



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AFONSO GUILHERME ARAÚJO RAMÔA JÚNIOR

**COMPORTAMENTO CINÉTICO DE COMPOSTOS
POLIFENÓLICOS E ENZIMAS OXIDATIVAS NA FERMENTAÇÃO
DE CACAU DA AMAZÔNIA**

Belém

2011

AFONSO GUILHERME ARAÚJO RAMÔA JÚNIOR

**COMPORTAMENTO CINÉTICO DE COMPOSTOS
POLIFENÓLICOS E ENZIMAS OXIDATIVAS NA FERMENTAÇÃO
DE CACAU DA AMAZÔNIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará como requisito necessário à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos
Lopes

Belém

2011

AFONSO GUILHERME ARAÚJO RAMÔA JÚNIOR

**COMPORTAMENTO CINÉTICO DE COMPOSTOS
POLIFENÓLICOS E ENZIMAS OXIDATIVAS NA FERMENTAÇÃO
DE CACAU DA AMAZÔNIA**

DATA DA AVALIAÇÃO: ___/___/___

CONCEITO: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes (FEA/ITEC/UFPA)

Prof^a. Dr^a. Gabriela Macedo (FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza (FEA/ITEC/UFPA)

Dr^a. Rafaella de Andrade Mattietto (EMBRAPA Amazônia Oriental)

LISTA DE FIGURAS

1. O cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	16
2. Corte transversal do fruto de cacau da variedade <i>Forastero</i>	17
3. Corte longitudinal de semente de cacau.....	18
4. Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por Grimaldi (1978).....	23
5. Classificação da semente quanto ao grau de fermentação: <i>in natura</i> (a); mal fermentada (b); parcialmente fermentada (c); bem fermentada (d).....	25
6. Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides.....	31
7. Principais flavonóides encontrados em plantas.....	32
8. Estrutura da (-)-epicatequina e (+)-catequina.....	33
9. A 3- α -L-arabinosidil-cianidina.....	34
10. Mecanismo de ação da polifenoloxidase (PPO) sob os monofenóis e difenóis.....	36
11. Caixa de fermentação baseada na caixa t-60 com dimensões reduzidas (largura e comprimento).....	40
12. Modelo cinético de ordem zero da variação de temperatura das sementes de cacau durante a fermentação.....	50
13. Modelo cinético de primeira ordem da variação de umidade das sementes de cacau durante a fermentação.....	52
14. Modelo cinético de primeira ordem da variação de pH das sementes de cacau durante a fermentação.....	54
15. Modelo cinético de primeira ordem da variação de acidez das sementes de cacau durante a fermentação.....	56
16. Modelo cinético de ordem zero da variação dos polifenóis totais das sementes de cacau durante a fermentação.....	59
17. Modelo cinético de ordem zero da variação dos teores de antocianinas totais das sementes de cacau durante a fermentação.....	62
18. Modelo cinético de ordem zero da variação da capacidade antioxidante pelo método TEAC das sementes de cacau durante a fermentação.....	63
19. Modelo cinético de ordem zero da variação de flavan-3-ols pelo método Vanilina-HCl das sementes de cacau durante a fermentação.....	66

20. Modelo cinético de ordem zero da variação de flavan-3-ols pelo método do Cloreto de Alumínio das sementes de cacau durante a fermentação. 67

LISTA DE TABELAS

1. Composição química média da amêndoa de cacau expressa em relação à matéria seca, segundo alguns autores.	19
2. Classe de compostos fenólicos em plantas.	28
3. Importantes alterações nos alimentos que seguem cinéticas de ordem zero ou primeira ordem.	38
4. Temperatura da massa durante a fermentação de sementes.	49
5. Umidade das sementes durante a fermentação.	51
6. Valores de pH* das sementes durante a fermentação.	53
7. Acidez total titulável* das sementes durante a fermentação.	55
8. Açúcares redutores totais* das sementes durante a fermentação.	56
9. Classificação das amêndoas secas.	58
10. Teores de polifenóis totais* das sementes durante a fermentação.	59
11. Teor de antocianinas totais* das sementes durante a fermentação.	61
12. Valores* de DPPH e TEAC das sementes de cacau.	63
13. Resultados* de flavan-3-ols dos cotilédones de cacau.	65
14. Atividades Enzimáticas* das Sementes Durante a Fermentação.	67
15. Caracterização físico-química* das amêndoas antes e depois do processo de secagem.	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	Aspectos Gerais	16
3.1.1	Variedades	18
3.1.2	Composição Química	19
3.2	Pré-processamento do Cacau	19
3.2.1	Colheita e Quebra do Fruto.....	20
3.2.2	Fermentação	20
3.2.3	Secagem	23
3.3	Prova de Corte	24
3.4	Bioquímica da Fermentação	25
3.5	Compostos Fenólicos	28
3.5.1	Definição.....	28
3.5.2	Vias de Formação	29
3.5.3	Propriedades Funcionais.....	30
3.5.4	Compostos Fenólicos Presentes no Cacau	30
3.5.5	As Antocianinas no Cacau	33
3.5.6	Fatores Relacionados à Redução dos Fenólicos Durante o Beneficiamento do Cacau	35
3.6	Cinética da Reação	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Coleta do Material	39

4.2	Processo de Fermentação Natural das Sementes de Cacau	39
4.3	Prova de Corte	40
4.4	Caracterização Físico-Química das Sementes e Amêndoas.....	41
4.5	Acompanhamento das Modificações Químicas na Fermentação	41
4.5.1	Determinação dos Teores de Açúcares Redutores Totais.....	41
4.5.2	Determinação dos Teores de Polifenóis Totais ao Longo da Fermentação e Secagem	41
4.5.3	Determinação dos Teores de Antocianinas Durante a Fermentação e Secagem	42
4.6	Capacidade Antioxidante e Determinação de Flavonóis.....	43
4.6.1	Preparo do Extrato	43
4.6.2	DPPH.....	44
4.6.3	TEAC	44
4.6.4	Método da vanilina-HCl para a determinação de flavan-3-ols.....	45
4.6.5	Método do Cloreto de Alumínio para flavan-3-ols	46
4.7	Atividades Enzimáticas.....	46
4.7.1	Atividade da Peroxidase.....	46
4.7.2	Atividade da Polifenoloxidase.....	47
4.8	Análise Estatística dos Resultados	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Fermentação do Cacau	49
5.1.1	Temperatura	49
5.1.2	Umidade	51
5.1.3	pH.....	53
5.1.4	Acidez Total Titulável	54
5.1.5	Teores de Açúcares Redutores Totais Durante a Fermentação	56
5.2	Classificação das Amêndoas Fermentadas de Cacau.....	58

5.3	Polifenóis Totais	58
5.3.1	Teores de Polifenóis Totais Durante a Fermentação	58
5.4	Teores de Antocianinas Totais Durante a Fermentação	61
5.5	Capacidade Antioxidante e Determinação de Flavonóis.....	62
5.5.1	Determinação de flavan-3-ols.....	65
5.6	Atividades Enzimáticas das Peroxidase e Polifenoloxidase.....	67
5.7	Composição Físico-Química das Amêndoas Secas de Cacau	68
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

RESUMO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é a árvore que dá origem ao cacau, fruto de grande importância para a região amazônica. Suas sementes são a base para a produção do chocolate, um dos alimentos mais consumidos no mundo e representam entre cerca de 14 a 30% do peso total do fruto. Apenas em 2010, mais de 200 milhões de toneladas de sementes de cacau foram produzidas no Brasil, tornando-o o quinto maior produtor mundial e destacando a importância do cacau no mercado brasileiro e mundial. O processo de industrialização do cacau envolve as etapas de fermentação e secagem. Durante essas duas etapas ocorrem importantes transformações que estão relacionadas com o desenvolvimento dos precursores do sabor e estão ligadas a qualidade global do chocolate. O estudo da fermentação de cacau amazônico foi o objetivo desse trabalho. O processo de fermentação foi monitorado através da temperatura, pH e acidez da massa diariamente ao longo de 7 dias e após a secagem, realizada em estufa de ar forçado com temperatura entre 35 e 40°C até que a umidade alcançasse valores próximos a 6%. No início do processo as sementes de cacau apresentaram os seguintes resultados médios: 35,93% de umidade; 6,60 de pH; e 7,11 mEqNaOH/100g de acidez total titulável. A prova de corte revelou que as amêndoas de cacau foram muito bem fermentadas e foram classificadas como Tipo I (Superior) de acordo com a classificação oficial (CONCEX, 1988). A composição média final para as amêndoas fermentadas foram: 42,80 de umidade; 4,24 de pH; e 60,28 mEqNaOH/100g de acidez total titulável. Os resultados obtidos revelaram uma alta acidez ao final do processo fermentativo levando a crer que o volume de sementes utilizado foi inadequado para a caixa de fermentação, bem como os intervalos insuficientes de revolvimento realizados que podem ter favorecido o acúmulo de ácido acético na massa. Também foram acompanhados ao longo da fermentação os teores de açúcares redutores totais; de polifenóis totais; e de antocianinas totais, que apresentaram respectivamente os valores iniciais de 0,97%; 75,63 mg/g; e 144,96 mg/100g; e finais de 0,78%; 75,63 mg/g; e 32,31 mg/100g. Os valores observados demonstraram que as antocianinas foram as mais sensíveis ao processo de fermentação, e reduziram em cerca de 77% o seu valor inicial ao final do processo. Também foram verificadas as capacidades antioxidantes das sementes pelos métodos DPPH e TEAC que apresentaram valores iniciais de 4,46 mg de cotilédone/mL de extrato (EC₅₀) e 87,76 µmol Trolox/g, respectivamente. Apenas para o método TEAC foi observado um aumento da capacidade antioxidante, passando para 109,46 µmol Trolox/g ao final do processo. Os teores de flavan-3-ols pelos métodos da Vanilina-HCl e AlCl₃ foram verificados ao longo da fermentação e ambos demonstraram um aumento ao longo do mesmo, iniciando em 7,47 mg de catequina/g de cotilédone e 22,61 mg de quercetina/g de cotilédone, respectivamente, e terminando em 10,19 mg de catequina/g de cotilédone e 36,14 mg de quercetina/g de cotilédone. As atividades enzimáticas da peroxidase e da polifenoloxidase ao longo da fermentação foram monitoradas. Observou-se uma redução das atividades de ambas enzimas ao término da fermentação. Inicialmente valores de 1792,67 U/g para peroxidase e 1269,58 U/g para polifenoloxidase foram observados. Entretanto, ao final do processo apenas para

a peroxidase foi detectada atividade, obtendo-se um valor final de 33,92 U/g. A influência da secagem nos parâmetros físico-químicos foi verificada. Para umidade o valor médio final foi de 5,43%, e esteve abaixo do recomendado para amêndoas de cacau, porém, demonstrou-se suficiente para garantir a integridade das mesmas durante o armazenamento. Houve também a redução da acidez da massa, alcançando valores finais de 38,83 mEqNaOH/100g, porém para o pH não houve diferença estatística entre o antes e depois da secagem. Para proteínas houve uma diminuição dos valores encontrados após a fermentação, passando de 13,58% para 10,24%, provavelmente devido à ação de enzimas proteolíticas que atuam durante essa etapa. Para lipídios, o comportamento encontrado foi contrário, ocorrendo um aumento da quantidade encontrada após a secagem, partindo de 43,94% e chegando a 56,99%. Para os açúcares redutores totais, a etapa de secagem influenciou positivamente, onde foi observado um aumento dos valores médios, que chegaram a 1,28%. Para os polifenóis totais houve uma redução dos valores iniciais, reduzindo para 39,15 mg/g. Em relação as capacidades antioxidantes, tanto para o método DPPH (EC₅₀), quanto para TEAC, foram observados aumento em relação aos valores anteriores a secagem, com valores finais de 4,58 mg de cotilédone/ml de extrato e 187,40 µmol Trolox/g de cotilédone para DPPH e TEAC, respectivamente. Foi observado também o aumento dos valores para os flavan-3-ols, alcançando médias de 15,80 mg de catequina/g e 125,45 mg de quercetina/g. O aumento dos valores encontrados para a capacidade antioxidante e teores de flavan-3-ols ocorreram provavelmente devido a redução da umidade das amêndoas que ocasionaram a concentração dos compostos antioxidantes presentes na mesma. Ao final da secagem não foi detectada atividade da enzima peroxidase, entretanto, para a polifenoloxidase, valor médio de 36,67 U/g foi encontrado, indicando uma renaturação da mesma devido possivelmente a fatores específicos presentes durante a etapa de fermentação que podem ter inibido a ação da mesma, não estando mais presentes após a secagem.

ABSTRACT

Cacao (*Theobroma cacao* L) is the tree that gives rise to cocoa, fruit of great importance to the Amazon region. Its seeds are the basis for the production of chocolate, one of the most consumed foods in the world and represents about 14 to 30% of the total weight of the fruit. Only in 2010, more than 200 million tons of cocoa beans were produced in Brazil, making it the fifth largest producer in the world and highlighting the importance of cacao in the Brazilian and world market. The cocoa industrialization process involves the steps of fermentation and drying. During these two steps occur important changes related to the development of the precursors of flavor and are linked to overall quality of the chocolate. The study of Amazon cocoa fermentation was the aim of this work. The fermentation process was monitored daily by temperature, pH and acidity of the mass for 7 days and after drying, held in a forced air oven at temperatures between 35 and 40 ° C until the moisture reached values close to 6% . At the beginning of the process the cocoa beans had the following average results: 35.93% moisture, pH 6.60, and 7.11 mEqNaOH/100g of total acidity. The cut test found evidence that cocoa beans were fermented very well and were classified as Type I (Superior) according to the official classification (CONCEX, 1988). The average composition for the final fermented were: 42.80% of moisture, pH 4.24, and 60.28 mEqNaOH/100g of total acidity. The results showed a high acidity at the end of the fermentation process leading to the belief that the volume of seed used was inadequate for the fermentation box, as well as insufficient intervals of inversion performed that may have favored the accumulation of acetic acid in the mass. Were also followed throughout the fermentation the levels of total reducing sugars, total polyphenols, and total anthocyanins, which had respectively the initial values of 0.97%, 75.63 mg/g, and 144.96 mg/100g; and 0.78%, 75.63 mg/g, and 32.31 mg/100g at the end. The observed values showed that anthocyanins were the most sensitive to the fermentation process, and reduced by about 77% of its initial value at the end of the process. Also were found the antioxidant capacity of seeds by the DPPH and TEAC methods that had initial values of cotyledon 4.46 mg/mL extract (EC50) and 87.76 µmol Trolox/g, respectively. Just for the TEAC method was shown to increase the antioxidant capacity, rising to 109.46 µmol Trolox/g at the end of the process. The levels of flavan-3-ols by the methods of Vanillin-HCl and AlCl₃ were observed throughout the fermentation and both showed an increase over the initial values, starting at 7.47 mg of catechin/g of cotyledons and 22.61 mg quercetin/g cotyledon, respectively, and finishing in 10.19 mg of catechin/g cotyledon 36.14 mg of quercetin/g cotyledon. The enzymatic activities of peroxidase and polyphenoloxidase during the fermentation were monitored. There was a reduction in activities of both enzymes at the end of fermentation. Initially values of 1792.67 U/g for peroxidase and 1269.58 U/g were observed for polyphenoloxidase. However, at the end of the process only for the peroxidase activity was detected, yielding a final value of 33.92 U/g. The influence of drying on the physicochemical parameters was observed. For the average final moisture was 5.43% and was lower than recommended for cocoa beans, however, proved to be sufficient to ensure the integrity of them during storage. There was also a reduction in acidity of the mass, reaching final values of 38.83 mEqNaOH/100g,

but for pH there was no statistical difference between the before and after drying. For proteins there was a decrease of the values found after fermentation, from 13.58% to 10.24%, probably due to the action of proteolytic enzymes that act during this step. For lipids, the behavior was found to be contrary, occurring an increase of the amount found after drying, starting at 43.94% and reaching 56.99%. For the total reducing sugars, the drying step had a positive effect, which was observed an increase of the average values, which reached 1.28%. For the total polyphenols there was a reduction from baseline, reducing to 39.15 mg/g. Regarding the antioxidant capacity, for both the DPPH method (EC50), and for TEAC were observed an increase after drying step, with final values of 4.58 mg of cotyledon/ml of extract and 187.40 $\mu\text{mol Trolox/g cotyledon}$ to TEAC and DPPH, respectively. Also were observed the increase of values for the flavan-3-ols, reaching averages of 15.80 mg of catechin/g and 125.45 mg of quercetin/g. The increase of the values found for the antioxidant capacity and levels of flavan-3-ols were likely due to a reduction of moisture from the beans that caused the concentration of antioxidant compounds present in it. At the end of drying wasn't detected any activity of peroxidase, however, for the PPO, the average value of 36.67 U/g was found, indicating a refolding of the same possibly due to specific factors present during the fermentation step that may have inhibited the action of the same, being no longer present after drying.

1 INTRODUÇÃO

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é a principal espécie pertencente ao gênero *Theobroma* e possui importância econômica e social para o Estado do Pará. Seu principal produto são as sementes, que após beneficiamento originam diversos produtos semimanufaturados, como por exemplo, a massa (*líquor*), a manteiga de cacau e produtos manufaturados, como os chocolates, aromas naturais e extratos com fins farmacêuticos.

Apenas no ano de 2009 foram produzidas 220 mil toneladas de cacau no Brasil, tornando-se o quinto maior produtor mundial de cacau (IBGE, 2010). Essa produção está concentrada no sul da Bahia (83% da oferta brasileira, especialmente nos municípios de Itabuna, Camacã e Ilhéus), seguida, em escala bem inferior, pelo Pará (9,9% da oferta brasileira, focalizada nos municípios de Medicilândia, Uruará, Altamira e Tomé-Açú) e por Rondônia (5,4% da produção brasileira, concentrada nos municípios ao longo da rodovia BR-364 ou Transamazônica) (CEPLAC, 2010).

Apesar do Estado do Pará ter importância na produção nacional, verifica-se a carência regional de informações técnico-científicas nessa área e a necessidade de gerar conhecimento a fim de suprir futuras demandas tanto nas etapas de pré-processamento e processamento de cacau.

No cacau, o desenvolvimento do sabor tem sido alvo de estudos, porém a complexidade de reações faz com que alguns mecanismos ainda não sejam totalmente compreendidos. O sabor do chocolate está atrelado não apenas a fatores genéticos e ambientais, mas também à forma como o mesmo é beneficiado. Algumas etapas, dentre elas a fermentação e secagem, são de difícil controle e compreender as mudanças que ocorrem durante essas etapas podem viabilizar medidas que assegurem uma alta qualidade e uniformidade do produto final.

Durante a fermentação, várias modificações químicas e bioquímicas responsáveis pela formação dos precursores do sabor de chocolate ocorrem.

