



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TÁSSIA CAVALCANTE PIRES

**COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE CACAU, NIBS E
CHOCOLATES CULTIVADOS NA REGIÃO SUL DA BAHIA**

SALVADOR

2017

TÁSSIA CAVALCANTE PIRES

**COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE CACAU, NIBS E
CHOCOLATES CULTIVADOS NA REGIÃO SUL DA BAHIA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eliete da Silva Bispo

Co-orientador: Dr. Leonardo Fonseca Maciel

SALVADOR

2017

PIRES, TÁSSIA CAVALCANTE PIRES
COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE CACAU, NIBS
E CHOCOLATES CULTIVADOS NA REGIÃO SUL DA BAHIA / TÁSSIA
CAVALCANTE PIRES PIRES. -- SALVADOR, 2017.
110 f.

Orientadora: ELIETE DA SILVA BISPO BISPO.
Coorientador: LEONARDO FONSECA MACIEL MACIEL.
Dissertação (Mestrado - MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS) --
Universidade Federal da Bahia, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA,
2017.

1. CHOCOLATE. 2. CACAU. 3. NIBS. 4. COMPOSTOS BIOATIVOS. 5.
ANTIOXIDANTES. I. BISPO, ELIETE DA SILVA BISPO. II. MACIEL,
LEONARDO FONSECA MACIEL. III. Título.



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

TERMO DE APROVAÇÃO

TÁSSIA CAVALCANTE PIRES

COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE
CACAU, NIBS E CHOCOLATES CULTIVADOS NA REGIÃO SUL DA
BAHIA

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 agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Eliete da Silva Bispo
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Sérgio Eduardo Soares
Universidade Federal da Bahia

Dr^a. Silmara Almeida de Carvalho
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

***À vitória dessa conquista dedico a
vocês, Cristina e Osvaldo, força motriz
da minha vida.***

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia, aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade e conhecimentos compartilhados.

À minha família, principalmente aos meus pais Cristina e Osvaldo (*in memoriam*) e meu irmão Alan, pelo incansável e verdadeiro amor, impulsionamento para o progresso, torcida e apoio, sem vocês nada seria possível. Vocês são a força motriz da minha vida.

Aos meus primos Juliana Rocha, Mariana Rocha, Caio Cavalcante e Lucas Rocha que estão para além dos laços consanguíneos, que são irmandade, porto seguro, calma em meio à tempestade, conforto e motivação. Gratidão por compartilhar os meus dias com vocês.

À professora Dr. Eliete Bispo pela confiança, compreensão, orientação, incentivo, carinho e encorajamento. Obrigada por ser um exemplo de mulher guerreira, se tornando um espelho de ser humano que eu planejo alcançar.

Ao meu co-orientador Dr. Leonardo Fonseca Maciel pela amizade, ensinamentos, colaborações e, sobretudo por me ensinar a encarar a vida com leveza e maestria nos momentos de dificuldade, o levarei para sempre comigo.

Às Fazendas Lajedo do Ouro e Riachuelo pela confiança e pelo fornecimento de amostras para a condução deste estudo. Em nome de Sra. Marilete e Sr. Raimundo Mororó, Sr. Pedro e Sra. Maria Ângela pelo aprendizado, zelo e atenção.

Aos anjos que a vida me deu que chamo de amigos que estiveram comigo nessa caminhada me apoiando no momento em que mais precisei, especialmente a Thamires Melo, Solimar Brito, Bruna Cabral, Thaís Amorim, Indira Caló e Thaíse Amorim pelo companheirismo, cuidado e parceria. Obrigada por serem tão especiais.

Ao grupo NEAPCCHOC pela ajuda nas análises e compartilhamento da rotina diária.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao laboratório LAPAAC, Tecnologia de Alimentos, Instrumental, Multiuso e os seus colaboradores pelo suporte, acolhimento do projeto de pesquisa e pelo auxílio nas análises, em especial a Mariana Barros.

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a execução desse projeto.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

RESUMO

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de cacau, e as regiões Norte e Nordeste são responsáveis por mais de 98% da produção de amêndoas no país. Após período de dificuldade devido à crise da Vassoura de Bruxa provocada pelo fungo *Moniliophthora Perniciosa*, os produtores juntamente com os centros de estudos de cacau começaram a investir na elaboração de matéria-prima com maior resistência e qualidade tecnológica para se diferenciar e buscar novos nichos de mercado. Um das alternativas foi o investimento em lavouras monoclonais de cacau, de tal forma que se torna necessário a quantificação de parâmetros que diferencie essas variedades que irão gerar produtos exclusivos. A amêndoa de cacau possui uma constituição complexa e que varia de acordo com fatores externos como clima, temperatura, índice pluviométrico, e fatores internos como composição físico-química e variedades. Há um interesse crescente no cacau e nos produtos feitos a partir desse pelo elevado teor de compostos com atividade biológica. Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo quantificar compostos bioativos, capacidade antioxidante de cacau, nibs e chocolate de cinco variedades (SR162, PH16, BN34, CEPEC2002 e TSH1188) e assim contribuir com a produção e comercialização de chocolates monovarietais conquistando o mercado de alimentos funcionais. Foi quantificado teor de compostos fenólicos totais, flavonóides, antocianinas, atividade antioxidantes DPPH, FRAP e CUPRAC por método espectrofotométrico, metilxantinas (cafeína, teobromina), fenóis monoméricos (ácido gálico, catequina e epicatequina) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) das variedades de cacau, nibs e chocolate. Foi aplicada análise estatística ANOVA, teste de Tukey ($p < 0,05$) e técnicas quimiométricas (análise de componentes principais e análise hierárquica) para tratamento dos resultados objetivando discriminar as variedades a partir dos parâmetros analisados. Os resultados demonstraram que há diferenças significativas entre as variedades sendo a variedade SR162 de cacau, nibs e chocolate a que apresentou menores valores para compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, ácido gálico, cafeína, flavonóides e antocianinas e maior valor de DPPH por precisar de uma maior quantidade de amostra para sequestro de radical. A variedade TSH1188, em todas as matrizes, apresentou os valores mais altos de compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, ácido gálico, cafeína,

flavonóides e atividade antioxidante FRAP. O teor de teobromina foi maior na variedade BN34 e menor na CEPEC de todas as amostras analisadas. A análise de PCA mostrou que as variedades têm características relacionadas com a sua composição em compostos bioativos, classificando quatro grupos bem definidos, pois as variedades BN34 e PH16 tiveram características semelhantes. Conclui-se que os chocolates monovarietais dessas variedades possuem características em termo de compostos bioativos diferentes, contribuindo assim na produção de chocolates funcionais, podendo conquistar novos nichos de mercado.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L., compostos fenólicos, atividade antioxidante e chocolate.

ABSTRACT

Brazil is the seventh largest producer of cocoa in the world, and the North and Northeast regions account for more than 98% of almond production in the country. After a period of difficulty due to the witch broom crisis caused by the fungus *Moniliophthora Perniciosa*, the producers together with the cocoa research centers began to invest in the elaboration of raw material with greater resistance and technological quality to differentiate and seek new niches of Marketplace. One of the alternatives was the investment in monoclonal cocoa crops, in such a way that it becomes necessary to quantify parameters that differentiate these varieties that will generate exclusive products. Cocoa almond has a complex constitution and varies according to external factors such as climate, temperature, rainfall index, and internal factors such as physicochemical composition and varieties. There is a growing interest in cocoa and cocoa products because of the high content of compounds with biological activity. The objective of this work was to quantify bioactive compounds, antioxidant capacity of cocoa, nibs and chocolate of five varieties (SR162, PH16, BN34, CEPEC2002 and TSH1188) and thus contribute to the production and commercialization of monovarietal chocolates conquering the market of functional foods. It was quantified the total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, antioxidant activity DPPH, FRAP and CUPRAC by spectrophotometric method, methylxanthines (caffeine, theobromine), monomeric phenols (gallic acid, catechin and epicatechin) by high performance liquid chromatography (HPLC) varieties of cocoa, nibs and chocolate. Statistical analysis ANOVA, Tukey's test ($p < 0.05$) and chemometric techniques (main component analysis and hierarchical analysis) were applied to the results, aiming to discriminate the varieties from the analyzed parameters. The results showed that there were significant differences among the varieties, with the SR162 variety of cocoa, nibs and chocolate being the one with the lowest values for total phenolic compounds, catechin, epicatechin, gallic acid, caffeine, flavonoids and anthocyanins, and higher DPPH values. a larger amount of sample for radical sequestration. The TSH1188 variety, in all matrices, showed the highest values of total phenolic compounds, catechin, epicatechin, gallic acid, caffeine, flavonoids and FRAP antioxidant activity. Theobromine content was higher in the BN34 variety and lower in the CEPEC of all samples analyzed. The PCA analysis showed that the varieties have characteristics related to their composition in bioactive compounds, classifying four well defined groups, because the varieties

BN34 and PH16 had similar characteristics. It is concluded that the single-varietal chocolates of these varieties have in term characteristics of different bioactive compounds, thus contributing to the production of functional chocolates, which can conquer new market niches.

Keywords: *Theobroma cacao L.*, Phenolic compounds, antioxidant activity and chocolate.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 01- Principais polifenóis encontrados no cacau	25
Figura 02 - Estrutura de moléculas de flavonóides.....	26
Figura 03- Estrutura química das metilxantinas	27
Figura 04 - Grupos de cacau	32
Figura 05– Produção de cacau na Bahia	35
Figura 06 – Colheita e quebra dos frutos do cacau	37
Figura 07- Fermentação das sementes de cacau.....	38
Figura 08– (a) Alterações durante a fermentação de amêndoas de cacau. (b) Mudanças químicas e bioquímicas dentro da semente do cacau durante a fermentação	40
Figura 09- Ilustração do processo de secagem natural do cacau	43
Figura 10- Fluxograma do processamento de chocolate	45
Figura 11- Quarteamento para amostragem das sementes de cacau	46
Figura 12– Prova de corte das sementes de cacau.....	46
Figura 13 - Torrador de sementes de cacau	48
Figura 14- Descascadeira de sementes de cacau	48
Figura 15 - Moagem e refino da massa de cacau.....	49
Figura 16 – Máquina de conchagem para produção de chocolate	50
Figura 17 – Máquina de temperagem de chocolate.....	51
Figura 18 – Túnel de resfriamento de chocolate	52
Figura 19 - Esquema do processo global da análise multivariada	54

CAPITULO II

Figura 01 - Resultado do teste de cortes das cinco variedades de cacau (CEPEC2002, PH16, BN34, CATONGO E TSH1188).	79
Figura 02 – Perfil cromatográfico catequina, epicatequina, cafeína, teobromina e ácido gálico(A – amostra da variedade de cacau TSH1188; B- solução com padrões).	87
Figura 03 - Dispersões dos escores PC1 e PC2 de Análise de cinco variedades de chocolate.....	88
Figura 04 - Dendograma (HCA) representativo da dissimilaridade entre chocolates produzidos de diferentes variedades <i>T. cacao L.</i>	89

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 01 - Composição semente de cacau Forastero	31
Tabela 02 - Produtores de cacau mundial	35
Tabela 03 - Tolerância de defeitos, expressa em % e respectivo enquadramento do produto	47

CAPITULO II

Tabela 01 - Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante nas cinco variedades de cacau, nibs e chocolate.....	80
Tabela 02 - Quantidade de fenóis monoméricos e metilxantinas nas cinco variedades de cacau, nibs e chocolate.....	84
Tabela 03 - Concentração de trabalho, equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção, limite de quantificação e teste de recuperação do método para Ác. Gálico, Cafeína, Teobromina, Catequina e Epicatequina.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sulfato de Amônia

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

A. O. A. C. - *Association of Official Analytical Chemistry*

AG – Ácido Gálico

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C – Catequina

CAT- Catalase

CATIE- Estação de Pesquisas de Cacau da Costa Rica

CEPEC- Centro de Pesquisa do Cacau

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

CUPRAC – Capacidade antioxidante de redução do cobre

DPPH – 1,1- difenil-2-picrilhidrazil

EC – Epicatequina

ERO – Espécies reativas de oxigênio

et al – E colaboradores/ outros

FRAP- Potencial antioxidante de redução do ferro

GPx - Glutathione Peroxidase

GSH- Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathione Oxidada

g – Grama

HCA – Hierarquic cluster analysis

HCl – Ácido Clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICCO - International Cocoa Organization (Organização Internacional do Cacau)

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

LDA - Análise discriminante linear

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

M – Molar

mg – Miligrama

mL – Miligrama

mm – Milímetro

mMol – Micromol

Mx- Metilxantinas

NaOH - Hidróxido de sódio

°C – Grau Celsius

PCA – Principal Components Analysis

pH - Potencial hidrogeniônico

SOD - Enzimas superóxido dismutase

TAH/HAT - Transferência do átomo de hidrogênio

TC - Conteúdo de taninos

TFC - Conteúdo de flavonoides totais

Ton - Toneladas

TPC - Compostos fenólicos totais

TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina

TROLOX - 6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-carboxílico

TSE- Transferência simples de elétrons

UFBA - Universidade Federal da Bahia

xg - Força equivalente à da gravidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPITULO I.....	20
1. BIOATIVOS	20
1.1. Radicais livres e Atividade antioxidante.....	20
1.2. Bioativos no cacau	23
1.2.1. Flavonóides	26
1.2.2. Metilxantinas.....	27
1.3. Mecanismos de atividade antioxidante e quantificação de bioativos	28
2. CACAU E CHOCOLATE	30
2.1. O mercado do cacau e chocolate	35
2.2. Pré-processamento do cacau.....	36
2.2.1. Fermentação	38
2.2.2. Secagem	42
2.2.3. Armazenamento.....	43
2.3. Processamento do chocolate	44
2.3.1. Classificação das sementes	46
2.3.2. Torração.....	47
2.3.2. Mistura de Ingredientes	49
2.3.3. Refino	49
2.3.4. Conchagem	50
2.3.5. Temperagem	51
3. ANÁLISE MULTIVARIADA	53
CAPÍTULO II	66
1. INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1. Amostras.....	70
2.2. Prova de corte e Umidade	71
2.3. Pré-processamento do cacau.....	71

2.4.	Elaboração dos chocolates.....	72
2.5.	Extração de compostos fenólicos	72
2.6.	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	72
2.7.	Flavonóides totais.....	73
2.8.	Antocianinas.....	73
2.9.	Atividade antioxidante.....	74
2.9.1.	Método de DPPH.....	74
2.9.2.	FRAP	75
2.9.3.	CUPRAC.....	75
2.10.	Determinação de fenóis monoméricos e metilxantinas por HPLC	76
2.12.	Análise Estatística	78
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.	CONCLUSÃO	90
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	98

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o sétimo maior produtor de cacau, atrás da Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Equador, Camarões e Nigéria (ICCO, 2017). O mercado do cacau apresenta um crescimento concomitante ao aumento da procura da população por produtos feitos a partir dele, como chocolates. Os chocolates são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como produtos feitos a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao L.*), massa (ou pasta ou *liquor*) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau. Os chocolates com apelo saudável seguem a tendência em alimentos funcionais, ou seja, com benefícios à saúde além da nutrição essencial. Com isso, verifica-se uma elevada demanda de consumo de chocolates com alto teor de cacau (KLINKE, 2005). Isso se deve há presença de compostos bioativos presentes no cacau que exercem atividade biológica positiva no organismo como atividade antioxidante e substâncias, como metilxantinas, que são alcalóides com efeito estimulante no cérebro. Esses bioativos possuem a capacidade de neutralizar a ação dos radicais livres e espécies não radicais ou participar dos sistemas enzimáticos com tal capacidade.

Os polifenóis do cacau representam, em média, 12-18% do total peso em base seca sendo os principais os flavonóides, catequina e epicatequina (MENG *et al.*, 2009). Os representantes das metilxantinas são a teobromina, estimulante do sistema nervoso central, e a cafeína que tem ação diurética e contribui para o controle da pressão arterial (WEISBURGER; CHUNG, 2002).

O programa de melhoramento genético do cacauzeiro está sendo implantado desde a infestação da Vassoura de Bruxa, e da forma como vem sendo conduzido no Brasil, certamente resultará no aumento da produtividade de amêndoas de cacau a médio e longo prazo. Além disso, é possível a partir desses clones a produção de chocolate varietal que é produzido com amêndoas de cacau provenientes de regiões geográficas e populações varietais determinadas, sendo que fatores genéticos além de climáticos como solo, quantidade e período de chuvas, temperatura, umidade, levam à perfis específicos exclusivos (LUNA *et al.*, 2002). Já existe aumento da demanda por amêndoas especiais: cacau fino que é definido por um mercado restrito e altamente exigente. O cacau fino é assim conhecido por suas peculiaridades aromáticas (frutado, floral, picante, notas de nozes e caramelo) e de

maciez. Esse tipo de matéria-prima dá origem aos chocolates finos, também conhecidos como chocolate gourmet.

No entanto, cabe ressaltar a importância da avaliação das características químicas, físicas, físico-químicas e sensoriais, bem como o desempenho tecnológico de produtos finais elaborados a partir dos clones desenvolvidos. Os aspectos bioquímicos e químicos da semente do cacau são pesquisados, pois apesar do fruto naturalmente não apresentar tais características de aroma e sabor, eles determinam, durante as etapas de pós-colheita (fermentação e secagem) e processamento (torração e conchagem), o *flavour* do chocolate, atributo que o torna único e inigualável. O sabor do chocolate é composto por muitos compostos cuja formação depende também da genética e ambiente onde o cacau é cultivado (BRUNETTO *et al.*, 2007). Um dos compostos que dependem da genética é o teor de polifenóis (NOORSOFFALINA *et al.*, 2009), que são responsáveis pela adstringência contribuindo para a amargura (MISNAWI *et al.*, 2004) e que por outro lado são responsáveis pela alta atividade antioxidante.

Neste contexto, estudos das características químicas das variedades de cacau e chocolates produzidos a partir delas, se faz necessário para melhor valorização do mercado de chocolates especiais, finos e/ou gourmet potencializando as suas diferenciações e qualidades.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo geral a quantificação de compostos bioativos e determinação da atividade antioxidante de cacau, nibs e chocolates de cinco variedades de clones de cacau, visando assim, contribuir para melhoria da qualidade dos chocolates produzidos na região Sul da Bahia, buscando a agregação de valor do produto final e a conquista de novos nichos de mercados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as variedades a serem estudadas na região Sul da Bahia;
- Classificar as amêndoas de cacau;
- Quantificar os compostos fenólicos totais das amêndoas, do nibs e chocolates de cada variedade estudada;
- Quantificar flavonóides e antocianinas das amêndoas, do nibs e chocolates de cada variedade estudada;
- Quantificar os fenóis monoméricos das amêndoas, do nibs e chocolates de cada variedade estudada;
- Determinar a atividade antioxidante pelo método DPPH, FRAP, CUPRAC das amêndoas, do nibs e chocolates de cada variedade estudada;
- Correlacionar o teor de fenólicos e atividade antioxidante entre as variedades;
- Correlacionar à presença de compostos fenólicos, atividade antioxidante entre o cacau, nibs e chocolates de uma mesma variedade.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

CAPITULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. BIOATIVOS

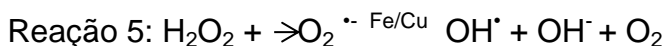
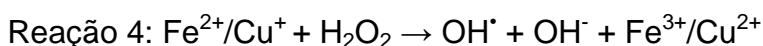
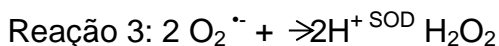
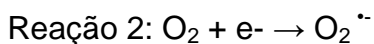
1.1. Radicais livres e Atividade antioxidante

São considerados radicais livres átomos ou moléculas que contém elétrons não pareados, capazes de existirem independentemente e que têm sua reatividade química aumentada em relação às espécies pareadas (DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 2008). Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O₂) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (KOURY; DONANGELO, 2003). Na mitocôndria, o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo c removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O₂ para formar água. A ação da citocromo oxidase (reação 1*) controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (KOURY; DONANGELO, 2003; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Os radicais livres apresentam alta reatividade molecular principalmente com lipídios e proteínas das membranas celulares e também com o DNA (ácido desoxirribonucléico). São responsáveis por favorecer o aparecimento de diversas injúrias, entre elas o câncer, diabetes e aterosclerose (PEREIRA; PEREIRA, 2012).

*Reação 1 – redução tetravalente do oxigênio $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O +$ energia

A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido-O₂ •- (reação 2). O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H₂O₂), através do processo chamado dismutação (PAL YU,1994). Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas

nas células de mamíferos e que acelera a reação a 104 vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (reação 3). Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (JENKINS, 1988). O radical hidroxil pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre (reação 4). A reação é conhecida como Reação de Fenton. Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil (reação 5), a chamada Reação de Haber-Weiss. Os radicais superóxido e hidroxil têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre; no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies reativas de interesse são os oxigênios singletes, que são formas de oxigênio spin-alteradas. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas (FISCHER, 1987), e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem. Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (reação 6). Cada ERO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida (DEL MAESTRO, 1980).

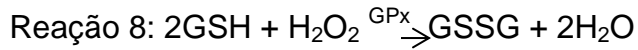
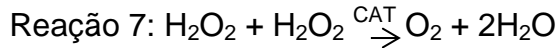


O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não radicais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas

de reparo). Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não radicais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade.

Como as ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo, em um dado tecido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a sua catálise até água. A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 e formando água como demonstrado na reação 8 (FERRARI *et al.*, 1985). Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (PAL YU, 1994). O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx) é importante para a manutenção da integridade celular. Já o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros, ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides). Em estudos reportados na literatura utilizando corações isolados de ratos, em um modelo de perfusão coronariana (Langendorff), demonstrara-se que tanto a vitamina A quanto o Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) agiram reduzindo os níveis de lipoperoxidação e os efeitos inotrópico, cronotrópico e lusitrópico negativos induzidos por H_2O_2 . Isto se deve à capacidade quencher de

oxigênio singlete de ambas as vitaminas. Um quencher é uma molécula que capta a energia de excitação do oxigênio singlete para si, levando-o ao estado fundamental e tornando-se excitada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



1.2. Bioativos no cacau

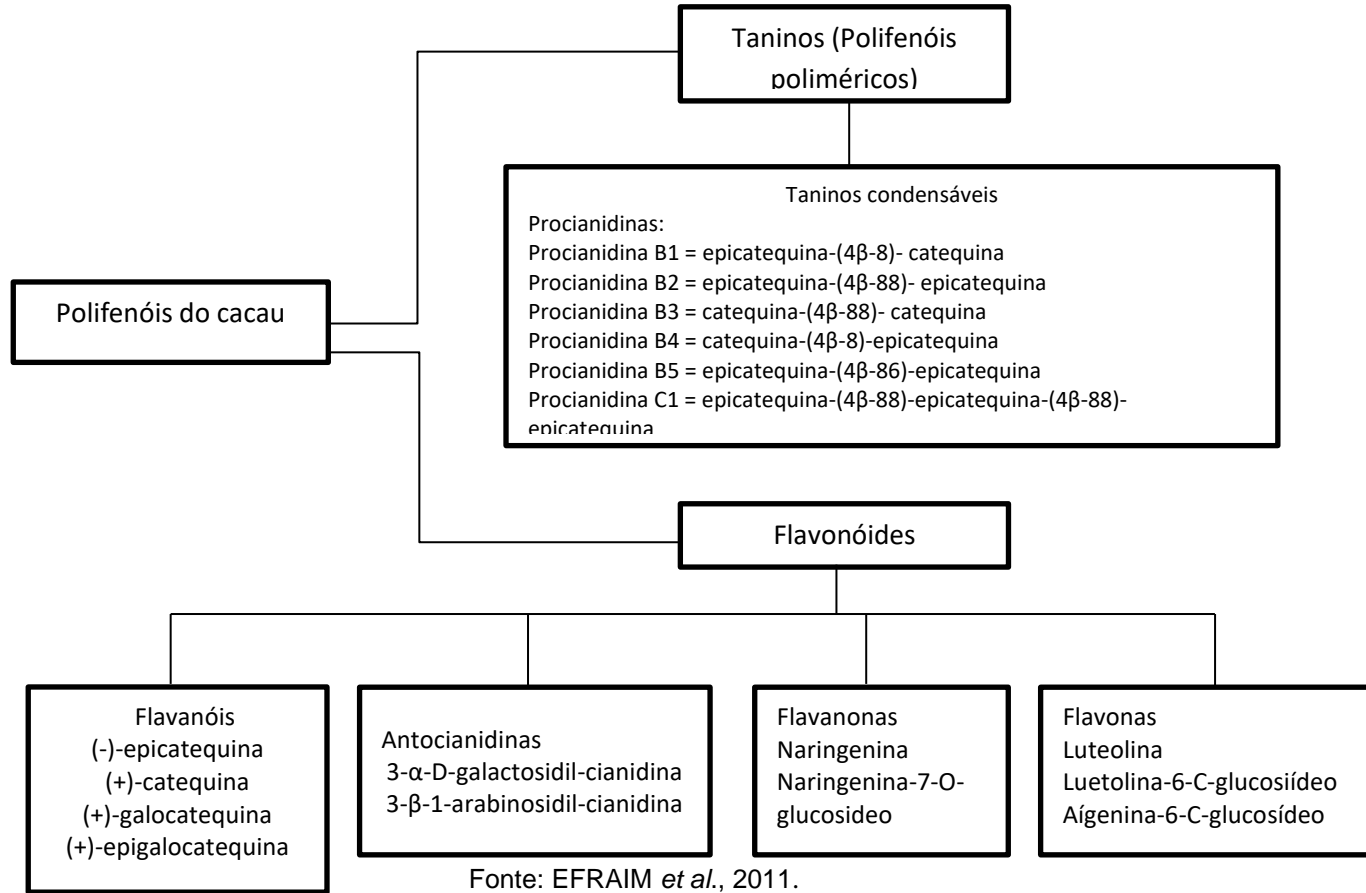
Os compostos bioativos são substâncias com atividade biológica encontradas em alimentos. Alguns deles são nutrientes já reconhecidos como tal e outros parecem não ter função como nutriente, mas são extremamente importantes para a manutenção da saúde humana. Dentre os compostos bioativos mais estudados estão os compostos fenólicos e as metilxantinas (MACIEL, 2017).

