, 2007.
- KORDALI, S.; CAKIR, A.; MAVI, A.; KILIC, H.; YILDIRIM, A. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1408–1416, 2005.
- KOTHE, L.; ZIMMERMANN, B. F.; GALENSA, R. Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. **Food Chemistry**, p.3656–3663, 2013.
- KPMG. International Cooperative. **Chocolate of tomorrow: State of the market**. Haymarket Network Ltd, 2014.
- KRYSIAK, W. Roasting conditions and cocoa bean quality. **Acta Agrophysica**, v.77, p.51–60, 2002.

- KRYSIAK, W. Effects of convective and microwave roasting on the physicochemical properties of cocoa beans and cocoa butter extracted from this material. **Grasas y Aceites**, v.62, p. 467–478, 2011.
- KRYSIAK, W. Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. **Journal of Food Engineering**, v.77, p. 449–453, 2006.
- KWIK-URIBE, C. **Potential Health Benefits of Cocoa Flavanols**. The Manufacturing Confectioner, Princeton, v. 85, n. 10, p. 43-49, 2005.
- LAGUNES-GALVEZ, S., LOISEAU, G., PAREDES, J. L., BAREL, M., & GUIRAUD, J. P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, p. 24– 3, 2007.
- LAJUS, B. **Estudos de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. São Paulo. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1982.
- LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TORNERO, A. Review: health effects of cocoa flavonoids. **Food Science Technology International**, v. 11: p.159–76, 2005.
- LARRAURI, J. A., RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.4, p.1390-1393, 1997.
- LEITE, P. B.; BISPO, E. S.; SANTANA, L. R. R. Sensory profiles of chocolates produced from cocoa cultivars resistant to *Moniliophthora perniciosa*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 594-602, 2013.
- LEITE, P. B.; MACIEL, L. F.; OPRETZKA, L. C. F.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from 'witch broom disease' resistant and non resistant cocoa cultivars. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, p. 244-250, 2013.
- LIMA, U. **Matéria prima dos alimentos**. 2.ed. Sao Paulo: Blucher, p. 238-331, 2010.
- LOPES, A. S.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*) e cacau (*Theobroma cacao L.*). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 309-316, 2003.
- LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 73-81, 2011.
- MACIEL, L. F.; OLIVEIRA, C. S.; BISPO, E. S.; MIRANDA, M. P. S. Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from biodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. **British Food Journal**, p.1103-1113, 2011.
- MACIEL, L. F. ; FELICIO, 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** , p. 00-00, 2017.
- MAGALHAES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytical Chimica Acta**, p. 1–19, 2008.
- MAO, T. K. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 $\beta$  in peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences**, v. 66; n. 15; p. 1377-1386, 2000.

- MARQUES, T. M. **Viabilidade econômica do cultivo de cacau e bananeira irrigados no maranhão**. Dissertação (MPAGRO) - Escola de Economia de São Paulo. 84 f. 2015.
- MARTIN, J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **Biochemical Journal**. Dec; v. 35(12): p. 1358–1368. 1941.
- MARTINI, M. H.; FIGUEIRA, A.; LENCI, C. G.; QUEIROZ, T. D. Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (*Sterculiaceae*). **Revista Brasileira de Botânica**, v.31(3): p.425–431, 2008.
- MARTINI, M. H. **Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao* L.** Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2004.
- MARTINS, J.M. et al. **Melhoria da Qualidade de Cacau**. Ilhéus. CEPLAC/CENEX. 45p. 2012.
- MATISSEK, R. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate: nutritional and chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 205, n. 3, p. 175-184, 1997.
- MATTIETO, R. A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Campinas, Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- MEDEIROS, M. L.; LANNES, S. C. S. Avaliação química de substitutos de cacau e estudo sensorial de achocolatados formulados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 247-253, 2009.
- MI – Ministério da Integração Nacional. **Companhias dos Vales do São Francisco e Parnaíba. Estudo para introdução do cacau irrigado na região do São Francisco**. Elaboração do estudo de viabilidade sócio-técnico-econômica e ambiental, e EIA/RIMA para o perímetro irrigado de Cruz das Almas do projeto Sertão de Pernambuco, localizado no município de Casa Nova - BA. Bahia, 2005.
- MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa, and confectionery: science and technology**. 3rd edition, **Van Nostrand e Reinhold**, New York, 907p. 1999.
- MISNAWI, J. S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p.917-924, 2005.
- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**, 4ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 496 p, 2008.
- MOON. J. K; SHIBAMOTO, T. Review. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. p.1655–1666, 2009.
- MURPHY, K. J. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. **American Journal of Clinical and Nutrition**, v.77, n.6, p.1466-1473, 2003.
- NACHTIGALL, A. M. **Processamento de chocolate**– Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