Dentre elas estão a produção de álcool por leveduras; a produção de ácidos láctico e acético por bactérias; a morte do germen; a liberação de enzimas e substratos; a hidrólise de proteínas; a hidrólise da sacarose em glicose e frutose; e a difusão de compostos fenólicos, que entram em contato com as enzimas, dentre elas as polifenoloxidase e peroxidase, responsáveis em parte pela redução de cerca de 70% dos polifenóis durante esta etapa (NIELSEN et al., 2008; LUNA et al, 2002; WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

Os polifenóis são compostos que estão relacionadas à capacidade antioxidante do cacau. Em sementes frescas de cacau esses compostos representam 15 a 20% do peso da semente fresca (seca e desengordurada), podendo chegar a valores de 120 a 180 g/Kg. Já em amêndoas fermentadas, secas e desengorduradas, com cerca de 6% de umidade, valores próximos a 11% são indicativos de uma boa fermentação, onde valores de 23%, ou mais, são indicativos de má fermentação (NAZARUDDIN et al., 2006; WOLLGAST; ANKLAN, 2000). Nas sementes de cacau, esses compostos estão armazenados em células de pigmentos localizadas no cotilédone (WOLLGAST; ANKLAN, 2000; DREOSTI, 2000).

A etapa de secagem deve ser iniciada logo após a fermentação e deve ser conduzida de modo que não seja muito rápida, nem muito lenta, evitando que ocorra uma secagem heterogênea das amêndoas e o crescimento de fungos, bem como para que a volatilização dos ácidos formados durante a fermentação ocorra de forma mais efetiva.

Neste estudo foi pesquisado o comportamento cinético das variações dos compostos fenólicos e enzimas oxidativas durante o período de fermentação das sementes de cacau da Amazônia. Além disso, este trabalho utilizou uma metodologia de fermentação alternativa, baseada na caixa de madeira T-60 desenvolvida pelo pesquisador J. Grimaldi.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar durante a fermentação de cacau *Forastero* da Amazônia as alterações químicas e enzimáticas que influenciam a qualidade das amêndoas fermentadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar física e físico-quimicamente os frutos e sementes de cacau;
- Avaliar a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase durante o processo de fermentação;
- Avaliar a degradação das polifenóis totais durante a fermentação;
- Avaliar os principais parâmetros de quantificação da capacidade antioxidante durante a fermentação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS

O cacau (*Theobroma cacao* L.) (Figura 1) é a árvore que produz o cacau, um fruto que possui grande expressão econômica no Brasil e no mundo. O fruto é consumido *in natura* ou em forma de refresco, licor, dentre outros produtos obtidos de sua polpa. Entretanto, sua maior aplicação está no fato de suas amêndoas, mundialmente conhecidas, serem empregadas na fabricação de chocolate, um alimento de alto valor nutritivo (CAVALCANTE, 1991).



Figura 1. O cacau (*Theobroma cacao* L.).

Acredita-se que o cacau seja proveniente do Alto Amazonas, na confluência dos Rios Solimões, Putumayo e Caquetá. Em condições espontâneas o cacau é encontrado no estrato interior das florestas, em clareiras e beirando os grandes rios, onde predominam condições de temperatura e umidade elevadas, típicas das regiões tropicais (BARTLEY, 2005).

Segundo referências do IBGE (2010) o Brasil produziu 220 mil toneladas de cacau em 2009, a área plantada com cacau no Brasil estava em torno de 680

mil ha (sul da Bahia: 95%; norte do Espírito Santo: 2,5%; e Estados da Amazônia: 2,5%). A produtividade correspondeu em média a 324 Kg/ha.

No Brasil, os órgãos que trabalham com pesquisas agrícolas e tecnológicas com o cacau são: CEPLAC (Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira), vinculado ao Ministério da Agricultura, e o CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau), ambos em Ilhéus, Bahia. Sendo que há uma unidade da CEPLAC estabelecida no norte do Brasil, no município de Marituba, no Estado do Pará, possuindo o maior banco de germoplasma de cacau.

O fruto é composto por casca, polpa, placenta e sementes, como pode ser observado na Figura 2. Cada fruto contém entre 30 a 40 sementes envoltas numa polpa adocicada, mucilaginosa, levemente presas à placenta (DOYLE et al., 1997).

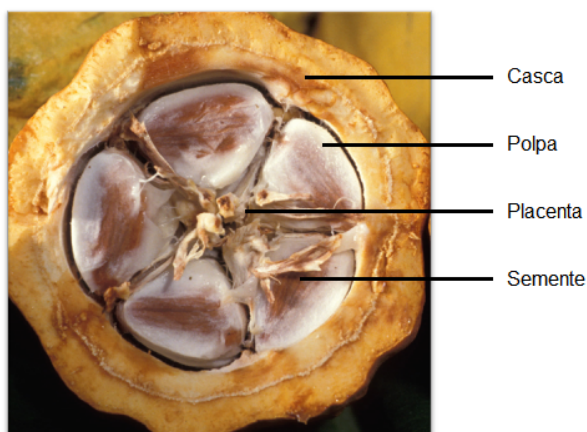


Figura 2. Corte transversal do fruto de cacau da variedade *Forastero*.

As sementes constituem cerca de 13,5 a 29% da massa total do fruto. O comprimento das mesmas varia entre 21 e 29 mm, a largura entre 10 a 17 mm, e sua espessura entre 8 e 12 mm (ZAMALLOA, 1994). A semente de cacau é formada pelo mesocarpo, endocarpo, espermoderma, endosperma e cotilédones. Essas quatro primeiras camadas constituem a testa ou tegumento da semente. Os cotilédones ficam envoltos na testa e representam a parte útil da semente na fabricação de chocolate e de manteiga de cacau (BEUK, 1997). As sementes são cobertas por uma polpa mucilaginosa doce, acidulada e de sabor agradável (Figura 3).

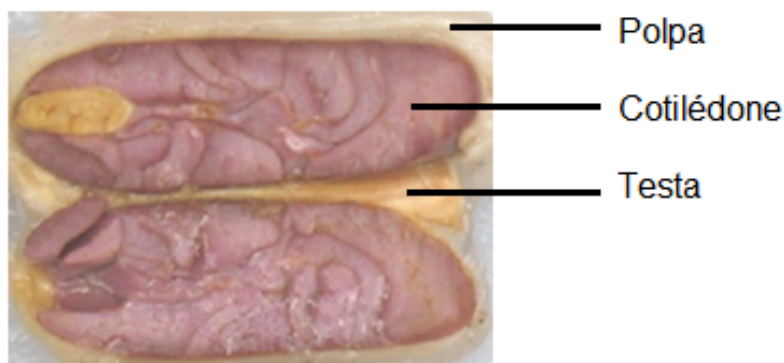


Figura 3. Corte longitudinal de semente de cacau.

3.1.1 Variedades

Cheesman (1944) propôs dois grupos morfogeográficos: *Criollo* e *Forastero*. Um terceiro grupo, *Trinitário*, responsável atualmente por 15% da produção de chocolate (CEPLAC, 2010a), foi descrito como um híbrido entre *Criollo* e *Forastero*. Atualmente, as variedades *Forastero* são estudadas pela sua origem geográfica: Alto Amazonas, Baixo Amazonas, Orinoco e Guyana, e também é classificado de acordo com a morfologia do fruto, como tipo Amelonado, caracterizado pela forma de melão, é encontrado no Brasil, na Bacia do Orinoco e nas Guianas.

A variedade *Forastero* é caracterizada por árvores maiores e mais vigorosas, e por isso que atualmente formam a maior parte do cacau plantado. Suas sementes são menores e achatadas quando comparadas ao *Criollo*, e seus cotilédones possuem cor violácea devido a presença de antocianinas que constituem cerca de 0,5% do seu peso e são ausentes na semente de *Criollo* (NAZARUDDIN et al., 2006; SCHWAN, 1996). O sabor derivado delas é mais forte e fornece a base para o chocolate amargo e ao leite. Apresenta também maior quantidade de gordura (WOOD; LASS, 1985).

Mais recentemente, Motamayor et al. (2008), em estudo sobre o mapeamento genético e geográfico de diversos tipos de cacauzeiros, propõe uma nova classificação com dez grandes grupos: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional and Guiana. Segundo os autores essa nova classificação reflete com maior precisão a diversidade genética

disponível para os agricultores, ao invés da classificação tradicional, encorajando aos novos produtores e estudiosos a adotar esse tipo de classificação.

3.1.2 Composição Química

A composição química das amêndoas fermentadas e secas de cacau depende de diversos fatores, dentre eles a espécie e origem das sementes, das práticas agrícolas e do grau de maturação dos frutos. A Tabela 1 apresenta a composição química média da amêndoa de cacau, segundo alguns autores.

Tabela 1. Composição química média da amêndoa de cacau expressa em relação à matéria seca, segundo alguns autores.

COMPONENTES	FERNÁNDEZ-BARBERRY ¹	FADINI ²	GILABERT ESCRIVÁ ³
Umidade	7,2%	-	-
Lipídios	53,7%	53,8%	50,2%
Proteínas	13,6%	19,15%	17,8%
Carboidratos	16,0%	18,8%	17,7%
Fibras	5,5%	5,6%	5,2%
Cinzas	2,8%	2,8%	2,6%
Teobromina	1,1%	-	-
Cafeína	0,2%	-	-

¹ 1999

² 1998

³ 1997

As sementes estão envoltas em polpa que representam cerca de 40% do peso da semente fresca, e sua composição é rica em açúcares (10-13% glicose e frutose; 0,7% sacarose), sais (8-10%), pentoses (2-3% pectina), ácidos orgânicos (1-2%) e proteínas (0,6%) (SCHWAN; WHEALS, 2004).

3.2 PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU

O pré-processamento do cacau compreende nas seguintes etapas: colheita, abertura dos frutos, retiradas das sementes, extração da polpa ou do exudado, fermentação das sementes, secagem e armazenamento das amêndoas.

3.2.1 Colheita e Quebra do Fruto

Estudos para cacau mostraram que a maturidade do fruto é muito importante para uma boa fermentação, pois amêndoas oriundas de frutos sobremaduros podem apresentar germinação, havendo conseqüentemente risco de contaminação interna devido ruptura da casca fina. Já no caso de frutos colhidos antes da maturidade plena, a polpa vai conter reduzido teor de açúcares e, portanto, a fermentação pode ser retardada e apresentará baixo rendimento (BRAUDEAU, 1969).

Recomenda-se que haja um período intermediário de espera entre a colheita e a fermentação, pois é necessário que certos fenômenos bioquímicos ocorram, como a liberação de açúcares contidos na polpa, os quais são indispensáveis a fermentação (CAMU et al., 2008; HASHIM, et. al 1998; BECKETT, 1994; ARAGÃO, 1992; BAREL, 1987). Em estudos realizados por Barel (1987) e Portillo et al. (2005), segundo Ortiz de Bertorelli et al. (2009), o melhor resultado de tempo de espera entre a colheita e a quebra do fruto se dá entre o quinto e sexto dia de espera.

Após a colheita, os frutos devem ser quebrados e deles retiradas as sementes com a polpa aderida, que serão submetidas à fermentação. O período entre a quebra e o início da fermentação não deve ser superior a 24 horas para que não ocorram reações químicas indesejáveis. Sementes provenientes de quebras em dias diferentes não devem ser fermentadas juntas, pois isso conduz a uma fermentação desigual (EFRAIM, 2004; CEPLAC, 1980).

3.2.2 Fermentação

A fermentação do cacau é um processo complexo. É uma das etapas mais importantes do pré-processamento, pois nesta fase de beneficiamento iniciam-se importantes transformações físicas, bioquímicas e estruturais que contribuem significativamente para o desenvolvimento de sabor, aroma e cor do chocolate,

características reveladas posteriormente na fase de processamento, principalmente na torração, das amêndoas (VALLE, 2007).

No processo de fermentação, considera-se como fatores importantes o sistema de fermentação (caixa, monte, cesto etc.); a temperatura ambiente e da massa em fermentação; o pH e a acidez da polpa e do cotilédone; o tempo de fermentação; o revolvimento da massa; a microflora presente; dentre outros (LOPES, 2000; BISPO, 1999; ROHAN; CONNEL, 1964).

A fermentação das sementes de cacau pode ser realizada de várias formas. Os sistemas mais usados são os montes, cestos, caixas de madeira e bandejas. No Brasil, a CEPLAC recomenda o uso de caixas de madeira, conhecidas como cochos de fermentação, construídas medindo de 0,90 a 1,20 metros de largura por 0,90 a 1,00 metro de altura e comprimento variável de 2,00 a 6,00 metros. As caixas são dotadas de paredes divisórias removíveis no sentido da maior dimensão para facilitar o revolvimento da massa em fermentação. O fundo deve conter orifícios com 0,6 a 1,0 centímetros de diâmetro espaçados de 15 em 15 centímetros para a drenagem dos líquidos liberados durante o processo e aeração da massa (CEPLAC, 2001).

Grimaldi (1978) propôs a utilização de uma caixa de fermentação contínua, a qual denominou T-60 (Figura 4). A caixa é composta por três compartimentos, cada um adequado a uma fase da fermentação. O pesquisador recomenda que após 48 horas as amêndoas sejam transferidas do compartimento 1 para o compartimento 2 e após 96 horas do compartimento 2 para o 3. Esse tipo de caixa constitui um excelente método, pois permite bom controle da fermentação e proporciona a cada fase as condições ideais para o melhor andamento do processo (MATTIETTO, 2001).

O tempo recomendável de duração da fermentação está entre cinco e sete dias, não sendo recomendáveis menos de cinco e mais de sete dias (FERNANDEZ-BARBERY, 1999), onde uma fermentação excessiva, superior à sete dias, resulta em um cacau de coloração castanho escuro, com cheiro de

amônia ou odor desagradável de matérias em putrefação (DIAS, 2001; FREIRE et al., 1992).

Durante o processo, a massa de cacau é coberta com sacos de juta ou folhas de bananeira para reduzir perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial. A CEPLAC não recomenda a utilização de plásticos como cobertura porque dificultam a aeração. A folha de bananeira também atua propiciando uma inoculação atribuída aos microrganismos existentes na superfície desta folha (microbiota selvagem) (LOPES et al., 2003).

A massa de sementes deve sofrer revolvimentos ao longo do processo. A CEPLAC (1980) e Lajus (1982) indicam períodos de 24, 48, 96, 120 e 144 horas, porém de acordo com Dias (2001), os tempos seriam 48, 72, 96, 120 e 144 horas após o início do processo. Esse revolvimento é muito importante no decorrer da fermentação, pois a aeração controla o nível de acidez e os acréscimos de temperatura e influencia na atividade enzimática necessária ao desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate (LEAL et al., 2008; SCHWAN et al., 1996).

De acordo com a CEPLAC (1980) o término da fermentação é definido pela estabilização da temperatura e aparência externa das sementes, apresentando coloração vermelho-castanho intensa e aroma de vinagre devido à formação do ácido acético durante o processo fermentativo. O cacau não fermentado apresenta cotilédones compactos, de coloração cinza-escuro ou roxo e de sabor extremamente amargo (VALLE, 2007).

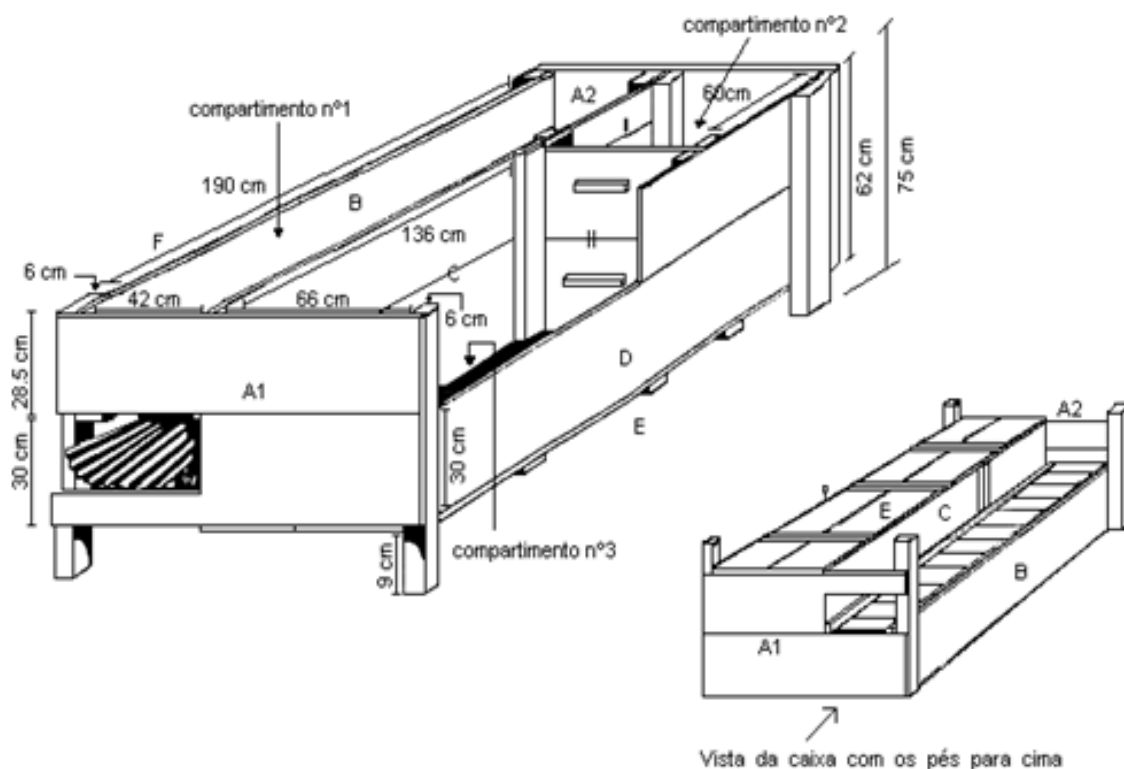


Figura 4. Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por Grimaldi (1978).

3.2.3 Secagem

Esta etapa deve ser iniciada imediatamente após a fermentação. Não deve ser realizada de maneira lenta ou mal conduzida para evitar o crescimento de fungos que, quando presentes, conferem sabor desagradável ao produto final, portanto, fazem-se revolvimentos constantes para facilitar a entrada de oxigênio na massa (EFRAIM, 2004). Por outro lado, a secagem não deve ser efetuada de forma demasiadamente rápida através do emprego de temperaturas elevadas para evitar problemas com a gordura (manteiga de cacau) e com o desenvolvimento do sabor do chocolate. Muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam nesta etapa. Segundo Fagunwa et al. (2009), Lopez e Quesnel (1973) e Rohan e Stewart (1967), a taxa de umidade das amêndoas deve ser reduzida de 40-50% para 6-8%.

Para a secagem do cacau utilizam-se duas técnicas básicas: a secagem natural e a secagem artificial, distinguindo-se pela fonte de calor e pelo tipo de equipamento utilizado. Pode também ser aplicado a combinação dos dois métodos de secagem.