Os fenólicos são um grupo de compostos que abrangem grande variedade de estruturas, sendo que sempre apresentam ao menos um anel aromático contendo grupamentos hidroxilas. Estes compostos são originados do metabolismo secundário de vegetais sendo encontrados na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (ARAÚJO, 2011). Na maioria dos vegetais são encontrados uma gama de compostos fenólicos. São substâncias de estruturas químicas heterogêneas e estão representados desde estruturas químicas simples até outras complexas, como os taninos. O efeito biológico dos ácidos fenólicos é devido ao local da ligação, a posição dos grupamentos hidroxil, e o tipo de substituintes no anel aromático (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). A presença de diferentes substituintes na estrutura do fenol modula a sua propriedade antioxidante, em particular a sua capacidade de doar hidrogênio. Em geral, fenóis sem substituição são inativos como doadores de hidrogênio, e monofenóis são menos inativos que polifenóis. A introdução de grupos eletrodoadores tal como grupo hidroxila na posição *orto* ou *para* aumenta a atividade antioxidante do ácido fenólico, assim como a presença de um grupo carboxila e quando este é separado do anel aromático também aumenta. Portanto, ácidos cinâmicos são mais efetivos como antioxidantes que os ácidos benzóicos (GULÇIN, 2012).

Há várias décadas sabe-se que as sementes do cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), apresentam elevado teor de polifenóis, entre 12 e 20% de seu peso seco e desengordurado, considerado bastante elevado em comparação a outros vegetais

(SANCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003; BRITO, 2000; SANBONGI *et al.*, 1998; KIM e KEENEY, 1984). Segundo BRITO (2000), 60% desses compostos são procianidinas, na forma de flavan-3-ols condensados, contendo entre 2 e 18 moléculas de (+)-catequina ou (-)-epicatequina. Segundo LANGE e FINCKE (1970) citados por WOLLGAST e ANKLAM (2000), cotilédones de sementes despigmentadas do cacauero (cotilédones brancos ou violáceo-claros) apresentam teor 33% mais baixo de compostos fenólicos em relação às sementes pigmentadas (coloração violácea intensa).

Figura 01- Principais polifenóis encontrados no cacau



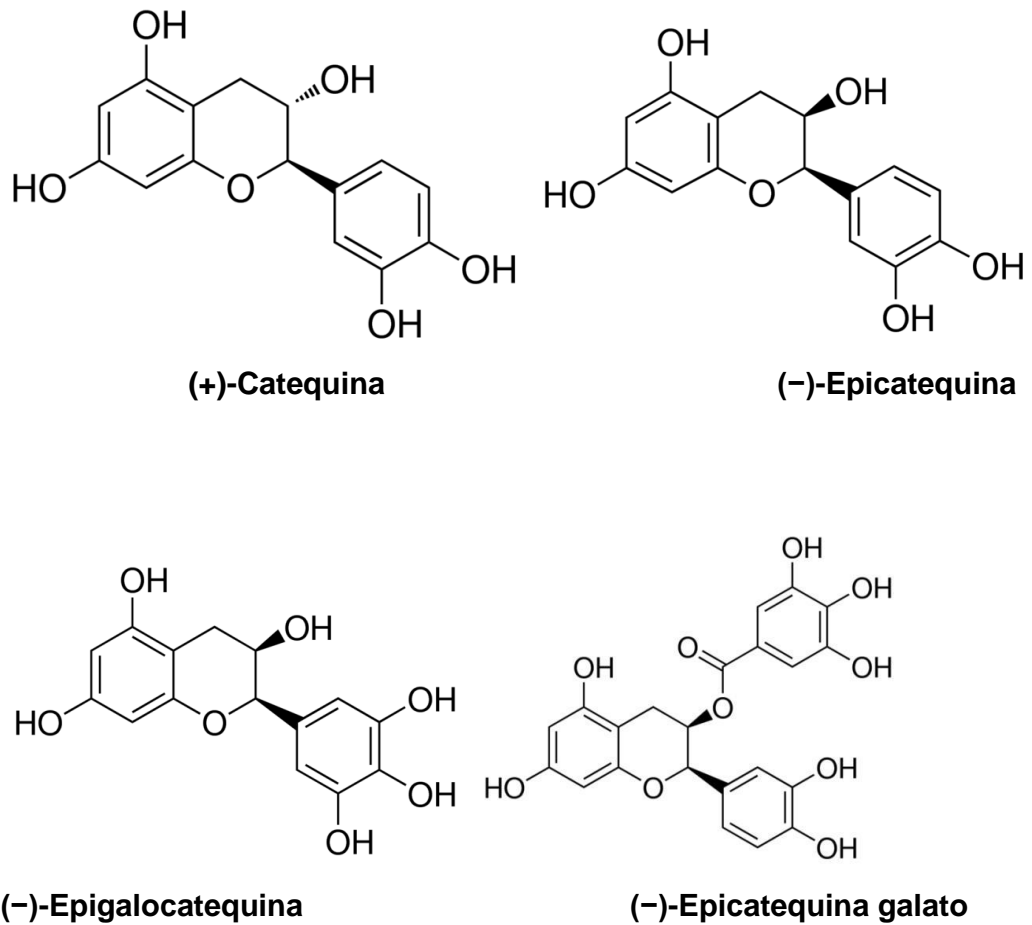
Fonte: EFRAIM *et al.*, 2011.

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas (KING, YOUNG, 1999). Os métodos realizados em análises de compostos fenólicos podem ser classificados em determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos (MOURE *et al.*, 2001). O método mais utilizado para quantificação de fenólicos totais em cacau é Folin-Ciocalteu. Esse método consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (MOYER *et al.*, 2002). Esse método não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, incluindo aquelas proteínas extraíveis. Outra desvantagem é a interferência de reduzir substâncias como ácido ascórbico (NACZK, 2004).

1.2.1. Flavonóides

Os flavonoides são compostos de baixa massa molecular, consistindo de quinze átomos de carbono, arrumados na configuração C6-C3-C6. Essencialmente a estrutura consiste de dois anéis aromáticos, A e B, ligados por uma ligação 3-carbono, usualmente na forma de um anel heterocíclico (Figura 4). Um anel aromático é derivado da via acetato/malonato, enquanto que o outro é derivado da fenilalanina por meio da via chiquimato (IGNAT *et al.*, 2011). Entretanto, variações estruturais dentro dos anéis subdividem os flavonoides em diferentes classes (antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonóis e flavanóis), com as principais encontradas/estudadas em cacau são catequinas (flavan-3-ols ou subclasse flavonol) e procianidinas (catequinas oligoméricas e poliméricas). As catequinas monoméricas predominantemente no cacau são (+)-catequina e (-)-epicatequina (OSMAN *et al.*, 2004).

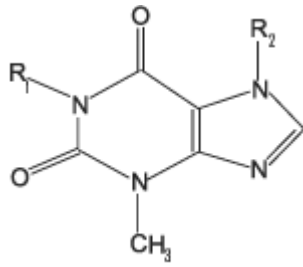
Figura 02 - Estrutura de moléculas de flavonóides



1.2.2. Metilxantinas

Além dos compostos fenólicos, o cacau apresenta metilxantinas em sua composição (MARIA; MOREIRA, 2007). Essas substâncias são responsáveis por alterações no organismo humano, agindo sobre os sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo. Os efeitos são qualitativamente semelhantes, mas quantitativamente diferentes, em função disso, são empregadas com diferentes finalidades terapêuticas (BRUNETON, 1991).

Figura 03- Estrutura química das metilxantinas



Cafeína ($R_1=R_2=CH_3$)
 Teofilina ($R_1=CH_3$, $R_2=H$)
 Teobromina ($R_1=H$, $R_2=CH_3$)

Fonte: MARIA; MOREIRA, 2007.

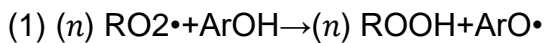
A teobromina e cafeína são as principais metilxantinas encontradas nas sementes de cacau, sendo a primeira mais predominante (BRUINSMA e TAREN, 1999). Os efeitos fisiológicos na saúde humana mais comuns da cafeína incluem estimulação do sistema nervoso central, dos músculos cardíacos, do sistema respiratório e da secreção de ácido gástrico. Também é considerada como um diurético fraco e relaxante muscular. A teobromina (3,7-dimetilxantina) tem ação diurética, estimulante, com menor efeito sobre o sistema nervoso central, ajuda no tratamento dietético da aterosclerose, e pode contribuir positivamente para o controle da pressão arterial a partir do aumento no consumo do cacau e do chocolate amargo (ALVES, BRAGAGNOLO, 2002; WEISBURGER, CHUNG, 2002). A teofilina aumenta o fluxo sanguíneo renal e a filtração glomerular, demonstrando a atividade diurética destas (SIMÕES *et al.*, 2004).

1.3. Mecanismos de atividade antioxidante e quantificação de bioativos

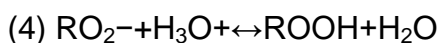
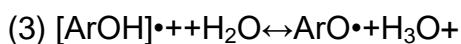
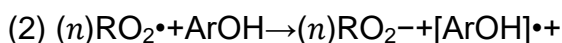
Pesquisas sobre antioxidantes aumentaram consideravelmente nos últimos anos, assim como o número de métodos propostos para medir a atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Entretanto, muitos antioxidantes naturais são multifuncionais e sua atividade em alimentos heterogêneos não pode ser avaliada por um único método (FRANKEL; MEYER, 2000). Os métodos espectrofotométricos tem sido adotados para medir os níveis dessas atividades *in vitro*. Entre estes, os mais comuns encontrados na literatura para a determinação da atividade antioxidante em cacau e chocolate destaca-se o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e FRAP (potencial antioxidante de redução do ferro).

Podem ser utilizadas abordagens diretas e indiretas para determinação da atividade antioxidante. Os métodos indiretos estudam a habilidade do antioxidante em

capturar radicais livres, o que não necessariamente corresponde a real degradação oxidativa, embora em alguns casos a doação de átomos de hidrogênio (ou elétrons) correlacione-se com a atividade antioxidante. Já os métodos diretos baseiam-se no estudo do efeito que um alimento contendo antioxidantes é capaz de induzir na degradação oxidativa de um sistema em análise (ROGINSKI; LISSI, 2005). A maioria dos métodos empregados apresenta o mesmo princípio, onde um radical colorido sintético é empregado e/ou um composto redox-ativo é gerado, e a habilidade da amostra biológica de eliminar o radical ou reduzir o composto redox-ativo é monitorado por espectrofotômetro UV-Vis-Fluorescência (FLOEGEL *et al.*, 2011). Os métodos podem ser divididos pelos diferentes mecanismos que são: transferência do átomo de hidrogênio (TAH), transferência simples de elétrons (TSE) e/ou a mistura entre TAH e TSE. O TAH funciona quando o extrato vegetal com propriedade antioxidante inibirá o radical livre através da doação dos átomos de hidrogênio e tornando mais estável o radical livre (Equação 1) (CRAFT *et al.*, 2012).



Outro possível mecanismo que pelo qual um composto antioxidante pode desativar um radical livre é pela transferência de elétrons, no qual o antioxidante transfere um simples elétron para o ERO. Então, o radical catiônico resultante é desprotonado pela interação com a água e o resultado final da reação é o mesmo de uma reação de transferência do átomo de hidrogênio em termos na eliminação de radicais, portanto se o $[ArOH]^{\bullet+}$ se mantiver estável pode agir em determinados extratos (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

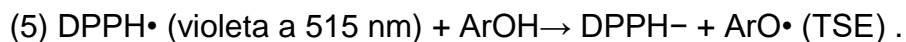


FRAP e CUPRAC são exemplos de métodos de transferência de elétrons, no qual se objetiva avaliar a capacidade da amostra na transferência de elétrons dos íons de ferro e cobre em um meio aquoso, respectivamente. O reativo de FRAP usa a reação do complexo ferro com tripiridil triazina (FeIII-TPTZ) com os antioxidantes (BENZIE; STRAIN, 1996), enquanto que o CUPRAC determina a habilidade da amostra reduzir o complexo cobre-neocuproina (Cull-Nc) (APAK *et al.*, 2007). O CUPRAC apresenta vantagem em relação ao FRAP por ser conduzida a pH 7,0, ou seja melhor simulada nas condições fisiológicas, onde a reação é completa para a maioria dos flavonoides. O método FRAP requer um meio ácido (pH 3,6), que é

distante do pH fisiológico e apresenta uma reação incompleta com polifenóis (APAK *et al.*, 2007; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Como a maioria das reações antioxidantes são caracterizadas seguindo os processos químicos de transferência do átomo de hidrogênio (TAH) ou transferência simples de elétrons (TSE), estes mecanismos de reação podem, e fazem ocorrer simultaneamente (CRAFT *et al.*, 2012). DPPH é um radical livre estável e colorido que pode apresentar esse mecanismo, no qual a solução reativa misturada com o extrato vegetal pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um simples elétron, e a forma reduzida do radical é gerada seguindo pela perda de cor (ALI *et al.*, 2008). O DPPH é um radical orgânico nitrogenado, livre e estável, comercialmente disponível. O método baseia-se na redução de soluções alcoólicas do radical DPPH• na presença de um antioxidante doador de elétron ou hidrogênio, formando um composto estável. A capacidade antioxidante é proporcional ao desaparecimento do radical DPPH• nas amostras analisadas. No decorrer da reação, a coloração violeta do meio passa a amarela, e a capacidade antioxidante é fácil de ser avaliada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância a 517nm (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micro mols de equivalente do padrão utilizado ou como IC50, o qual expressa à quantidade de antioxidante ou amostra necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A seguir é mostrado o esquema das reações com o DPPH para ambos os mecanismos:



2. CACAU E CHOCOLATE

O cacauero é uma planta originada na Bacia Amazônica e cultivada nas regiões tropicais do mundo, pertencente à família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L. (ALVES, 2002). O cacau foi introduzido na região Sul da Bahia em 1746, às margens do Rio Pardo na Fazenda Cubículo, hoje município de Canavieiras, por sementes vindas do Pará. A partir daí a cultura se expandiu nessa região, onde as condições climáticas e a riqueza dos recursos naturais contribuíram bastante para torná-la a principal produtora de cacau do país

(GRAMACHO *et al.*,1992; SANCHES, 2006). O interesse de cultivo desta espécie está no aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de cacau, chocolate e seus derivados (ALVES, 2002). O cacau é uma matéria-prima com grande valor nutricional e sua composição varia com a época da colheita, tamanho do fruto, grau de maturação, clima, tipo de solo e manipulação pós-colheita (ZOUMAS *et al.*, 1980).

Tabela 01- Composição semente de cacau Forastero

Constituintes	Peso Seco (%)
Cotilédones	89,60
Testa	9,63
Embrião	0,77
Lipídios	53,05
Umidade	3,65
Cinzas	2,63
Nitrogênio Total	2,28
Nitrogênio proteico	1,50
Teobromina	1,71
Cafeína	0,085
Glicose	0,30
Sacarose	1,58
Amido	6,10
Pectina	2,25
Fibras	2,09
Pentosanas	1,27
Polifenóis	7,54
Acético	0,014
Oxálico	0,29

Fonte: AFOAKWA, 2010.

O cacau é classificado sob três grandes grupos: *Criollo*, *Forastero* e *Trinitário* (Figura 06). O *Criollo*, originado do lado ocidental dos Andes e o grupo *Forastero* do lado oriental. O terceiro grupo, *Trinitário*, é oriundo de um cruzamento (hibridização) entre os dois primeiros, considerado como uma primeira tentativa de melhoramento genético (GRAMACHO *et al.*, 1992; SANCHES, 2006) e de alta qualidade (BATALHA, 2009). Os grupos *Trinitário* e *Criollo* produzem um chocolate considerado de qualidade excelente pelo suave aroma e sabor (BECKETT, 2009).O

grupo *Forastero* responde por 80% da produção mundial, sendo este predominante nas plantações da Bahia, Amazônia, e nos países produtores da África (FARINÃS *et al.*, 2002; MARITA *et al.*, 2001).

Figura 04 - Grupos de cacau



Fonte: Cacau fino de aroma.

O grupo *Criollo* é caracterizado por sementes brancas ou de coloração rósea clara e frutos com casca vermelha ou verde, quando imaturos; o grupo *Forastero* possui sementes intensamente pigmentadas e frutos verdes, quando novos (PIRES, 2003). A qualidade dos grãos de cacau depende de muitos fatores como a variedade do cacauzeiro, manejo agrônômico, fatores do solo, condições climáticas, e a tecnologia pós-colheita. Desta forma, a qualidade dos grãos de cacau, sabor e aroma, dependerão das habilidades e bons cuidados tomados pelos técnicos responsáveis. Por causa disso, é necessária a avaliação dos parâmetros físicos, químicos e sensoriais que permitem determinar a qualidade em relação à variedade e ao meio ambiente (BRUNETTO *et al.*, 2007).

A Vassoura-de-bruxa é uma doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, e representa uma das mais importantes doenças do cacauzeiro por sua grande capacidade destrutiva e pela grande velocidade com a qual se espalha (PEREIRA, 1996; PIRES, 2003). Por conta da crise de produção de cacau ocasionada pelo avanço da Vassoura de Bruxa, o plantio de clones resistentes foi implantado. Muitos desses clones consistiram em seleções locais, feitas em condições de fazenda pelos agricultores, extensionistas e pesquisadores de instituições governamentais dessa região (LEAL *et al.*, 2008). Clones de *Theobroma*

cacao L. estão sendo recomendados pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), unidade de geração de tecnologia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) aos cacauicultores baianos objetivando a formação de novas lavouras mais produtivas, resistentes e com maior uniformidade (CEPLAC, 2010). Outra alternativa para minimizar esses problemas, se faz com a utilização de clones auto compatíveis e manejados em blocos monoclonais. Nesse modelo as variedades de cacau são enxertadas em blocos separados, facilitando o manejo, eliminando o problema da compatibilidade sexual, diferenças de taxas de crescimento, vigor, porte, e reduzindo gastos (MANDARINO e GOMES, 2009).

De acordo com Guittard (2005), a pressão exercida pelas indústrias processadoras aos cacauicultores em busca da redução de preços aliada à própria competição dos produtores entre si os leva a buscar cacaueiros que apresentem maior produtividade e resistência às pragas e doenças. No Brasil, mais especificamente na região produtora de cacau da Bahia, a mais importante em nível nacional, a grande devastação dos cultivos pela Vassoura de Bruxa está promovendo mudanças entre os produtores de cacau, que buscam agregar maior valor às amêndoas por meio da produção de material orgânico, com fermentações e secagens especiais e utilização de genótipos de cacauero com sabores/aromas diferenciados.

Um dos fatores determinantes na qualidade, sabor e intensidade do chocolate é o genótipo do cacau, pois possivelmente determina a quantidade de precursores do sabor formados na etapa da fermentação (AFOAKWA, 2010). Estudos relatados por *American Cocoa Research Institute* (ACRI) em 1991 demonstraram que alguns híbridos da Estação de Pesquisas de Cacau da Costa Rica (CATIE) apresentavam características de aroma e sabor inferiores em relação a outros materiais estudados (MATILIK, 1994).

Zamalloa (1994) citados por Efraim (2009) avaliaram as características químicas, físico-químicas e sensoriais de grupos dos tipos *Forastero* e *Trinitário* cultivados no Estado de São Paulo, em condições climáticas distintas das quais o cacauero vem sendo cultivado no mundo em larga escala. TUCCI *et al.* (2002) e Efraim *et al.* (2006) avaliaram os grupos, respectivamente com relação a composição em ácidos graxos, triacilgliceróis e conteúdo de gordura e os teores de compostos fenólicos. Todos os três estudos encontraram diferenças entre os materiais em relação às características avaliadas. Trabalhos conduzidos por Efraim

(2009) comprovaram a diferença do comportamento dos clones de cacau ao serem monitorados os parâmetros de temperatura e pH durante a fermentação, da mesma forma que foi encontrada diferenças nos *liquors*, manteiga e chocolate. Trabalhos realizados por Cruz (2012) demonstraram a evolução distinta do processo fermentativo (durante a fermentação e após a secagem concluindo através do monitoramento da temperatura e pH da massa em fermentação e a avaliação dos teores de umidade, atividade de água, pH, acidez titulável, açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, compostos fenólicos, durante a fermentação e ao término da secagem) para dois clones (resistentes à Vassoura de Bruxa), e uma amostra susceptível a doença denominada de cacau convencional, corroborando com os estudos de Efraim. Uma das principais dificuldades em avaliar comparativamente as diferenças entre os clones de cacau encontra-se na escassez de trabalhos que tenham utilizado materiais distintos submetidos aos mesmos protocolos de fermentação, secagem e torração. Porém, algumas pesquisas têm permitido maior compreensão dos fatores positivos e negativos ao sabor do chocolate influenciados por variações genéticas do cacau.

Pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), chocolate é definido como produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (ou pasta ou *liquor*) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau (BRASIL, 2005). Os chocolates com apelo saudável seguem a tendência em alimentos funcionais, ou seja, com benefícios à saúde além da nutrição essencial. Com isso, verifica-se um aumento da procura e do consumo de chocolates cada vez com teores mais altos de cacau e conseqüentemente de flavonóides naturalmente encontrados no cacau (KLINKE, 2005).

Chocolate varietal é aquele produzido com sementes de cacau oriundas de regiões geográficas e populações varietais (cultivares) específicas, sendo que o sabor destas sementes é fortemente influenciado pelo meio ambiente onde é produzido, o que imprime a todos esses produtos uma verdadeira identidade de origem (LUNA *et al.*, 2002). Esse novo conceito para chocolates remete a algo ainda considerado subjetivo do ponto de vista sensorial, como as peculiaridades de sabor do cacau utilizado e do chocolate produzido, mas objetivo do ponto de vista de mercado, mostrando-se como uma excelente forma de agregar alto valor ao cacau,

sendo que para produtos consagrados como uvas e vinhos; certos tipos de queijo e, mais recentemente, cafés, isso já é bastante comum (EFRAIM, 2009).

2.1. O mercado do cacau e chocolate

Por ser um *commodity* de participação relevante no comércio de produtos agrícolas, o cacau tem importância econômica no contexto internacional tanto em importações quanto exportações (GUYTON, 2003).

De acordo com o ICCO (*International Cocoa Organization*, 2017) a África detém 73,9% da produção mundial com mais de três milhões de toneladas, seguida da América com 16,8% e Ásia e Oceania com 9,2%. Os maiores produtores mundiais de cacau são a Costa do Marfim, seguida por Gana, Indonésia, Equador, Camarões, Nigéria, Brasil, e Papua Nova Guiné.

Tabela 02- Produtores de cacau mundial

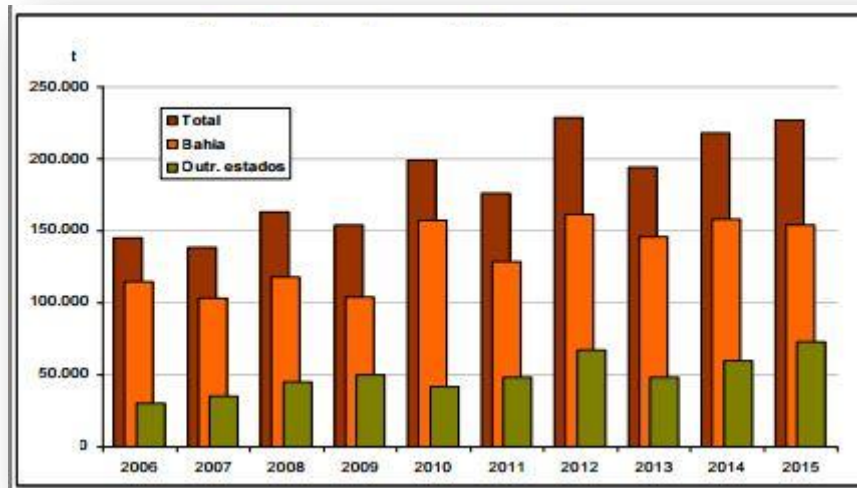
Países	Produção de cacau mil ton/ano
Costa do Marfim	1900
Gana	850
Indonésia	330
Equador	270
Camarões	250
Nigéria	230
Brasil	190
Papua Nova Guiné	41

Fonte: ICCO 2017.

Apesar das diversas crises a Bahia se mantém com a maior produção de amêndoas de cacau do Brasil com 53,4%, seguida do Pará (41,3%), Rondônia (2,4%) e Espírito Santo (2,1%), sendo esta posição alcançada principalmente pelo investimento nos clones resistentes à “vassoura de bruxa”. Desta forma as regiões Norte e Nordeste do Brasil são responsáveis por mais de 98% da produção de amêndoas no Brasil, sendo que em 2016 foi de 214.065 toneladas, esperando-se para safra de 2017, 233.550 toneladas, um acréscimo de 10%. O faturamento das fazendas produtoras de cacau ficou em R\$ 1, 2 bilhões em 2016 (IBGE, 2017).

Como se ilustra na Figura 07, a Bahia já ultrapassa a produção de 150000 toneladas de cacau por ano segundo o Mercado do Cacau (2015). Os demais estados aumentou a produção de cacau em 22,18%, apresentando uma tendência crescente nos últimos anos.

Figura 05– Produção de cacau na Bahia



Fonte: Mercado do cacau, 2015.

Estudos realizados por Santos *et al.* (2016) da análise do mercado de chocolate apontou para uma tendência de crescimento dos chocolates amargos com alto teor de cacau e a necessidade da utilização de cacau fino ou especial. Observou-se que em 1973, na França, o chocolate amargo representava apenas 2% do mercado e em 2006 já representava 49%. Duas constatações desta pesquisa constituíram uma demonstração da consolidação do mercado de cacau fino: a primeira foi a presença das maiores indústrias mundiais neste segmento, lançando diretamente seus produtos a base de cacau fino e comprando pequenas indústrias renomadas que utilizam exclusivamente esse tipo de cacau nas suas formulações. A segunda foi exemplificada pela ação de pequenas empresas pioneiras e renomadas neste mercado que estão inovando para melhorar sua participação. O mercado de cacau fino demonstrou uma tendência de expansão com a entrada de grandes indústrias neste segmento. Nessa pesquisa se concluiu que o cacau fino produzido no Brasil reúne as características essenciais para adotar uma estratégia de diferenciação e se posicionar estrategicamente neste segmento de mercado. Entre os fatores que tornam possíveis essa obtenção de vantagens competitivas estão à raridade das matérias genéticas e fatores naturais, de difícil imitação pelos concorrentes.