- NASCIMENTO, R. F.; ARRIECHE, L. S.; "Síntese da Estrutura de Processamento de um Produto à Base de Cacau: Maximização de Componentes Antioxidantes", p. 1956-1961. In: Anais do XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, ISSN Impresso: 2446-8711. São Paulo: Blucher, v. 1, n.3, 2015.
- NAZARUDDIN, R.; SURIAH, A. R.; OSMAN, H.; AYUB, M. Y.; MAMOT, S.; LIM, L. S.; NG W. F. Caffein and theobromine levels in chocolate couverture and coating products. Malasya, **Journal Nutrition**, v. 6, p. 55–63, 2000.
- NAZARUDDIN, R., SENG, L.K., HASSAN, O., SAID, M.. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation - **Industrial Crops and Products** – Elsevier. 2006
- NEBESNY, E.; RUTKOWSKI, J. The effect of roasting and secondary fermentation on cocoa bean enrichment. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.7/48(3), p.437–444, 1998.
- NESTEL, P. J. How good is chocolate? Am. **Journal Clinical Nutrition**, v. 74, n. 5, p.563-564, 2001.
- NIJVELDT, J. R. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.
- NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, p. 503–515, 2010.
- OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, SP: Manole, p.612, 2006.
- OLIVEIRA, C. S.; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. S.; BISPO, E. S. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, p.1094-1102, 2011.
- OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma Cacao*)**. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Nov., 2005.
- ORACZ, J; NEBESNY,E; ŻYŻELEWICZ, D. Effect of roasting conditions on the fat, tocopherol, and phytosterol content and antioxidant capacity of the lipid fraction from cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. cultivars. **European journal of lipid Science and Technology**. 2014.
- OTHMAN, A., et al. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. **African Journal of Biotechnology**, v.9((7)), p.1052-1059, 2010.
- OZCELIK, B.; LEE, J.H.; MIN, D.B. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of Food Science**, p. 487–490, 2003.
- PAOLETTI, R., et al. **Chocolate and Health**. Italy, Springer.v.153.p.1-13; 23-26; 42-60; 128, 2012.
- PASCHOAL, V.; KALLUF, L. Fome de bom humor. In: MARANGONI, S. (Edit.). **Revista Nutrir**, 2 ed., n. 2, p. 32-35, 2009.
- PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 11, p. 5331-5337, 2000.
- PAUWELS, R. A.; BUIST, A. S.; CALVERLEY, P. M.; JENKINS, C. R.; HURD, S. S.; Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive

pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.163: p.1256-76, 2001.

PEREGO, P.; FABIANO, B.; CAVICCHIOLI, M.; DEL BORGHI, M. Cocoa quality and processing: a study by solid-phase micro extraction and gas chromatography analysis of methylpyrazines. **Food and Bioproducts Processing**, 84(C4): p.291–297, 2004.

PICKENHAGEN, Wl. Identification of the Bitter Principle of Cocoa. *Helvetica Chimica Acta*, v. 58, n. 4, p. 1078–1086, 1975.

PONTILLON, J. **Do cacao ao tablete**. A Ciência na cozinha, São Paulo, v. 1, p. 62-71, 2009.

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

POSSIGNOLO, A. A. **Perfil protéico de sementes de acessos de cacauero no desenvolvimento do sabor de chocolate**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba – SP, p.116, 2010.

PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.10, p. 4290–4302, 2005.

PULIDO, R., BRAVO, L., SAURO-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: p.3396-3402, 2000.