Aparentemente, a secagem natural tornou-se o método mais utilizado na secagem de cacau, principalmente no Oeste Africano e América Latina, devido não apenas a questões socioeconômicas, mas também à falta de conhecimento sobre os elementos da secagem de sementes de cacau utilizando ar forçado. Esse tipo de secagem tem como principal vantagem o baixo custo, e como desvantagens o tempo necessário para realização de todo o processo assim como a facilidade de crescimento de microrganismos nas amêndoas devido ao alto teor de sujidade aderida à sua casca, já que as mesmas ficam próximas ao solo em ambiente aberto sob condições ambientais irregulares (RAMÔA, 2008).

Além da eliminação de água, a secagem do cacau dá continuidade às mudanças bioquímicas, iniciadas na fermentação, que vão contribuir para o sabor, aroma e cor característicos do chocolate (COUNET; COLLIN, 2003; LUNA, et al. 2002). A secagem é também responsável pela redução da acidez das amêndoas (GARCÍA-ALAMILLA, 2006; CUNHA; SERÔDIO, 1991).

3.3 PROVA DE CORTE

Tradicionalmente, o grau de fermentação do cacau é determinado usando o teste de corte onde as amêndoas secas são cortadas ao meio no sentido longitudinal e a coloração interna é examinada. Amêndoas de cotilédone cinza foram pouco fermentadas; violeta foram parcialmente fermentadas; e marrons foram completamente fermentadas (Figura 5) (LOPEZ; DIMICK, 1995; LOPEZ, 1984; ROHAN; CONNEL, 1964).

De acordo com a Resolução nº 161 do CONCEX (1988), para que as sementes fermentadas e secas de cacau apresentem classificação do Tipo I Superior, a soma dos defeitos não deve ultrapassar a tolerância de 6%, sendo 2%

para cada defeito isoladamente. Esses defeitos incluem amêndoas mofadas, achatadas e ardósias.

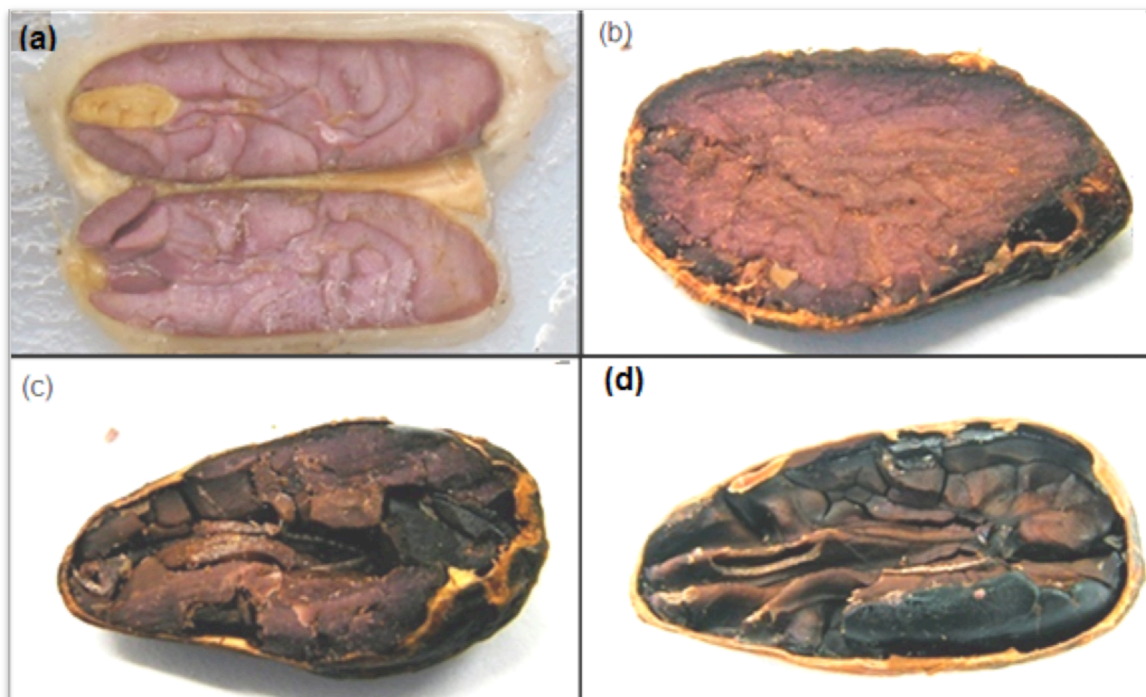


Figura 5. Classificação da semente quanto ao grau de fermentação: *in natura* (a); mal fermentada (b); parcialmente fermentada (c); bem fermentada (d).

3.4 BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO

Durante a fermentação a polpa do cacau sofre a ação de microrganismos presentes naturalmente no meio. As leveduras convertem os açúcares simples presentes na polpa em etanol. Na sequência, bactérias acéticas e, em partes, as lácticas, oxidam o etanol a ácido acético e lático e liberam energia (calor). Com o aumento da concentração parte dos ácidos produzidos durante essa primeira etapa, esse compostos penetram a testa e alcançam o cotilédone, acidificando-o e causando a morte do gérmen e, conseqüentemente, o rompimento das paredes celulares, permitindo que substâncias presentes no interior das mesmas (proteínas, compostos fenólicos, enzimas, entre outros) se espalhem pelo cotilédone, iniciando assim várias reações responsáveis pela mudança de cor, sabor e aroma da massa em fermentação (NIELSEN et al., 2008).

A polpa, que após a fermentação transforma-se em um líquido, chamado exudado, escorre e é drenada. Como resultado da drenagem o ar é introduzido no sistema e começa uma segunda etapa de fermentação (WILLEMSEN; KATTENBERG, 2001). A partir do terceiro dia a temperatura das sementes alcança entre 45 e 50°C permanecendo assim até o final da fermentação (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

Neste segundo estágio de fermentação, os ácidos formados no primeiro estágio vão permitir uma série de modificações bioquímicas necessárias para o desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma de chocolate (JINAP, 1994). Essas modificações incluem a formação de aminoácidos livres e de peptídeos através da ação das proteases aspárticas e carboxipeptidases sob as proteínas (VOIGT et al., 1993), e de açúcares redutores, como a frutose e glicose, através da ação da enzima invertase sob a sacarose (BIEHL; VOIGT, 1996), que atingem suas atividades máximas no segundo e terceiro dia de fermentação, especialmente quando ocorre a morte da semente e que reduz com o progresso dessa etapa (BRITO et al., 2001; HASHIM 1998).

Segundo Brito et al. (2001), a sacarose é o único açúcar presente em concentração significativa na semente (18,78 g/Kg) representando 95% do total de açúcares. Durante a fermentação, a quantidade de sacarose e açúcares totais diminui em cerca de 90 e 75%, respectivamente, enquanto que a quantidade de açúcares redutores totais, glicose e frutose, aumentam cerca de 400, 100 e 200%, respectivamente.

Os aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores, através da reação de Maillard, são condensados, formando compostos (pirazinas) responsáveis pelo sabor e aroma durante a torração do cacau (BRITO et al., 2001; MOHR et al., 1976; ROHAN, 1972). Segundo Kratzer et al. (2009), Noor-Soffalina et al. (2009) e Voigt et al. (1993) além dos açúcares redutores, os peptídeos e aminoácidos livres hidrofóbicos são os precursores específicos do sabor de chocolate. Trabalhos prévios mostraram que alguns aminoácidos livres hidrofóbicos como a leucina, alanina, fenilalanina e tirosina são alguns dos mais importantes

componentes que contribuem para a formação desse sabor, e são desenvolvidos durante a fermentação das sementes (BRITO et al., 2001; MOHR et al., 1976).

As pirazinas representam 40% do total de compostos identificados no sabor do chocolate e são normalmente encontradas durante a torração dos *nibs* (cotilédones fragmentados de cacau) (MISNAWI et al., 2004; MAGA, 1992; SILWAR, 1988; KOEHLER et al., 1969). Esses compostos também são produzidos durante a fermentação, sendo detectadas em altas concentrações em alguns alimentos fermentados (BELITZ et al., 2009; MISNAWI et al., 2004; BESSON et al., 1997).

Algumas bactérias são responsáveis pela produção de pirazinas durante a fermentação e entre elas estão o *Bacillus spp.* e o *Lactococcus lactis* (SCHAWN; WHEALS, 2004; BESSON et al., 1997; KIM et al., 1994), identificado como espécies de bactérias láticas predominantes durante a fermentação de cacau (MÜLLER; RAPPERT, 2010; KOSTINEK et al., 2008; SCHWAN; WHEALS, 2004; ARDHANA; FLEET, 2003; THOMPSON et al., 2001).

Durante a fermentação a composição de aminoácidos nas sementes de cacau não fermentadas e fermentadas muda sensivelmente. Sementes não fermentadas de cacau possuem concentrações significativas de aminoácidos totais (5,16 g/kg), aminoácidos ácidos (0,93 g/kg), aminoácidos hidrofóbicos (1,56 g/kg) e outros aminoácidos (2,68 g/kg) (YUSEP et al. 2002; HASHIM et al., 1998; KIRCHHOFF et al., 1989). Ao final da fermentação, os aminoácidos totais, hidrofóbicos, e outros, aumentam cerca de 150, 280 e 130%, enquanto é observada uma queda em torno de 15% nos aminoácidos ácidos (PINTO; CHICHESTER, 1996; OTHMAN et al., 1992). Dos aminoácidos hidrofóbicos, as concentrações de leucina, valina, tirosina, isoleucina e fenilalanina são as que mais aumentam (em torno de 270, 360, 400, 750 e 1900%) e as que mais contribuem para a formação do sabor (YUSEP et al., 2002; HASHIM et al., 1998; KIRCHHOFF et al., 1989; MOHR et al., 1976; ROHAN; CONNEL, 1964).

O acúmulo desses aminoácidos durante a fermentação está ligado a atividade específica da protease aspártica das sementes, que quebram as

proteínas preferencialmente próximas aos peptídeos hidrofóbicos, permitindo a ação limitada da carboxipeptidase de liberar os aminoácidos e peptídeos hidrofílicos (BRITO et al., 2004; VOIGT et al., 1993).

A etapa de fermentação também é responsável pela redução significativa dos polifenóis solúveis presentes na semente de cacau fresca, implicando na redução da adstringência das sementes de cacau (LUNA et al, 2002).

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

3.5.1 Definição

Quimicamente, um fenol é definido como uma substância que possui um anel aromático ligado à uma hidroxila podendo ter vários grupos substituintes como carboxilas, metoxilas, outras estruturas cíclicas não aromáticas, entre outras (BEZERRA, 2008; NYCHAS, 1995). A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes como mostradas na Tabela 2 (ANGELO e JORGE, 2007; HARBORNE, 1989).

Dentre os fenólicos destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, as proantocianidinas e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (KING; YOUNG, 1999; SHAHIDI; NACZK, 1995). Esses compostos encontram-se disponíveis nos frutos, vegetais, sementes, flores e em suas cascas e são produtos do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento (ANGELO; JORGE, 2007).

Tabela 2. Classe de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ -C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆

Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanás, neolignanás	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Proantocianidinas	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: Angelo e Jorge (2007); Harborne (1989).

3.5.2 Vias de Formação

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, ou seja, do conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas. O metabolismo secundário é imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta-ambiente (BEZERRA, 2008).

As substâncias, produtos desse metabolismo secundário das plantas, são conhecidas principalmente como “princípios ativos”. Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas, no entanto sua produção é associada à defesa da planta contra herbívoros, ataque de patógenos, radiação solar, ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes e também em alelopatias (BEZERRA; 2008; SANTOS, 2002).

Os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biogénicas: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato, que inicia com a acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogénica determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, formado a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas

dispostas em *meta* (FÜLLER, 2008; ALMEIDA; 2007; CARVALHO et al., 2001; BRUNETON, 1991).

3.5.3 Propriedades Funcionais

Entre os seres vivos, apenas os vegetais e os microrganismos são capazes de sintetizar compostos fenólicos (SIQUEIRA et al., 1991). Esses compostos estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários, sendo conhecidos pela sua grande importância no sistema solo-planta (ALMEIDA, 2007).

A maioria dos estudos relaciona os compostos fenólicos ao estresse metabólico, parede celular e exudados de raízes e sementes. Esses compostos tem importância na pigmentação de flores e na proteção contra pragas e doenças (BRUNETON, 1991). A contribuição dos compostos fenólicos para os mecanismos de defesa dos vegetais e às características sensoriais e nutricionais estão estabelecidas (NYCHAS, 1995), entretanto, a função da maior parte dos compostos fenólicos não (SIQUEIRA et al., 1991). Esses compostos, por sua vez, tem sido alvos de pesquisa e interesse pelo seu benefício à saúde, incluindo efeitos anticarcinogênico, antiaterogênico, antiúlcera, antitrombótico, antiinflamatório, modelador do sistema imunológico, antimicrobiano, vasodilatador e analgésico (RUSCONI; CONTI, 2010).

3.5.4 Compostos Fenólicos Presentes no Cacau

O cacau e seus derivados, como o chocolate, são amplamente consumidos em vários países e culturas. Em alguns países o consumo de chocolate contribui em até 20% da ingestão de compostos fenólicos em adultos, e em crianças essa porcentagem é ainda maior, chegando a fornecer cerca de 100 mg/dia (RUSCONI; CONTI, 2010).

Em sementes frescas de cacau esses compostos representam 15 a 20% do peso da semente fresca (seca e desengordurada), podendo chegar a valores

de 120 a 180 g/Kg. Já em amêndoas fermentadas, secas e desengorduradas, com cerca de 6% de umidade, valores de fenólicos totais próximos a 11% são indicativos de uma boa fermentação, enquanto valores iguais ou superiores a 23% são indicativos de má fermentação. Esses valores são válidos para a variedade *Forastero*. A variedade *Criollo* apresenta aproximadamente 2/3 desses valores, excluindo-se as antocianinas, que não são encontradas nos cotilédones de suas sementes (NAZARUDDIN et al., 2006; WOLLGAST; ANKLAN, 2000). Nas sementes de cacau, esses compostos estão armazenados em células específicas no cotilédone (WOLLGAST; ANKLAN, 2000; DREOSTI, 2000).

Dos polifenóis vistos na Tabela 2, o foco dos estudos neste trabalho serão os flavonóides, presentes em grandes quantidades no cacau. Os flavonóides seguem uma estrutura básica de C6-C3-C6, sendo dois anéis aromáticos (A e B) e uma ligação entre 3 carbonos formando um heterociclo oxigenado (OLIVEIRA, 2005; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; FINE, 2000; PIETTA, 1999). Sua estrutura básica é mostrada na Figura 6.

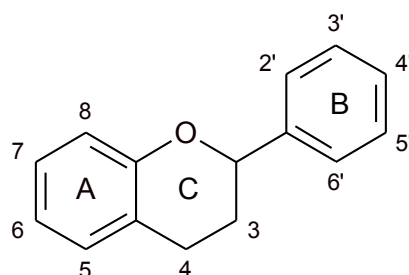
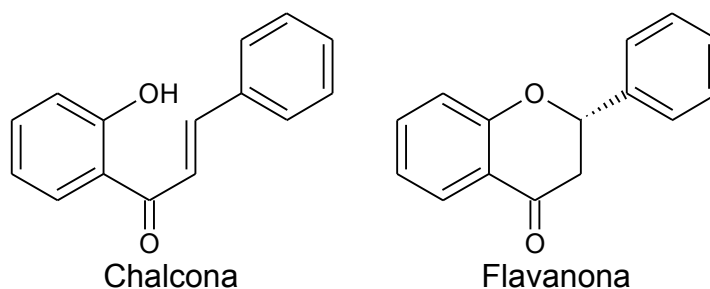


Figura 6. Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides.

Os flavonóides estão divididos em subclasses baseados nas ligações existentes nos anéis B e C bem como no grau de saturação, oxidação e hidroxilação do anel C. Na Figura 7 estão representados os principais flavonóides encontrados em plantas.



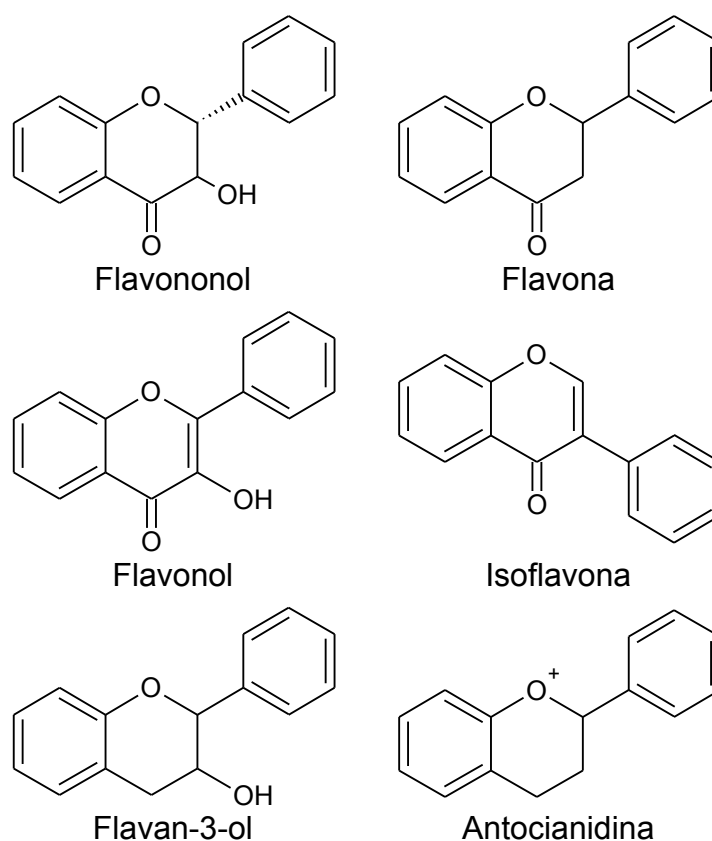


Figura 7. Principais flavonóides encontrados em plantas.

A classe que será foco do estudo é a classe dos flavan-3-óis, encontrada em grandes quantidades em sementes de cacau na forma de catequina e epicatequina (Figura 8), podendo juntas representar até 37% do total de compostos fenólicos presentes na mesma (ZHU et al, 2002; HATANO et al, 2002; WOLLGAST; ANKLAN, 2000; BONVEHÍ; COLL, 1996).

Além da catequina e epicatequina, as antocianinas e as proantocianidinas estão presentes em grandes quantidades no cacau, chegando a cerca de 4 e 58% do total de compostos fenólicos da semente, respectivamente (OLIVEIRA, 2005; WOLLGAST; ANKLAN, 2000).