2.2. Pré-processamento do cacau

O fruto do cacau quando maduro está apto aos procedimentos para transformação nos diversos produtos. Para isso, conforme indica o fluxograma da Figura 4, há o pré-processamento que acontece em campo pelos produtores e será detalhado em cinco fases, todas elas importantes para um bom resultado final (MARTINS *et al.*,2011).

Dado o período de aproximadamente cinco anos de plantado o cacauzeiro, a colheita deve ser realizada com os frutos já maduros, pois assim estão no estágio ideal de peso das sementes e quantidade de açúcares, fundamentais para a fermentação. Como a maturação dos frutos não ocorre ao mesmo tempo, este processo é repetido a cada 2 – 4 semanas. Para a realização desta atividade, utilizam-se facões, tesoura ou similar se os frutos tiverem fácil acesso, caso contrário utiliza-se o podão. Deve-se evitar perfurar os frutos durante a colheita para não prejudicar a fermentação (MARTINS *et al.*,2011; BECKETT, 2009).

Figura 06 – Colheita e quebra dos frutos do cacau



Fonte: Fazenda Lajedo do Ouro.

Após serem todos amontoados em um local específico no chão e passar um período de descanso de 3 dias a quebra é realizada. Este momento é necessário para que haja concentração de açúcares, e outros compostos importantes para a fermentação, além da facilidade de soltura da casca. A quebra é realizada com um instrumento com lâmina de metal não afiado. A polpa retirada manualmente é

conduzida a caixas de madeira e depois transportada para os cochos de fermentação no mesmo dia. Não devem fermentar sementes de dias diferentes de quebra (MARTINS *et al.*,2011).

2.2.1. Fermentação

A fermentação é a fase fundamental do pré-processamento para o resultado final do *flavour* de chocolate, pois ela dá início à formação dos precursores de sabor. Para isso as sementes devem estar completamente maduras, caso contrário o processo não poderá finalizar com o aroma desejado (AFOAKWA, 2010; ZIEGLER, 2009). Segundo Beckett (2009) o desenvolvimento dos precursores do sabor do cacau ocorre nos cotilédones durante fermentação e secagem. Existem dois tipos importantes de células dentro dos cotilédones: células de armazenamento contendo gorduras e proteínas, e as células de pigmento contendo compostos polifenólicos e metilxantinas (teobromina e cafeína).

O tempo requerido para a fermentação das sementes é variável, segundo o material genético. A fermentação dura entre cinco a sete dias, sendo o final determinado pela prova de corte. De outra forma, em grandes fazendas, as sementes são deixadas em caixas de madeira perfuradas no fundo com pequenos furos para drenagem e entrada de ar, medem de 1-1,5m e tem profundidade de 1m. Para melhorar a aeração e garantir a uniformidade da fermentação, as sementes são transferidas de caixas ou cochos a cada dia, num período de três dias (FOWLER, 2009).

Figura 7- Fermentação das sementes de cacau

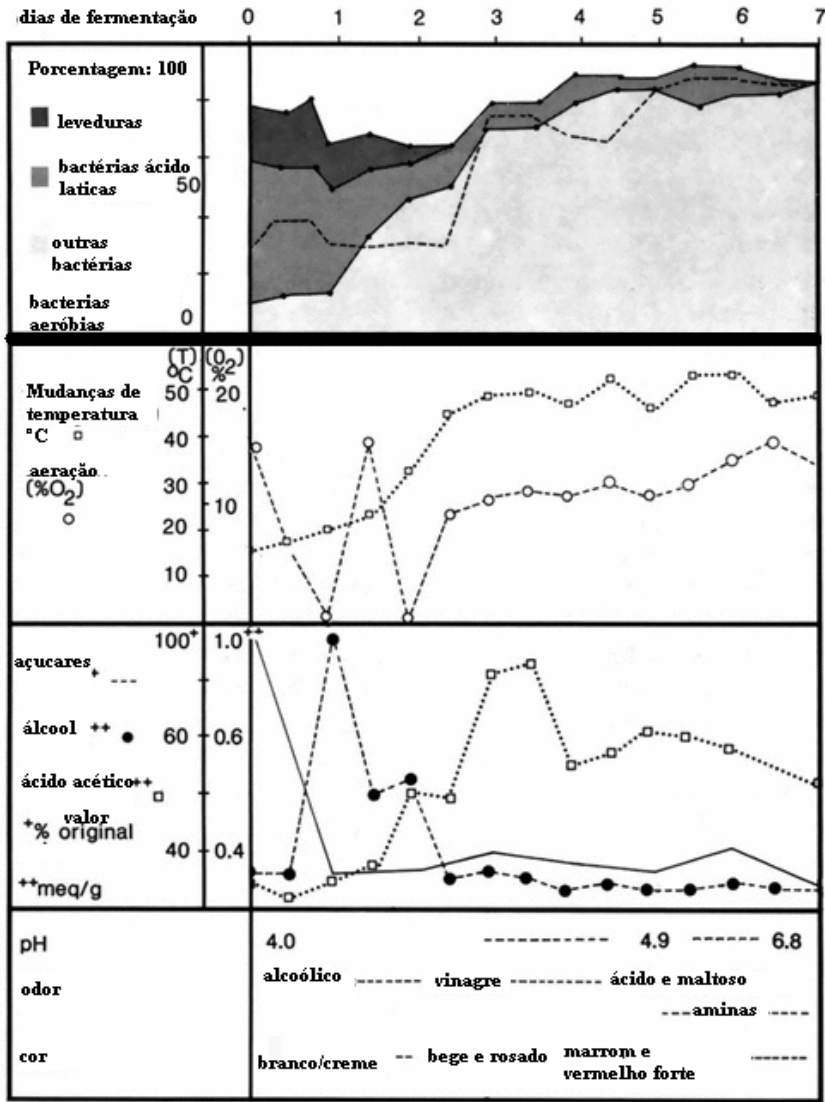


Fonte: Fazenda Lajedo do Ouro.

Segundo Schwan e Wheals (2004) o processo de fermentação pode ser dividido em três fases. A primeira fase é caracterizada pela ação das leveduras anaeróbicas. Estudos realizados por Papalexandratou *et al.* (2011), mostram que na fase inicial da fermentação prevalecem as espécies de bactérias *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Lactobacillus plantarum*, e *Acetobacter senegalensis*. Schwan e Wheals (2004) citado por Afoakwa (2010) informam que as leveduras comuns de serem encontradas nesta fase são *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces exiguous*, *Candida castelli*, *Candida saitoana*, *Candida guil- liermondii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia farinosa* e *Torulopsis* spp. Nas primeiras 24-36 h, as leveduras transformam o açúcar em álcool sob condições anaeróbicas em um pH abaixo de 4,0. A morte da semente geralmente ocorre no segundo dia, causada pela presença de ácido acético e álcool. É a partir deste momento que as sementes podem ser chamadas de amêndoas de cacau. Normalmente a partir do segundo dia até o final do processo, se faz o revolvimento da massa para que a temperatura não passe de 45°C e favoreça a ação das enzimas. Os revolvimentos podem acontecer de um cocho para o outro ou de um local para o outro, quando o processo for efetuado em montes, e tem por finalidade uniformizar a temperatura e oxigenar a massa (OETERRER, 2006). A segunda fase é caracterizada pela ação das bactérias lácticas na qual estão presentes desde o

início da fermentação, mas só se tornam dominantes entre 48 e 96 h. Bactérias lácticas convertem açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido láctico. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50° C. Nessa fase, há uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor da semente. A última fase é marcada pela ação das bactérias acéticas responsáveis pela conversão do álcool em ácido acético com o auxílio das bactérias acéticas que tornam o tegumento permeável, fazendo com que as amêndoas sofram a ação das enzimas. Ressalta-se a oxidação dos polifenóis que formam ou não complexos com as proteínas e peptídeos levando a redução da adstringência e do amargor. As alterações podem ser visualizadas nas figuras 11 (a) e 11 (b).

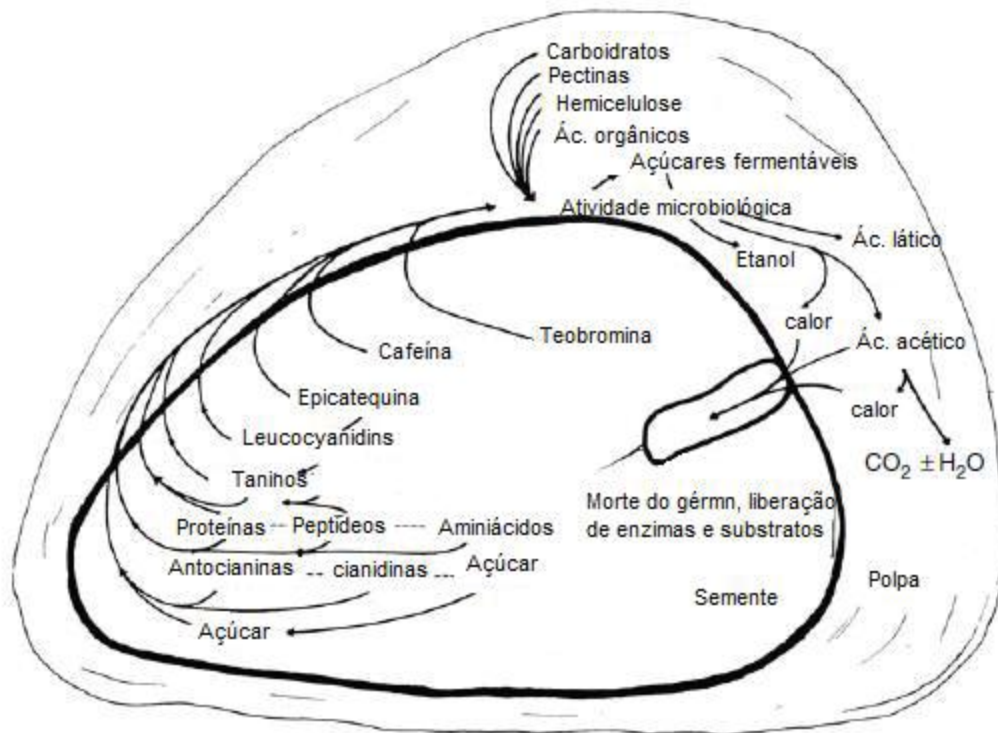
Figura 8– (a) Alterações durante a fermentação de amêndoas de cacau. (b) Mudanças químicas e bioquímicas dentro da semente do cacau durante a fermentação



(a)

Fonte: Adaptado de MINIFIE, 1989.

(b)



Fonte: LOPEZ, 1986, citado por BECKETT, 2009.

2.2.2. Secagem

Ao final da fermentação as sementes são removidas dos cochos ou montões para secagem ao sol, sendo um processo ambientalmente favorável, de baixo custo e produz sementes de boa qualidade. Comumente no Sul da América, a secagem ocorre em plataformas altas ou barcaças com telhado móvel que pode ser puxada para proteger durante a noite ou em períodos de chuva. Nesta etapa muitas reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam e os grãos que ainda estão com 60% de umidade devem ao final do processo chegar a 7 a 8% com acidez reduzida num período de 8 a 12 dias que depende das condições climáticas. Aí também as sementes devem ser revolvidas periodicamente para uniformizar a secagem. Na impossibilidade de secagem natural, o processo artificial ocorre, com as sementes sendo colocadas numa superfície em secadores ou estufas, controlando a temperatura em torno de 50°C, realizando revolvimento durante aproximadamente 40h para chegar ao 7 – 8% de umidade. Dois problemas podem ser gerados durante a secagem artificial: rapidez no processo, ocasionando acidez da semente e residual de fumaça, reduzindo a qualidade sensorial do produto final. Como visto no estudo de Efraim *et al.* (2010) a secagem por meio artificial em comparação à natural não

permitiu a volatilização de compostos formados durante a fermentação, como por exemplo o ácido acético, levando à diminuição do pH e ao aumento da acidez total titulável, prejudicando sensorialmente os produtos obtidos (FOWLER, 2009; MARTINS *et al.*,2011).

Durante a secagem ocorre à reação de Maillard e os compostos de Amadori, são formados os primeiros intermediários das reações entre os aminoácidos e glicose. Entretanto, tais compostos de Amadori não são detectáveis por mudança da cor ou odor e podem ser reversíveis durante a secagem. Essas reações iniciais são importantes porque os compostos intermediários de Amadori decompõem-se durante torração em numerosos componentes voláteis (ZIEGLEDER, 2009).

Figura 9- Ilustração do processo de secagem natural do cacau



Fonte: Fazenda Lajedo do ouro.

2.2.3. Armazenamento

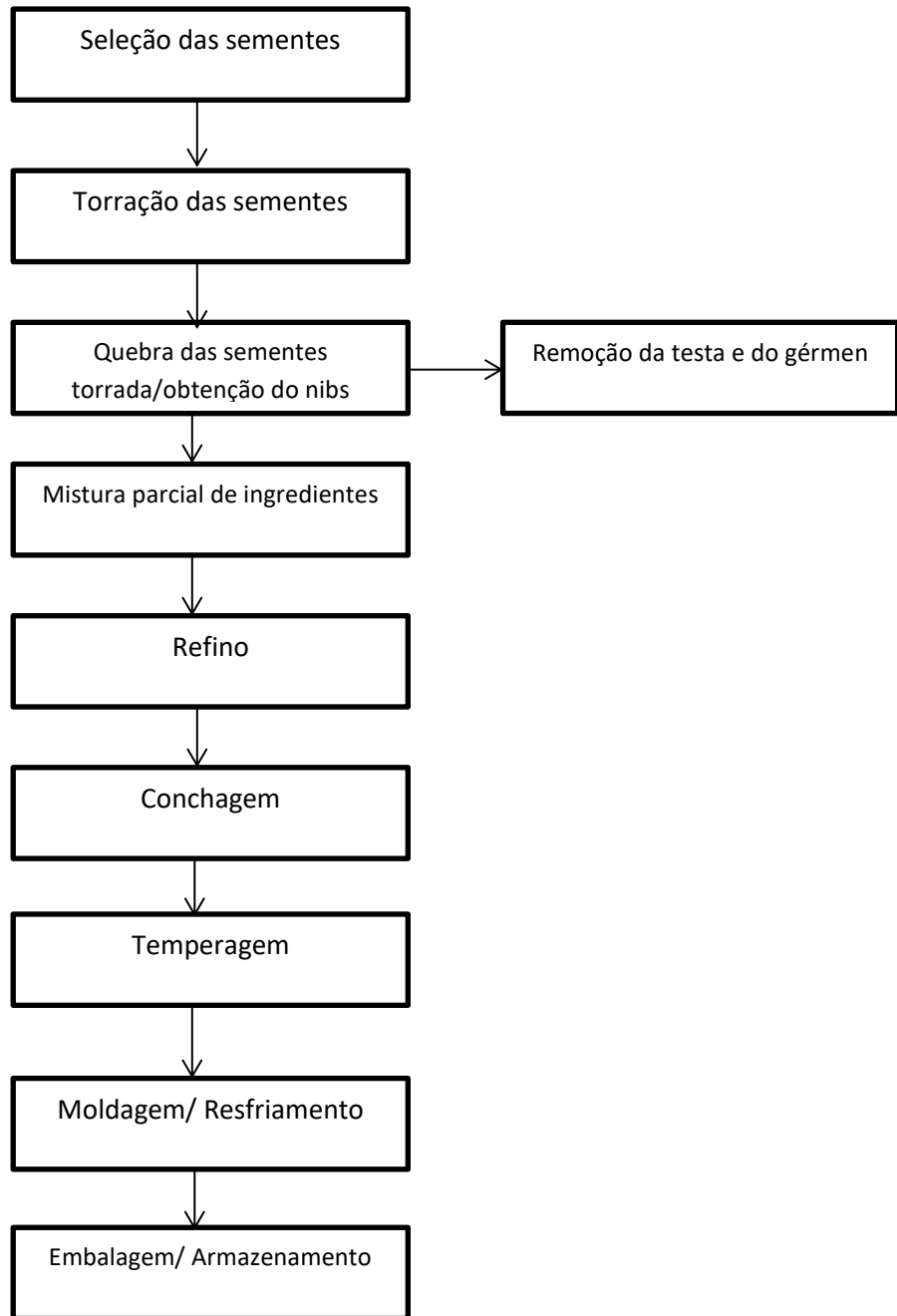
As amêndoas de cacau são altamente higroscópicas e seu ganho de umidade pode resultar no desenvolvimento de fungos e outros microrganismos indesejáveis. Logo as condições de estocagem das amêndoas devem ser observadas, evitando-se o armazenamento de grandes volumes em ambientes com elevada umidade e pouca circulação de ar (BECKETT, 1994). O acondicionamento geralmente é realizado em sacos de aniagem de 60 Kg que permitem o transporte de vapor de água, desta forma o equilíbrio entre a umidade das amêndoas de cacau e a do

ambiente onde estão estocadas é garantido. Para manter o nível da amêndoa de cacau do Brasil em 8%, a umidade relativa do ar deve estar em torno de 75% (MARTINS *et al.*, 2011; AFOAKWA, 2010). Esta etapa assume importância devido ao longo tempo em que o cacau pode permanecer armazenado. Segundo Serra (2004) as instalações destinadas ao armazenamento de cacau devem possuir luminosidade e aeração adequadas.

2.3. Processamento do chocolate

Para iniciar o processamento do chocolate as amêndoas de cacau devem ser processadas de forma que as ações químicas e bioquímicas do pré-processamento continuem formando o sabor de chocolate (EFRAIM, 2010). Depois de fermentadas e secas, as amêndoas estão prontas para entrarem no processo de torração.

A figura 13 abaixo ilustra o fluxograma do processamento de chocolate.

Figura 10- Fluxograma do processamento de chocolate

Fonte: A autora (2017).

2.3.1. Classificação das sementes

Segundo a Instrução Normativa 38/2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a quantidade de produto coletada deverá ser homogênea, quarteada e reduzida em, no mínimo, 4 kg (quatro quilogramas) para compor, no mínimo, 4 (quatro) vias de amostras, constituídas de, no mínimo, 1 kg (um quilograma) cada uma, que serão representativas do lote. Essa instrução normativa tem o objetivo de estabelecer o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem.

Figura 11- Quarteamento para amostragem das sementes de cacau



Fonte: Fábrica Mendoá.

Será realizada a prova de corte nas sementes coletadas para avaliação das mesmas. O analista ou técnico deve ser treinado para classificar as amêndoas quanto aos parâmetros previstos no regulamento técnico que são: mofadas, fumaça, danificadas por insetos, ardósia, germinadas e achatadas.

Figura 12– Prova de corte das sementes de cacau



Fonte: Fábrica Mendoá.

A amêndoa de cacau será classificada em Tipos de acordo com os percentuais de tolerância de defeitos previstos no Regulamento Técnico (Tabela 03), podendo ainda ser enquadrada como Fora de Tipo ou Desclassificada.

Tabela 03- Tolerância de defeitos, expressa em % e respectivo enquadramento do produto

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

Fonte: Instrução Normativa 38/2008 do MAPA.

2.3.2. Torração

A torração é um tratamento térmico fundamental no processamento de chocolate e suas condições dependem de fatores como: variedade do cacau, tratamentos anteriores à torração, umidade e características de sabor desejadas. Em condições ótimas, na torração há o desenvolvimento máximo do potencial aromático da amêndoa. É uma etapa definida como uma operação térmica caracterizada pelos seguintes fenômenos: perda do teor de água; diminuição dos ácidos voláteis indesejáveis (principalmente acético); inativação de enzimas que podem degradar a manteiga de cacau; desenvolvimento de aromas desejáveis

através da Reação de Maillard partindo dos precursores formados na etapa de fermentação e o desenvolvimento da coloração típica do chocolate (DRUMMOND, 1998; LOPES *et al.*, 2003; EFRAIM, 2004). O processo de torra não apenas gera novos compostos voláteis de aromas específicos, por meio da pirólise de açúcares, mas também gera perda de compostos secundários que afetam o sabor final do chocolate. (NAZARUDDIN *et al.* 2000).

Figura 13 - Torrador de sementes de cacau



Fonte: Fábrica Mendoá.

As temperaturas de torração variam entre 110° - 140°C ao final do processo, porém iniciam mais baixas e vão aumentando gradativamente, assim como o tempo. O que vai determinar o final do processo são os resultados de umidade para não crescimento de bactérias, como a salmonela que pode estar presente (BURNDRED, 2009). Após a torração, o material é moído para a obtenção da massa de cacau, também conhecida como *liquor* podendo ser comercializada para a fabricação de chocolates e prensada para a obtenção de manteiga e torta de cacau, sendo que esta última pode ser moída em moinho de pinos originando o cacau em pó natural (BECKETT, 1994; COHEN, JACKIX, SOUSA, 2004).

Figura 14- Descascadeira de sementes de cacau



Fonte: Fábrica Mendoá.

2.3.2. Mistura de Ingredientes

Há uma mistura inicial do *liquor* com açúcar, e/ou outros ingredientes a depender da formulação nas proporções adequadas, realizada em tachos encamisados a 40°C por tempo adequado para formar uma massa homogênea pronta para o refino (EFRAIM, 2004; AFOAKWA 2011).

2.3.3. Refino

O refino promove a redução do tamanho das partículas dos ingredientes tornando-os imperceptíveis na boca durante a degustação do produto final. O tamanho das partículas da massa refinada não deve ser superior a 25µm para que o consumidor não perceba areosidade ao degustar o chocolate (LUCCAS, 2001). O tamanho da partícula final é um ponto crítico para a qualidade do chocolate. O teor de gordura do *nibs* influencia de forma que massas muito secas são refinadas mais rapidamente, porém, apresentam tamanho de partículas mais elevados que o ideal (EFRAIM, 2004; AFOAKWA, 2011).

Figura 15 - Moagem e refino da massa de cacau



Fonte: Fábrica Mendoá.

2.3.4. Conchagem

A conchagem se constitui como a última etapa de importância na formação do sabor característico e desejável do chocolate. A conchagem é um processo geralmente dividido em duas etapas: conchagem seca, quando a umidade é reduzida e a reologia melhorada; conchagem úmida, quando a lecitina é adicionada (COUNET *et al.*, 2002).

Figura 16 – Máquina de conchagem para produção de chocolate



Fonte: Fábrica Mendoá.

É uma etapa de mistura que envolve a redução da umidade, volatilização dos ácidos graxos e aldeídos, o desenvolvimento da textura uniforme e a mudança da cor devido à emulsificação e oxidação de taninos. A volatilização reduz o amargor e desenvolve o sabor do chocolate. As partículas sólidas, tais como o açúcar e o

cacau, são revestidas com gordura, dissociadas pelo atrito tornam-se arredondadas. O envolvimento das partículas sólidas pela gordura (principalmente pela manteiga de cacau) associados ao cisalhamento e movimentação da massa de chocolate contribuem para a textura do chocolate, que também exerce grande influência ao sabor global do chocolate. (EFRAIM, 2009; AFOAKWA *et al.*, 2008b; PRAWIRA, 2009). O processo ocorre sob agitação do chocolate derretido por conchas em temperatura acima de 50°C por algumas horas. O tempo e a temperatura de conchagem variam com o tipo de chocolate a ser produzido. Em chocolates com alto teor de cacau a temperatura varia de 70°C e continua até 82°C, podendo levar de 8 a 96 horas, dependendo do tipo de produto que se deseja e do equipamento utilizado. Após a conchagem os componentes do *flavor* nos sólidos do cacau, gordura e superfície do açúcar são todos equilibrados (AFOAKWA *et al.*, 2007; BECKETT, 2009).

2.3.5. Temperagem

A temperagem tem como objetivo fazer com que um número suficiente de cristais seja desenvolvido para que a cristalização da fase gordurosa seja realizada na sua forma polimórfica mais estável, produzindo, assim, um chocolate mais estável. A agitação, o tempo e a temperatura de cristalização são os parâmetros do processo de temperagem. A velocidade de agitação tem que proporcionar boa transferência de calor e massa no produto. O tempo de cristalização deve ser o suficiente para que ocorra a formação e o amadurecimento dos cristais estáveis. De todos, a temperatura exerce uma função essencial no processo, em face de ser a força propulsora de cristalização. Dos diversos fatores que afetam o processo de temperagem, a formulação tem destaque especial, pois para cada tipo há uma determinada condição de temperagem, devendo-se ajustar os parâmetros do processo, de modo a obter produto de qualidade (COHEN; JACKIX; SOUSA, 2004).

O processo de temperagem para o chocolate inicia-se com a fusão completa da fase gordurosa do chocolate em 40-50°C. Em seguida é feito um resfriamento controlado, para 28-29°C, sob agitação, para induzir à cristalização da gordura, seguido de aquecimento a 30-32°C para derreter os cristais instáveis, mas ainda formando novos cristais estáveis tipo V. A taxa de resfriamento deve ser próxima a 2,0°C.min⁻¹ (BRIGGS; WANG, 2004; QUAST *et al.*, 2007).