RAMIREZ-SANCHEZ, I.; MAYA, L.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin-Ciocalteu method. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 8, p. 790-793, 2010.

RAMIRO-PUIG, E.; CASADESUS, G.; LEE, H.; ZHU, X.; MCSHEA, A.; PERRY, G.; Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. **European Journal of Nutrition**, v.48: p.54–61, 2009.

RAMLI, N.; HASSAN, O.; SAID, M.; SAMSUDIN, W.; IDRIS, N. A. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted malaysian cocoa beans. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, p. 280–298, 2006.

REIN, D.; PAGLIERONI, T. G.; PEARSON, D. A.; WUN, T.; SCHMITZ, H. H.; GOSSELIN, R.; KEEN, C. L. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. **Journal Nutrition**, v. 130, p.2120S-6S, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27: p.771-780, 2004.

RIMBACH, G., MELCHIN, M., MOEHRING, J., WAGNER, A. Polyphenols from cocoa and vascular health—A critical review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.4290–4309, 2009.

RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, n.3, p. 357-369, 2007.

- ROCHA, G. L. **Características do cacau**. [S.I.], 2008. Disponível em: <<http://www.jornallivre.com.br/83465/caracteristicas-do-cacau.html>> Acesso em 16 de out., 2016.
- ROCHA, I. S. **Influência do tempo e temperatura de torração de amêndoas de cacau nas características sensoriais de chocolates**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia. 2015.
- ROCHA, I.S.; SANTANA, L.R.R.; SOARES, S.E.; BISPO, E.S. Effect of the roasting temperature and time of cocoa beans on the sensory characteristics and acceptability of chocolate. **Food Science and Technology**. Campinas, 2016.
- RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2ª ed. Campinas: Editora Cárita. 2009. 358p.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- ROZIN, P.; LEVINE, E.; STOESS, C. Chocolate craving and liking. **Appetite**, London, n.17, p. 177–185, 1991.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **EMBRAPA**, 2006.
- SAKAKIBARA, H., HONDA, Y., NAKAGAWA, S., ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetable, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.571–581, 2003.
- SANCHEZ-RABANEDA, O.; JAUREGUI, I.; CASALS, C. ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Mass Spectrometry**, New York, v. 38, n. 1, p. 35-42,2003.
- SANTOS, A. **Estudo químico e nutricional de amendoas de cacau (*Theobromacacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandifloruk Schum*) Em função do processamento**. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- SANTOS, E. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**. v.30, p.604-610, 2007.
- SANTOS, M. M. N. **Aproveitamento tecnológico de resíduos da cadeia do cacau para geração de energia**. Programa de Pós-graduação em Energia do Centro Universitário Norte do Espírito Santo. Dissertação Mestre em Energia, área de concentração em Engenharia, Tecnologia e Gestão. São Mateus, 2016.
- SARMENTO, L. A. V. **Obtenção e separação de polifenóis de sementes de cacau por extração supercrítica associada a membranas**. 103p. Tese (Doutorado de Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- SCHROETER, H.; HEISS, C.; BALZER, J.; KLEINBOGARD, P., KEEN, C. L.; HOLLENBERG, N. K. (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavonol rich cocoa on vascular functions in humans. **PNAS**, v. 103: p.1024–9, 2006.
- SENER, S. D.; ROBERTSON, J. A.; MEREDITH, F. I. Phenolic compounds of the mesocarp of crethaven peaches during storage and ripening. **Journal Food Science**, v.54 (5): p. 1259-62, 1989.

SERAFINI, M.; BUGIANESI, R.; MAIANI, G.; VALTUENA, S.; DE SANTIS, S.; CROZIER, A. Plasma antioxidants from chocolate. **Nature**, 2003.

SILVA, J. H.; RODRIGUES, M. T.; CAMPOS, J. Desempenho de cabras leiteira recebendo dietas com diferentes relações volumoso: concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.6, p.1412-1418, 1999.

SILVA NETO, P. J. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belem: CEPLAC, 2001.

SILVA, A. M. **Paridade de preços do cacau na região sul da Bahia, 1975 a 2000**. Ilhéus, BA: Universidade Estadual de Santa Cruz, p.62, 2000.