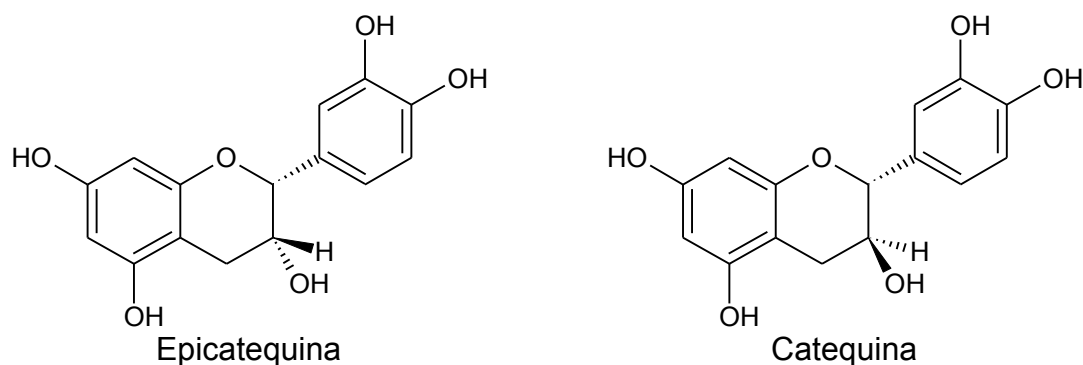


Figura 8. Estrutura da (-)-epicatequina e (+)-catequina.

3.5.5 As Antocianinas no Cacau

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides (grupo de pigmentos naturais com estruturas fenólicas variadas), apresentando em sua estrutura química um resíduo de açúcar na posição 3, facilmente hidrolisado na fermentação do cacau. Hansen et al. (1998) atribui a hidrólise das antocianinas pelas enzimas β -galactosidase e pela α -arabinosidase, que apresentam pronunciada estabilidade no decorrer da etapa de fermentação. Como produtos da hidrólise da antocianina obtém-se um açúcar e uma antocianidina (aglicona) (ARSEGO et al., 2002).

As antocianinas são componentes presentes em frutas vermelhas e hortaliças escuras (DOWNHAM; COLLINS, 2000) e representam um significativo papel na prevenção ou retardamento do aparecimento de várias doenças por suas propriedades antioxidantes (KUSKOSKI et al., 2004; MARTÍNEZ-FLÓREZ, 2002). Segundo Niemenak et al. (2006), a antocianina majoritária da semente de cacau é 3- α -L-arabinosidil-cianidina (Figura 9).

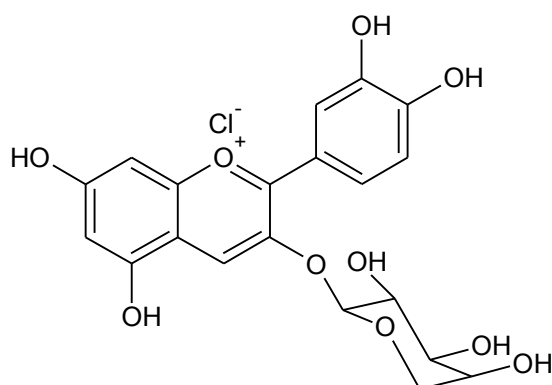


Figura 9. A 3- α -L-arabinosidil-cianidina.

Uma característica marcante das antocianinas está no fato de as mesmas apresentarem diferentes estruturas e coloração em função do pH. De modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico (AH^+). Para um meio com pH maior que 2, é observado um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (B). Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH aproximadamente 6, devido à predominância da espécie pseudobase carbinol. Em valores de pH acima de 6,0, tanto a estrutura pseudobase carbinol quanto anidrobases quinoidais (A) podem formar a espécie cis-chalcona (C_C). A formação desta ocorre com a ruptura do anel heterocíclico o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível. A formação da cis-chalcona a partir da anidrobases quinoidal pode ocorrer por dois caminhos diferentes: de maneira direta, resultado de um aumento brusco de pH, ou com a formação das espécies anidrobases ionizadas (A^-), possivelmente provenientes de um aumento gradual de base entre os valores de pH 6,5 e 9. Ao iniciar-se a ionização das antocianinas, são formadas estruturas de anidrobases que exibem coloração azul. Em meio extremamente alcalino, observa-se o equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas cis e trans, apresentando coloração amarelada (MARÇÓ; POPPI, 2008; GALVANO, et al., 2004; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; TERCI; ROSSI, 2002; BOBBIO, 2001).

O aquecimento é um fator que acelera a degradação das antocianinas. Em presença de cátions de Al, Fe, Sn e outros metais, as antocianinas formam produtos insolúveis que, no caso do alumínio, encontram aplicações como

corantes que apresentam estabilidade ao calor, pH e oxigênio superior à das antocianinas livres. Além do pH, a luz é um outro fator de grande importância na alteração da cor das antocianinas. A transformação é mais intensa quando o fator luz é combinado com o efeito do oxigênio. As antocianinas também podem se combinar com HSO_3^- presente em muitos alimentos formando produtos incolores provenientes da ligação deste com o carbono 4 da antocianina. A estabilidade das antocianinas ao descolorimento é aumentada consideravelmente pela presença de ácidos fenólicos. O mesmo efeito é observado pela presença de flavonóides não-antociânicos, especialmente os flavonóis, como por exemplo a rutina. Compostos como o acetaldeído, amino ácidos, taninos, dentre alguns outros, também conferem aumento na estabilidade da molécula. Esse aumento na estabilidade é atribuído à copigmentação, ou seja, associação entre antocianina e flavonol (copigmento) por ligações de hidrogênio, de modo que o flavonol venha a formar uma estrutura protetora envolvendo a antocianina (MARÇO; POPPI, 2008; GALVANO et al., 2004; BOBBIO, 2001).

3.5.6 Fatores Relacionados à Redução dos Fenólicos Durante o Beneficiamento do Cacau

A etapa de fermentação é a maior responsável pela redução significativa de polifenóis solúveis do cacau (LUNA et al, 2002). A redução dos polifenóis solúveis ocorre através da perda do exudado (LUNA et al, 2002; WOLLGAST; ANKLAM, 2000) e pela ação da enzima polifenoloxidase, que se estende até a etapa de secagem (AMAROWICZ et al., 2009; MISNAWI et al., 2002).

A polifenoloxidase (PPO) (1,2 benzenodiol: oxigênio óxido-redutase) é um conjunto de enzimas cúpricas, denominadas freqüentemente de tirosinase, polifenolase, fenolase, catecol oxidase, creolase ou catecolase, dependendo dos substratos utilizados na reação de escurecimento dos tecidos vegetais (SILVA et al., 2009; ELBE; SCHWARTZ, 2000; ARAÚJO, 1999).

Na natureza, a PPO e os substratos fenólicos são separados dentro das células vivas, predominantemente em membranas tilacóides do cloroplasto e os substratos fenólicos em vacúolos; entretanto, sob qualquer tratamento que

danifique a célula, a enzima e o substrato podem entrar em contato, permitindo uma rápida oxidação dos fenóis. (EFRAIM, 2004; MISNAWI et al., 2002).

A PPO catalisa a oxidação de monofenóis e difenóis (Figura 10) na presença de oxigênio com produção de quinonas (compostos de cor amarelada). As quinonas formadas nessas reações polimerizam-se formando melaninas (compostos de cor marrom escura) (MISNAWI et al., 2002; NICOLAS, 1994; SIGNORI et al., 1994).

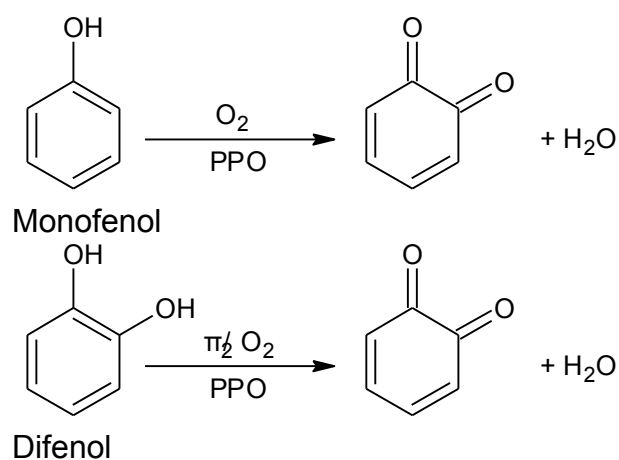


Figura 10. Mecanismo de ação da polifenoloxidase (PPO) sob os monofenóis e difenóis.

Devido a ação dessa enzima os polifenóis presentes são oxidados e grande parte formam polímeros de altos pesos moleculares chamados de polifenóis condensados (EFRAIM, 2010; HANSEN; OLMO; BURRI, 1998). Segundo Bonvehí e Coll (1996) os compostos polifenólicos e os flavonóides presentes na semente de cacau são submetidos a uma oxidação bioquímica onde estes compostos aumentam suas cadeias poliméricas, podendo se complexar com proteínas, diminuindo a solubilidade e o sabor adstringente característicos dos polifenóis e flavonóides.

Além da polifenoloxidase, a peroxidase também está presente no cacau (NDOUMOU et al., 1995). Essa enzima oxida eficientemente os compostos fenólicos usando H_2O_2 como co-substrato (SAKHAROV; ARDILA, 1999).

Uma baixa atividade da polifenoloxidase e da peroxidase, ou condições que podem levar a uma redução da atividade das mesmas, tem sido apontadas como fatores responsáveis pela cor violácea em amêndoas mal fermentadas.

Ocasionalmente a oxidação enzimática é inibida pela falta de aeração na massa (EFRAIM, 2004; BRITO et al., 2001; REEVES et al., 1988).

3.6 CINÉTICA DA REAÇÃO

A cinética química trata das velocidades das reações químicas, isto é, de como a velocidade varia em função das diferentes condições e quais mecanismos controlam o desenvolvimento de uma reação. Dentre os fatores que mais contribuem para o decorrer de uma reação química, pode-se citar: a natureza dos reagentes e produtos, a concentração das espécies reagentes, o efeito da temperatura e a influência dos agentes externos chamados catalisadores (ATKINS, 2001).

A partir do estudo da velocidade de reação, é possível ainda estabelecer relações por meio das quais se pode definir a ordem cinética da reação, que pode ser de zero, primeira ou segunda ordem. Os modelos se propõem descrever aspectos do comportamento do sistema real, através do estabelecimento de equações matemáticas. Porém, dificilmente descrevem perfeitamente a realidade, a não ser o suficiente para responder as hipóteses específicas. O uso da modelagem de dados experimentais permite a discussão de hipóteses que visam à elucidação das tendências gerais do sistema estudado e para fazer comparações quantitativas (CUNHA-SANTINO, 2003; LABUZA; RIBOH, 1982).

De acordo com Labuza (1984), a maior parte das reações nos alimentos que têm sido estudadas são basicamente caracterizadas como de ordem zero ou primeira ordem. Alguns exemplos característicos destes tipos de alterações são mostrados na Tabela 3.

Nas reações de ordem zero a velocidade da reação é independente da concentração dos reagentes, e estas ocorrem, freqüentemente, em alimentos onde há limitação de difusão de certos participantes da reação. As reações de primeira ordem, que dependem da concentração dos reagentes, são as mais comuns e bastante estudadas em alimentos (VITALI; TEIXEIRA NETO, 2002).

Tabela 3. Importantes alterações nos alimentos que seguem cinéticas de ordem zero ou primeira ordem.

Ordem aparente da reação	Alteração no alimento
Zero	Escurecimento não-enzimático (Maillard).
Primeira	Morte/crescimento de microorganismos; Oxidação de pigmentos;

Fonte: Taoukis et al. (1997).

Em uma reação de ordem zero, a taxa de alteração é constante com o tempo, enquanto que em uma reação de primeira ordem esta taxa apresenta decréscimo exponencial. As equações das reações de ordem zero (Eq. 1) e de primeira ordem (Eq. 2), resultantes da integração da Equação 1 para $n=0$, $n=1$, respectivamente, são mostradas a seguir (FU; LABUZA, 1997):

$$C = C_0 - kt \quad (\text{Eq. 1})$$

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: C_0 = fator de qualidade inicial; C = fator de qualidade no tempo decorrido; k = constante da reação; t = tempo decorrido.

Deve-se dar ênfase ao fato de que as equações utilizadas para descrever a cinética das reações dos alimentos não representam o mecanismo real destas reações e, portanto, deve-se considerar que a ordem de reação é aparente (TAOUKIS, et al., LABUZA; SAGUY, 1997).

Nas reações de ordem zero, obtém-se gráfico um linear da progressão da reação versus o tempo. Já para o modelo de primeira ordem, a linearização é alcançada através do emprego do logaritmo Neperiano, que nesse caso representa o fator a ser medido com o decorrer do tempo (FERREIRA, 2001). Ibanoglu e Ibanoglu (2001) concluíram que as equações obtidas através das modelagens cinéticas são úteis na predição de dados envolvidos no processo de fermentação, como pH e acidez.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL

Para o estudo foram utilizados frutos de cacau da variedade *Forastero* contendo menos de 2% de cacau da variedade *Criollo* e *Trinitário*, provenientes da Estação Experimental de Recursos Genéticos José Haroldo (ERJOH) da CEPLAC/SUPOR localizada em Marituba-PA e partidos em até 48 horas após a colheita. O estudo foi realizado no Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados (LAFAMI) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

4.2 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO NATURAL DAS SEMENTES DE CACAU

As sementes de cacau foram fermentadas em caixa de madeira construída de acordo com Grimaldi (1978) (Figura 11) com capacidade reduzida para 45 Kg de sementes. O processo fermentativo foi realizado em duplicata (n=2). A caixa possui três compartimentos com forma e volume adequados para as fases aeróbia e anaeróbia da fermentação, e foi colocada sob o abrigo de chuva e sol.

A etapa de fermentação foi realizada ao longo de 7 dias. Revolvimentos foram feitos durante 5 minutos a cada 24 horas após o segundo dia de fermentação quando as sementes foram transferidas para o segundo compartimento. Após 96 horas as sementes foram então transferidas para o terceiro compartimento.

O primeiro compartimento foi revestido com filme plástico a fim de minimizar a entrada de oxigênio no sistema, criando um ambiente anaeróbio, assim como impedir o ressecamento da superfície da massa e a perda de calor da mesma.

As fermentações foram avaliadas foi feita através do monitoramento dos perfis de temperatura da massa em fermentação, pH (método AOAC n° 31.1.07) e acidez total titulável (método AOAC n° 31.1.06) durante o processo fermentativo. Amostras foram coletadas diariamente ao longo dos sete dias para realização das determinações químicas e físico-químicas. As determinações químicas foram

realizadas utilizando-se o interior das sementes (cotilédones). Foram feitos acompanhamentos dos teores açúcares redutores, polifenóis totais e antocianinas ao longo da fermentação.



Figura 11. Caixa de fermentação baseada na caixa t-60 com dimensões reduzidas (largura e comprimento).

Ao término da etapa de fermentação, as amêndoas foram secas em estufa de circulação de ar a temperatura de 35 a 40°C até umidade em torno de 6%, sendo revolvidas em intervalos de 12 horas, totalizando 48 horas, e então armazenadas em sacos plásticos.

4.3 PROVA DE CORTE

Para a avaliar a qualidade da fermentação utilizando caixa T-60, foram utilizados 3 lotes de 100 amêndoas fermentadas e secas, retiradas aleatoriamente, as quais foram seccionadas longitudinalmente e observadas uma a uma o grau de fermentação, de acordo com o método proposto na Resolução Nº 161 do Conselho Nacional de Comércio Exterior (CONCEX, 1988), que consiste de especificações de padronização das amêndoas de cacau, visando a classificação e a fiscalização para exportação.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SEMENTES E AMÊNDOAS

As sementes e amêndoas de cacau foram submetidas as análises de pH (n° 31.1.07); acidez total titulável (n° 31.1.06); umidade (n° 31.1.08); proteínas totais (n° 31.1.08); lipídios totais (n° 31.4.02); e cinzas (n°31.1.04) de acordo com os métodos oficiais para cacau e derivados da AOAC (1997):

4.5 ACOMPANHAMENTO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA FERMENTAÇÃO

4.5.1 Determinação dos Teores de Açúcares Redutores Totais

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Lane-Eynon (1934), utilizando-se solução de Fehling. Os resultados foram expressos percentualmente, em termos de glicose e sacarose, respectivamente, considerando-se o peso da amostra integral ou seca.

4.5.2 Determinação dos Teores de Polifenóis Totais ao Longo da Fermentação e Secagem

A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de métodos; todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (FC) é o mais extensivamente empregado (OLIVEIRA et al, 2009a; DASTMALCHI, 2007). Esse método, popularmente reconhecido como o teste para medir o conteúdo total de fenóis mede a capacidade redutora das amostras (OLIVEIRA et al., 2009b; ESCARPA; GONZÁLES, 2001). Entretanto, é necessário lembrar que alguns grupos amina podem reagir com o reagente (NORSHAZILA, 2010; VERZELLONI et al., 2007; ROURA et al., 2006).

Para o presente estudo, amostras congeladas de cada dia de fermentação foram liofilizadas até cerca de 6,0% de umidade para análise de polifenóis totais. Posteriormente, para a realização das análises, foram removidos a testa e o gérmen de cada semente, e os seus cotilédones foram triturados em processador de alimentos e moídos em almofariz.

Para a determinação de polifenóis pesou-se 1 g de amostra de cada dia, utilizando 5 mL de n-hexano para desengordurar a amostra. Essa etapa foi repetida por mais quatro vezes. Após isso houve uma secagem rápida por ar frio em capela de laboratório para remover o n-hexano residual.

O conteúdo total de polifenóis foi então determinado pelo método Folin-Ciocalteu (FC) (SINGLETON et al. 1999). Para a extração dos polifenóis dos cotilédones de cacau foram pesados 0,1 g de amostra desengordurada em tubos de centrifuga, aos quais acrescentou-se 5 ml da solução extratora composta por acetona, água e ácido acético (70:29,5:0,5, v/v) obtendo-se uma concentração de 0,02 g de cacau desengordurado e seco (CDS) por ml de solução. Os tubos vedados foram agitados em vortex por 25 minutos e centrifugados a 3700 RPM por 15 minutos.

Os extratos de amêndoa de cacau foram diluídos a 0,60 mgCDS/ml em água destilada, e 0,5 ml do extrato diluído foi adicionada a 2,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu (previamente diluído em água destilada à proporção de 1:9, v/v). Após 5 min, 2 ml de Na_2CO_3 (75 g/L) foi adicionado, seguido de incubação a 50 °C por 5 minutos em banho maria. A absorbância foi medida a 760 nm e os resultados foram expressos como miligrama de equivalente de (+)-catequina por grama de cacau desengordurado e seco (mgEqCAT/gCDS), calculados com base em curva padrão construída com catequina.