Figura 17 – Máquina de temperagem de chocolate

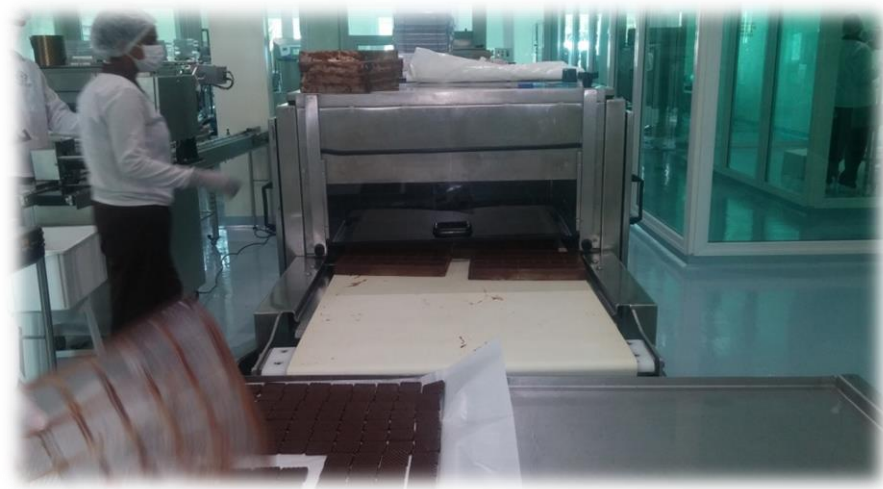


Fonte: Fábrica Mendoá.

A temperagem influencia de forma positiva as características de qualidade do produto final como dureza e quebra à temperatura ambiente (*snap*), completa fusão na boca, brilho, contração durante a desmoldagem a rápido desprendimento de aroma e sabor na degustação (QUAST, 2008).

Há, ainda, a utilização de uma mesa vibratória para retirada de bolhas de ar da massa do chocolate antes da etapa de resfriamento, para evitar a formação de espaços vazios no chocolate pronto. É, então, resfriado entre 12-18°C em túnel de resfriamento, para desenvolver os cristais e formar uma massa quebradiça, brilhante, estável e homogênea. Segue para sala de repouso de 6 a 12 horas, é embalado e armazenado em câmeras frias com condições específicas que contribuem para garantir o brilho e aspecto do produto final.

Figura 18 – Túnel de resfriamento de chocolate



Fonte: Fábrica Mendoá.

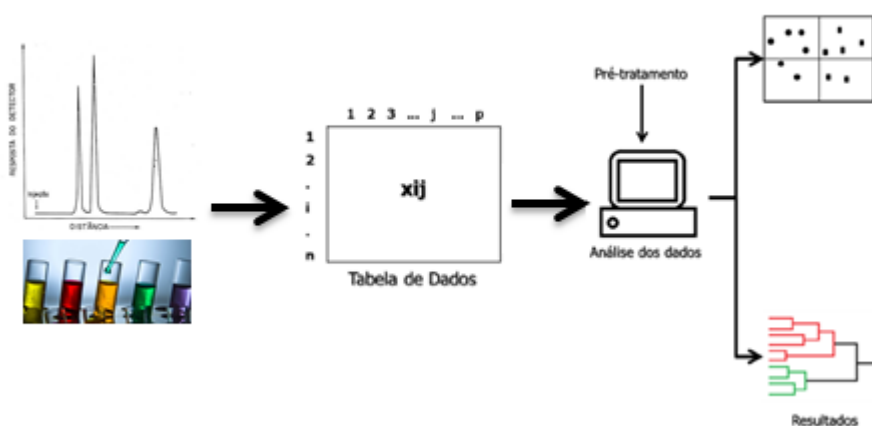
3. ANÁLISE MULTIVARIADA

Com o avanço da tecnologia no passar dos anos, novas técnicas analíticas tem sido desenvolvidas e o número de variáveis e pontos de dados coletados em uma análise cresceram muito. Assim, abordagens de análises unidimensionais não são tão adequadas para explorar os dados, uma vez que não garantem a determinação da associação entre os dados experimentais e obter informações sobre as características intrínsecas das matrizes alimentares complexas. A fim de ultrapassar esta limitação, métodos quimiométricos são reconhecidos como uma valiosa ferramenta em Ciência e Tecnologia de Alimentos de maneira a explorar os dados com todas as variáveis/amostras em conjunto (ZIELINSKI *et al.*, 2014).

A quimiometria é a área que emergiu da necessidade de extrair informação química que de outra forma estaria soterrada na avalanche de dados produzidos pela moderna instrumentação. Ela é considerada a interseção da química, matemática e estatística. Os métodos quimiométricos utilizados para identificar as semelhanças e as diferenças em variados tipos de amostras, para agrupá-las e classificá-las, estão divididos em dois grupos: os métodos “supervisionados”, e os métodos “não supervisionados” de reconhecimento de padrões. Ambos os grupos se baseiam que as amostras do mesmo tipo são semelhantes, que existem diferenças significativas entre diferentes tipos de amostra e que o conjunto de medidas disponíveis é capaz de detectar essas semelhanças e diferenças.

Nos métodos supervisionados, cada amostra analisada provém de uma classe preestabelecida, e essa informação é utilizada durante a análise de dados e na construção dos modelos de classificação. Os métodos não supervisionados não fazem uso dessa informação e, portanto, não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da classificação das amostras. Elas serão agrupadas naturalmente com base na informação contida nos dados experimentais em questão. Na quimiometria são utilizados modelos matemáticos capaz de “descobrir” ou “organizar” as informações escondidas nos dados, ou seja, um “microscópio” que converta as observações em algo que possa ser visualizado no espaço bi ou tridimensional que são as análises de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA). Nestas análises e nas outras de carácter multivariado, em primeiro momento há a coleta dos dados que podem ser adquiridos de diversas técnicas analíticas tal como aceitação sensorial, propriedades reológicas, conteúdo de vitaminas, compostos fenólicos, minerais essenciais, carotenoides, e bioatividade junto com microrganismos e radicais livres, espectros, entre outros. Em seguida, uma importante e decisiva etapa para realização das análises é a organização dos resultados experimentais, onde a matriz deve ser definida e estruturada antes do uso do software (ZIELINSKI *et al.*, 2014). Em geral, uma transformação dos dados na tabela é requerida para fazer sua distribuição simétrica e dar cada variável resposta (coluna) o mesmo peso e a mesma importância na análise (WOLD *et al.*, 2001). Se o pré-processamento dos dados não for realizado propriamente, deve ocorrer uma extra variação no conjunto de dados (ENGEL *et al.*, 2013). Por fim, com o adequado software estatístico escolhido pelo analista os diferentes métodos multivariados podem ser realizados.

Figura 19 - Esquema do processo global da análise multivariada



Fonte: A autora (2017).

A Análise das Componentes Principais é uma técnica de estatística multivariada que tem por objetivo reduzir a dimensão dos dados originais permitindo a fácil visualização das informações mais importantes em um número menor de fatores, ou componentes principais (RIBEIRO, 2001). Essa análise consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados, ou seja, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância. A componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2 que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois, embora a informação estatística presente nas n-variáveis originais seja a mesma dos n-componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90% desta informação. O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observação dos pontos no espaço n-dimensional (NETO, 1998).

A Análise Hierárquica por Agrupamento (HCA) baseia-se em encontrar similaridade em um amplo conjunto de dados. Dividindo o conjunto de dados em números de grupos predeterminados pelo usuário. O método de agrupamento hierárquico produz uma hierarquia de *clusters* (aglomerados) de pequenos grupos de itens muito semelhantes aos grandes aglomerados, que incluem mais itens diferentes. A partir do método de agrupamentos hierárquicos normalmente são produzidos gráficos conhecidos como dendrograma (ou árvore) que mostra esta estrutura de agrupamento hierárquico (HOLLAND, 2006).

Estudos realizados por Lessa (2014) resultaram na classificação físico-química de cafés comerciais por análise exploratória agrupando por similaridade as amostras analisadas. A Análise das Componentes Principais permitiu separar a partir dos escores positivos e negativos das componentes principais (CP1 e CP2) cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G5). Grupos estes confirmados a partir da Análise Hierárquica por Agrupamento denotados num dendrograma pela distância dos

vizinhos mais próximos. A formação dos grupos teve a influência das variáveis denotadas nos pesos através dos valores dos parâmetros L^* , b^* , a^* , pH, sólidos Solúveis, flavonóides, acidez titulável e compostos fenólicos. Kara (2009), Deetae *et al.* (2012) e Yi *et al.* (2015) realizaram estudos em amostras de chás aplicando PCA e HCA avaliando compostos fenólicos, voláteis e minerais com objetivo de correlacionar e verificar a similaridade entre as amostras, distinguir e classificar as amostras relacionadas ao processo. Não foi encontrado na literatura a aplicação dessa ferramenta em análises utilizando a matriz cacau, nibs e chocolate.

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 6, p. 290–8, 2007.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 9, p. 840–57, 2008.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; VIEIRA, J. Relationship between rheological, textural and melting properties of dark chocolate as influenced by particle size distribution and composition. **European Food Research Technology**, v. 227, n. 4, p. 1215–23, 2008.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd, New Delhi, Índia, 2010.
- ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2008.
- 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.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; DEMIRATA, B.; OZYUREK, M.; ÇELIK, S. E.; BEKTASOGLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496-547, 2007.
- ARAÚJO, C. R. R. R. **Composição química, potencial antioxidante e hipolipidêmico da farinha da casca de *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba)**. 2011. 119p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Vale de Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

BATALHA, P. G. **Caracterização do cacau catongo de São Tomé e Príncipe, Lisboa.** 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar – Tecnologia de produtos vegetais) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2009.

BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 2 ed. London: Black Academic e Professional, 1994. p. 407.

BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate.** Zaragoza: Editorial Acribica, 1994. p. 432.

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

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-6, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30,1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC Nº 264, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para chocolate e produtos de cacau. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso: 21 janeiro de 2017.

BRIGGS, J. L.; WANG, T. Influence of shearing and time on the rheological properties of milk chocolate during tempering. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 2, p. 117-21, 2004.

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

BRUINSMA, K. K.; TAREN, D. L. Chocolate: Food or Drug? **Journal of the American Dietetic Association**, n. 99, n. 10, p. 1249-56, 1999.

BRUNETTO, M. R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A.; GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 459–67, 2007.

BURNDRED, F. Food Safety in Chocolate Manufacture and Processing. *In*: BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate manufacture and use.** 4 ed. New York: Blackwell Publishing Ltda, 2009, p. 530-49.

CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Indicação de variedades de cacau para cultivo comercial** – Rede de avaliação de clones em larga escala. Material cedido pela CEPLAC, 2010.

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. 115-27, 2004.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; OUWERX, COLLIN, C. S. Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2385-91, 2002.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. v.2. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. p. 723-37.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148-73, 2012.

CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de micro-ondas**. 2002. 101p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

DEETAE, P.; PARICHANON, P.; TRAKUNLEEWATTHANA, P.; CHANSEETIS, C.; LERTSIRI, S. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 953-9, 2012.

DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 492, p. 153-68, 1980.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-52, 2006.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S.; **Ciências Nutricionais: Aprendendo a aprender**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2008. 760p.

DRUMMOND, M. C. M. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Theobroma cacao* L.), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**. 1998. 127p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 2004. 114p. Dissertação

(Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacau de diferentes genótipos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229- 36, 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**. 2009. 136p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

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. 142-50, 2010.

ENGEL, J.; GERRETZEN, J.; SZYMAN, E.; JANSEN, J. J.; DOWNEY, G.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M. C. Breaking with trends in preprocessing? **Trends Analytical Chemistry**, v. 50, p. 96-106, 2013.

FERRARI, R; CECONI, C; CURELLO, S; GUARNIERI, C; CALDARERA, M; ALBERTINI, A; VISIOLI, O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 17, n. 10, p. 937-45, 1985.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FISCHER, A. B. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. Proceedings of a Brook Lodge Symposium, Augusta, Apr. 1987;27-29:99-104.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-8, 2011.

FOWLER, M. S. Cocoa beans: from tree to factory. *In*: BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. York: Blackwell Publishing Ltda, 2009, p. 10-47.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, n. 13, p. 1925-41, 2000.

GRAMACHO, I. da C. P.; MAGNO, A. E. de S.; MANDARINO, E. P.; MATOS, A. **Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia**. Ilhéus: CEPLAC, 1992. 124p.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-91, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.

HOLLAND, S. M.; Cluster Analysis, Department of Geology, University of Georgia, Athens, GA 30602 -2501, Janeiro 2006.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201706_5.shtm>. Acesso em 15 de julho 2017.

ICCO International Cocoa Organization, Produção Mundial de cacau. Disponível em: <<http://www.icco.org/>>. Acesso em 16 de julho de 2017.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-35.

JENKINS, R. R. Free radical chemistry relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 5, n. 3, p. 156-70, 1988.

KARA, D. Evaluarion of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal componente analysis. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 347-54, 2009.

KIM, H.; KEENEY, P.G. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 4, p.1090-2, 1984.

KLINKE, A. Autogratiificação, mármore e laços. Valor online, São Paulo, 2005. Disponível em <<http://www.valoronline.com.br/print.htm>>. Acesso em 11 de julho de 2017.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-8, 1999.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

LEAL; J. B.; SANTOS, L. M.; SANTOS, C. A. P.; PIRES, J. L.; AHNERT, D.; CORREA, R. X. Diversidade genética entre acessos de cacau de fazendas e de banco de germoplasma na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 851-8, 2008.

FARIÑAS, L. G. de; BERTORELLI, L. O. de; LEMUS, M.; PARRA, P. Efecto del mezclado de granos de dos tipos de cacao sobre algunas características químicas durante la fermentación. **Agronomía Tropical**, v. 52, n. 3, 2002.

LESSA, M. R.. **Classificação físico-química de cafés comerciais por análise exploratória**. 2004. 68p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2004.

LOPES, A. S.; GARCÍA, N. H. P.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum* Schum) e cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal Food Technology**. v. 6, n. 2, p. 309-16, 2003.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, n. 6, p. 1-10, 2013.

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas a manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. 2001. 188p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3527-32, 2002.

MACIEL, L. F., FELÍCIO, A. L.S.M., HIROOKA, E. Y. Bioactive compounds by UPLC-PDA in different cocoa varieties (*Theobroma Cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. **British Food Journal**, 2016. No prelo.

MANDARINO, E. P.; SENA GOMES, A. R. **Produtividade do cacauero (*Theobroma cacao* L.) cultivados em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico, n. 197, 2009. 32p.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

MARITA, J. M.; NIENHUIS, J.; PIRES, J. L.; AITKEN, W. M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. **Crop science**, v. 41, n. 4, p. 1305-16 2001.

MARTINS, J. M.; SANTOS, J. H. F.; SILVA, W. S. da; SILVA, V. B.; ARRUDA, J. A. P. de; NASCIMENTO, J. A. R.; DORTAS, L. C.; FREITAS, A. J. A.; RAMOS, A. A. Melhoria da Qualidade de Cacau. Ilhéus: CEPLAC/CENEX. 2011. 45p.

MALTIK, B, K. Cocoa: Post Harvest Practices, Part I. **The Manufacturing Confectioner**. V.74, n. 6, p. 95-6, 1994.

MENG, C. C.; JALIL, A. M; ISMAIL, A. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 200-9, 2009.

MINIFIE, B. W. **Chocolate Cocoa and confectionery: Science and Technology**. 3 ed. New York: AVI Book, 1989.

MISNAWI; JINAP, S.; JAMILAH, B.; NAZAMI, S. Sensory properties of cocoa liquor as affect by polyphenol concentration and duration of roasting. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 5, p.403-9, 2004.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655–66, 2009.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-71, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. ½, p. 95-111, 2004.

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, n. 1, p. 55–63, 2000.

NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à Análise Exploratória de Dados Multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-9, 1998.

NOOR-SOFFALINA, S. S.; JINAP S.; NAZAMID, S.; NAZIMAH, S. A. H. Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavor precursors in a lipidic model system. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 168-80, 2009.

OETTERER, M. Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate. In: OETTERER, M; REGITANO D'ARCE. M. A. B.; SPOTO, M. H. F. (Org.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, v. 1, 2006. p. 1-50.

OSMAN, H.; NAZARUDDIN, R.; LEE, S. L. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. **Food Chemistry**. v. 86, n. 1, p. 41-5, 2004.

PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N.; FALONY, G.; DE VUYST, L. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil, **Food Microbiology**. v. 28, n. 5, p. 964-73, 2011.

PEREIRA, B. C.; PEREIRA, A. K. T. Radicais livres: uma nova abordagem. **Revista Saúde Quântica**. v. 1, n. 1., p. 35-42, 2012.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento de cacauero com ênfase na produtividade, qualidade dos frutos e resistência à doenças**. 2003. 226p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,2003.

PRAWIRA, M.; BARRINGER, S. A. Effects of conching time and ingredients on preference of milk chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.33, n. 5, p. 571-89, 2009.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 11, p. 3273-9, 2003.

QIN, Z.; PANG, X.; CHEN, D.; CHENG, H.; HU, X.; WU, J. Evaluation of Chinese tea by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 864-874, 2013.

QUAST, L. B. **Estudo do efeito da adição de gorduras alternativas na cristalização da manteiga de cacau**. 2008. 127p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

QUAST, L. B.; LUCCAS, V.; ROTH, T. C. W.; KIECKBUSCH, T. G. Influência da incorporação de gordura de cupuaçu na temperagem da manteiga de cacau. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 130-6, 2007.

RIBEIRO, F. A. **Aplicação de Métodos de Análise Multivariada no Estudo de Policíclicos Aromáticos**. 2001. 174 p. Dissertação (Mestrado em Química)– Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-56, 1996.

ROGINSKI, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. v. 92, n. 2, p. 235-54, 2005.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 454-7, 1998.

SANCHES, C. L. G. **Murcha-de-ceratocystis (*ceratocystis cacaofunesta*) no sul da Bahia: metodologia para seleção de genótipos de cacau resistente e estudos preliminares descritivos do patógeno**. 2006. 75p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2006.

SANCHEZ-RABANEDA, O.; JAUREGUI, I.; CASALS, C.; ANDRES-LACUEYA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.

SANTOS, G. B.; SANTOS, P. B. M.; SANTOS, A. M. Potencialidades de mercado para o cacau fino. CEPLAC, 2016. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/POTENCIALIDADES_DE_MERCADO_PARA_O_CAU_FINO.pdf>. Acesso em 15 de julho de 2017.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 10, p. 308-13, 2004.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 205-21, 2004.

SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, 1102p.

WEISBURGER, J. H.; CHUNG, F. L. Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1145-54, 2002.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109-30, 2001.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 449-59, 2000.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1173-1183, 2001.

YI, T.; ZHU, L.; PENG, W. L.; HE, X. C.; CHEN, H. L.; LI, J.; YU, T.; LIANG, Z. T.; ZHAO, Z. Z.; CHEN, H. B. Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 194-201, 2015.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p.139-62, 1994.

ZAMALLOA, W. A. C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (Theobroma cacao L.) produzidos no Estado de São Paulo**. 1994. 111p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ZIEGLER, G. Flavour Development in Cocoa and Chocolate. *In*: BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate manufacture and use**. 4 ed. York: Blackwell Publishing Ltda, 2009, p. 169-88.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-54, 2014.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; NUNES, C. A.; SCHNITZLER, E.; van RUTH, S. M.; GRANATO, D. Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: a critical review and guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 3, p. 300-16, 2014.

ZOUMAS, B. L.; KREISER, W. R.; MARTIN, R. A. Theobromine and caffeine content of chocolate products. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 2, p. 314-6, 1980.

CAPÍTULO II

**QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA A
CLASSIFICAÇÃO DE VARIEDADES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.),
NIBS E CHOCOLATES PRODUZIDOS NA REGIÃO SUL DA BAHIA
UTILIZANDO ANÁLISE MULTIVARIADA**

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE VARIEDADES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.), NIBS E CHOCOLATES PRODUZIDOS NA REGIÃO SUL DA BAHIA UTILIZANDO ANÁLISE MULTIVARIADA

Tássia Cavalcante Pires¹, Leonardo Fonseca Maciel², Sergio Eduardo Soares³,
Eliete da Silva Bispo⁴

¹Discente do curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos do departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, CEP: 40171-970, Salvador, BA, Brasil

²Co-orientador. Dr. em Ciência de Alimentos

³Docente do curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos do departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia.

⁴Orientadora. Profa. Dra. em Tecnologia de Alimentos

RESUMO

O interesse pelos compostos bioativos do cacau (*Theobroma cacao* L.) tem aumentado devido a sua capacidade antioxidante e benefícios relacionados à saúde. A exploração da cultura do cacau é realizada com interesse nos seus derivados, entre eles o chocolate. A Bahia é o maior produtor de amêndoas de cacau do Brasil e vem tentando após período de crise se posicionar no mercado especializado através de plantações monoclonais visando agregar valor ao produto final e a produção de chocolate varietais, finos e/ou *gourmet*. Dessa forma este trabalho teve como objetivo quantificar compostos bioativos e atividade antioxidante de cinco variedades (SR162, PH16, BN34, CEPEC2002 e TSH1188) de sementes de cacau, nibs e chocolate e classifica-los aplicando técnicas estatísticas multivariadas. O teor de compostos fenólicos totais, flavonóides, antocianinas, cafeína, teobromina, catequina e epicatequina e as atividades antioxidantes DPPH, FRAP e CUPRAC foram determinados nas variedades de cacau, nibs e chocolate. Os resultados da Análise de Componentes Principais, ANOVA e Teste de Tukey ($p < 0,05$) mostraram diferenças significativas entre as amostras. Existe uma variação considerável entre as variedades analisadas quanto ao seu teor em compostos bioativos e atividade antioxidante. A variedade SR162 de cacau, nibs e chocolate apresentaram menores valores para compostos fenólicos totais (91,67 mg.g⁻¹, 48,75 mg.g⁻¹, 82,87 mg.g⁻¹) catequina (<LQ em todas as matrizes), epicatequina (1,87 mg.g⁻¹, <LQ no nibs e chocolate), ácido gálico (1,33 mg.g⁻¹, <LQ no nibs e chocolate), cafeína (1,33 mg.g⁻¹, <LQ no nibs e chocolate), flavonóides (13,37 mg.g⁻¹, 10,04 mg.g⁻¹, 1,54 mg.g⁻¹), antocianinas (28,2 µg.g⁻¹, 90,77 µg.g⁻¹, 130,3 µg.g⁻¹) e maior valor de DPPH (82,9 µg.mL⁻¹, 66,6 µg.mL⁻¹, 67,3 µg.mL⁻¹) por precisar de uma maior quantidade de amostra para exercer a atividade antioxidante. A variedade TSH1188, em todas as matrizes, apresentou os valores mais altos de compostos fenólicos totais (143,73 mg.g⁻¹, 90,22 mg.g⁻¹, 134,29 mg.g⁻¹), catequina (2,9 mg.g⁻¹, 1,98 mg.g⁻¹, 1,58 mg.g⁻¹), epicatequina (4,6 mg.g⁻¹, 3,05 mg.g⁻¹, 1,92 mg.g⁻¹), ácido gálico (15,24 mg.g⁻¹, 9,49 mg.g⁻¹, 3,69 mg.g⁻¹), cafeína (25,13 mg.g⁻¹, 16,97 mg.g⁻¹, 11,96 mg.g⁻¹), flavonóides (20,4 mg.g⁻¹, 13,13 mg.g⁻¹, 30,03 mg.g⁻¹), e atividade antioxidante FRAP (849 µmol.g⁻¹, 451,6 µmol.g⁻¹, 717,48 µmol.g⁻¹). O teor de teobromina apresentou maiores quantidades na variedade BN34 (15,24 mg.g⁻¹, 12,36 mg.g⁻¹, 11,91 mg.g⁻¹) e menores na CEPEC2002 (11,14 mg.g⁻¹, 8,38 mg.g⁻¹, 7,17 mg.g⁻¹) de todas as

amostras analisadas. A análise de PCA mostrou que as variedades têm características relacionadas com a sua composição em compostos bioativos, classificando quatro grupos bem definidos, pois as variedades BN34 e PH16 tiveram características semelhantes. Concluindo que os chocolates monovarietais dessas variedades possuem características relativas aos compostos bioativos diferentes, contribuindo assim na produção de chocolates *gourmet*, podendo conquistar novos nichos de mercado.

Palavras-chave: compostos fenólicos, metilxantinas, antioxidantes, quimiometria.

1. INTRODUÇÃO

Há várias décadas sabe-se que as sementes do cacau (*Theobroma cacao* L.), apresentam elevado teor de polifenóis, entre 12 e 20% de seu peso seco e desengordurado, considerado bastante elevado em comparação a outros vegetais (SANCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003; BRITO, 2000; SANBONGI *et al.*, 1998; KIM; KEENEY, 1984). Esses compostos têm sido estudados devido à influência negativa que exercem no sabor, conferindo o amargor e a adstringência verificados em produtos obtidos a partir do cacau (BRITO, 2000; SOARES, 2001), por outro lado, descobertas mais recentes sobre os efeitos benéficos desses compostos à saúde humana têm provocado interesse em mantê-los durante o processamento dos produtos, sem causar prejuízo no sabor (KEALEY *et al.*, 1998; KEALEY *et al.*, 2004; EFRAIM, 2004; RIZO, 2006).

Segundo Bruinsma e Taren (1999) as metilxantinas, como teobromina e cafeína, são outro grupo de compostos bioativos encontrados nas sementes de cacau. Esses alcalóides têm efeito estimulante no sistema nervoso central. No cacau e no chocolate, a metilxantina predominantemente encontrada é a teobromina, seguida da cafeína, em quantidades menores (ROZIN *et al.*, 1991). Segundo Wakao (2002), os teores finais de teobromina e cafeína estão relacionados com o genótipo de cacau, o grau de maturidade das amêndoas e o nível de fermentação.

O cacau pertence à família das Malvaceae e ao gênero *Theobroma* (PRABHAKARAN NAIR, 2010). O gênero tem vinte e duas espécies das quais *Theobroma cacao* L. é comercialmente o mais importante devido ao valor de suas sementes (BARTLEY, 2005; CACAONET, 2012). Os grãos de cacau são as sementes fermentadas e secas, e é o ingrediente fundamental na fabricação de chocolate (WOOD; LASS, 1985; ASIEDU, 1989; AFOAKWA *et al.*, 2008; AFOAKWA, 2010; ADEYEYE *et al.*, 2010). Por muitos anos, a produção e a comercialização de

cacau têm sido à base da economia em alguns estados brasileiros e particularmente na Bahia (ICCO, 2012).