SILVA, R. J. M.; ROSEC, J. P.; BOURZEIX, M.; HEREDIA, N. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.53 (1): p.85-92, 1990.

SILVA, R.; CARNEIRO, M.; SILVA, M.; SILVA, M.; MOURA, H. **O Processo de Conversão para Produção Orgânica da Cultura do Cacau (*Theobroma cacao* L.)** na Cooperativa de Produtos Orgânicos do Xingu (COPOXIN) no Município de Brasil Novo/PA. VI CBA e II CLAA, 2009.

SILVA, L. T. **Eficácia da atividade antioxidante e caracterização de embalagens ativas biodegradáveis formuladas com amido de mandioca e derivados de cacau e café**. Repositório UFBA, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965.

SODRÉ, G. A. A espécie *Theobroma cacao*: novas perspectivas para a multiplicação de cacauero. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.29, n.2, 2007.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 103, n. 2, p. 215-223, 2003.

STEINBERG, F. M.; HOLT, R. R.; SCHMITZ, H. H.; KEEN, C. L. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13: p.645-52, 2002.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, p.71-81, 2002.

SOUSA, ET AL., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**. v.30, p.351-355. 2007.

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(1), p.50-56, 2014.

TARNAWSKI, M.; DEPTA, K.; GREJCIUN, D.; SZELEPIN, B. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulator. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical, Anal**, v.41 (1): p.182-8, 2006.

TAVARES, C.; SAKATA, R. K. Cafeína para o tratamento de dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 62, n. 3, 2012.

- TODOROVIC, I. R., et al. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. **Journal of Food Composition and Analysis**.v. 41, p. 137–143. 2015.
- URBANSKI, J. J. Chocolate sabor/origins and descriptions. The effects of process and bean source. **Manufacturing Confectioner**, Chicago, n.72, p.69-82, 1992.
- VERÍSSIMO, A. J. M. **Efeito da origem do cacau na sua qualidade comercial, funcional e sensorial. O caso do Cacau Catongo de São Tomé e Príncipe e do Brasil**. Lisboa. Dissertação de Mestrado– Processamento de Alimentos, 2012.
- VICENTIM, A.; MARCELLINO, M. C. L. Efeito do pó de cacau (*TheobromaCacao*) e seus princípios ativos na pressão arterial de portadores do Diabetes Mellitus Tipo II. **Salusvita**, Bauru, v. 31, n. 1, p. 29-40, 2012.
- VINSON, J. A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D. 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, p.8071–6, 2006.
- VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.5315–5321, 2001.
- VISIOLI, F. F. et al. Chocolate, Lifestyle, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 49, p. 299-312, 2009.
- VITAL, A. **Validação de um método para determinação de ácido benzoico e sórbico em concentrados de fruta por HPLC**. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja, Beja. p.39, 2002.
- VOIGT, J.; BIEHL, B. Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* L. seeds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, p. 299-307, 1995.
- WATERHOUSE A.L., et al. Antioxidants in chocolate. **Lancet**. p.348:834. 1996.
- WAKAO, H. **Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (Theobroma cacao L.) de producción nacional, durante el proceso de beneficio**. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador, 2002. 91 f. Tesis (Especialización en Química Analítica), 2002.
- WEISBURGER, J. H.; WILLIAMS, G. M. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicology Science**, v.49, p. 231-246, 2000.
- WESTON, A. **High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices**. PR Brown, 1997.
- WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243S–255S, 2005.
- 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, p. 423-447, 2000.
- YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science e Technology**, p. 64-71, 2006.

ZHU Q.Y., Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood) v.227: p.321–329, 2002.

ZUMBÉ, A. Polyphenols in cocoa: are there health benefits? **BNF Nutrition Bulletin**, London, v. 23, n. 1, p. 94-102, 1998.

ŻYŻELEWICZ, D.; KRYSIAK, W.; ORACZ, J.; SOSNOWSKA, D. BUDRYN, G.; NEBESNY, E. The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. **Food Research International**. p.918–929, 2016.