4.5.3 Determinação dos Teores de Antocianinas Durante a Fermentação e Secagem

A análise quantitativa das antocianinas extraídas dos cotilédones das sementes e amêndoas de cacau foi realizada de acordo com o método descrito por Fuleki e Francis (1968a) posteriormente revisado por Lees e Francis (1972) onde 5 g de amostra foi adicionado a 20 ml de solução extratora, preparada com etanol 95%:HCl 1,5N (85:15, v/v) e agitada manualmente por 2 minutos. Após isso deixou-se em repouso a solução com amostra por uma noite em temperatura ambiente (30 °C), sem exposição direta a luz. Os extratos foram filtrados em

papel de filtro Whatman nº 1, e o resíduo lavado repetidamente com a solução extratora até extração completa das antocianinas.

A solução resultante foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e aferida com solução extratora e deixada em repouso por 90 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, para estabilização das formas antociânicas. Posteriormente foi realizada leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda 535 nm.

As análises foram realizadas em duplicata e para cálculo da concentração utilizou-se a Equação 3, proposta por Fuleki e Francis (1968a):

$$\text{Antocianinas totais (mg/100g)} = \frac{A \times fd \times 100}{\varepsilon} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: A = absorvância à 535nm; fd = fator de diluição; ε = absortividade molar à 535nm (100,2).

4.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIS

4.6.1 Preparo do Extrato

Para as análises à seguir, extratos de cada dia de fermentação das sementes de cacau foram preparados.

Em tubos de centrífuga com tampa, 2 g de cotilédones moídos foram extraídos com 40 mL de metanol aquoso à 50% por 1 hora em repouso e em seguida centrifugados por 15 minutos à 15.000 RPM, sendo transferidos os sobrenadantes para balões volumétricos de 100mL.

Em seguida, 40 mL de acetona aquosa à 70% foi adicionado ao resíduo, permanecendo em repouso por mais uma hora. Logo após, as soluções foram centrifugadas por 15 minutos e misturadas aos primeiros extratos. Os volumes foram então aferidos e os extratos finais de cada dia de fermentação armazenados em garrafas âmbar em freezer.

4.6.2 DPPH

A capacidade antioxidante dos extratos de cacau foram determinadas de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995) modificado por Sánchez-Moreno et al. (1998). O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm.

De cada extrato, três diluições foram preparadas e então 100 µL de cada extrato diluído foram adicionados à 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM), previamente preparado, homogeneizados e lidos em espectrofotômetro a 515 nm após 20 minutos. Para o controle, 100 µL de solução contendo água, metanol 50% e acetona 70% (20:40:40 v/v) foi adicionado à 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM). Para o branco, metanol foi utilizado.

Após a leitura, foi calculada a quantidade equivalente de DPPH (µM) substituindo o *y* da equação da reta obtida na curva padrão de DPPH pela metade da absorvância do controle e então convertido para g pela Equação 4:

$$g \text{ DPPH} = \frac{\mu\text{M DPPH} \times 394,3}{1.000.000} \quad (\text{Eq. 4})$$

Para cada extrato, curvas foram plotadas utilizando a absorvância (*Y*) e diluição (*X*) e as equações da reta foram obtidas. Então, de cada extrato, foi calculada a atividade antioxidante total, expressa em EC₅₀ (mg de cotilédone/mL de extrato), substituindo o *y* de cada equação da reta pela metade da quantidade equivalente de DPPH do controle calculada anteriormente.

4.6.3 TEAC

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. A atividade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Re et al. (1999).

De cada extrato, três diluições foram preparadas e então 30 µL de cada extrato diluído, em ambiente escuro, foram adicionados à 3 mL do radical ABTS (5 mL de ABTS 7mM com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM), preparado no dia anterior, homogeneizados e após 6 minutos lidos em espectrofotômetro a 734 nm. Para o branco, metanol foi utilizado.

A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorvância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida foram determinadas as equações da reta de cada dia de fermentação.

Para calcular a atividade antioxidante total, substituiu-se na equação da reta a absorvância equivalente a 1.000 µM do padrão trolox, calculada utilizando a curva padrão de trolox anteriormente construída. Sendo assim, o valor obtido para o termo X corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox. O resultado final é calculado pela divisão de 1.000.000 pelo valor de X para encontrar o valor final, expresso em µM trolox / g de cotilédone.

4.6.4 Método da vanilina-HCl para a determinação de flavan-3-ols

Os conteúdos de flavan-3-ols das sementes *in natura*, em fermentação, fermentadas e secas foram determinados pelo método descrito por Di Stefano et al. (1989), com pequenas modificações.

Para a análise, soluções de vanilina 4% em metanol foram preparadas diariamente. 500 µL do extrato de cacau foram adicionados à 3 mL do reagente vanilina e após 5 minutos, 1,5 mL de HCl concentrado. A mistura permaneceu em repouso por 15 minutos em banho de gelo e então a absorvância foi lida à 500 nm contra o branco. Para o branco, metanol foi utilizado no lugar do reagente vanilina.

Para o cálculo da quantidade de flavan-3-ols, utilizou-se a Equação 5:

$$mg \text{ de catequina/g} = 290,8 \times A \times fd \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde: A = Absorvância à 500 nm; fd = fator de diluição do extrato (50)

4.6.5 Método do Cloreto de Alumínio para flavan-3-ols

Foi utilizado o método colorimétrico descrito por Dewanto et al. (2002) para determinação dos flavan-3-ols para as sementes *in natura*, em fermentação, fermentadas e secas com pequenas modificações. Resumidamente, 0,5 mL de extrato foi misturado com 2,25 mL de água destilada em um tubo de ensaio seguido pela adição de 0,15 mL de solução de NaNO₂. Após 6 minutos, 0,3 mL de solução de AlCl₃ foi adicionada e deixada em repouso por outros 5 minutos antes de 1,0 mL de NaOH 1M. A mistura foi homogeneizada em seguida. A absorbância foi medida imediatamente a 510 nm usando espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como mg de quercetina em 1 grama de amostra seca (mg de quercetina/g).

4.7 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Foram realizadas análises das atividades enzimáticas das enzimas peroxidase e polifenoloxidase nas sementes de cacau *in natura*, em fermentação, fermentadas e após a secagem.

4.7.1 Atividade da Peroxidase

Para análise da atividade da enzima peroxidase, em uma cubeta foram adicionados 1500 µl de solução de guaiacol e 1200 µl de tampão fosfato de sódio (0,05M) com pH 6,0, sendo mantida em equilíbrio por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 400 µl de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato (0,165 µl de H₂O₂ 30% em 50 ml de tampão fosfato de sódio 0,05M) e 200 µl de extrato. Agitou-se com auxílio de parafilme, retirou-se o mesmo e fez-se leitura imediata em espectrofotômetro a 470 nm, acompanhando por 10 minutos o aumento da absorvância.

O branco foi obtido a partir de 1500 µl de solução de guaiacol em 1500 µl de solução tampão fosfato 0,05M pH 6,0 e 200 µl do extrato enzimático. Realizando-se a leitura no tempo zero e após 10 minutos, em espectrofotômetro a

470 nm. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 de absorvância por minuto por ml de amostra, calculada pela Equação 6:

$$Atividade (U/g) = \frac{(AF_a - AI_a) - (AF_b - AI_b)}{0,001 \times t} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde: AF_a = absorvância final da amostra; AI_a = absorvância inicial da amostra; AF_b = absorvância final do branco; AI_b = absorvância inicial do branco; t = tempo em minutos.

4.7.2 Atividade da Polifenoloxidase

Para análise da atividade da enzima polifenoloxidase, em uma cubeta foram adicionados 1500 µl de tampão fosfato de sódio (0,05M) com pH 6,0, 1000 µl de catecol (0,2 M) e 1000 µl de extrato. Agitou-se com auxílio de parafilme, retirou-se o mesmo e fez-se leitura imediata em espectrofotômetro a 425 nm, acompanhando por 10 minutos o aumento da absorvância.

O branco foi obtido a partir de 1500 µl de solução tampão fosfato 0,05M pH 6,0 e 1000 µl de amostra. Realizando-se a leitura no tempo zero e após 10 minutos, em espectrofotômetro a 425 nm. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 de absorvância por minuto por ml de amostra.

A atividade enzimática foi calculada pela Equação 6.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para os cálculos estatísticos - média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), ANOVA e teste Tukey, e modelagem cinética - os resultados obtidos foram tratados estatisticamente com o auxílio do programa Statistica® versão 6.5 (STATSOFT INC., 2004).

Os critérios utilizados para avaliar o modelo cinético (de ordem zero ou primeira) de reação foram: coeficiente de determinação (R^2), análise do gráfico bidimensional (pontos experimentais e curva representativa do modelo), análise de resíduos (faixa e distribuição) e o desvio relativo médio (P), calculado pela Equação 7.

Segundo Lomauro et al. (1985), um valor de P menor que cinco corresponde a um elevado ajuste da equação aos dados experimentais.

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{V_{obs} - V_{pred}}{V_{obs}} \right| \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: n = número de observações; V_{obs} = valor observado experimentalmente e V_{pred} = valor predito pelo modelo de regressão linear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTAÇÃO DO CACAU

5.1.1 Temperatura

De acordo com a Tabela 4, os valores de temperatura das sementes de cacau obtidos durante a fermentação mostraram uma elevação da temperatura desde o início da fermentação, mantendo-se constante do segundo ao quinto dia ($\rho \leq 0,05$) e alcançando as temperaturas máximas no quinto, sexto e sétimos dias ($\rho \leq 0,05$).

Tabela 4. Temperatura da massa durante a fermentação de sementes.

Dia	Temperatura* (°C)
0	24,83 ± 0,75 e
1	29,83 ± 1,47 d
2	37,50 ± 1,87 b
3	40,00 ± 2,53 bc
4	38,50 ± 2,51 b
5	41,50 ± 2,59 abc
6	43,67 ± 4,88 ab
7	45,50 ± 2,88 a

* Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($\rho \leq 0,05$).

O comportamento da temperatura durante a fermentação das sementes pode ser observada a seguir, na Figura 12, pela modelagem cinética de ordem zero, modelo que melhor se ajustou a variação de temperatura da massa, com valores de R^2 e P iguais a 76,33% e 8,14%, respectivamente.

O início da fermentação está associado ao aumento da temperatura e da acidez da massa em fermentação (BIEHL; PASSERN, 1982). O aumento de temperatura da massa durante a fermentação é atribuído à atividade metabólica dos microrganismos. Durante a primeira fase predominam certas espécies de leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces*, que exigem pouco oxigênio e a temperatura não se eleva muito. Quando o pH da polpa aumenta começam a predominar as bactérias produtoras de ácido acético, alcançando temperaturas mais elevadas, que prossegue até o último dia de fermentação (DIAS, 1987),

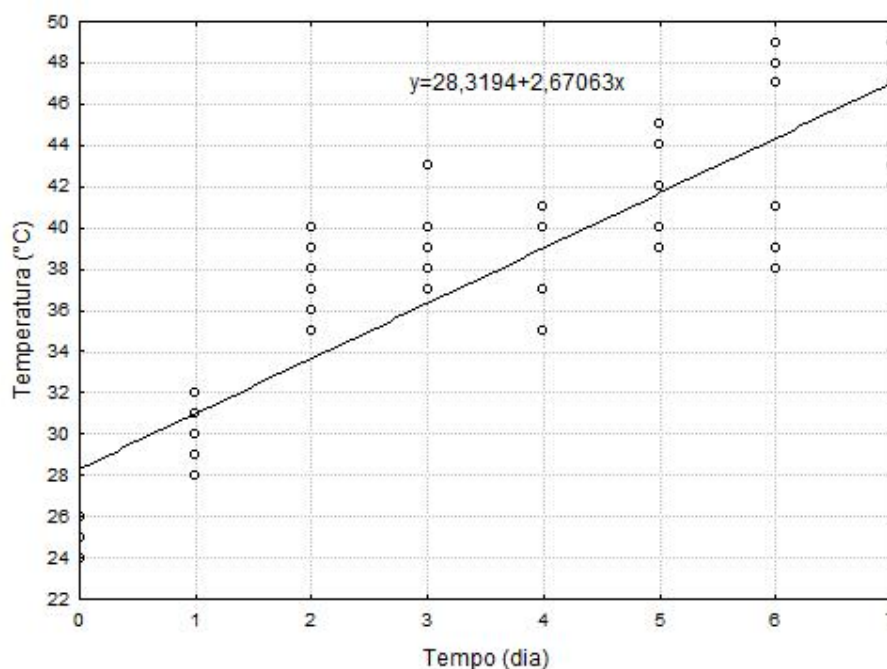


Figura 12. Modelo cinético de ordem zero da variação de temperatura das sementes de cacau durante a fermentação.

Ramôa (2008) observou que a temperatura no início do processo de fermentação de cacau amazônico elevou-se de 25,4°C para a máxima de 45°C no quarto dia. No presente estudo a máxima posicionou-se no sétimo dia de fermentação.

As oscilações de temperatura durante a fermentação podem ser explicadas pelo fato de que o aumento e/ou decréscimo de temperatura é função da atividade metabólica de microrganismos, além do clima do ambiente. Essa diferença pode ser explicada também pelas características físicas (tamanho e morfologia das sementes, espessura da testa, teor de polpa, entre outras) e físico-químicas (pH, composição e quantidade de açúcares e ácidos da polpa) (LOPES et al., 2003) assim como pela diferença de metabolismo dos microrganismos presentes durante esse período (MATTIETTO, 2001) que, segundo Schwan (1996), são cerca de cinquenta espécies.

Em boas fermentações comerciais, a temperatura da massa de sementes deve atingir 45 a 48°C em aproximadamente 72 horas. Essa diferença de tempo para atingir a temperatura adequada pode ser devida ao volume do produto em

fermentação, flora microbiana presente e inclusive às condições climáticas (ZAMALLOA, 1994).

O aumento da temperatura da massa e a penetração dos ácidos nas sementes de cacau são os responsáveis pela morte dos embriões, pela descompartimentação celular e pela formação de precursores de aroma (EFRAIM, 2004; LERCETEAU, 1999).

5.1.2 Umidade

Os valores de umidade durante a fermentação podem ser visualizados na Tabela 5.

Os cotilédones de cacau apresentaram teor inicial de 35,93% de umidade, com uma queda no segundo dia e posterior aumento progressivo da umidade até atingir os valores máximos a partir do quinto dia de fermentação ($p \leq 0,05$). Tal comportamento pode ser justificado pela liquefação da polpa (exudado) e sua drenagem da massa e pela morte do gérmen que ocorre geralmente ao segundo dia de fermentação, quando as condições do meio (temperatura, pH e acidez) se tornam extremamente desfavoráveis ao embrião da semente, que morre e perde a capacidade de germinação, tornando-se uma amêndoa. Com a morte da semente a capacidade de reter ou impedir a entrada de água nas células acaba, e assim ocorre o inchamento das sementes (CAMU et al., 2008).

Tabela 5. Umidade das sementes durante a fermentação.

Dia	Umidade* (%)
0	35,93 ± 0,84 d
1	32,69 ± 0,11 e
2	36,14 ± 0,90 bc
3	36,82 ± 1,77 bc
4	38,16 ± 0,96 b
5	41,63 ± 1,21 a
6	43,05 ± 0,75 a
7	42,80 ± 1,56 a

* Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

Biehl e Passern (1982), citado por Lopes et al. (2008), justificam o aumento da umidade pela capacidade das proteínas vacuolares reterem água antes da temperatura atingir cerca de 50°C. Acima disso a fusão de lípidios no meio reduz as trocas de difusão nas células e a absorção de água.

O comportamento da temperatura durante a fermentação das sementes pode ser observada a seguir, na Figura 13, pela modelagem cinética de primeira ordem, modelo que melhor se ajustou à variação de umidade da massa de cacau durante a fermentação, com valores de R² e P iguais a 78,49% e 3,79%, respectivamente.

Os resultados encontrados neste estudo assemelham-se com os resultados referentes a umidade de Ramôa (2008) e Mattietto (2001), os quais obtiveram valores de umidade iguais a 35,98% e 33,69% para o 1º dia e 42,36% e 40,44% para o último dia de fermentação, respectivamente.

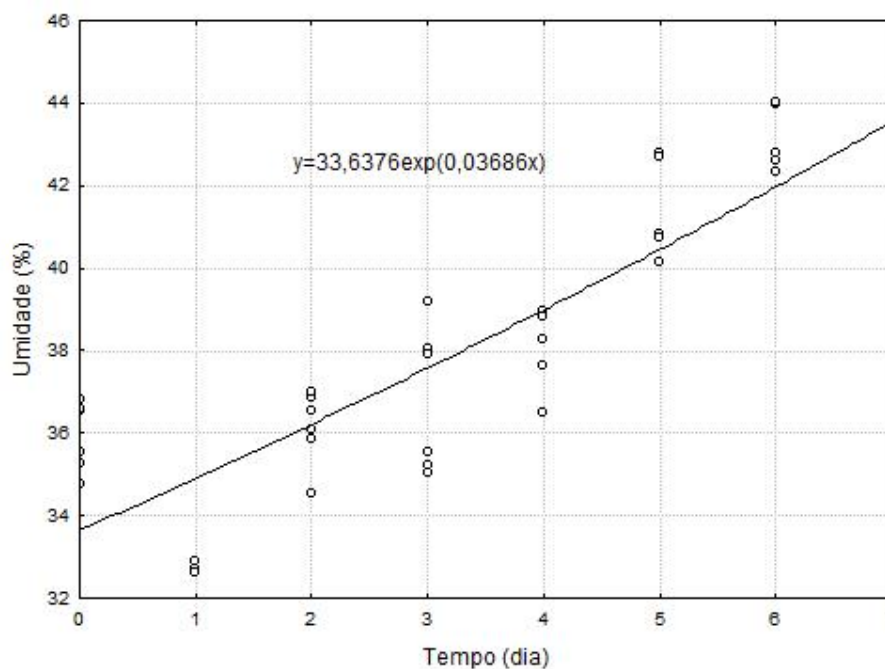


Figura 13. Modelo cinético de primeira ordem da variação de umidade das sementes de cacau durante a fermentação.

5.1.3 pH

Atribui-se, principalmente, aos ácidos láctico e acético difundidos para os cotilédones, os decréscimos de pH durante a fermentação de cacau (LOPES, 2000; DIAS 1998; DIAS; ÁVILA, 1994; QUESNEL, 1965). Dias (1987) relatou que amêndoas de cacau, cujo pH é inferior a 4,5, apresentam um baixo potencial na formação do sabor de chocolate enquanto em valores de pH acima de 5,0 este potencial é aumentado significativamente.

De acordo com a Tabela 6, o pH inicial das sementes *in natura* e fermentadas não variou durante o primeiro dia de fermentação ($p \leq 0,05$), porém ocorreu a redução do mesmo ao longo da fermentação, alcançando valores mínimos de pH à partir do sexto dia e permanecendo assim até o final da fermentação ($p \leq 0,05$). Os valores observados nesse estudo ficaram próximos aos encontrados por Ramôa (2008), Mattietto (2001) e Lopes (2000).