Diferentes grupos de *T. cacao* L. são comumente empregados: Criollo, Forastero e Trinitário (o último é um grupo cruzado entre ambos (CALIGIANI *et al.*, 2007). Os grupos de cacauzeiros existentes no sul da Bahia são principalmente cacau Forasteros, introduzido há mais de 260 anos e cultivado nesta região (MELLO; GROSS, 2013). Estes cultivares apresentam algumas semelhanças e diferenças na aparência das sementes, rendimento de cacau, resistência a pragas e doenças, concentrações de acidificação (pH e acidez), bem como características de sabor, intensidade e adstringência (WOOD; LASS, 1985; AFOAKWA *et al.*, 2008; KRATZER *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2011). No entanto, o indicador de qualidade sensorial mais importante das sementes de cacau é a quantidade e o tipo de compostos voláteis (MAGI *et al.*, 2012; KRÄHMER *et al.*, 2015) e o indicador de qualidade funcional são os compostos bioativos.

O Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC), que faz parte da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) reorientou seu programa de melhoramento genético para o desenvolvimento de variedades resistentes a vassoura de bruxa, e passou a enfatizar métodos de seleção recorrente, visando acumular genes de resistência e de outros caracteres de interesse agrônomo em um material para posteriormente disponibilizá-lo como variedade (PEREIRA, 2001).

Recomendações agrônomicas feitas por Leite *et al.* (2012) para a produção de lavouras monoclonais, vem gerando oportunidade econômica para a melhor comercialização do cacau monovarietal, já que cada variedade tem perfil sensorial único, possibilitando a produção chocolates com aromas e sabores peculiares e exclusivos associados ao liquor produzido a localização geográfica específicas, levando a possibilidade de denominar geograficamente o produto chocolate como já se faz amplamente com outras cadeias agro alimentares, como a produção de vinhos (MANDARINO *et al.*, 2009).

A região cacaueira da Bahia é o principal pólo de produção da cacauicultura nacional, sendo responsável por 53,4% da produção total de cacau no país (IBGE, 2017). Em função da crise os cacauicultores baianos vêm buscando alternativas para agregar maior valor ao produto final de cacau, como plantações de cacau monoclonais, buscando novos nichos de mercado como o de orgânico, fino,

gourmet e/ou especial; a inovação tecnológica; e as certificações sócio ambientais (BRASIL, 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define chocolate como o produto obtido a partir de uma mistura de derivados do cacau (*Theobroma cacao L.*), massa de cacau (ou pasta ou licor), cacau em pó e manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo pelo menos 25% ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) de sólidos totais de cacau (BRASIL, 2005). O processo convencional de fabricação de chocolate envolve, em sequência, as etapas de mistura dos ingredientes, refino, conchagem, temperagem, moldagem, resfriamento, desmoldagem e embalagem (BECKETT, 2009). Chocolate fino é produzido com grãos de cacau finos ou sabor especial, também conhecidos como chocolate gourmet. Essas categorias de grãos de cacau são produzidas a partir de cacau Criollo ou Trinitario e possuem características de sabor: notas frutadas, florais, herbais e de madeira, notas de nozes e caramelo. O chocolate varietal é aquele produzido com sementes de cacau oriundas de regiões geográficas e populações varietais (cultivares) específicas, sendo que o sabor destas sementes é fortemente influenciado pelo meio ambiente onde é produzido, o que imprime a todos esses produtos uma verdadeira identidade de origem (LUNA *et al.*, 2002).

Assim, o objetivo desse trabalho foi quantificar compostos bioativos e atividade antioxidante de cinco variedades de sementes de cacau, nibs e os chocolates produzidos e classifica-los aplicando técnicas estatísticas multivariadas, buscando agregar valor sensorial com aromas peculiares e sabores únicos para cada chocolate monovarietal contribuindo para produção de chocolate tipo fino ou *gourmet*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

As amostras de cacau foram obtidas de uma fazenda no sul da Bahia (Ibirataia-Ba) localizada no Nordeste do Brasil ($14^{\circ}41'96''\text{S}$ e $39^{\circ}12'109''\text{W}$) sob clima tropical durante o período de novembro / 2014 e janeiro / 2015. Utilizaram-se frutos saudáveis, maduros e selecionados, com base na produtividade, qualidade tecnológica e resistência à doença vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), indicada pela Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira (CEPEC /

CEPLAC) como variedades de cacau com características de cacau fino. As variedades estudadas foram: CEPEC2002 (híbrido de cruzamento entre Forastero Amazônico e Trinitário), PH16 (híbrido de cruzamento entre Forastero Amazônico e Trinitário), TSH1188 (híbrido de cruzamento entre Forastero Amazônico e Trinitário), BN34 (híbrido de origem desconhecida) e SR162 (originado de uma mutação genética do Forasteiro / classificado como subvariedade do Catongo). Foram produzidos três lotes de chocolates, a partir de lotes distintos de cacau. Todas as amostras foram analisadas em três repetições em triplicatas. As amostras de cacau, nibs e chocolate foram submetidas ao mesmo processamento. Os chocolates foram produzidos em uma indústria localizada na região de Uruçuca, sul da Bahia.

2.2. Prova de corte e Umidade

A análise da qualidade das amêndoas de cacau fermentadas e secas foi realizada através do teste de corte longitudinal de 300 amêndoas de cacau coletadas de cada lote de cacau aleatoriamente. Foram avaliadas as propriedades físicas das amêndoas como a umidade, aspecto externo, aroma, presença de mucilagem e detritos, e de material estranho, coloração e compartimentação. Esta avaliação teve como base na Resolução nº 160/1988, do Conselho Nacional do Comércio Exterior (CONCEX). O teor de umidade foi determinado por gravimetria, utilizando estufa (NOVA ÉTICA) com circulação de ar a temperatura de 105°C até peso constante de acordo com o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008).

2.3. Pré-processamento do cacau

As temperaturas na área de cultivo durante o período de maturação dos frutos foram de 14° e 28°C, respectivamente, a umidade relativa entre 90 e 95% e a precipitação entre 200 e 300 mm. Os grãos de cacau foram pré-selecionados, transportados à temperatura ambiente e a fermentação foi realizada em caixas de madeira padrão em condições controladas (sementes com polpa durante 5 dias em caixas de madeira de 120L), seguido pelo processo de secagem em superfícies de telhado solar até 8,0% de umidade conforme parâmetros de qualidade do produtor.

2.4. Elaboração dos chocolates

Os grãos fermentados e secos (cerca de 16 kg) foram submetidos ao processo de torrefação em torrador elétrico rotativo (Jaf Inox, TX, São Paulo, Brasil) iniciando a $90^{\circ}\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e finalizando a $120^{\circ}\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por uma hora e vinte minutos.

As amostras de chocolate com alto teor de cacau foram produzidas segundo a formulação: massa de cacau (66,0%), manteiga de cacau (4,0%), açúcar (29,60%) e lecitina (0,4%). Após a torração os lotes de cacau foram encaminhados a uma descascadeira onde houve fragmentação e remoção da casca e germe obtendo o nibs de cacau. Os nibs foram moídos em moedor de facas (Jaf Inox, FX, São Paulo, Brasil), com açúcar adicionado nesta fase. A pasta de cacau foi então refinada em moinho de cinco rolos (Jaf Inox, MX, São Paulo, Brasil), produzindo uma pasta de cacau com uma granulação adequada ($20\mu\text{m}$) para a confecção de chocolate. A pasta refinada foi submetida a conchagem em concha horizontal a 70°C por 24 horas. A manteiga de cacau e lecitina foram adicionados durante esta fase. O chocolate foi transportado para uma máquina de temperagem (plataforma de agitação) onde foi mantido até alcançar 42°C , na qual é a temperatura ideal para formação dos cristais estáveis da manteiga de cacau. As amostras de chocolate foram moldadas em moldes de polietileno retangulares, obtendo barras de 5g e 1kg. Seguiu para a mesa vibratória e após foram arrefecidas, embaladas e mantidas a 18°C .

2.5. Extração de compostos fenólicos

Para extração dos compostos fenólicos as amostras foram desengorduradas com éter de petróleo na proporção 1:2. A extração foi realizada com solução metanol: água (80:20 v/v) de acordo com Oliveira *et al.* (2011). Pesou-se 100mg de cada amostra, previamente trituradas, em tubos e foram adicionados 10mL do solvente. Os tubos foram agitados no vórtex (Phoemix, modelo AP-56) durante 5 minutos e, em seguida, centrifugados a 5699 xg em centrífuga (Mikro 220R, Lettich zenthifugen) por 25 minutos. O extrato foi filtrado em filtro de papel (Qualy 11,0 J.Prolab) e armazenado em tubo de Falcon em ambiente refrigerado.

2.6. Quantificação de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada usando o método de Folin-Ciocalteu descrito por Swain e Hillis (1959) e citado por Roesler *et al.* (2007).

A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada utilizando uma curva padrão preparada com epicatequina (EC), $R^2= 0,9933$, nas concentrações 6, 4,8, 4,2, 3,6, 3, 2,4, 1,8, 1,2, 0,6 mg.mL⁻¹. Para a reação de Folin-Ciocalteu, utilizou-se uma alíquota do 0,5mL do extrato (concentração 10mg.ml⁻¹), adicionando 2,5mL do reagente a 10% e 2,0ml da solução de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada ao abrigo da luz durante 2 horas, e a absorvância foi medida a 760nm no espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51).

2.7. Flavonóides totais

A quantificação dos flavonoides foi realizada de acordo Lee *et al.*, 2003. Para realizar a reação 1mL do extrato fenólico foi transferido para um balão volumétrico de 10mL contendo 4mL de água deionizada. Em seguida, foi adicionado 0,3mL de solução de nitrito de sódio 5%. Depois de cinco minutos, 0,3mL de solução de cloreto de alumínio 10% foi acrescentado. Após um minuto, 2mL de hidróxido de sódio 1M foi adicionado e completado o volume com água destilada. A quantidade de flavonóides em cada extrato foi quantificada usando uma curva padrão preparada com epicatequina $R^2=0,9942$, nas concentrações 0,4, 0,32, 0,28, 0,24, 0,20, 0,16, 0,12, 0,08, 0,04 mg.mL⁻¹. Subsequentemente, a absorvância foi medida a 510nm no espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51).

2.8. Antocianinas

A extração e quantificação dos pigmentos foram realizadas pelo método descrito por Teixeira *et al.* (2008). As amostras foram previamente trituradas e pesadas correspondendo a 5,0g em todas as amostras, adicionados posteriormente 80mL de uma mistura de solvente extrator metanol:água (70:30) e em seguida adicionado ácido clorídrico suficiente para ajustar o pH do meio para 2,0. O material foi deixado em repouso por 24 horas a 5°C, ao abrigo da luz, e prensado manualmente em papel de filtro, posteriormente, transferido para balão volumétrico de 100mL, tendo seu volume completado com o solvente extrator, formando o Extrato Concentrado. Para a quantificação foi utilizado o método do pH diferencial, utilizando espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51), efetuando as leituras em comprimento de onda de 535nm. O conteúdo total de antocianinas foi expresso em mg de antocianinas.100g⁻¹ de cacau. O Coeficiente de Extinção médio (E1% 1cm) de diversas antocianinas foi utilizado, adotando-se 873 e 775

respectivamente para os pH 1,0 e pH 4,5 (FULEKI & FRANCIS, 1968a). A solução pH 1,0 foi preparada a partir da mistura de soluções de cloreto de potássio (0,2M) e ácido clorídrico (0,2M) na proporção (27:73). O tampão pH 4,5 foi preparado a partir de solução de acetato de Sódio (1M) e água na proporção (40:60), e HCl (o suficiente para ajustar o meio para pH 4,5). Alíquotas de 12,5mL e 5mL de extrato concentrado foram transferidas para balões volumétricos de 25mL e 10mL, respectivamente, tendo seus volumes completados com as soluções tampões pH 1,0 nos balões de 25mL e com a solução pH 4,5 nos balões de 10mL.

O cálculo do teor de Antocianinas Totais por 100 gramas da amostra avaliada foi obtido de acordo com a fórmula a seguir, adaptando-se o valor de DO para a diferença de leitura entre os dois métodos de pH.

$$AntT_{mg \frac{Ant}{100g} Amostra} = \frac{DO_{535nm}^* \times V_{E1} \times V_{E2} \times 1000}{V_{Alq} \times m \times E_{1cm}^{1\%}}$$

Onde,

DO: Densidade ótica do extrato diluído;

V_{E1} : Volume total do extrato concentrado;

V_{E2} : Volume total do extrato diluído;

V_{Alq} : Volume da alíquota utilizado na diluição do extrato concentrado;

m: Massa da amostra;

$E_{1cm}^{1\%}$: Coeficiente de Extinção médio.

2.9. Atividade antioxidante

2.9.1. Método de DPPH

O método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) seguiu o procedimento descrito por Roesler *et al.*, 2007. Para avaliar a atividade antioxidante, 0,5mL dos extratos obtidos na concentração de 10mg.mL⁻¹ foi submetidos a reação com 3,5mL do radical DPPH em solução metanólica de 0,004% m.v⁻¹. A redução do radical do DPPH foi medida através do monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517nm por 30 minutos, ao abrigo da luz, até valores estáveis de absorção. A absorbância foi convertida em porcentagem da atividade antioxidante.

$$\%Inibição = ((A_{DPPH} - A_{Extr}) / A_{DPPH}) * 100$$

Nessa fórmula, o A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH e o A_{Extr} é a absorvância do extrato na solução. A capacidade antioxidante de cada amostra (IC50) é expressa como a concentração em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato requerida para consumir (decrecer a concentração inicial) de DPPH em 50%.

2.9.2. FRAP

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 como segue: 2,5mL de uma solução 10mM de TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine) em HCl 40mM e adicionados a 2,5mL de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 25mL de tampão acetato 0.3mM pH 3.6. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para a avaliação da atividade antioxidante, 2,7mL do reagente FRAP preparado previamente, foi misturado com 270 μL de água destilada e 20 μL da amostra. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C, por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm no espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV-M51). A atividade antioxidante em cada extrato foi quantificada usando uma curva padrão preparada com solução de sulfato ferroso $R^2=0,992$, e os resultados expressos em μM sulfato ferroso/g de amostra.

2.9.3. CUPRAC

A capacidade antioxidante de redução do cobre CUPRAC (foi determinada de acordo com o método de Apak *et al.* (2008). Resumidamente, uma alíquota de 50 μL do extrato foi misturado com 1mL de cada solução: solução de CuCl_2 (1.0×10^3 mol/L), solução alcoólica de neocupraína (7.5×10^3 mol/L), solução tampão de NH_4Ac (1 mol/L, pH 7.0), e 1 mL de água para completar o volume final de 4,1 mL. A absorvância foi medida contra um branco (água ultra pura) depois de 30 min de reação. O valor de CUPRAC das misturas foi quantificado usando uma curva de calibração $R^2=0,9899$ empregando Epicatequina (34,6 – 3000 $\mu\text{mol/L}$) como padrão, e os resultados serão expressos como $\mu\text{molEC/L}$.

2.10. Determinação de fenóis monoméricos e metilxantinas por HPLC

Para a análise quantitativa e qualitativa dos fenóis monoméricos e metilxantinas das amostras em estudo, foi utilizado o método descrito por Maciel *et al.* 2016, com algumas adaptações. 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 (4,6x 250 mm, 5 μ m). A coluna foi mantida a 30°C em todas as análises e os comprimentos de onda utilizados para detecção foram de 280 nm. Na análise em HPLC, os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os dos padrões puros. A fase móvel utilizada foi (A:B 85:15 v/v): água acidificada com ácido fosfórico 0,05% e metanol:acetonitrila na proporção 2:4 v/v isocrático com fluxo 0,4ml.min⁻¹.

2.10.1. Preparação da curva de calibração

Os padrões utilizados para este estudo foram: Compostos fenólicos (Catequina, Epicatequina e Ácido Gálico) e Metilxantinas (Teobromina e Cafeína). As soluções padrões de cafeína e ácido gálico foram preparadas em água ultrapura, catequina e epicatequina em metanol e theobomina em metanol: água ultrapura (80:20 v/v) e as curvas de calibração foram obtidas a partir de injeções em triplicatas de oito concentrações (2 mg.mL⁻¹-1000 mg.mL⁻¹).

2.11. Parâmetros do método de validação

Para verificar a confiabilidade dos resultados, foram selecionados alguns parâmetros de validação de métodos: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (recuperação) e robustez.

2.11.1. Linearidade

A análise de regressão linear foi realizada com a média de oito concentrações diferentes (n=3). A linearidade da curva de calibração para concentração versus as áreas dos picos da epicatequina, catequina, ácido gálico, cafeína e teobromina foi analisada por R (coeficiente de correlação) de 1. Portanto, a equação de regressão linear foi utilizada para calcular as concentrações de áreas de pico correspondentes aos compostos epicatequina, catequina, ácido gálico, cafeína e teobromina.

2.11.2. Precisão

A precisão foi avaliada pela determinação da repetibilidade intradia e da precisão intermediária (interdia), pela análise de amostras preparadas em um dia (intradiário) e amostras de cacau em três dias diferentes (interdia). As amostras foram fortificadas com epicatequina, catequina, ácido gálico, cafeína e teobromina em três repetições, extraídas, filtradas e injetadas na coluna de HPLC. Foi avaliada a precisão através do desvio padrão relativo, do tempo de retenção e da concentração, com base nas áreas dos picos dos compostos epicatequina, catequina, ácido gálico, cafeína e teobromina (BONFATTI *et al.*, 2008).

2.11.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção foi expresso como: $LOD = 3,3 * \sigma / S$, onde σ é a estimativa do desvio padrão dos coeficientes lineares das equações (interceptação y) e S é a inclinação da curva analítica. Para calcular estes dados, foi desenvolvida uma curva analítica utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção, foram obtidas curvas analíticas, na faixa de concentração de 0,2-30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o limite de quantificação, foram utilizados os mesmos critérios de LOD, sendo calculado utilizando a razão entre a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e o declive da curva de calibração (S), a partir da equação: $LOQ = 10 * \sigma / S$ (ICH 2005).

2.11.4. Seletividade

A seletividade foi demonstrada pela ausência de qualquer pico de interferência na região do tempo de retenção dos compostos epicatequina, catequina, ácido gálico, cafeína e teobromina.

2.11.5. Robustez

As variáveis utilizadas para avaliar a robustez durante a injeção da amostra foram: temperatura do forno e proporção da fase móvel. Cada parâmetro foi realizada três variações e cada experimento foi realizado em três repetições. O desvio padrão relativo do tempo de retenção e da concentração com base nas áreas dos picos dos compostos epicatequina, catequina, ácido gálico, cafeína e teobromina foram utilizados para avaliar a robustez.

2.12. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a Análises de Variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de significância de modo a investigar semelhança entre as variedades. Foi empregada também a análise multivariada que utilizou os métodos, técnicas e, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos para identificação e discriminação das variedades. Para a análise de componentes principais (PCA) foi realizado uma pré-seleção dos dados para utilizar como parametro de classificação das variedades e foi utilizada a matriz de correlação. Foi selecionada a matriz chocolate e as análises de compostos fenolicos, flavonoides e FRAP. O autoescalamto foi empregado como pré-processamento dos dados. Para a obtenção do dendrograma foram utilizadas a distância euclidiana e o método de conexão incremental, utilizando-se o software MINITAB 17 para tratar os dados e plotar os gráficos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de corte das amostras de cacau baseada pela CONCEX, todas as amêndoas foram classificadas como tipo I, classe A pelo peso médio superior a 1g e como “BOA” segundo a qualidade dos frutos, devido a seu bom aspecto externo, aroma natural de cacau, ausência de mofo interno e defeitos. A amostra TSH1188 foi a única na qual não havia 50% das amêndoas analisadas fermentadas. Não foram encontradas amostras infestadas. Havia amêndoas germinadas nas amostras TSH1188 e PH16 e achatadas nas amostras BN34 e TSH1188.

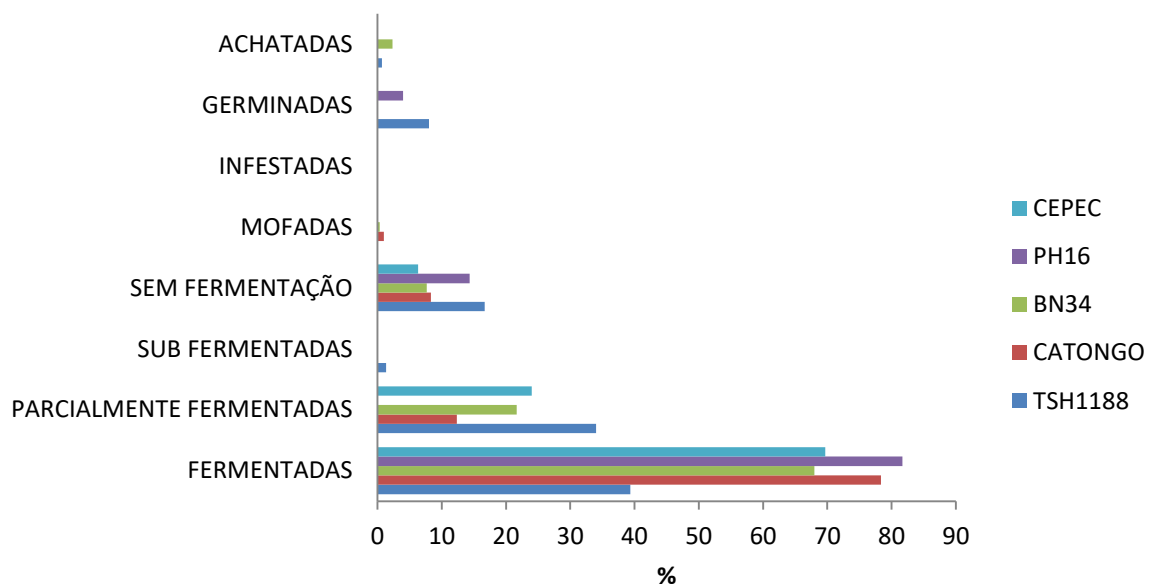


Figura 0120- Resultado do teste de cortes das cinco variedades de cacau (CEPEC2002, PH16, BN34, CATONGO E TSH1188).

A umidade das amêndoas após secagem diferiu entre as variedades, sendo a amostra CEPEC2002 a que foi encontrado o maior valor de umidade, correspondente a 9% e o menor valor de umidade foi de 6,79% pertencente a variedade BN34. As variedades TSH1188, PH16 E SR162 tiveram umidade de 7,05%, 7,88% e 7,42%, respectivamente. Pelo artigo 11 da resolução normativa a umidade deverá ser obrigatoriamente determinada, mas não será considerada para efeito de enquadramento do produto em Tipo, sendo recomendado para fins de comercialização da amêndoa de cacau o percentual máximo de 8,00% para os Tipos 1 e 2; e 9,00% para o Tipo 3 e Fora de Tipo. Em trabalhos realizados por Cruz (2002) foram encontrados para amêndoas secas, do grupo Forastero, 5,07% de umidade. Efraim (2009), analisando 10 variedades de cacau, encontrou para amêndoas fermentadas e secas, percentuais de umidade que variaram de 5,80% a 6,78%. Leite *et al.* (2013) analisou as variedades SR162 e PH16 onde os valores de umidade encontrados foram 7,38% e 8,3%, respectivamente, valores próximos aos encontrados nesse estudo. Todas as variedades alcançaram umidade esperada após torrefação para produção de chocolate, que é de até 1,2%.

Os diferentes teores de umidade citados nos outros dois trabalhos são decorrentes dos tempos de fermentação e secagem aplicados que variam conforme quem a realizou. No estudo realizado por Cruz (2002) esses períodos não são mencionados e no estudo realizado por Efraim (2009) o período do processo fermentativo foi de 6 a 7 dias e o da secagem de 5 a 7 dias até umidade inferior a 8,0%.

Os resultados encontrados para o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides, antocianinas, DPPH, FRAP, CUPRAC estão apresentados na tabela 1.

Tabela 01 - Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante nas cinco variedades de cacau, nibs e chocolate.

VARIETADES	Com. Fenólicos mg.g ⁻¹	Flavonoides mg.g ⁻¹	Antocianinas µg.g ⁻¹	DPPH µg.mL ⁻¹	FRAP µmol.g ⁻¹	CUPRAC µmol.L ⁻¹
CACAU						
SR162	91,67 ^{Aa}	13,37±0,8 ^{Aa}	28,2±3,29 ^{Aa}	82,9±01,5 ^{Aa}	490,63±9,47 ^{Aa}	19,26±1,41 ^{Aa}
CEP.2002*	139,36±2,87 ^{Ba}	18,52±0,07 ^{BCa}	95,36±0,56 ^{BCa}	66,8±0,1 ^{Ba}	814,5±31,3 ^{Ca}	29,29±0,76 ^{ABa}
PH16	141,66±6,01 ^{Ba}	17,64±0,35 ^{BCa}	112,16±7,73 ^{Ca}	66,9±0,02 ^{Ba}	698,22±21,7 ^{Ba}	28,57±2,55 ^{Ba}
BN34	132,00±4,21 ^{Ba}	15,73±0,12 ^{ABa}	105,87±0,79 ^{Ca}	66,6±0,1 ^{Ba}	723,8±23,8 ^{Ba}	31,86±2,04 ^{ABa}
TSH1188	143,73± 11,67 ^{Ba}	20,4±2,29 ^{Ca}	65,61±4,19 ^{Ba}	66,8±0,2 ^{Ba}	849,7±15,52 ^{Ca}	27,01±1,26 ^{Ba}
NIBS						
SR162	48,75±0,48 ^{Ab}	10,04±0,07 ^{Ab}	90,77±11,81 ^{ABb}	66,6±0,2 ^{Ab}	208,78±11,48 ^{Ab}	7,06±0,49 ^{Ab}
CEP.2002*	76,07±4,47 ^{Bb}	11,57±0,17 ^{ABb}	91,47±10,37 ^{ABa}	66,9±0,1 ^{Aa}	422,1±30,4 ^{Cb}	9,18±0,77 ^{ABb}
PH16	75,38±10,06 ^{BCb}	12,63±2,12 ^{ABb}	104,96±5,77 ^{ABa}	68,1±0,2 ^{Aa}	353,04±11,55 ^{Bb}	8,81±2,94 ^{ABb}
BN34	71,90±5,51 ^{BCb}	11,37±0,5 ^{ABb}	117,15±13,60 ^{Ba}	66,9±0,4 ^{Aa}	356,42±12,35 ^{Bb}	9,23±1,091 ^{ABb}
TSH1188	90,22±3,26 ^{Cb}	13,13±0,52 ^{Bb}	80,11±15,20 ^{Aa}	66,9±0,1 ^{Aa}	451,6±20,8 ^{Cb}	11,9±1,59 ^{Bb}
CHOCOLATE						
SR162	82,87±5,37 ^{Aa}	19,54±1,75 ^{Ac}	130,3±0,75 ^{Ab}	67,3±0,1 ^{Ab}	467,11±15,22 ^{Aa}	15,62±1,23 ^{Ac}
CEP.2002*	86,96±9,22 ^{Ab}	22,32±1,44 ^{Ac}	191,89±15,94 ^{Bb}	67,3±0,1 ^{Bb}	702,5±21,8 ^{Cc}	25,72±1,88 ^{Cc}
PH16	111,28±4,27 ^{BCc}	21,10±1,12 ^{Aa}	200,07±0,16 ^{Bb}	67,4±0,1 ^{Ba}	517,94±13,80 ^{Bc}	18,25±1,35 ^{ABc}
BN34	109,16±1,93 ^{Bc}	21,86±1,44 ^{Ac}	198,24±4,43 ^{Bb}	67,2±0,2 ^{Ba}	555,4±27,1 ^{Bc}	19,84±0,42 ^{Bc}
TSH1188	134,29±13,15 ^{Ca}	30,03±2,21 ^{Bc}	236,51±19,49 ^{Cb}	67,9±0,2 ^{Bb}	717,48±4,49 ^{Cc}	21,88±1,94 ^{BCc}

*

Letras maiúsculas diferentes representa diferença estatística significativa para teste de Tukey (p<0,05) entre as variedades dentro das matrizes. Letras minúsculas diferentes representa diferença estatística significativa para teste de Tukey (p<0,05) entre matrizes de uma mesma variedade.