Tabela 6. Valores de pH* das sementes durante a fermentação.

Dia	pH
0	6,60 ± 0,12 a
1	6,46 ± 0,11 a
2	5,46 ± 0,04 b
3	4,67 ± 0,08 c
4	4,79 ± 0,07 c
5	4,39 ± 0,02 d
6	4,33 ± 0,09 de
7	4,24 ± 0,03 e

* Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

Para a análise de pH, o modelo cinético de primeira ordem foi escolhido para representar o comportamento observado dos dados obtidos, com valores de R^2 e P iguais à 88,98% e 4,78%, conforme a Figura 14.

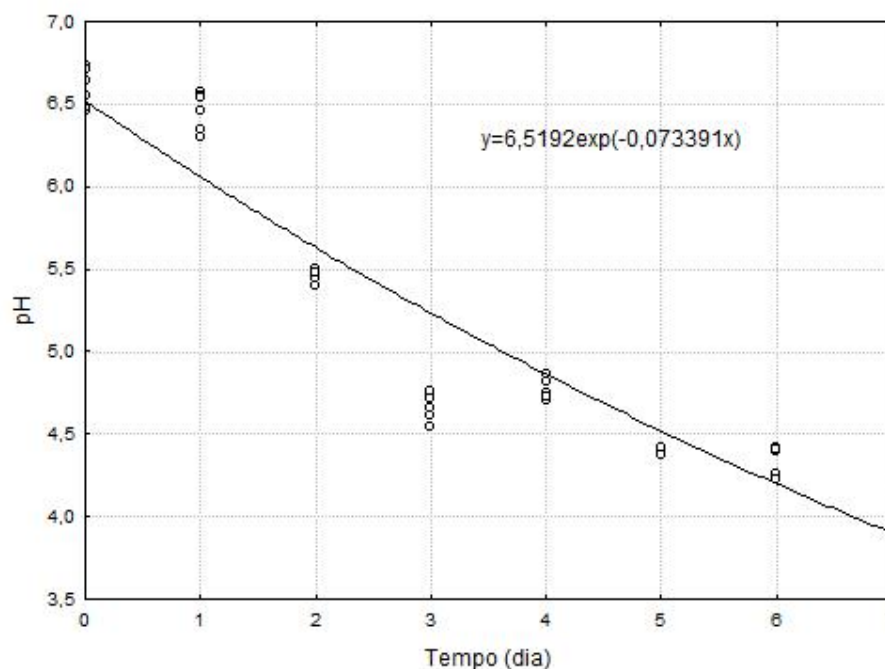


Figura 14. Modelo cinético de primeira ordem da variação de pH das sementes de cacau durante a fermentação.

5.1.4 Acidez Total Titulável

Neste estudo encontrou-se valores de acidez para a semente “in natura” de 7,11 mEqNaOH/100g e observou-se que o valor máximo (65,09 mEqNaOH/100g) foi alcançado no sexto dia de fermentação. Um pequeno decréscimo ocorreu no último dia, com valores de 60,28 mEqNaOH/100g, de acordo com a Tabela 7.

A produção de ácido láctico e acético ocorre durante os primeiros dias de fermentação das sementes de cacau sendo posteriormente absorvidos pelas sementes (GUEHI, 2010; ARDHANA, 2003; ROELOFSEN, 1958). Isto está associado com a fase de desagregação celular, perda de compartimentação e absorção de água.

Os ácidos, principalmente o acético, absorvidos pelo cotilédone são essenciais para o desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma de chocolate, entretanto, quando em excesso promovem um forte sabor ácido que deprecia o produto final (BELITZ, 2009; LOPEZ, et al., 1973). Vários autores observaram que a produção máxima de ácido acético situa-se entre o terceiro e quinto dia da fermentação, decrescendo no restante do processo.

Tabela 7. Acidez total titulável* das sementes durante a fermentação.

Dia	Acidez**	
0	7,11 ± 1,51	f
1	7,74 ± 1,43	f
2	19,68 ± 0,68	d
3	39,74 ± 2,64	e
4	37,45 ± 2,27	e
5	55,36 ± 3,79	c
6	65,09 ± 0,96	a
7	60,28 ± 2,37	b

* Base seca. Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$);

** mEqNaOH/100g

Dias (1998) encontrou valores de acidez que variam de 19,27 a 25,65 mEqNaOH/100g em cacau da Amazônia de acordo com os meses do ano. Mattietto (2001) obteve valor na faixa média de 18,5 mEqNaOH/100g. Ramôa (2008) obteve o valor máximo de 64,56 mEqNaOH/100g no terceiro dia, finalizando no sétimo dia com acidez igual a 24,89 mEqNaOH/100g.

Comportamento parecido foi encontrado por Lopes (2000), com um aumento significativo no terceiro dia, onde se encontrou o valor máximo de 65,7 mEqNaOH/100g, e uma posterior queda até o último dia, finalizando com 30,55 mEqNaOH/100g.

Segundo Jinap e Dimick (1990) diversos fatores como variedade, maturidade do fruto, época de colheita, região de plantio e principalmente a técnica de fermentação provocam variações na acidez.

Na Figura 15, o comportamento da variação da acidez dos cotilédones de cacau durante a fermentação é representado pelo modelo cinético de primeira ordem, apresentando valores de R^2 e P iguais à 92,45% e 23,99%.

Os valores obtidos para as sementes ao final da fermentação podem ser justificados pelo volume inadequado de semente para a caixa de fermentação e também pelo intervalo insuficiente de revolvimentos, que podem ter favorecido o

acúmulo de ácido acético na massa em fermentação, resultando em amêndoas de alta acidez (YUSEP et al., 2002; HASHIM et al., 1998).

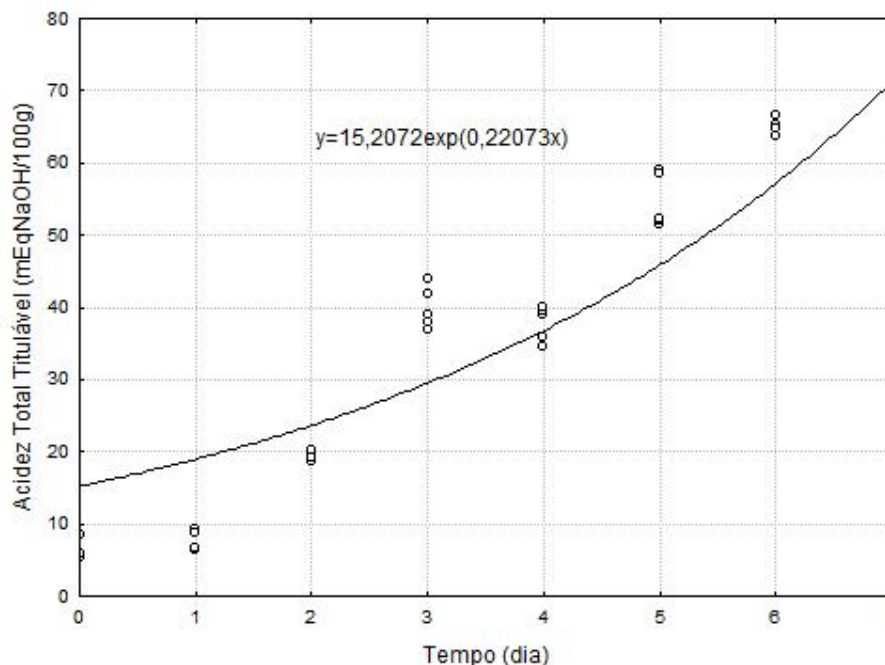


Figura 15. Modelo cinético de primeira ordem da variação de acidez das sementes de cacau durante a fermentação.

5.1.5 Teores de Açúcares Redutores Totais Durante a Fermentação

Os resultados das análises de açúcares redutores podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8. Açúcares redutores totais* das sementes durante a fermentação.

Dia	Açúcares Redutores Totais** (%)
0	0,97 ± 0,33 a
1	0,87 ± 0,13 a
2	0,89 ± 0,29 a
3	0,94 ± 0,06 a
4	1,03 ± 0,04 a
5	1,07 ± 0,15 a
6	0,94 ± 0,01 a
7	0,78 ± 0,08 a

* Base úmida. Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($\rho \leq 0,05$).

De acordo com os dados obtidos, não houveram diferenças significativas para os teores de açúcares redutores totais ($p \leq 0,05$), sendo que o valor máximo encontrado posicionou-se no quinto dia (1,07%) de fermentação. Segundo Pezoa (1989) citado por Zamalloa (1994), o conteúdo de sacarose diminui rapidamente nos primeiros dias de fermentação devido ao consumo dos mesmos por leveduras. Após as primeiras 24 horas as bactérias acéticas começam a produzir pequenas quantidades de ácido acético, porém a partir de 48 horas a metabolização do etanol pelas bactérias acéticas é intensificado e observa-se que o abaixamento do pH favorece a hidrólise ácida da sacarose e também promove um aumento na atividade das invertases. Esse comportamento foi observado nas fermentações de cacau realizadas neste trabalho.

Rohan e Stewart (1967) relataram que a concentração máxima de açúcares redutores é atingida geralmente no quarto ou quinto dia de fermentação dependendo das condições de processo e composição físico-química das sementes.

Pezoa (1989) citado por Zamalloa (1994) relatou que o conteúdo de sacarose diminui rapidamente no curso dos primeiros dias de fermentação e o teor máximo em açúcares é produzido a partir do quarto dia, corroborando com os valores encontrados no presente estudo.

De acordo com Reineccius et al. (1972) a relação utilizada entre açúcares redutores e totais das amêndoas foi considerada um indicador útil do grau de fermentação, quando associada a outros indicadores, pois o perfil de açúcares é mais importante do que a quantidade total, uma vez que as cetoses são mais importantes do que as aldoses na formação do aroma do cacau, e também que as amêndoas bem fermentadas possuem mais cetoses (cerca de 62%) do que as mal fermentadas (cerca de 21%).

Em relação à modelagem cinética, não houve ajuste a nenhum modelo aplicado. O comportamento de consumo e produção de açúcares redutores totais encontrados nesta pesquisa foi similar ao relatado por diversos autores na literatura.

5.2 CLASSIFICAÇÃO DAS AMÊNDOAS FERMENTADAS DE CACAU

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da classificação das amêndoas secas.

Tabela 9. Classificação das amêndoas secas.

Classificação	Proporção (%)
Bem Fermentadas	93
Parcialmente Fermentadas	5
Mal Fermentadas	0
Defeitos	2

De acordo com a Resolução Nº 161 do Conselho Nacional de Comércio Exterior (CONCEX, 1988) uma amêndoa de cacau bem fermentada apresenta cotilédones de coloração marrom. Quando há mistura de coloração marrom com violeta, roxo ou púrpura, a amêndoa é classificada como parcialmente fermentada. Caso apresente coloração de violeta a púrpura em grande parte de sua extensão é considerada como mal fermentada. De fato, o que diferencia uma amêndoa bem fermentada da mal fermentada, além da coloração, é a quantidade de sulcos presentes em seus cotilédones. Logo, quanto mais sulcos, melhor fermentada estará a amêndoa. Para que as amêndoas de cacau apresentem classificação do Tipo I (superior), a soma dos defeitos não deve ultrapassar a tolerância de 6%, sendo 2% para cada defeito isoladamente. Portanto, pela Tabela 9, verifica-se que as amêndoas fermentadas e secas de cacau foram classificadas como Tipo I.

5.3 POLIFENÓIS TOTAIS

5.3.1 Teores de Polifenóis Totais Durante a Fermentação

Na Tabela 10 estão apresentados os valores obtidos na determinação de compostos fenólicos totais das sementes durante a fermentação.

Tabela 10. Teores de polifenóis totais* das sementes durante a fermentação.

Dia	Polifenóis totais** (mg/g)
0	99,09 ± 2,71 a
1	91,81 ± 1,39 b
2	88,94 ± 1,25 bc
3	86,01 ± 0,23 c
4	81,47 ± 0,31 d
5	80,65 ± 0,25 d
6	79,85 ± 1,05 d
7	75,63 ± 2,33 b

* Base seca e desengordurada. Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

O comportamento da variação dos teores de polifenóis totais durante a fermentação das sementes pode ser observado a seguir, na Figura 16, pela modelagem cinética de ordem zero, modelo que melhor se ajustou ao comportamento dos resultados obtidos, com valores de R^2 e P iguais a 91,60% e 1,88%, respectivamente.

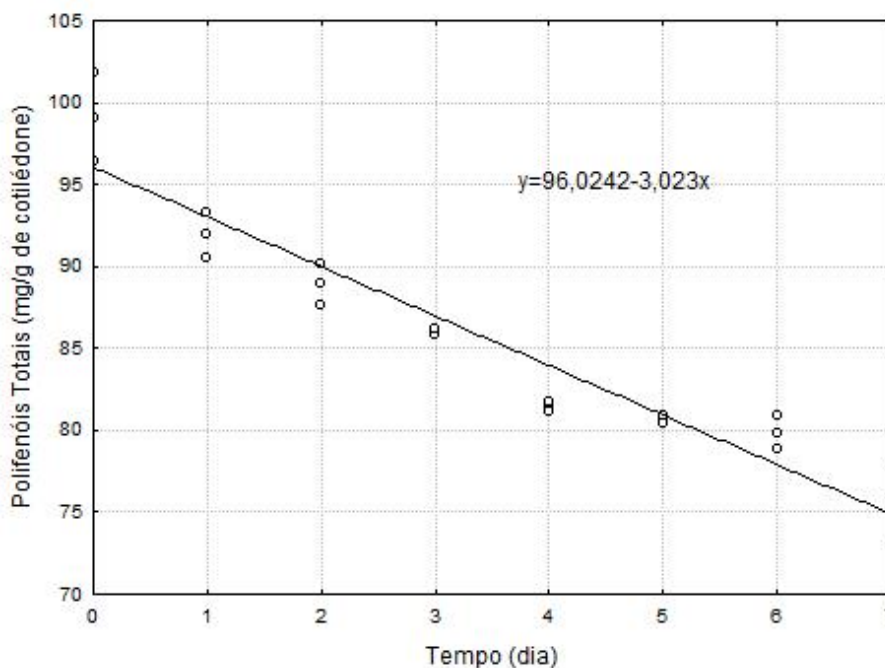


Figura 16. Modelo cinético de ordem zero da variação dos polifenóis totais das sementes de cacau durante a fermentação.

Para Niemenak et. al (2006) o teor total de polifenóis variou de 67 a 149,2 mgEqEpicatequina/g em sementes de cacau “in natura” secas e desengorduradas. Elwers (2009) encontrou valores de polifenóis para sementes “in natura” secas e desengorduradas que variou de 69,3 a 179,6 mgEqEpicatequina/g. O estudo deste autor concluiu que os resultados indicam que os nutrientes fornecidos pela “planta-mãe” afetam a quantidade de compostos fenólicos nas sementes de cacau.

Em outro estudo, verificando a degradação de polifenóis no cacau, Ortega et al. (2008) obteve resultados que variaram de 123,9 a 302,5 mgEqCAT/g em amêndoas secas e desengorduradas.

Observou-se uma degradação ao longo do processo de fermentação, o que era esperado devido a ação de enzimas e das condições extrínsecas, entretanto, os valores encontrados tanto para a semente “in natura” quanto a amêndoa ao final da fermentação (99,09 mg/g e 75,63 mg/g) são semelhantes aos reportados na literatura.

A fermentação diminui o amargor e propriedades adstringentes da amêndoa de cacau, efeito que é atribuído à perda de polifenóis durante a fermentação (LUNA et al, 2002; KIM; KEENEY, 1984; FORSYTH, 1951).

A redução dos polifenóis em parte ocorre através da perda de líquido gerado durante a fermentação (LUNA et al, 2002; WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Além da perda pelo escoamento do líquido gerado durante a fermentação (exudado), os polifenóis sofrem ação da enzima polifenoloxidase (PPO). Devido à ação dessa enzima os polifenóis presentes são oxidados e grande parte formam polímeros de altos pesos moleculares chamados de polifenóis condensados (WEISBURGER, 2001; HANSEN et al., 1998). Segundo Bonvehí e Coll (1996) os compostos polifenólicos e os flavonóides presentes na semente de cacau são submetidos a uma oxidação bioquímica onde estes compostos aumentarão a

cadeia polimérica e se complexarão com as proteínas, diminuindo a solubilidade e o sabor adstringente característicos dos polifenóis e flavonóides.

5.4 TEORES DE ANTOCIANINAS TOTAIS DURANTE A FERMENTAÇÃO

Na Tabela 11 estão os valores de antocianinas nas sementes de cacau ao longo da fermentação. Neste estudo os teores de antocianinas totais do primeiro ao sétimo dia de fermentação diminuíram cerca de 77,7%, alcançando a menor média no último dia de fermentação ($p \leq 0,05$). Esses valores estão dentro dos reportados na literatura.

Tabela 11. Teor de antocianinas totais* das sementes durante a fermentação.

Dia	Antocianinas totais (mg/100g)
0	144,96 ± 5,36 a
1	128,70 ± 0,46 b
2	92,03 ± 2,68 g
3	93,00 ± 0,55 g
4	76,84 ± 2,36 c
5	53,79 ± 1,22 d
6	43,99 ± 2,44 e
7	32,31 ± 0,73 f

* Base seca e desengordurada. Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

O comportamento da redução dos teores de antocianinas totais ao longo da fermentação das sementes pode ser observado a seguir (Figura 17) pela modelagem cinética de ordem zero, com valores de R^2 e P iguais a 96,50% e 7,42%, respectivamente.

Durante o processo de fermentação, as antocianinas são hidrolisadas a antocianidinas. Os compostos polimerizam-se com catequinas simples para formar proantocianidinas. As antocianinas geralmente desaparecem rapidamente durante o processo de fermentação, alcançando perdas de 93% após quatro dias (SHAHIDI; NACZK, 2003; PETTIPHER, 1986; LANGE; FINCKE, 1970).

Segundo Niemenak et. al (2006) os compostos antociânicos, obtidos da cianidina-3-arabinosideo, em sementes *in natura* secas e desengorduradas de várias origens, varia de 46,6 a 455,2 mg/100g. Elwers (2009) encontrou valores para cianidina-3- α L-arabinosideo variando entre 0 e 773,7 mg/100g.

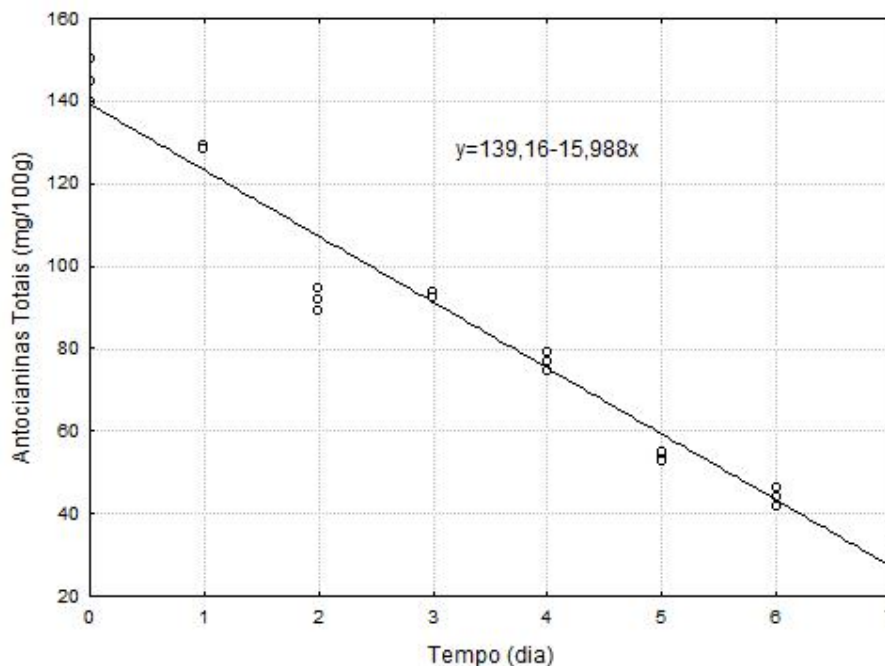


Figura 17. Modelo cinético de ordem zero da variação dos teores de antocianinas totais das sementes de cacau durante a fermentação.

5.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIS

Mudanças na quantidade e composição de polifenóis durante o pré-processamento do cacau (fermentação e secagem) são resultados do uso de altas temperaturas e presença de oxigênio que aceleram os processos oxidativos, as quais influenciam diretamente na capacidade antioxidante do cacau.

Na Tabela 12 são mostradas as mudanças no conteúdo de DPPH e TEAC. O comportamento da capacidade antioxidante pelo método TEAC, durante a fermentação das sementes, pode ser observado na Figura 18, pela modelagem cinética de ordem zero, modelo que melhor se ajustou às variações da capacidade antioxidante, com valores de R^2 e P iguais 75,04% e 6,55%, respectivamente.

Para o comportamento da capacidade antioxidante pelo método DPPH, não houve ajuste a nenhum modelo aplicado.

Tabela 12. Valores* de DPPH e TEAC das sementes de cacau.

Dia	EC ₅₀ ¹	TEAC ²
0	4,46 ± 0,70 c	87,76 ± 2,00 c
1	4,34 ± 0,56 c	91,63 ± 4,67 cd
2	4,86 ± 0,08 abc	91,92 ± 3,23 cd
3	4,97 ± 0,25 abc	96,32 ± 3,44 bcd
4	4,98 ± 0,18 abc	96,81 ± 2,16 bd
5	5,45 ± 0,27 ab	98,50 ± 2,87 bd
6	5,72 ± 0,44 a	104,51 ± 2,91 ab
7	4,58 ± 0,25 bc	109,46 ± 2,98 a

* Base úmida. Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

¹ mg de cotilédone/mL de extrato

² μ mol Trolox/g

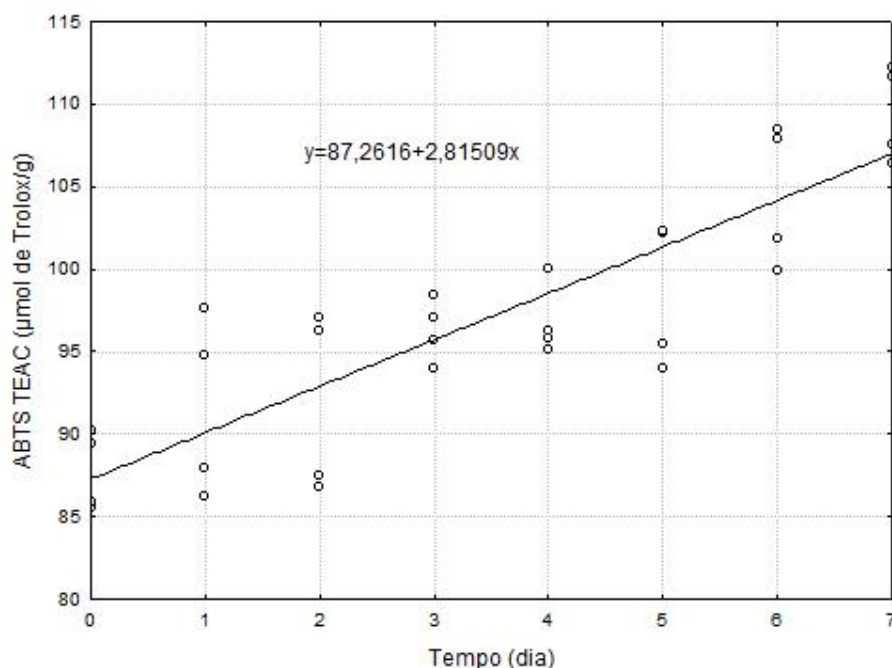


Figura 18. Modelo cinético de ordem zero da variação da capacidade antioxidante pelo método TEAC das sementes de cacau durante a fermentação.

O método DPPH determina a capacidade de sequestro do radical estável DPPH por antioxidantes presentes na amostra. Valores de EC₅₀ indicam a quantidade necessária de antioxidantes para reduzir a concentração inicial de

DPPH em 50%. Quanto mais altos os valores de EC_{50} , menor é a capacidade antioxidante da amostra.

Na Tabela 12 é observada uma estabilização tanto dos valores de EC_{50} e de TEAC até o sexto dia de fermentação, quanto ocorre um aumento na capacidade antioxidante das amostras. Esse aumento pode ser explicado em partes pela provável inativação da enzima polifenoloxidase, pela diminuição da umidade das sementes, levando assim à concentração dos compostos presentes na amêndoa, assim como pela difusão dos constituintes internos, entre ele os antioxidantes, das células para todo o cotilédone.

Apesar do processo de secagem, que diminui significativamente a quantidade de polifenóis presentes nas amêndoas, as amêndoas secas obtiveram valores menores valores de EC_{50} do que as sementes em fermentação e conseqüentemente a maior capacidade antioxidante entre todas as amostras analisadas. Isso pode ser explicado pelo fato da mesma possuir umidade muito menor às outras, o que acaba por concentrar os polifenóis em seus cotilédones. O mesmo comportamento é observado para o método TEAC,

Radojčić Redovniković et al. (2009) estudando a capacidade antioxidante de liquores de cacau desengordurados provenientes de vários países, encontrou valores de EC_{50} entre 4,82 a 11,01 mg/mL. Por sua vez, Hii et al. (2009), encontraram valores de EC_{50} entre 1,3 e 2,9 mg/mL para sementes de cacau de diferentes países. Esses valores variaram de acordo com o solvente utilizado (metanol ou água).

Taberner et al. (2006) estudando a capacidade antioxidante de vários produtos de cacau encontrou, para a massa de cacau (ou liquor de cacau), valores de TEAC entre 246 e 290 μmol de Trolox/g, enquanto Belščak et al. (2009) obteve valores próximos a 100 μmol de Trolox/g para o mesmo produto.

Othman et al. (2010), também estudando a capacidade antioxidante de cacaus provenientes de vários países encontrou valores entre 0,38 e 0,44 μmol de Trolox/g dependendo do grau de fermentação de suas amêndoas. Esses valores significativamente menores podem ser devido à etapa de preparação de

seus extratos que utilizou temperatura de 50°C por duas horas, o que pode ter degradado grande parte dos antioxidantes, enquanto que no presente trabalho a mesma etapa foi feita a frio (20±2°C).

A variação entre os valores encontrados na literatura pode ser explicada pelas diferentes origens dos cacaus estudados, assim como pela época de colheita, grau de maturidade, técnica de cultivo e processamento pelo qual o cacau foi submetido, assim como pela metodologia de preparação da amostra para análise. Sendo assim, liquores de cacau, por sua baixa umidade (0,6%) podem apresentar valores de EC₅₀ e TEAC próximos aos das amêndoas secas (6%) e das sementes frescas (36%) (RAMÔA, 2008).

5.5.1 Determinação de flavan-3-ols

Na Tabela 13 são apresentados os valores encontrados de acordo com a metodologia da Vanilina-HCL e do AlCl₃ para flavan-3-ols para as sementes durante a fermentação, que variaram de 7,47 a 09,02 mg de catequina/g de cotilédones e de 22,61 a 35,59 mg de quercetina/g de cotilédones, respectivamente.

Tabela 13. Resultados* de flavan-3-ols dos cotilédones de cacau.

Dia	Vanilina-HCl ¹	AlCl ₃ ²
0	7,47 ± 0,46 bc	22,61 ± 1,97 c
1	6,57 ± 0,48 c	27,18 ± 4,22 b
2	7,27 ± 1,07 c	28,11 ± 1,31 b
3	8,54 ± 0,78 bd	33,10 ± 2,73 a
4	8,80 ± 0,40 d	32,71 ± 0,89 a
5	9,06 ± 0,54 ad	32,49 ± 0,58 a
6	9,02 ± 0,47 d	35,59 ± 1,15 a
7	10,19 ± 0,46 a	36,14 ± 0,75 a

* Base úmida. Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p≤0,05). ¹ mg de catequina/g de cotilédone. ² mg de quercetina/g de cotilédone.

Segundo Belščak et al. (2009) sementes de cacau de vários países contém de 1,20 a 10,66 mg (+)-catequina/g de cotilédones desengordurados, estando na faixa encontrada no presente trabalho, com o limite inferior cerca de cinco vezes

menor que o mesmo. Pimentel et al. (2010) encontrou valores em torno de 6,27 mg (+)-catequina/g estudando chocolate com 71% de cacau.

O comportamento da variação dos teores de flavan-3-ols pelos métodos da Vanilina-HCl e Cloreto de Alumínio, durante a fermentação das sementes, podem ser observados a seguir (Figuras 19 e 20), respectivamente. Segundo a modelagem cinética o ajuste de ordem zero explicou em maior proporção as variações de flavan-3-ols, com valores de R^2 e P iguais a 66,13% e 7,53% para Vanilina-HCl e 74,49% e 6,06% para Cloreto de Alumínio, respectivamente.

Os teores de flavan-3-ols, principalmente no início da fermentação, aumentaram significativamente em ambas as análises realizadas. Isso pode ser explicado, em partes, pela perda do drenado, que é maior durante os primeiros dias de fermentação, promovendo assim a concentração dos compostos presentes no frutos.

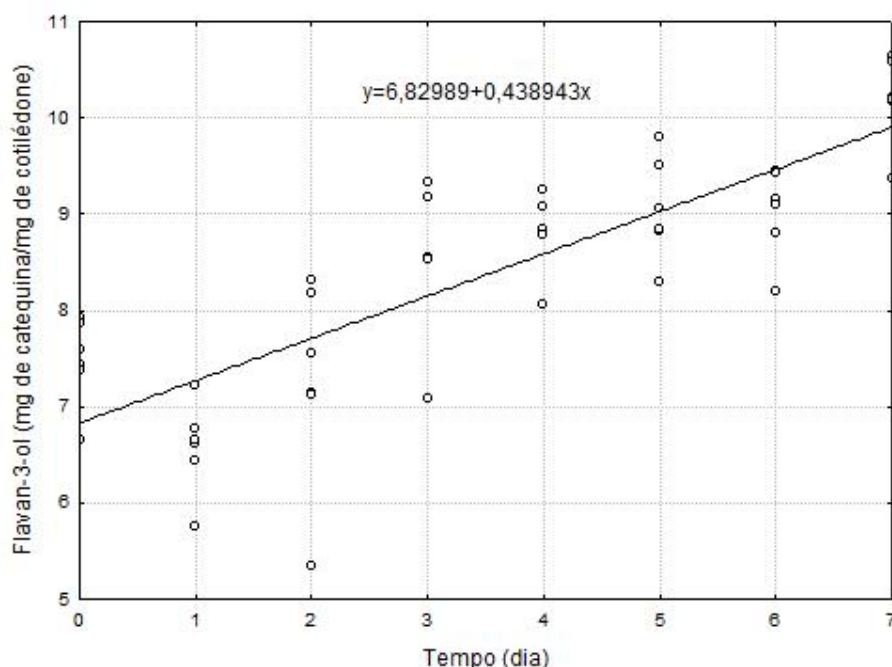


Figura 19. Modelo cinético de ordem zero da variação de flavan-3-ols pelo método Vanilina-HCl das sementes de cacau durante a fermentação.

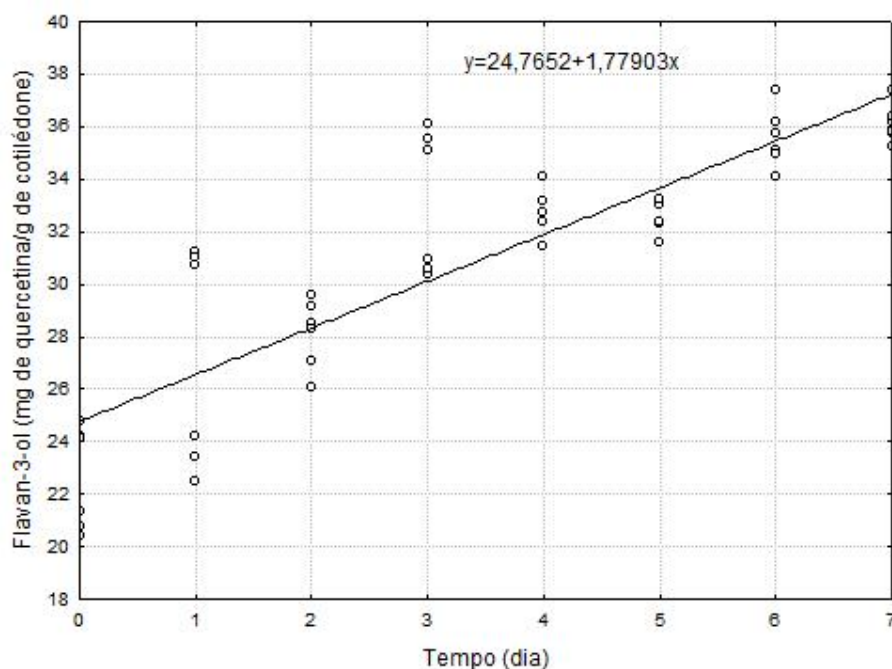


Figura 20. Modelo cinético de ordem zero da variação de flavan-3-ols pelo método do Cloreto de Alumínio das sementes de cacau durante a fermentação.

5.6 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE

Os valores encontrados para as atividades enzimáticas das sementes de cacau durante a fermentação mostraram uma grande redução das mesmas conforme a Tabela 14 durante o processo.

Tabela 14. Atividades Enzimáticas* das Sementes Durante a Fermentação

Dia	Peroxidase (U/g)	Polifenoloxidase (U/g)
0	1792,67 ± 11,31 a	1269,58 ± 21,80 a
1	1086,83 ± 17,68 b	1019,58 ± 08,84 b
2	787,33 ± 08,25 c	82,08 ± 07,66 c
3	583,21 ± 25,77 d	66,25 ± 12,37 d
4	327,08 ± 20,15 e	28,33 ± 02,36 e
5	133,92 ± 14,50 f	21,25 ± 02,95 g
6	86,06 ± 12,53 g	7,79 ± 01,83 h
7	33,92 ± 05,07 h	nd** -

* Letras iguais para a mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

** Não detectado.

Verificou-se que a peroxidase possuiu uma maior atividade em relação a polifenoloxidase durante todo o processo de fermentação, reduzindo em 98% sua atividade. Para a polifenoloxidase foi observada sua inativação ao término da fermentação.

Sakharov e Ardila (1998), estudando a peroxidase no cacau, encontrou valores de 5.700 U/g, e diferentemente deste trabalho, observou um aumento da atividade da peroxidase durante os três primeiros dias de fermentação, decaindo em seguida. Misnawi et al. (2002), entretanto, observou uma redução na atividade enzimática da polifenoloxidase durante a fermentação de cacau, obtendo valores próximos a 1% em relação aos valores originais.

Para as análises em questão, não houve ajuste a nenhum modelo aplicado.

5.7 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMÊNDOAS SECAS DE CACAU

Na Tabela 15 apresenta-se a caracterização físico-química das amêndoas antes e depois do processo de secagem.

Em relação à umidade, as sementes no último dia de fermentação apresentaram valores de 42,81% e após o processo de secagem, esse valor caiu para 5,42%, estando levemente abaixo do limite de 6,0% estabelecido pelas especificações de padronização recomendadas pelo Conselho Nacional do Comércio Exterior (CONCEX, 1988).

O pH da amêndoa seca (4,34) aumentou comparado ao pH encontrado no último dia de fermentação (4,24), o que era esperado devido as perdas por volatilização do ácido acético no processo de secagem.

Ao final da fermentação a acidez total titulável estava em torno de 58,16 meqNaOH/100g e após a secagem as amêndoas reduziram para 38,83 meqNaOH/100g. Essa redução era esperada devido também a evaporação do ácido acético durante o processo de secagem.

Tabela 15. Caracterização físico-química¹ das amêndoas antes e depois do processo de secagem.

Análise físico-química	Antes	Depois
Umidade (%)	42,81 ± 1,56 a	5,43 ± 00,27 b
pH	4,24 ± 0,03 a	4,34 ± 00,13 a
Acidez Total Titulável (mEqNaOH/100g)	60,28 ± 2,37 a	38,83 ± 02,77 b
Lípidios ² (%)	43,94 ± 1,41 a	56,99 ± 01,96 b
Proteínas (%)	13,58 ± 0,25 a	10,24 ± 00,36 b
Cinzas (%)	3,06 ± 0,01 a	3,57 ± 00,02 b
Açúcares Redutores Totais (%)	0,94 ± 0,20 a	1,28 ± 00,08 b
Antocianinas ³ (mg/100g)	32,31 ± 0,73 a	30,44 ± 01,05 b
Polifenóis Totais ³ (mg/g)	75,63 ± 2,33 a	39,15 ± 02,33 b
DPPH (EC ₅₀)	4,58 ± 0,25 a	2,72 ± 00,66 b
TEAC (mg Trolox/g)	109,46 ± 2,90 a	187,40 ± 10,22 b
Vanilina (mg catequina/g)	10,19 ± 0,46 a	15,80 ± 01,26 b
AlCl ₃ (mg quercetina/g)	36,14 ± 0,74 a	125,45 ± 12,46 b
Peroxidase (U/g)	33,92 ± 5,07 a	nd ⁴ b
Polifenoloxidase (U/g)	nd ⁴ a	36,67 ± 14,14 b

¹ Letras iguais para a mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

² Resultados expressos em base seca.

³ Resultados expressos em base seca e desengordurada.

⁴ Não detectado.

Mattietto (2001) ao estudar a fermentação de cacau encontrou valores inferiores para acidez total titulável e superiores para pH das amêndoas secas. Esses valores foram de 18,50 meqNaOH/100g e 5,42, respectivamente.