O teor de compostos fenólicos totais variaram de 91,67 a 143,73, 48,75 a 90,22 e 82,87 a 134,29 mgEC.g⁻¹ em cacau, nibs e chocolate, respectivamente, sendo os maiores valores encontrados na variedade TSH1188 e os menores no SR162. Algumas variedades apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas. A variedade TSH1188 também apresentou o maior valor para flavonóides 20,4, 13,13 e 30,03 mgC.g⁻¹ em cacau, nibs e chocolate, respectivamente. A variedade SR162 apresentou 66,83, 50,2 e 97,69 mgC.g⁻¹ em cacau, nibs e chocolate, nesta ordem, de flavonóides, sendo os menores valores entre as variedades. No cacau apenas a variedade SR162 diferiu estatisticamente das demais em relação aos compostos fenólicos totais, enquanto que no chocolate as variedades SR162 e CEPEC2002, PH16 e BN34 não diferiram entre si. Os compostos fenólicos diminuíram do cacau para o nibs, um comportamento já esperado devido ao processo de torração que degrada uma parte dos compostos fenólicos. Do nibs para o chocolate houve um aumento e isso pode se atribuir a quantidade de interferentes da formulação no chocolate. Era de se esperar uma redução visto que, no processamento do chocolate a fase de conchagem é realizada a temperatura em torno de 80°C por 12-24 horas o que ocasiona diversas reações dos compostos fenólicos como degradação, transformação em voláteis e emulsificação dos taninos. Assim através dessa análise em chocolates não se pode afirmar que houve aumento/formação de bioativos já que o chocolate possui constituintes na formulação que podem superestimar a concentração de fenólicos totais, já que a quantificação por esse método detecta uma grande parte dos agentes redutores além dos bioativos.

Leite *et al.* (2013) determinaram compostos fenólicos em massa de cacau e chocolate com alto teor de cacau a partir de cultivares de cacau resistentes à "doença da vassoura-de-bruxa" e não resistentes à doença (variedades SR162 e PH16) e encontraram valores de 23,95 a 25,78 mgC.g⁻¹ em cacau e 15,46 a 19,11 mgC.g⁻¹ em chocolates. Oliveira *et al.* (2011), encontraram valores que variaram de 221,82 a 233,32 mgAG.g⁻¹ em cacau e 289,43 a 301,43 mgAG.g⁻¹ em nibs. Ortega *et al.*, (2008) em estudo com a caracterização de compostos fenólicos em diferentes amostras de cacau e nibs encontrou valores de 259 mgC.g⁻¹ em cacau e 302,5 mgC.g⁻¹ em nibs, valores estes mais altos aos encontrados nesse trabalho. NIEMENAK *et al.* (2006), encontrou valores de compostos fenólicos totais que variaram de 103,00 a 143,60 mg.100g⁻¹ em cinco variedades de cacau fermentado

Vinson *et al.* (2006) nos EUA obteve resultados de 23.80mgC.g^{-1} de fenóis totais em chocolate com alto teor de cacau e Cooper *et al.* (2008) na Suíça encontrou $23,40\text{mg}_{\text{ECE.g}^{-1}}$ em chocolate. Meng *et al.* (2009) encontrou $5,78\text{mgC.g}^{-1}$ em chocolate na Malásia. Efraim *et al.* (2006), com sementes de cacau fermentadas encontraram valores que variaram de 86.75 a 149.49 mgC.g^{-1} , valores estes semelhantes ao encontrados nesse trabalho.

Oliveira *et al.* (2011) encontraram concentrações de flavonoides 168,8 a $173,63\text{ mgEC.g}^{-1}$ em cacau e 211,89 a $214,03\text{ mgEC.g}^{-1}$ em nibs. Maciel *et al.* (2016) analisando onze variedades de cacau obteve concentração de flavonoides que variaram de $40,94\text{ mgEC.}100^{-1}\text{g}$ a $234,07\text{ mgEC.}100^{-1}\text{g}$, ambos resultados diferentes aos encontrados nesse estudo.

Vale ressaltar que a variação dos valores encontrados nos demais trabalhos em relação a esse se deve ao fato da utilização de padrões diferentes em cada estudo para quantificação dos fenólicos totais. É reportado na literatura por WOLLGAST e ANKLAM (2000) que a epicatequina é o fenol monomérico mais abundante nessa matriz representando cerca de 35% do conteúdo fenólico total. Outro ponto importante a ser considerado é o pré-processamento (fermentação, secagem e torrefação) de cacau, que, de acordo com alguns autores, reduz a concentração deste tipo de compostos (ADAMSON *et al.*, 1999; STAHL *et al.*, 2009). Além disso, variadas regiões com condições específicas podem resultar em frutos com diferentes características para a produção de chocolate. Os valores relatados reafirmam que cada região apresenta características edafoclimáticas distintas resultando em frutos com características próprias.

Os valores de antocianinas variaram de 22,8 a $112\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ em cacau, 80,11 a $117,15\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ em nibs e 130,2 a $236,51\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ em chocolate. Na variedade Catongo foi encontrado menor valor no cacau e chocolate e no Nibs o variedade TSH1188. Os variedades BN34 e TSH1188 no nibs diferiram estatisticamente e os variedades BN34, PH16 E CEPEC 2002 não diferiram estatisticamente no chocolate. NIEMENAK *et al.* (2006), avaliou o teor de antocianinas de cinco variedades de cacau de Camarões, encontrando níveis que variaram entre 79 e $2817\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$. Estudos realizados por Maciel *et al.* (2017) em doze variedades de cacau encontraram teores de antocianinas que variaram de 58,98 a $953,71\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$. Os teores de antocianinas foram maiores no chocolate seguidos do nibs e cacau, respectivamente.

A atividade antioxidante frente ao radical DPPH (hidrazil 2,2-difenil-1-picril) foi determinada por IC50, ou seja, a concentração de amostra necessária para inibir 50% da atividade máxima do radical livre. Os valores das IC50 neste trabalho variaram de 66,6 a 82,9, 66,6 a 68 e 67,2 a 67,9 μg de amostra. mL^{-1} em cacau, nibs e chocolate, respectivamente. O maior valor encontrado foi no cacau SR162 indicando que ele possui uma menor capacidade antioxidante perante as outras variedades e assim necessita de uma maior quantidade de amostra para inibir 50% da atividade do radical livre. A variedade SR162 foi a única que diferiu estatisticamente dentro da matriz cacau e chocolate das demais variedades. Entre as matrizes as variedades TSH1188 e CEPEC2002 difeririam nas amostras de chocolate e a variedade SR162 diferiu nas amostras de cacau. Notou-se que as amostras com menores valores de fenólicos obtiveram maiores valores de DPPH, confirmando assim que quanto menor o teor de fenólicos menor é a atividade antioxidante da amostra.

Arlorio *et al.* (2008) realizaram estudo sobre o impacto da torração na atividade antioxidante em diferentes variedades de cacau e encontraram valores entre 26,54 a 34,76 μg de amostra. mL^{-1} . 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 verificaram que na análise de DPPH, o chocolate que apresentou maior potencial antioxidante era proveniente do cultivar SR162 igualmente aos resultados desse trabalho. Oliveira *et al.* (2011) em estudos com cultivo convencional e orgânico encontraram valores de 4,22 a 5,29 μg de amostra. mL^{-1} em nibs e 7,67 a 9,87 μg de amostra. mL^{-1} em liquor de cacau, valores estes menores aos encontrados nesse estudo.

Na análise através do método FRAP, em que foi monitorada a formação do complexo Fe^{2+} - TPTZ espectrofotometricamente, foi detectado 490 a 849,7 μmol $\text{Fe}^{++} \cdot \text{g}^{-1}$ de cacau, 208,20 a 451,6 μmol $\text{Fe}^{++} \cdot \text{g}^{-1}$ de nibs e 467,1 a 712,46 μmol $\text{Fe}^{++} \cdot \text{g}^{-1}$ de chocolate. A análise pelo método FRAP possui a limitação em que o sistema deve ser aquoso (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Outra desvantagem é que o método não pode detectar compostos que agem por meio da doação de átomos de hidrogênio, particularmente tióis, como a glutatona, e proteínas, o que pode levar a subestimação da capacidade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Todorovic *et al.* (2015), analisaram chocolates de diferentes marcas e teores de cacau 65 e 70% e encontrou valores entre 130,3 e 151,4 μM $\text{TE} \cdot \text{g}^{-1}$, este

estudo apresenta valores com diferente margem devido ser expressos em Trolox e não sulfato ferroso. Podendo apontar mais uma vez a influência das variedades dos cultivares e do pré-processamento e processamento de fabricação aos quais os chocolates foram submetidos em ambos os estudos. Ioannone *et al.* (2015) estudaram o efeito da torração em diferentes tempos e temperaturas nos teores de antioxidantes e encontraram valores entre 250 a 500 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$, valores estes semelhantes ao encontrados nesse estudo.

A análise da atividade antioxidante pelo método CUPRAC determinou a habilidade da amostra reduzir o complexo cobre-neocuproina (Cull-Nc). Os resultados encontrados nesse trabalho variaram de 19,26 a 31,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 7,06 a 11,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 15,62 a 25,72 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ nas amostras de cacau, nibs e chocolate, respectivamente. Os resultados no cacau foram superiores ao nibs e chocolate e a variedade SR162 obteve o menor valor e a BN34 o maior valor em todas as matrizes. Não há na literatura trabalhos com essa análise em cacau, nibs ou chocolate para comparar os resultados.

Tabela 02 - Quantidade de fenóis monoméricos e metilxantinas nas cinco variedades de cacau, nibs e chocolate.

VARIETADES	FÉNOIS MONOMÉRICOS (mg.g^{-1})			METILXANTINAS (mg.g^{-1})	
	Ácido Gálico	Catequina	Epicatequina	Cafeína	Teobromina
CACAU					
SR162	1,33±0,03 ^D	<LQ	1,87±0,01 ^C	1,33±0,18 ^C	14,45±0,59 ^{Aa}
CEPEC 2002	10,23±0,08 ^{Ca}	2,38±0,30 ^{ABa}	4,33±0,06 ^{Aa}	2,56±0,32 ^{Ca}	11,14±0,79 ^{Ba}
PH16	12,42±0,54 ^{Ba}	2,21±0,01 ^{BCa}	3,08±0,05 ^{Ba}	23,10±0,35 ^{Aa}	14,44±0,58 ^{Aa}
BN34	9,83±0,05 ^{Ca}	1,61±0,01 ^{Ca}	3,97±0,06 ^{ABa}	10,35±0,90 ^{Ba}	15,24±0,05 ^{Aa}
TSH1188	15,24±0,05 ^{Aa}	2,90±0,10 ^{Aa}	4,6±0,52 ^{Aa}	25,13±2,04 ^{Aa}	13,38±0,23 ^{Aa}
NIBS					
SR162	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,73±0,06 ^{ABb}
CEPEC 2002	7,80±0,05 ^{Bb}	1,73±0,01 ^{Bab}	2,45±0,01 ^{Bb}	1,39±0,08 ^{Bb}	8,38±0,51 ^{Bb}
PH16	9,45±0,19 ^{Ab}	1,12±0,01 ^{Db}	1,97±0,01 ^{Cb}	12,65±1,79 ^{Ab}	10,07±0,03 ^{ABb}
BN34	6,63±0,04 ^{Cb}	1,32±0,02 ^{Cb}	1,52±0,2 ^{Db}	5,65±0,05 ^{Bb}	12,36±1,86 ^{Aa}
TSH1188	9,49±0,07 ^{Ab}	1,98±0,01 ^{Aab}	3,05±0,06 ^{Ab}	16,97±1,28 ^{Ab}	11,96±0,00 ^{Aab}
CHOCOLATE					
SR162	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8,67±0,32 ^{Bc}
CEPEC 2002	2,96±0,02 ^{Bc}	1,52±0,01 ^{Bb}	1,68±0,1 ^{Bc}	1,05±0,01 ^{Bb}	7,17±0,25 ^{Bb}
PH16	3,07±0,04 ^{Bc}	0,95±0,02 ^{Dc}	1,02±0,01 ^{Dc}	10,16±0,32 ^{Ab}	8,69±0,01 ^{Bb}
BN34	2,76±0,06 ^{Cc}	1,02±0,01 ^{Cc}	1,44±0,19 ^{Cc}	3,59±0,3 ^{Bb}	11,91±0,04 ^{Aa}
TSH1188	3,69±0,01 ^{Ac}	1,58±0,01 ^{Ac}	1,92±0,01 ^{Ab}	11,96±1,66 ^{Ab}	11,19±0,8 ^{Ab}

*Letras maiúsculas diferentes representa diferença estatística significativa para teste de Tukey ($p<0,05$) entre as variedades dentro das matrizes. Letras minúsculas diferentes representa diferença estatística significativa para teste de Tukey ($p<0,05$) entre matrizes de uma mesma variedade; LQ: limite de quantificação.

Os teores de cafeína variaram de 1,33 a 25,13 mg.g^{-1} de amostra, sendo que na variedade SR162 do nibs e chocolate, os valores encontrados foram abaixo do limite de quantificação. O clone que apresentou o maior teor dessa metilxantina (MX)

no cacau, nibs e chocolate foi TSH1188, correspondendo 25,13, 16,97 e 11,96 mg.g⁻¹ de amostra, respectivamente. Em todas as matrizes houve diferença significativa entre as variedades na qual TSH1188 e PH16, BN34 e CEPEC2002 não apresentaram diferenças entre si. O cacau de todas as variedades apresentaram diferença significativa comparando com nibs e chocolate, e estes não apresentaram diferença significativa entre si em uma mesma variedade. Maciel (2017) encontrou teores de cafeína que variaram de 83,29 a 244,30 µg.g⁻¹ nos clones TSH 1188 e PH 16 respectivamente. Deus (2015) encontrou valores de 1,6 a 2,33 mg.g⁻¹ em amostras de cacau submetidas a diferentes tipos de secagem e Leite *et al.* (2013) obtiveram valores de 0,02 a 0,9 µg.g⁻¹, ambos valores menores aos encontrados nesse estudo. A diferença pode estar relacionada ao tipo de método cromatográfico, no qual se utiliza diferentes fases móveis, em diferentes proporções, tipo de coluna, faixa de absorvância e até mesmo a marca do equipamento além da diferença das variedades e cultivo, clima e condições do processamento do cacau e do chocolate.

Os teores de teobromina variaram de 7,17 a 15,24 mg.g⁻¹ de amostra, sendo os menores valores no cacau, nibs e chocolate encontrados na variedade CEPEC2002 e os maiores valores na variedade BN34. No cacau e no nibs a variedade CEPEC2002 foi a única que apresentou diferença significativa entre as variedades. No chocolate as variedades SR162, CEPEC2002 E PH não apresentaram diferenças significativas entre si, igualmente as variedades BN34 E TSH1188. Comparando cacau, nibs e chocolate de uma mesma variedade, a amostra BN34 não apresentou diferença significativa, enquanto o SR162 apresentou diferença entre as matrizes e TSH, CEPEC2002 E PH16 apresentou diferença somente no cacau. Os resultados de teobromina aproximam com os encontrados por Deus (2015) que variaram de 11,14 a 14,96 24 mg.g⁻¹ de amostra. Maciel (20176) e Leite *et al.* (2013) obtiveram menores valores nas amostras correspondendo a faixa de 2,01 a 3 µg.g⁻¹ e 1379,12 a 1807,23 µg.g⁻¹, respectivamente.

Três das cinco variedades analisadas apresentaram teores de teobromina maior que de cafeína no cacau, nibs e chocolate. Isso é um resultado satisfatório visto que é reportado por estudos que a teobromina é a metilxantina mais abundante no cacau.

Os fenóis monoméricos catequina e epicatequina variaram de 0,95 a 2,90 mg.g⁻¹ de amostra e 1,02 a 4,6 mg.g⁻¹ de amostra, respectivamente, sendo que a

variedade SR162 foi a que apresentou menores teores tanto no cacau, nibs e chocolate e a amostra TSH1188 apresentou os maiores teores. A variedade SR162 apresentou teor de catequina abaixo do limite de detecção e de epicatequina abaixo do limite de quantificação. As cinco variedades apresentaram teores de epicatequina superiores aos de catequina. De acordo com os resultados de alguns estudos Leite *et al.* (2013), Carrillo *et al.* (2013), Cruz, 2012 as catequinas possuem teores menores do que os teores de epicatequina em amêndoas de cacau. Em trabalho realizado com pó de cacau na Croácia foram encontrados $380 \mu\text{g.g}^{-1}$ de epicatequina e $40,00 \mu\text{g.g}^{-1}$ de catequina (BELŠČAK, 2009). NIEMENAK *et al.* (2006), encontrou teores de catequina e de epicatequina em cacau fresco no país de Camarões, que variaram entre 125 e $1442 \mu\text{g.g}^{-1}$ e 14435 e $43903 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Leite *et al.* (2013) encontrou valores de 0,95 a $1,73 \text{mg.g}^{-1}$ e 1,55 a $1,85 \text{mg.g}^{-1}$, de catequina e epicatequina, valores estes próximos ao encontrado nesse trabalho.

Os teores de ácido gálico variaram de 1,33 a $15,24 \text{mg.g}^{-1}$ de amostra, sendo a variedade SR162 representada pelo menor valor e o TSH1188 o maior valor nas amostras de cacau. A variedade SR162 no nibs e chocolate apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método.

A tabela 03 apresenta a faixa de concentração de trabalho, a equação de regressão linear, o coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção, limite de quantificação e teste de recuperação do método para os compostos analisados. As curvas de calibração de sete pontos foram lineares no intervalo de concentração de 10 a 1000mg.L^{-1} para catequina, epicatequina e cafeína, 2 a 200mg.L^{-1} para teobromina e 8 a 800mg.L^{-1} para ácido gálico.

O coeficiente de determinação (R^2) de todos os compostos analisados foi maior de que 0,99. Os valores de recuperação médio foram de 90,1% para Ácido gálico, 89,7% para a cafeína, 92,1% para a teobromina, 87,8% para a catequina e 94,7% para a epicatequina.

Tabela 03 - Concentração de trabalho, equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção, limite de quantificação e teste de recuperação do método para Ác. Gálico, Cafeína, Teobromina, Catequina e Epicatequina

Padrão	Faixa de trabalho (mg.L^{-1})	Equação	R^2	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Rec (%)
Ác. Gálico	8 - 800	$y=5 \times 10^6 x + 95759$	0,9991	1,2	1,6	90,1 \pm 1,99

Cafeína	10-1000	$y=7 \times 10^6 x - 143321$	0,9901	0,2	0,65	$89,7 \pm 3,91$
Teobromina	2 – 200	$y=5 \times 10^6 x + 41130$	0,995	0,11	0,4	$92,1 \pm 3,92$
Catequina	10-1000	$y=1 \times 10^6 x - 3046$	0,997	2	5	$87,8 \pm 2,13$
Epicatequina	10-1000	$y=2 \times 10^6 x + 38097$	0,996	1	3	$94,7 \pm 1,87$

Os cromatogramas mostraram uma boa resolução para os analitos estudados e sem a presença de picos de interferência. Os tempos de retenção para os analitos (Fig.01- A) nas amostras foram semelhantes aos picos das soluções padrão (Fig.01- B).

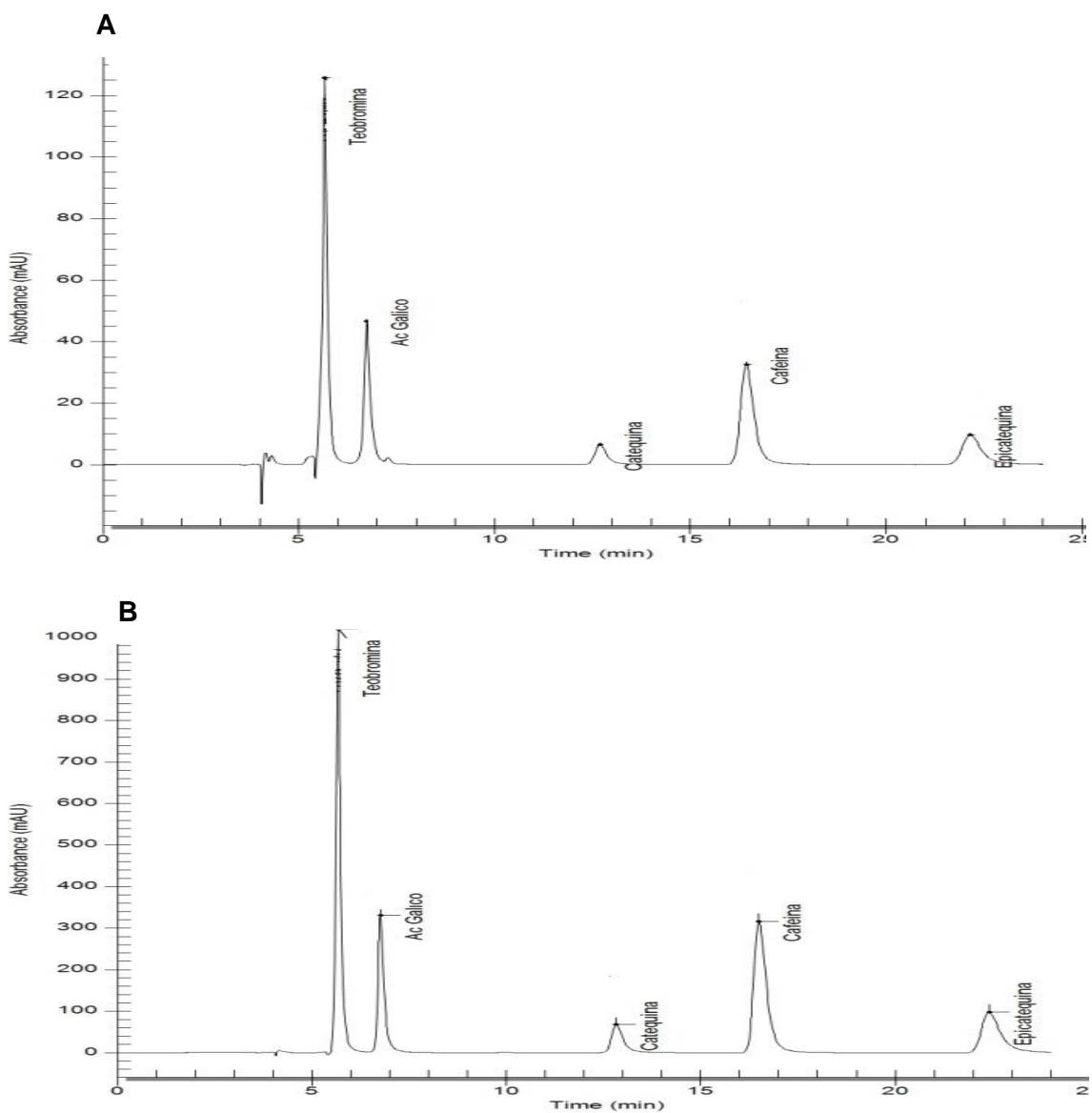


Figura 021 – Perfil cromatográfico catequina, epicatequina, cafeína, teobromina e ácido gálico (A – amostra da variedade de cacau TSH1188; B- solução com padrões).

Na Figura 03 está expresso o gráfico dos scores das componentes principais.

A partir da análise de componentes principais (PCA), figura 03, foi verificado que as componentes PC1 e PC2 descrevem 91,1% da variância total dos dados e forneceram informações discriminatórias das amostras. Sendo que, a primeira componente principal (PC1) descreveu 74% e a segunda descreveu 20,1% da variação total dos dados. A PC1 foi responsável por discriminar três das cinco variedades devido aos parâmetros selecionados. Já a PC2 promoveu a separação de dois grupos. A projeção conjunta das PC1 e PC2 foi capaz de discriminar quatro grupos de chocolate produzidos por cinco variedades de cacau avaliadas neste trabalho, sendo que houve uma junção das variedades BN34 e PH16 pelas suas similaridades.

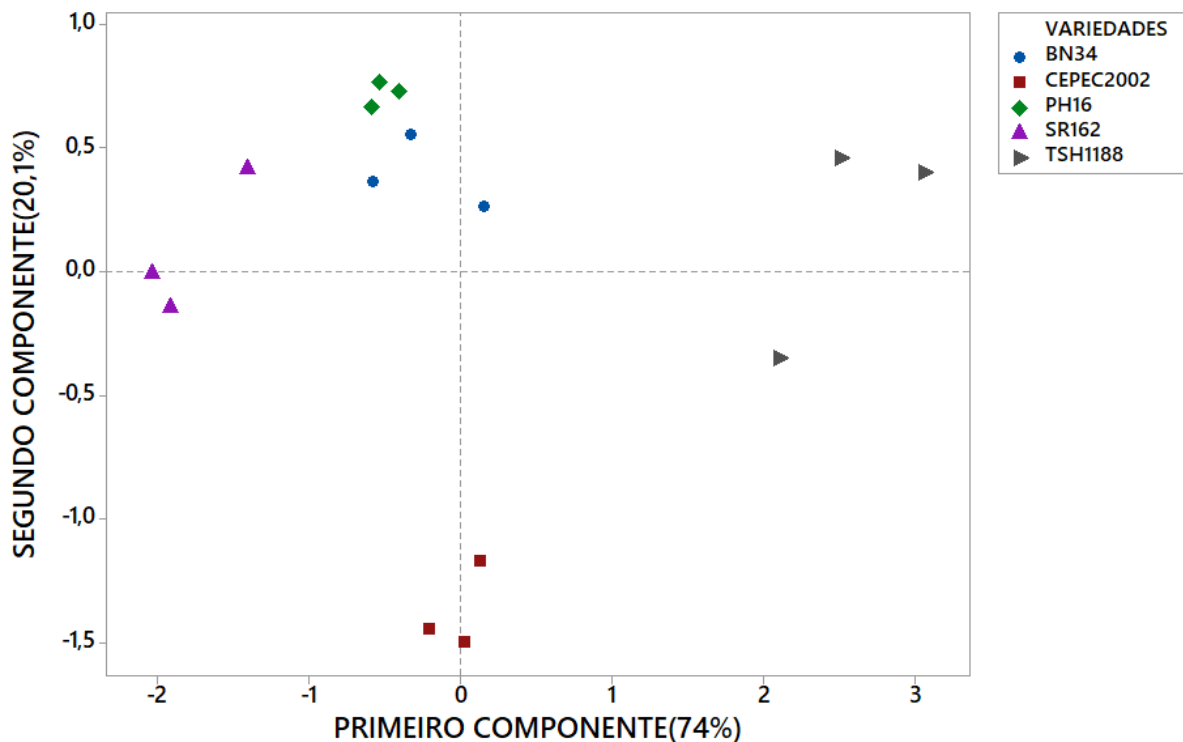


Figura 03- Dispersões dos escores PC1 e PC2 de Análise de cinco variedades de chocolate

As tendências observadas através da análise dos componentes principais (PCA) foram confirmadas através do dendrograma obtido pela HCA (Figura 04). Foi possível observar a formação de 4 agrupamentos em uma distância euclidiana de

1,70 visto que as amostras das variedades BN34 e PH16 foram semelhantes em algumas análises formando um único grupo.

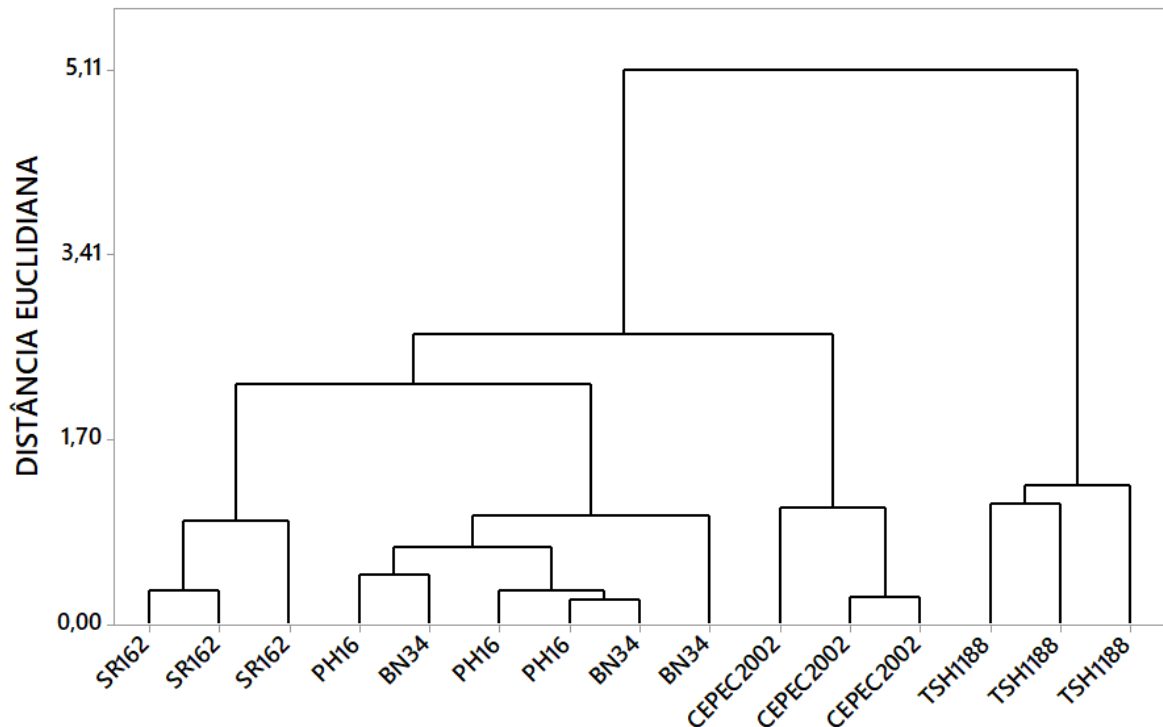


Figura 22 - Dendrograma (HCA) representativo da dissimilaridade entre chocolates produzidos de diferentes variedades *T. cacao L*

O motivo pelo qual o Catongo diferiu dos outros grupos se deve ao fato de ser considerado uma mutação albina do cacau Forastero. A sua principal característica sob o ponto de vista morfológico é a despigmentação dos cotilédones o que poderia levar a classificação de cacau Criollo. No entanto sendo o fruto de casca dura e o número de sementes por fruto superior a 30, é geralmente integrado na população Forastero (Veríssimo, 2012). A despigmentação dos cotilédones é justificada pelo baixo teor de antocianinas.

Segundo Efraim (2009) o TSH1188 é descendente do grupo Forastero e Trinitário. O PH 16 é uma variedade proveniente da seleção feita em área comercial. Não tem progenitores conhecidos, a planta foi originalmente identificada em 1996 da população de cacauzeiros híbridos, provenientes de cruzamentos interclonais entre cacauzeiros dos grupos Amazônico e Trinitário (Cruz, 2012) e o CEPEC2022 híbrido de cruzamento entre Forastero Amazônico e Trinitário. Não foram encontrados na literatura o grupo que se enquadra a variedade BN34. Como observado no resultado das análises mesmo pertencendo a um mesmo grupo, híbridos Forastero e Trinitário,

as variedades PH16 e TSH1188 diferiram, constatando que existem conjuntos de características que identificam cada variedade.

Existem vários fatores internos e externos que afetam a qualidade e quantidade de compostos bioativos no cacau e seus derivados. As diferenças registradas poderiam ser explicadas, pelo menos em parte, pela interação de vários fatores genéticos, fisiológicos, agrônômicos, e fatores ambientais (microclima) que modificam a concentração final destes compostos em cada variedade.

4. CONCLUSÃO

A variedade SR162 de cacau, nibs e chocolate apresentaram menores valores para compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, ácido gálico, cafeína, flavonóides e antocianinas e maior valor de DPPH por precisar de uma maior quantidade de amostra para exercer a atividade antioxidante. A variedade TSH1188, em todas as matrizes, apresentou os valores mais altos de compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, ácido gálico, cafeína, flavonóides e atividade antioxidante FRAP. Assim sendo um produto feito a partir dessa variedade possui maiores teores de compostos bioativos que proporcionam benefícios a saúde. O teor de teobromina apresentou maiores quantidades na variedade BN34 e menores na variedade CEPEC2002 de todas as amostras analisadas. Os resultados dos fenóis monoméricos para chocolates foram satisfatórios devido à ausência de interferentes da formulação dos mesmos. Através da análise por HPLC dos fenóis monoméricos pode ser observado que os compostos diminuíram do cacau para o nibs e desse para o chocolate em todas as variedades. Comprovando que a quantificação de fenólicos totais no chocolate não é viável devido aos interferentes. A análise de PCA mostrou que as variedades têm características relacionadas com a sua composição em compostos bioativos, classificando quatro grupos bem definidos (considerando as análises de fenólicos, flavonoides e FRAP), pois as variedades BN34 e PH16 tiveram características semelhantes. Existe uma variação considerável entre as variedades analisadas em relação aos seus teores de compostos bioativos e atividade antioxidante. Por meio da análise exploratória de dados empregada sobre resultados de técnicas analíticas simples e rápidas, foi possível obter informações sobre a dissimilaridade entre as variedades de cacau a partir de amostras de chocolates, a qual corrobora com estudos já realizados acerca de diferenças das

mesmas. As variedades apresentam características próprias referentes à sua composição em compostos bioativos e atividade antioxidante, classificando cada variedade, demonstrando que essas características podem agregar oportunidade econômica para melhor comercialização do cacau monovarietal, possibilitando a produção de chocolate fino e/ou “gourmet”.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pelo financiamento do projeto "Caracterização de parâmetros instrumentais e sensoriais de chocolates produzidos a partir de variedades de cacau utilizadas para produção do cacau fino e/ou especial da região sul da Bahia." e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo fornecida.

REFERÊNCIAS

- 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**, 47(10): 4184-8, 1999.
- ADEYEYE, E. I.; AKINYEYE, R. O.; OGUNLADE, I.; OLAOFE, O.; BOLUWADE, J.O. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. **Food Chemistry**, 118(2): 357-63, 2010.
- AFOAKWA, E. O. Chocolate science and technology. **Wiley-Blackwell Publishers**, Oxford, UK, p. 3–22, 2010.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavour formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 48(9): 840-57, 2008.
- APAK, R.; GUCLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, 160(4): 413-19, 2008.
- ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, 877(23): 2224-34, 2009.
- ARLORIO, M.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J.-D.; GROSSO, E. D.; MINASSI, A.; APPENDINO, G.; MARTELLI, A. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao L.*). **Food Chemistry**, 106(3): 967-75, 2008.

ASIEDU, J. J. **Processing tropical crops: a technological approach**. London: Macmillan, 1989. p. 24-41.

BARTLEY, B. G. D. The genetic diversity of cacao and its utilization. UK: **CABI Publ**, Wallingford, 2005.

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

BONFATTI, V.; GRIGOLETTO, L.; CECCHINATO, A.; GALLO, L.; CARNIER, P. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. **Journal of Chromatography A**, 1195(1-2): 101-6, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA CHOCOLATE E PRODUTOS DE CACAU". Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5e63cd804745929d9afede3fbc4c6735/RDC_264_2005.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 21 jan.2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC no 07, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, n. 46, p.66, 9 mar 2017.

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

BRUINSMA, K. K.; TAREN, D. L. Chocolate: Food or Drug? **Journal of the American Dietetic Association**, 99(10): 1249-56, 1999.

CACAONET. A global strategy for the conservation and use of cacao genetic resources, as the foundation for a sustainable cocoa economy (B. Laliberté, compiler). Montpellier, France: **Bioversity International**, 4–7, 2012.

CALIGIANI, A.; CIRLINI, M.; PALLA, G.; RAVAGLIA, R.; ARLORIO, M. GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. **Chirality**, 19(4): 329–34, 2007.

COOPER, K. A.; CAMPOS-GIMÉNEZ, E.; JIMÉNEZ ALVAREZ, D.; RYTZ, A.; NAGY, K.; WILLIAMSON, G. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56(1): 260-5, 2008.

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

CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. 2002. 101 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

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. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 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. **Food Science and Technology**, 35(2): 279-84, 2015.

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

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; GARCIA, N. H. P.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacau de diferentes genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology**, 9(4): 229-36, 2006.

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

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

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201706_5.shtm>. Acesso em 15 de julho 2017.

ICCO document: Annual report 2007/2008. **International Cocoa Organization**, London U.K, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, v. 1, 3. ed. São Paulo: IMESP, 2008.

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

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

KRÄHMER, A.; ENGEL, A.; KADOW, D.; ALI, N.; UMAHARAN, P.; KROH, L. W.; SCHULZ, H. Fast and neat — Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, 181: 152-9, 2015.

KRATZER, U.; FRANK, R.; KALBACHER, H.; BIEHL, B.; WÖSTEMEYER, J.; VOIGT, J. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa - and chocolate - specific aroma precursors. **Food Chemistry**, 113(4): 903-13, 2009.

LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 51(25): 7292-5, 2003.

LEITE, J. B. V.; FONSECA, E. V.; SODRÉ, G. A.; VALLE, R. R.; NASCIMENTO, M. N.; MAROCOS, P. C. L. Comportamento produtivo de cacau no semiárido do Brasil. **Agrotropica**, 24(2): 85-90, 2012.

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. **Ciências e Agrotecnologia**, 37(3): 244-50, 2013.

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**, 1(spe): 73-81, 2011.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, 763: 1-10, 2013.

LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3527-32, 2002.

MACIEL, L. F., FELÍCIO, A. L.S.M., HIROOKA, E. Y. Bioactive compounds by UPLC-PDA in different cocoa varieties (*Theobroma Cacao L.*) developed in the southern region of Bahia, Brazil. **British Food Journal**, 2016. *NO PRELO*

MANDARINO, E.P.; SENA GOMES, A.R. **Produtividade do cacauzeiro (*Theobroma cacao L.*) cultivado em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil**. Ilhéus: Ceplac/Cepec, 2009. 32 p. (Boletim Técnico, 197).

MAGI, E.; BONO, L.; DI CARRO, M. Characterization of cocoa liquors by GC–MS and LC–MS/MS: Focus on alkyipyrazines and flavanols. **Journal of Mass Spectrometry**, 47(9): 1191-7, 2012.

MELLO, D. L. N.; GROSS, E. **Guia do manejo do agrossistema cacau cabruca**. Ilhéus: Instituto Cabruca, 2013.

MENG, C. C.; JALIL, A. M; ISMAIL, A. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. **Molecules**, Berlin, 14(1): 200-9, 2009.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(5): 1655-66, 2009.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 50(3): 519-25, 2002.

NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; ELWERS, S.; NDOUMOYA, D.O.; LIEBEREI, R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19(6-7): 612-9, 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**, 113(9): 1094-102, 2011.

ORTEGA, N.; ROMERO, M. P.; MACIA, A.; REGUANT, J.; ANGLES, N.; MORELLO, J. R.; MORTILVA, M. J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 56(20): 9621-7, 2008.

PRABHAKARAN NAIR, K. P. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In: **The agronomy and economy of important tree crops of the developing world**. Elsevier Inc, 2010. p. 131-80.

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

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(10): 4290-302, 2005.

RIZO, D. C. Barry Callebaut confirma el poder de los polifenoles en el chocolate. **Dulcelandia**, 65(789): 33-7, 2006.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.; OROZCO- AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Dynamics of volatile and non-

volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, 44(1): 250-8, 2011.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, 27(1): 53-60, 2007.

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

ROZIN, P.; LEVINE, E.; STOESS, C. Chocolate craving and liking. **Appetite**, 17(3): 177-85, 1991.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46(2): 454-7, 1998.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JÁUREGUI O, C. I.; 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*). **Journal of Mass Spectrometry**, 38(1): 35-42, 2003.

SHAUGHNESSY, W. J. Cocoa beans: planting through fermentation. Its effect on flavor. **Manufacturing Confectioner**, 72: 51-8, 1992.

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

STAHL, L.; MILLER, K. B.; APGAR, J.; SWEIGART, D. S.; STUART, D. A.; MCHALE, N.; OU, B.; KONDO, M.; HURST, W. J. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols and procyanidin content in cooked and baked foods prepared with cocoa powder. **Journal of Food Science**, 74(6): 456-61, 2009.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*: The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 10(1): 63-8, 1959.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revistas Ceres**, 55(4): 297-304, 2008.

WAKAO, H. **Estudio de la variación del contenido de alcaloides en caçao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional, durante el proceso de beneficio**. 2002. 91p. Tesis (Especialización en Química Analítica)- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, 2002.

WATSON, R. R. ; PREEDY, V. ; ZIBADI, S. **Chocolate in Health and Nutrition**, Springer. 542.12-16; 20-23; 40-45; 290-292, 2013.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International, Essex**, 33(6): 449-59, 2000.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**, 4ed. London: Wiley-Blackwell. 1985. p. 620.

Veríssimo, A. J. N. **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**. 2012. 87 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012

VILLENEUVE, F.; CROS, E.; MACHEIX, J. J. Effet de la fermentation sur les activités peroxidasiques et polyphenoloxidasiques de la fève de cacao. **Café, Cacao, Thé**, 33(2): 113-20, 1985.

VINSON, J. A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G. A. Chocolate is a powerful *ex vivo* and *in vivo* antioxidant, an anti-atherosclerotic agent in an animal model, and significant contributor to antioxidants in European and American diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(21): 8071-6, 2006.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Para estudos futuros vale ressaltar que é aplicável a utilização de modelos de calibração utilizando técnicas multivariadas para a identificação, e discriminação de variedades de cacau, assim como a proposição de investigação de outros parâmetros para a classificação de variedades de cacau, seus derivados e produtos. Assim com uma amostragem adequada e análises suficientes poderá trabalhar pela certificação de denominação geográfica de cacau e chocolate do Sul da Bahia. Além disso, é indispensável o conhecimento da biodisponibilidade desses compostos no organismo humano, o quanto se absorve e o quanto é necessário para se ter um efeito benéfico a saúde.

ANEXO

MAPEAMENTO PATENTÁRIO DE PRODUTOS DE CACAU, CARACTERIZADO PELA COMPOSIÇÃO CONTENDO COMPOSTOS ORGÂNICOS OU INORGÂNICOS

Tassia Cavalcante Pires¹, Leonardo Fonseca Maciel¹, Eliete da Silva Bispo¹

¹*Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, CEP: 40171-970, Salvador, BA, Brasil.*

RESUMO

O interesse no cacau e nos seus subprodutos tem crescido devido a sua composição com grande fonte de compostos bioativos e seu alto potencial para gerar inovação. O cacau possui compostos que influenciam diretamente na qualidade dos produtos e estes diferenciam de acordo com as características genéticas e cultivares do fruto. Este trabalho tem como objetivo a busca de anterioridade sobre produtos de cacau como, por exemplo, chocolate e sucedâneos caracterizados pela composição contendo compostos orgânicos ou inorgânicos, além de apresentar uma visão geral do desenvolvimento tecnológico, estado atual de novos produtos feitos a partir dessa matéria prima. A pesquisa foi realizada na base de patentes Espacenet. Foram encontradas 1013 patentes depositadas nessa base de dados através do código A23G1/32, específico para o tema em estudo. Verificou-se que os Estados Unidos é o país que apresenta maior investimento nesses produtos apesar de não estar entre os maiores produtores de cacau. Durante o período de 2005 a 2012 houve uma grande quantidade de depósitos de patentes provavelmente pelo incentivo recebido pelos pesquisadores das áreas e empresas.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, patentes, produtos de cacau.

ABSTRACT

The interest in cocoa and its by-products has grown due to its composition with great source of bioactive compounds and their high potential to generate innovation. Cocoa has compounds that directly influence the quality of products and these differ according to the genetic characteristics and cultivars of the fruit. This work aims to prior art search on cocoa products such as chocolate and substitutes characterized by the composition containing organic or inorganic compounds, in addition to presenting an overview of the technological development, current state of new products made from this material cousin. The survey was conducted in the Espacenet patent base. They were found in 1013 patents filed in the database through the A23G1 code / 32, specific to the topic under study. It was found that the United States is the country with greater investment in these products despite not being among the largest producers of cocoa. During the period 2005-2012 there was a lot of patent applications probably the encouragement received by researchers in the areas and businesses.

Keywords: *Theobroma cacao*, patentes, cocoa products.

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma planta pertencente à família Malvaceae, provavelmente originada da Bacia Amazônica e cultivada nas regiões tropicais do mundo. O interesse de cultivo desta espécie está no aproveitamento de suas sementes para produção de derivados de cacau (ALVES, 2002). O cacau tem importância econômica no contexto internacional por ser uma commodity de participação relevante no comércio mundial de produtos agrícolas tanto em importações quanto exportações (GUYTON, 2003).

De acordo com o ICCO (International Cocoa Organization), os maiores produtores mundiais de cacau são a Costa do Marfim, seguida por Gana, Indonésia, Nigéria, Camarões, Brasil, Equador e Papua Nova Guiné (ICCO, 2011). A Bahia ainda é o maior produtor de cacau no Brasil, com 64% do total produzido, seguido por Pará (25%), Rondônia (8%) e Espírito Santo (3%) (LOPES et al., 2011).

Basicamente, após a colheita do cacau, são efetuadas as operações de abertura dos frutos, fermentação das sementes junto à polpa que as envolve, secagem e torração para obtenção da massa ou liquor de cacau, que será utilizado na obtenção de manteiga e pó de cacau, além de chocolates e produtos análogos (BECKETT, 1994). Durante essas etapas são gerados não apenas os precursores do sabor característico dos produtos de cacau, como também compostos que não mais sofrerão modificações e que contribuirão para esse sabor.

Quanto à composição química, o cacau é constituído de triglicerídeos e ácidos graxos, compostos polifenólicos, taninos condensados e bases púricas representadas particularmente pela teobromina, cafeína, adenina e guanina. A constatação da presença de antioxidantes polifenólicos em sua constituição tem causado interesse crescente na utilização deste produto em preparações cosméticas (Simões, 2007; Costa, 2002). O cacau possui composição química única, com mais de 500 compostos, dentre os quais merecem destaque as metilxantinas. Classificadas como alcaloides purínicos, são consideradas substâncias estimulantes, e as encontradas no cacau são: teobromina, em maior concentração, seguida da cafeína e por último da teofilina (Hurst et al., 2002).

O cacau se destaca como um grande contribuinte da economia. Por isso é importante aproveitá-lo de maneira mais rentável, visto que devido à globalização, cada vez mais os produtos vem sofrendo modificações para se encaixarem no mercado competitivo, o que gera muitas pesquisas para tentar suprir os desejos dos consumidores, que querem um produto com qualidade e que faça bem a saúde (CUZZUOL et al., 2014).

Este estudo tem como finalidade realizar um levantamento das pesquisas desenvolvidas sobre os produtos de cacau, por exemplo, chocolates e sucedâneos, caracterizados pela composição contendo compostos orgânicos ou inorgânicos.

METODOLOGIA

A busca por documentos de patentes foi realizada de maneira a prover o maior número de documentos de patentes correspondentes ao tema de interesse, utilizando a classificação internacional de patentes que tornasse possível uma pesquisa representativa e palavras chave apenas para encontrar os códigos apropriados a cerca de produtos de cacau caracterizados pela composição contendo compostos orgânicos ou inorgânicos.

A Tabela 1 mostra o escopo utilizado para a pesquisa dos documentos de patentes.

Chocolat*	Cocoa*	Phenolics	Nibs	Anthocyanins	A23G1/32	A23L1/00	A23G	A23G1/30	Worldwide
------------------	---------------	------------------	-------------	---------------------	-----------------	-----------------	-------------	-----------------	------------------

X				10.000(CPC)
	X			8150(CPC)
		X		507(CPC)
			X	1761(CPC)
			X	468(CPC)
			X	1013(CPC) - 1276(IPC)
			X	427
			X	10.000(CPC)
			X	8515(CPC)
		X		491(IPC)
			X	11(CPC)
		X	X	1013(CPC)
	X	X		181(CPC)
X		X		265(CPC)

Tabela 01- Número de documentos de patentes por palavras-chave/códigos de classificação. A23G1/32: Cacau; produtos do cacau, por exemplo, chocolate; substitutos para cacau ou produtos de cacau; confeitaria ; goma de mastigação; gelado ; sua preparação caracterizado por a composição contendo compostos orgânicos ou inorgânicos. A23L1/00: Alimentos ou gêneros alimentícios; Sua preparação ou tratamento (preservação dos mesmos, em geral. A23L3/00 ; aspectos mecânicos A23P). A23G: Cacau; produtos do cacau, por exemplo, chocolate; substitutos para cacau ou produtos de cacau; confeitaria ; goma de mastigação ; gelado ; sua preparação. A23G1/30: Cacau; produtos do cacau, por exemplo, chocolate; sucedâneos. **Fonte:** Autoria própria, 2016.

As buscas foram realizadas por meio do banco de patentes do CPC (Classificação Cooperativa de Patentes) e IPC (Classificação Internacional de Patentes), através da ESPACENET, que é uma base mundial de acesso livre usualmente empregada em trabalhos de prospecção, no período de Abril de 2016. Inicialmente, foi realizada a análise do número de patentes depositadas com palavras chaves distintas em inglês, como Cocoa*, Chocolat*, Nibs encontrando 8.150, 10.000 e 1761 documentos de patentes, respectivamente, e compostos importantes do cacau como Phenolics, 507 patentes e Anthocyanins, 468 patentes. Através das palavras chaves foi encontrado o código específico para o presente trabalho A23G1/32, com 1013 documentos de patentes no CPC E 1276 no IPC, código relacionado a produtos de cacau, por exemplo, chocolate e sucedâneos: caracterizados pela composição contendo compostos orgânicos ou inorgânicos. Foi escolhido o código no CPC por ser mais detalhado, restringindo a busca para o assunto de interesse. Após a eliminação das duplicidades, compactando as patentes no Espacenet, reduziu o número de documentos para 865, estando disponíveis 322 patentes para exportação através do CSVed.

A interpretação de dados a partir das informações obtidas da tecnologia patenteada sobre produtos de cacau caracterizados pela composição orgânica ou inorgânica foi selecionada e analisada para obtenção de informações relevantes, as quais descrevessem a invenção, gerando gráficos elaborados no Microsoft Excel (2010) que mostram os resultados da evolução anual de depósitos, a quantidade de patentes depositadas por códigos, os principais campos de aplicação dos documentos de patentes, países detentores da tecnologia e aplicantes. No tratamento desses dados houve limpeza das grafias e ajustes necessários para a fidedignidade dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os dados coletados dos países de depósito é possível verificar que foram registrados 93 depósitos de patentes na Organização Mundial de Propriedade Intelectual

(WO) e 36 patentes na Organização Européia de Patentes (EP). O país que mais se destacou no domínio de depósito patentes relacionados a produtos de cacau caracterizados pela composição contendo compostos orgânicos ou inorgânicos foi o Estados Unidos com 203 patentes, seguidos do Japão com 61, República Centro Africana com 35, Alemanha com 29, França com 28, China com 18, República da Moldova com 7, Suécia com 4, Espanha com 4, Itália com 3, Nova Zelândia, Holanda, Israel, Canada, Austrália, com 2 e Tunísia, Sérvia e Luxemburgo com 1.

Segundo a ICCO os Estados Unidos é o principal país consumidor de cacau com 689 mil toneladas, seguido pela Alemanha, França e Reino Unido, com 280, 218 e 215 mil toneladas, respectivamente. Mesmo os Estados Unidos não sendo produtores de cacau, eles lideram as importações, investindo na inovação e métodos de conservação e aplicação dos produtos de cacau. Não foi identificado nenhum depósito de patente no Brasil. Existe ainda uma carência de parcerias entre empresas, universidades e o próprio governo brasileiro capaz de desenvolver um sistema sólido e eficaz de pesquisa e desenvolvimento no intuito de permitir o avanço da inovação do Brasil. A Figura 01 relaciona o número de documentos de patentes depositados por país de origem que não estão em sigilo até o momento da presente pesquisa.

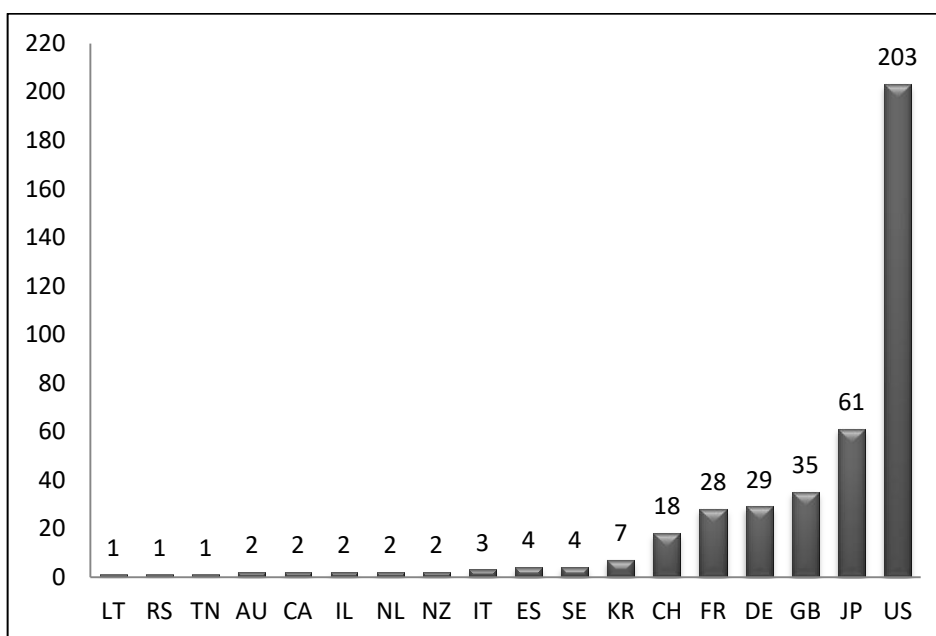


Figura 01- Número de patentes depositadas por país. **Fonte:** Autoria, 2016.

Na figura 02 encontra-se o gráfico de patente por países de aplicação. Os Estados Unidos continua liderando em número de patentes, e comparando-o com o gráfico de depósitos se constata que embora o Brasil não esteja entre os inventores das patentes nem por autores nem por países no qual foi depositado, ele faz uso da tecnologia, com 9 patentes aplicadas no país.

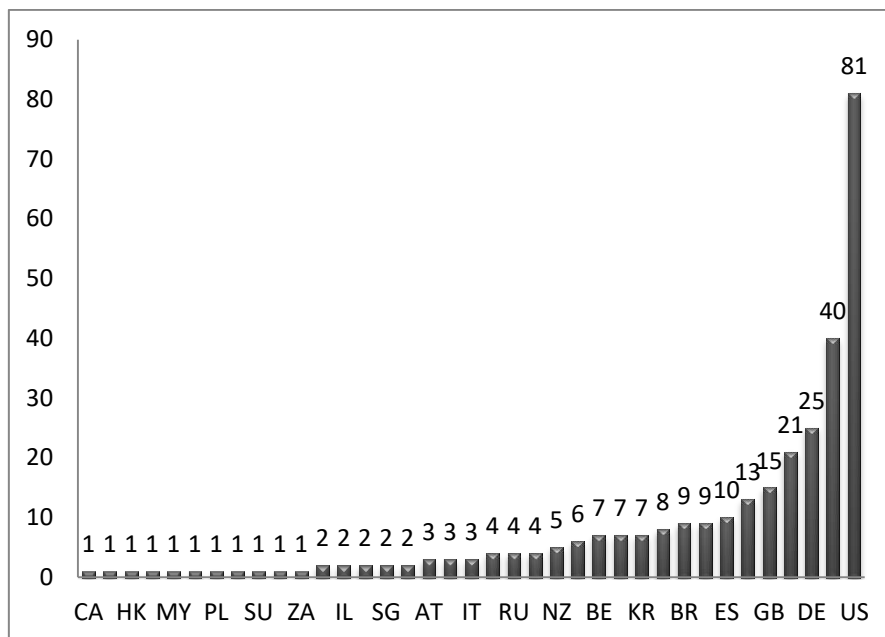


Figura 02- Número de patentes aplicadas por país. **Fonte:** Autoria, 2016.

Entre os anos de 1995 e 2015, foram depositadas cerca de 441 (51% do total) patentes, provavelmente pelo incentivo recebido para empresas e pesquisadores das áreas. Destacam-se os anos de 2005 e 2012, com maiores número de depósitos de patentes (43 e 53 respectivamente), o que pode ser explicado pelo aumento da demanda por produtos de melhor qualidade e incentivos pela busca de melhores tecnologias que pudessem apresentar total aproveitamento da produção do cacau e inovação de produtos que utilizem seus compostos com características funcionais. Analisando a evolução anual cronológica das patentes depositadas (Figura 03) em vinte anos, verifica-se que os anos anteriores a 2004 houve baixa produção de patentes, refletindo a escassez de invenções registradas nas bases de dados ou pouco incentivo à pesquisa para aplicação e melhorias desta tecnologia.

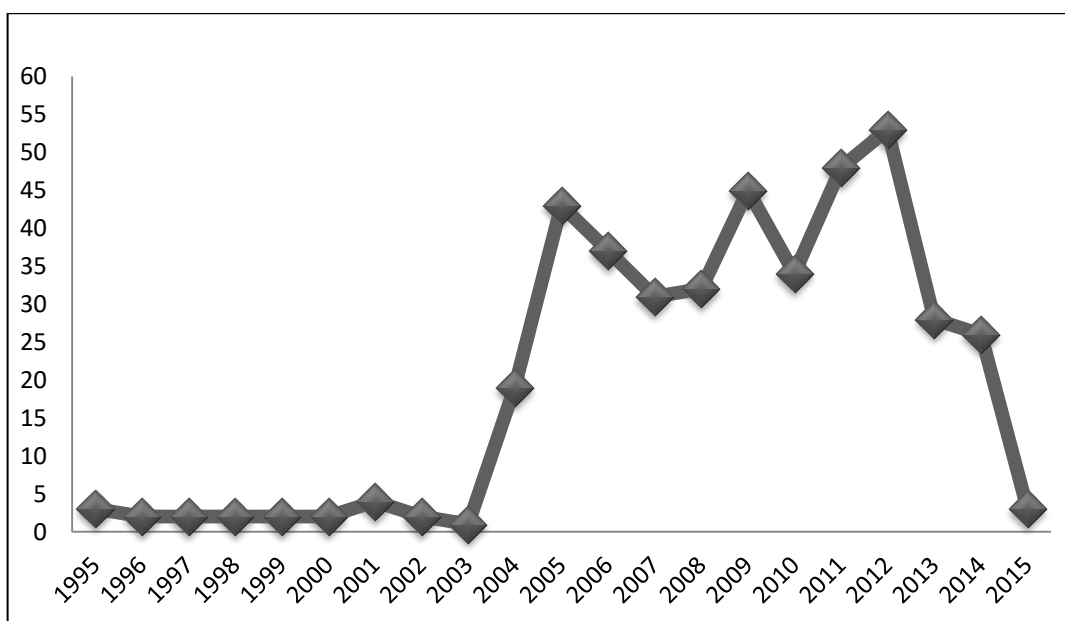


Figura 03- Número de patentes depositadas por ano. **Fonte:** Autoria, 2016.

A Figura 04 ilustra a tendência de produção tecnológica dos produtos de cacau nos últimos dez anos, mostrando um comportamento em ascensão, porém esse crescimento diminuiu nos dois últimos anos, provavelmente devido ao período de sigilo das patentes que é 18 meses após sua data de depósito.

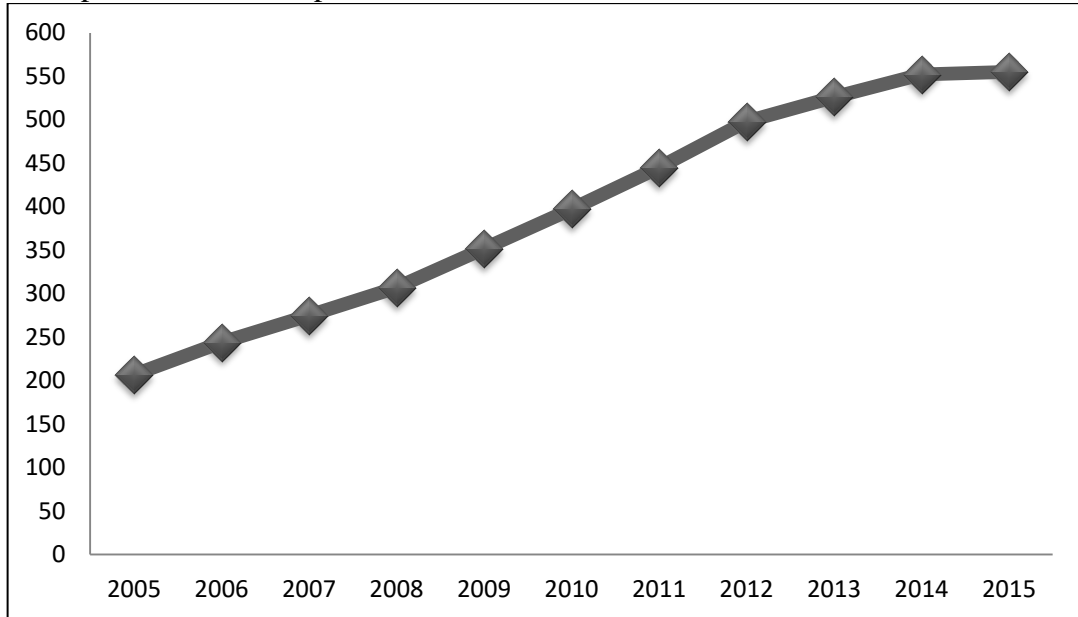


Figura 04- Acúmulo de patentes depositadas por ano. **Fonte:** Autoria, 2016.

As classificações mais presentes nos resultados foram A23G1/32 liderando com 167 patentes, seguidas dos códigos A23G1/00, A23G1/30, A23G1/56, A23L1/30.

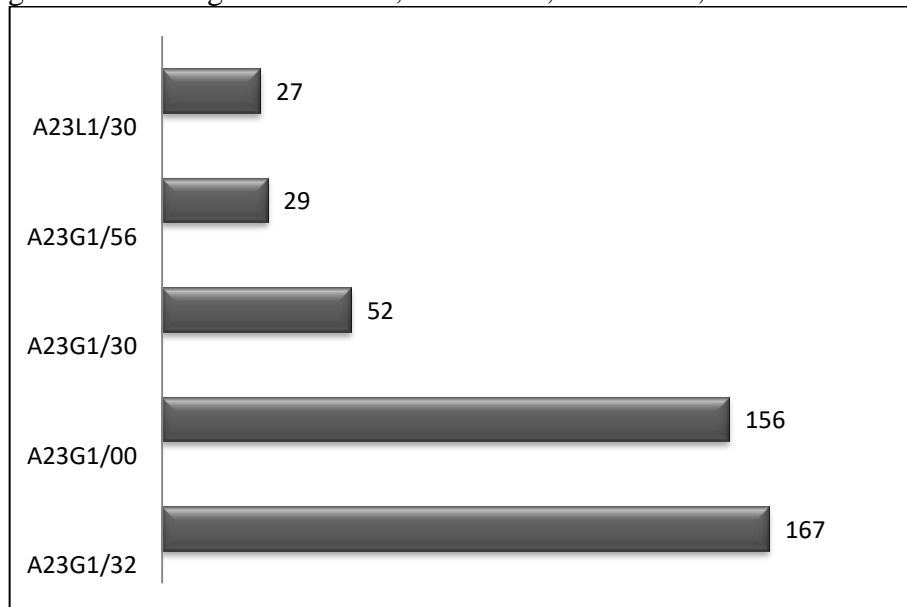


Figura 05- Quantidade de patentes por código de Classificação Internacional. **Fonte:** Autoria própria, 2016.

Código	Nome
A23G1/32	Cacau; Produtos de cacau, por exemplo, o chocolate; sucedâneos .Caracterizados por a composição (contendo compostos orgânicos ou inorgânicos).
A23G1/00	Cacau; Produtos de cacau, por exemplo, o chocolate; sucedâneos (equipamentos de cozinha para o cacau preparação A47J, por

	exemplo, um aparelho para fazer bebidas A47J31/00).
A23G1/30	Produtos do cacau, por exemplo, o chocolate; sucedâneos.
A23G1/56	Fabricação de produtos líquidos, por exemplo, para fazer leite com chocolates (bebidas e produtos para a sua preparação, pastas para espalhar, migalha de leite, (A23G1/305 tem prioridade).
A23L1/30	Contendo aditivos (A23L1/308 tem prioridade).

Tabela 02- Nome dos códigos de classificação. **Fonte:** Autoria própria, 2016.

Das patentes depositadas 21% não possuem os nomes dos inventores (Figura 06B). Os inventores que mais se destacam no depósito de patente sobre o tema em estudo são Ley Jakob Peter (DE- Alemanha) e Wang Xiaoying (US- Estados Unidos) com 5 patentes, seguidos de Mosimann Gustav (CH- China) e Wonschik Johann (DE- Alemanha) com 4 patentes. Observa-se que os inventores optam por depositar suas patentes em outros países diferentes da sua nacionalidade, como preferência os Estados Unidos.

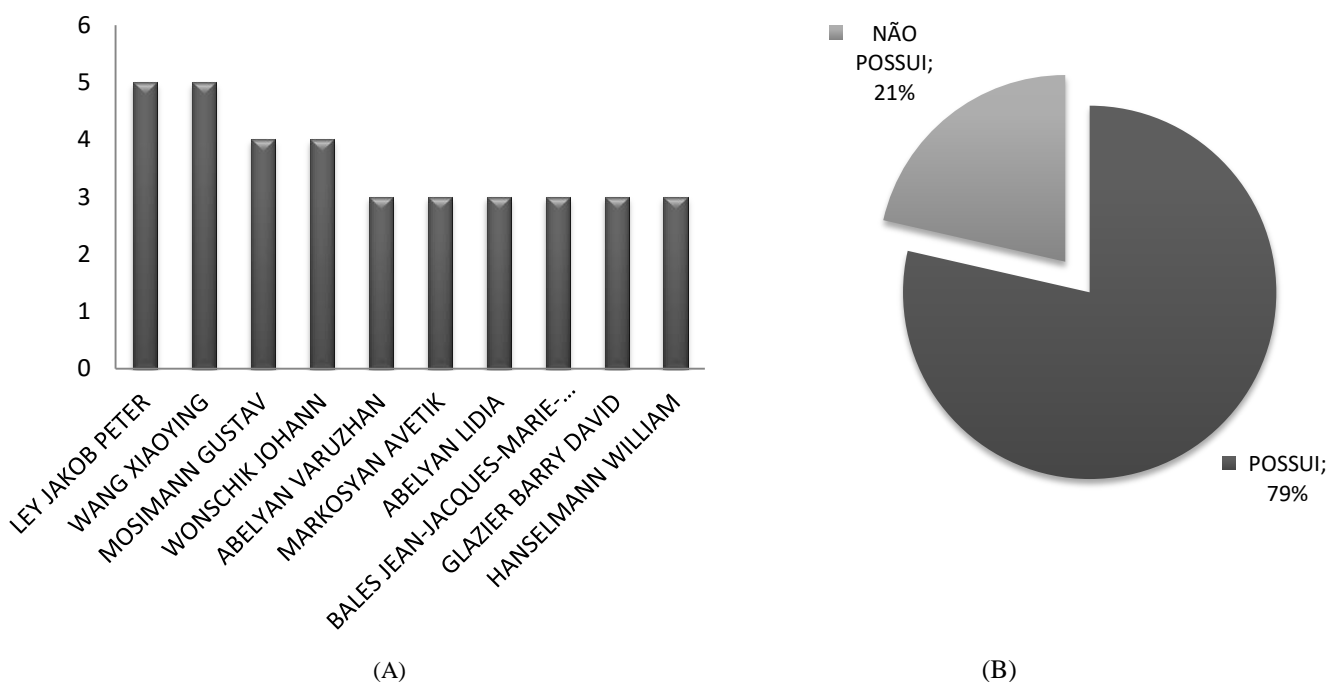


Figura 06- (A) Quantidade de patentes por inventor. (B) Percentual de patentes que possuem e que não possuem nomes dos inventores. **Fonte:** Autoria própria, 2016.

O perfil dos aplicantes, demonstrado na Figura 07, destaca que 59% dos depósitos de patentes provêm de empresas, 39% Inventores Individuais e 2% provêm de Universidades. Uma parte considerável das patentes é acerca de métodos para melhoria das propriedades dos produtos, desenvolvimento de novas tecnologias e disponibilização de novos produtos para a sociedade, possuindo aplicação industrial, logo constatando a alta porcentagem do perfil de aplicantes serem de empresas.

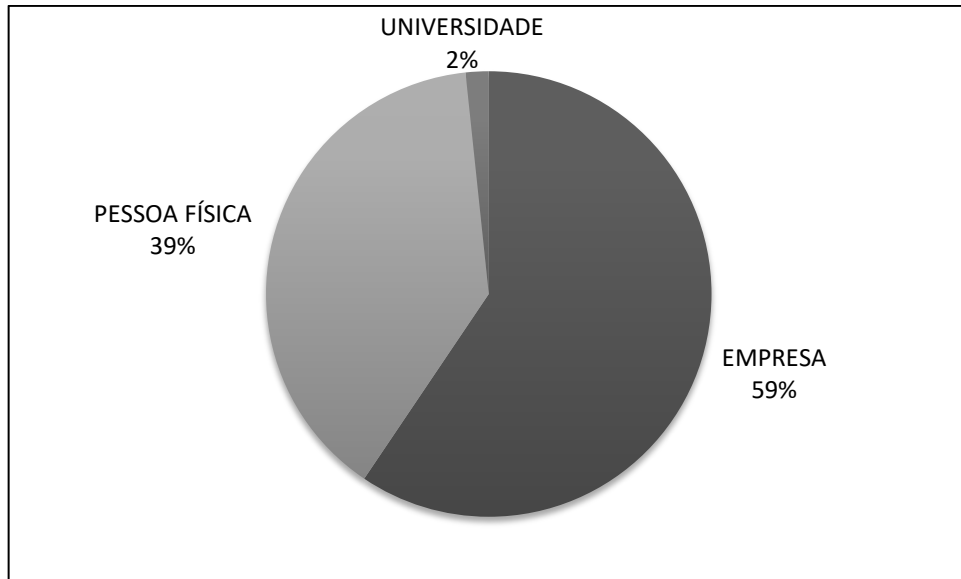


Figura 07- Distribuição dos documentos de patentes relacionados por tipo de depositante. **Fonte:** Autoria própria, 2016.

De acordo com o levantamento realizado, a empresa que mais se destaca como aplicante de patentes a cerca de produtos de cacau e sucedâneos caracterizados pela composição de compostos orgânicos ou inorgânicos é a MARS com 13 documentos de patentes. A MARS é uma grande empresa que produz chocolates, balas e gomas de mascar além de ter moinho de arroz , negócios de cuidados para animais de estimação, produção de molhos e investimentos em um centro de ciência do cacau. Possui 17 Centros de cacau de Desenvolvimento (CDCs) na Costa do Marfim, que promove a realização de pesquisas de ponta para melhorar a cultura do cacau, métodos agrícolas e proteção contra pragas e doenças, investi em regiões críticas de cacau e dar aos agricultores o conhecimento e tecnologia que eles precisam para triplicar seus rendimentos(CACAU,2016). As maiorias das suas patentes são acerca de adição de compostos para melhoria da qualidade sensorial dos chocolates. Em segunda vem as empresas Unilever (11 patentes), Hershey(10 patentes), Cadbury Adams(9 patentes) e Symrise(7 patentes) .

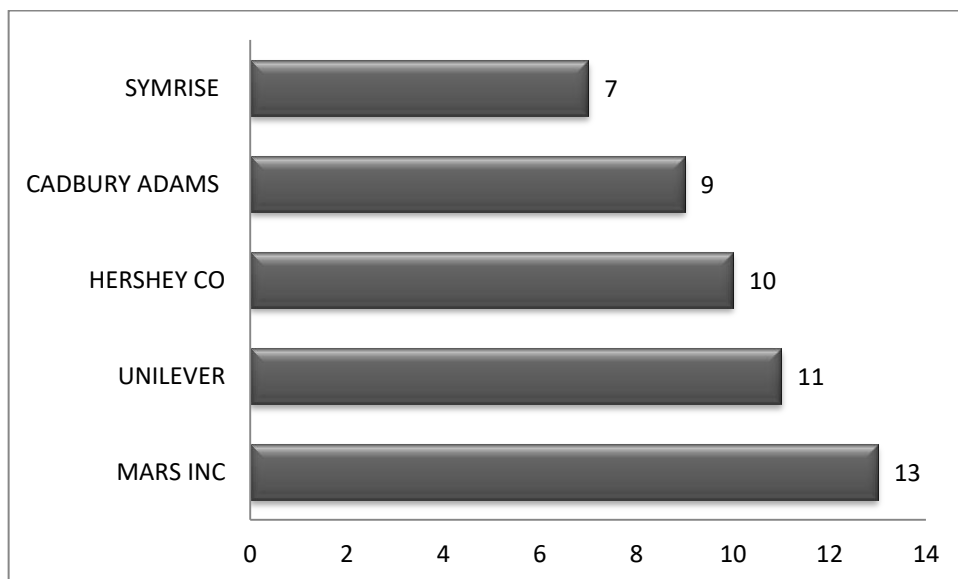


Figura 08 – Número de patentes por empresa. **Fonte:** Autoria própria, 2016.

CONCLUSÃO

Através do estudo prospectivo tecnológico, pôde-se constatar que houve uma quantidade considerável de depósitos de patentes entre os anos de 2005 a 2012, o que pode ser explicado pelo aumento da demanda por produtos de melhor qualidade e incentivos pela busca de melhores tecnologias que pudessem apresentar total aproveitamento de produção do cacau e das características funcionais. No emprego das patentes depositadas na base de dados (Espacenet) por diferentes países entre o período de 1913 a 2015, sobre produtos de cacau, foi possível verificar que existe um forte crescimento de depósito de patentes pelos Estados Unidos e Japão mesmo esses não sendo países que lideram a produção do cacau. A maioria das patentes foram depositadas por empresas e de acordo com Código Internacional de Patentes estão associadas a inovação de produtos do cacau (*Theobroma Cacao L.*).

O Brasil ainda possui uma participação muito inferior aos países desenvolvidos, não apresentando nenhuma patente depositada em relação aos aspectos deste estudo, possui apenas 9 patentes aplicadas. Existe ainda uma carência de parcerias entre empresas, universidades e o próprio governo brasileiro capaz de desenvolver um sistema sólido e eficaz de pesquisa e desenvolvimento no intuito de permitir o avanço da inovação no país.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. A. M. *Epidemiologia da vassoura de bruxa (Crinipellis perniciosa (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba.* 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BECKETT, S.T. *Fabricación y utilización industrial del chocolate.* Zaragoza: Editorial Acibica, 1994, 432p.

CACAU. Disponível em: <<http://www.mars.com/global/about-mars/mars-pia/our-supply-chain/cocoa.aspx>>. Acesso em : 15 de maio de 2016.

COSTA, A. F. *Farmacognosia.* 5ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2002.

CUZZUOL, G. T.; RECKEL, A. S.; NASCIMENTO, R. F.; ARRIECHE, L. S. Desenvolvimento de um novo produto de cacau, elaborado artesanalmente. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014, 20., 2014. São Paulo. *Anais...*Blucher Chemical Engineering Proceedings, São Paulo: Blucher, 2015. 1(2), p. 4803-10

GUYTON, B. *Commodities – Cocoa Review. 2003 Issues, trends and performance of the chocolate and confectionery industries,* New York. 40p.

HURST, W.J.; TARKA, S.M.; POWIS, T.G, VALDEZ, F.; HESTER, T.R. Cacao usage by earliest Maya civilization. *Nature*, v. 418, p. 280-290, 2002.

ICCO. International Cocoa Organization. Produção mundial de cacau. Disponível em: <http://www.icco.org/>. Acesso em: 15 de mai. 2016.