Os valores encontrados no presente trabalho para acidez podem ser explicados pelas características iniciais da semente como o grau de maturidade do fruto, acidez inicial da polpa, teor de polpa aderida, quantidade de açúcares na polpa entre outros.

Dias (1998) encontrou valores de acidez para as amêndoas que variaram de 19,27 a 25,65 meqNaOH/100g de acordo com os meses do ano utilizando cacau da Amazônia. Zamalloa (1994), utilizando cacau de diferentes procedências, encontrou valores na faixa média de 15 meqNaOH/100g para amêndoas secas.

O valor final de 38,83 meqNaOH/100g mostrou uma faixa de acidez alta, uma vez que a indústria considera a faixa ótima entre os valores de 12 a 15 meqNaOH/100g.

Os teores de lipídeos encontrados são similares aos encontrados por Lopes (2000) para amêndoas de cacau secas. Os valores encontrados nesse trabalho foram 56,99% para amêndoas secas artificialmente e estão próximos ao encontrados por Fernandez-Barbery (1999), Fadini (1998), Gilabert-Escrivá (1997) e Minifie (1970).

Em relação às proteínas, as sementes de cacau apresentaram valor inicial de 13,58%, diminuindo ao final da secagem, alcançando 10,24%. Buyukpamukcu et al. (2001) no estudo do teor de proteínas em amêndoas de cacau mostrou que as mesmas sofrem variação durante a fermentação sendo observado um pequeno decréscimo ao final do processo. Dentre as modificações que ocorrem durante a fermentação pode-se ressaltar a hidrólise específica de proteínas, especialmente da fração globulina (LOPES, 2008; VOIGT; BIEHL, 1993), liberando peptídeos e aminoácidos livres importantes na formação do sabor e aroma durante a torração das amêndoas (VASCONCELOS, 1999; ROHAN; STEWART, 1967). Valores similares de proteínas foram encontrados por Lopes (2003; 2000) e por Mattietto (2001).

O teor de cinzas para as sementes frescas e amêndoas secas artificialmente foram de 3,06% e 3,57%, respectivamente. A variação no teor de cinzas entre a semente *in natura* e amêndoa fermentada seca pode ter ocorrido devido à solubilização de alguns minerais da polpa que foram permeados para o interior do cotilédono durante a fermentação.

Cros e Jeanjean (1995) relatam que as sementes fermentadas e secas de cacau possuem teores finais de glicose em torno de 0,05 a 0,2%, enquanto que Brito (2001), encontrou valores de 2,64%. No presente trabalho, o valor final encontrado para açúcares redutores totais foi de aproximadamente 0,78%.

A divergência entre os valores reportados na literatura pode ser explicada pelos diversos fatores que influenciam desde a quantidade presente na semente

in natura quanto as variáveis dos processamentos durante o beneficiamento do cacau. A redução dos teores de açúcares está relacionada com a formação do sabor de chocolate pela reação com aminoácidos livres. Essa reação inicia-se durante a fermentação, quando a temperatura da massa ultrapassa 40°C, continuando durante a secagem e se intensificando durante na torração das amêndoas, principal etapa no desenvolvimento do sabor de chocolate.

No presente estudo verificou-se que a etapa de secagem foi responsável pela redução de mais de 10% no teor de açúcares redutores totais, enquanto que a etapa de fermentação foi responsável por mais de 20% da perda dos mesmos, porém não houve diferença estatística entre as mesmas ($p \leq 0,05$) Essa diferença possivelmente deve-se à grande quantidade de água presente durante todo o processo fermentativo que facilita algumas reações químicas como a de Maillard enquanto que durante a secagem, a perda de água logo alcança valores que reduzem a velocidade de tais reações.

Após a secagem, as amêndoas apresentaram valores de polifenóis e antocianinas totais iguais a 39,15 meqCatequina/g e 30,44 g/100g, respectivamente. Isto permite observar que a perda de polifenóis totais e antocianinas totais desde o início da fermentação corresponderam a 60,5% e 80%, respectivamente.

É válido também lembrar que a secagem é um fator importante na perda desses compostos. No presente estudo verificou-se uma queda de 48,25% do teor de polifenóis totais após a secagem das amêndoas.

A mesma etapa não exerceu tanta influência em relação às antocianinas totais, que apresentaram uma queda de 6,14% após a secagem. Isso pode ser explicado pela pequena quantidade encontrada ao final da fermentação, assim como pela quantidade muito maior de outros polifenóis presentes inicialmente.

Quanto a capacidades antioxidante, os valores de EC_{50} reduziram após a secagem. Isso significa dizer que as amêndoas secas tiveram maior capacidade antioxidante que as amêndoas fermentadas e não secas. Novamente, esse comportamento pode ser explicado pela concentração de polifenóis no cotilédone

após a secagem que reduziu para cerca de 6% a umidade do mesmo. O mesmo comportamento também foi observado para TEAC, onde, após a secagem, houve um aumento da capacidade antioxidante das amêndoas, alcançando valores cerca de 70% superiores ao encontrados ao término da fermentação.

Após a secagem os teores de flavan-3-ols aumentaram, indo de 10,19 para 15,80 mg de catequina/g para o método da Vanilina-HCl, e 36,14 para 125,45 mg de quercetina/g para o método do Cloreto de Alumínio. Esses resultados estão diretamente ligados com as capacidades antioxidantes das amostras e corroboram com os valores obtidos em tais análises, onde também verificou-se um aumento após a etapa de secagem das amêndoas.

Para a peroxidase, a secagem foi, do mesmo modo que a fermentação, responsável pela redução de sua atividade, onde se observou sua inativação. Porém para a polifenoloxidase, após a secagem observou-se um aumento de sua atividade.

Segundo Furtunato (2002), enzimas podem se tornar novamente ativas após a inativação - fenômeno conhecido por renaturação - o qual ocorre com algumas enzimas depois de cessado o agente causador da desnaturação.

Além disso, em pHs baixos, forças repulsivas ocorrem entre os grupos ionizáveis presentes na estrutura da enzima, levando a perda da sua forma original, resultando em formas menos funcionais ou em sítios ativos não funcionais (LAM QUOC et al., 2005).

Sais, açúcares e álcoois polihídricos podem previnirem perdas na atividade enzimática (BRADBURY; JAKOBY, 1972) e inibem agregação irreversível (FRIGON; LEE, 1972) ou aumentam a temperatura de transição termal de macromoléculas (GERLSMA, 1968; NEUCERE; ANGELO, 1972; KAVRAYAN; AYDEMIR, 2001).

Lee e Timasheff (1981) encontraram uma significativa contribuição à estabilização proteica por açúcares em soluções aquosas, sendo a interação preferencial função do aumento da superfície de tensão da água pela adição de sacarose.

Hansen et al. (1998) em seu trabalho com enzimas durante a fermentação do cacau, observou a inativação total da polifenoloxidase após a etapa de fermentação, indicando, porém, que pode existir um período de reativação da enzima.

Misnawi et al. (2002) sugere que esse tempo de reativação pode ser conseguido dentro dos parâmetros adequados de temperatura e pH e observou que, após a secagem de amêndoas subfermentadas, a polifenoloxidase ainda apresentava atividade enzimática próxima a 30% da inicial.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os perfis observados durante a fermentação (temperatura, pH e acidez) a metodologia empregada na fermentação foi capaz de produzir amêndoas de boa qualidade, classificadas como Tipo I (Superior) de acordo com o CONCEX (1988).

Ao longo da fermentação, observou-se que:

- O teor de umidade das sementes aumentou durante a fermentação;
- Os teores de açúcares redutores totais não sofreram variação ao longo do processo de fermentação;
- Os teores de polifenóis totais reduziram ao longo da fermentação;
- Para polifenóis totais houve ajuste para o modelo cinético de ordem zero;
- As antocianinas totais sofreram redução de 77,7% ao final da fermentação;
- Para antocianinas totais houve ajuste para o modelo cinético de ordem zero;
- Para o método DPPH (EC_{50}) ocorreu uma leve diminuição da capacidade antioxidante das amêndoas ao final da fermentação;
- Não houve ajuste a nenhum modelo aplicado para o método DPPH;
- Para o método TEAC houve um aumento na capacidade antioxidantes ao final da fermentação;
- Para TEAC houve ajuste para o modelo cinético de ordem zero;
- Os teores de flavan-3-ols em ambas as metodologias Vanilina-HCl e $AlCl_3$ aumentaram ao longo da fermentação;
- Para metodologias Vanilina-HCl e $AlCl_3$, houve ajuste do modelo cinético de ordem zero.
- Houve uma redução na atividade enzimática da peroxidase e a inativação da polifenoloxidase ao final da fermentação;

- Não houve ajuste a nenhum modelo aplicado para as atividades enzimáticas da peroxidase e polifenoloxidase.

Em relação à etapa de secagem foi observado que:

- Não houve variação de pH entre o antes e depois da etapa de secagem;
- Houve uma redução da acidez, porém a mesma permaneceu alta ao final da secagem;
- O teor de lipídeos aumentou após a secagem;
- O teor de proteínas diminuiu após a secagem;
- Houve um aumento do teor de cinzas;
- Os teores de açúcares redutores totais aumentaram;
- Os teores de antocianinas e polifenóis totais reduziram;
- Ocorreu um aumento nas capacidades antioxidantes das amêndoas tanto para o método DPPH quanto para TEAC;
- Os teores de flavan-3-ols aumentaram tanto para a metodologia da Vanilina-HCl quanto para $AlCl_3$;
- Observou-se a inativação da peroxidase e renaturação da polifenoloxidase ao final do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar.** UFMG. Tese de Doutorado, 2007.

AMAROWICZ R., CARLE R., DONGOWSKI G., DURAZZO A., GALENSA R., KAMMERER D., MAIANI G., PISKUŁA M.K. *Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods.* **Molecular Nutrition & Food Research.** v.53, p.S151-S183, 2009.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**, 16° ed, 3ª rev, 1997.

ARAGÃO, C. G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) durante o processo fermentativo.** Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade do Amazonas, 1992, 115p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática.** Viçosa: UFV. 2ª ed, p.319-329, 1999.

ARDHANA, M.; FLEET, G.H. *The microbial ecology of coca beans fermentations in Indonesia.* **International Journal of Food Microbiology.** v.86, p.87-100, 2003.

ARSEGO JL, CAPEL LS, PASSOS R, IANSSEN C, ABREU MF, VENDRUSCULO LF, et al. Cinética de extração de antocianinas em frutos de framboesa (*Rubus idaeus*) e amora preta (*Rubus fruticosus*). Em: **www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/tecnologia_de_alimentos/896.htm**. 2002.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química.** Bookman, Porto Alegre. 689p, 2001.

BAREL, H. *Délai d'écabossage. Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié.* **Café Cacao Thé.** v.31, n.2, p.141-150, 1987.

BARTLEY, B. G. D. *The genetic diversity of cacao and its utilization*. **CABI Publishing**, Wallingford, UK, 341p, 2005.

BECKETT S. T. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. Black Academic & Professional, Londres, 1994.

BELITZ, H-D. SCHIEBERLE, P. GROSCH W. *Food Chemistry*, 383p, 4ed, Springer, 2009.

BELŠČAK, A.; KOMES, D.; HODŽIĆ, D.; KOVAČEVIĆ-GANIĆ, K.; KARLOVIĆ D. *Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition*. **Food Research International**. v.42, p.707-716, 2009.

BESSON, I., CREULY, C., GROS, J. B. & LARROCHE, C. *Pyrazine production by Bacillus subtilis in solid-state fermentation on soybeans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 47, 5^a ed, p.489-495, 1997.

BEUK, M. R. **Atlas de microscopia alimentar: identificação e elementos histológicos vegetais**. São Paulo: Livraria Varela, 79p, 1997.

BEZERRA, D. A. C. **Abordagem fitoquímica e composição bromatológica de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. Patos, PB: UFCG (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido), p.62, 2008.

BIEHL, B; PASSERN, D. *Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.33, p.1280-1290, 1982.

BIEHL, B; VOIGT, J. *Biochemistry of chocolate flavour precursors*. In **International cocoa conference**. Salvador, Bahia, 1996.

BISPO, E. DA S. **Processo de alcalinização dos nibs de cacau (*Theobroma cacao* L.) e avaliação da qualidade do pó**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O.; **Química de processamento de alimentos**, Varela: São Paulo, 3^a ed., 2001.

BONVEHÍ, J. S; COLL, F. V. *Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder*. **Food Chemistry**, v.60, n.3, p.365-370, 1997.

BRADBURY, S. L. & JAKOBY, W. B. *Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effect on aldehyde dehydrogenase*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.69, p.2373-2376, 1972.

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

BRAUDEAU J. **Le cacaoyer**. G. P. Maisonneuve et Larose, Paris, 304p, 1969.

BRITO, E. S. PEZOA GARCIA, N. H. GALLÃO, M. I. CORTELAZZO, A L. FEVEREIRO, P. S. BRAGA, MR. *Structural and chemical changes in cocoa (Theobroma cacao L) during fermentation, drying and roasting*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, n.2, p.281-288, 2001.

BRITO, E. S; GARCIA, N. H. P.; AMANCIO, A. C. *Use of a Proteolytic Enzyme in Cocoa (Theobroma cacao L.) Processing*. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.4, p.533-558, Agosto, 2004.

BRUNETON, J. **Fitoquímica y farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1ª ed, 594p, 1991.

BUYUKPAMUKCU, E.; GOODALL, D. M.; HANSEN, C. E.; KEELY, B. J.; KOCHHAR, S.; WILLE, H. *Characterization of peptides formed during fermentation of cocoa bean*. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v.49, p.5822-5827, 2001.

CAMU, N; DE WINTER, T; ADDO, SK; TAKRAMA, JS; BERNAERT, H; DE VUYST, L. *Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.13, p.2288-2297, 2008.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia - da**

planta ao medicamento, p.443-459. 3ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 821p. 2001.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: Edições CEJUP/CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991, 279p, CEPLAC. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **CACAU: Informações do Mercado Ano I – n.3 - 05/10/2009–06/11/2009**. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br>. Acesso em: Jan. de 2010.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira: **Normas técnicas para o cultivo do cacau no Recôncavo Baiano**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, 43p, 1980.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira: **Sistema de Produção de Cacau a Amazônia Brasileira**. Belém, Pará, 82p, 2001.

CHEESMAN, E. E. *Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations*. **Journal of Tropical Agriculture**, v.21, p.144–159, 1944.

CONCEX. **Conselho Nacional do Comércio Exterior**. Resolução nº 161, Rio de Janeiro, Brasil, 1988.

COUNET, C; COLLIN, S. *Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6816–6822, 2003.

CROS, E; JEANJEAN, N. *Cocoa quality: effect of fermentation and drying*. **Plantations, recherche, développement**, n.24, p.25-27, 1995.

CUNHA, J; SERÔDIO, R. S. **Tecnologia disponível para o beneficiamento e armazenamento do cacau**, Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 45 p, 1991.

CUNHA-SANTINO, M.B. **Atividade enzimática, cinética e modelagem matemática da decomposição de *Utricularia breviscapa* da lagoa do Óleo (Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio – SP)**. 154p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2003.

DALZELL, S. A.; KERVEN, G. J. *A rapid method for the measurement of Laucaena ssp. Proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay. Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.78, p.405-416, 1998.

DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.; KOSAR, M.; HILTUNEN, R.; *Chemical composition and in vitro evaluation of a water-soluble Moldavian balm (Dracocephalum moldavica L.) extract, LWT - Food Science and Technology*, v. 40, n.2, p.239-248, 2007.

DEGÁSPARI CH, WASZCZYNSKYJ N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos.** *Visão Acadêmica*, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.K.; LIU, R.H. *Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p.3010–3014, 2002.

DI STEFANO, R.; GUIDONI, S. *La determinazione dei polifenoli totali nei mosti e nei vini. Vignevini*, v.16, p.47-52, 1989.

DIAS, J. C. *Influência do tamanho do fermentador e da época no tempo de fermentação e acidez do cacau. Belém, CEPLAC/SUPOR. Boletim Técnico n. 16*, 18p, 1998.

DIAS, J. C. **Permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético: evolução na fermentação e efeito da adição de celulases, antes da secagem, na acidez do produto final.** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Lavras, 70p, 1987.

DIAS, J. C.; ÁVILA, M. da G. M. *Avaliação do grau de fermentação e da acidez do cacau comercial dos estados do Pará e Rondônia. Belém, CEPLAC/SUPOR. Boletim Técnico*, n.12, p.13, 1994.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauzeiro.** Viçosa: Funape, 578p, 2001.

DOWNHAM A, COLLINS P. *Colouring our foods in the last and next millennium. International Journal of Food Science and Technology*. v.35, n.1, p.5-22, 2000.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. *Food microbiology: fundamentals and frontiers.* Washington: ASM. 2ª ed, p.497-519, 1997.

DREOSTI, I.E. *Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine*. **Health Sciences and Nutrition**. Adelaide, Austrália, v.16, p.692-694, 2000.

EFRAIM, P. **Estudo para Minimizar as Perdas de Flavonóides Durante a Fermentação de Sementes de Cacau para Produção de Chocolate**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, 110p. UNICAMP, Campinas, 2004.

ELBE, J. H. von; SCHWARTZ, S. J. Colorantes. In: FENNEMA, O. R. (Dir.) **Química de los alimentos**, Zaragoza: Acríbia. p.587-588, 2000.

ELWERS, S.; ZAMBRANO A.; ROHSIUS, C.; LIEBEREI R. *Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (Theobroma cacao L.)*. **European Food Research and Technology**, n.229, p.937–948, 2009.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C. *Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods*. **Analytica Chimica Acta**, v.427, p.119, 2001.

FADINI, A. L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração do cacau frente ao processo por microondas**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 122p, 1998.

FAGUNWA, A. O., KOYA, O. A., FAVORODE, M. O. *Development of an Intermittent Solar Dryer for Cocoa Beans*. **Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal**. Manuscrito n. 1292, v.11, Julho, 2009.

FERNÁNDEZ-BARBERY, S. D. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (Theobroma cacao L.) utilizando polifenoloxidase E.C 1.1.0.3.1. extraída da pinha (Annona squamosa L.) e tratamento térmico não convencional**, 76 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 1999.

FERREIRA, J.E.M. **Cinética e fatores que influenciam na degradação de carotenóides em sistemas modelos de alimentos**. 96p. Dissertação (Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2001.

FINE, A. M. *Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications*. **Alternative Medicine Review**, v.5, n.2, p.144-151, 2000.

FORSYTH, W. G. C. **Cocoa Chocolate and Confectionery Alliance**, Londres, n.73, 1951.

FREIRE E.S.; et. al. Beneficimento, armazenamento e classificação. **In: Sistema de produção de cacau no recôncavo da Bahia**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, 1992.

FREITAS, et al. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p.172-177, 2008.

FRIGON, R. P., & LEE, J. C. *The stabilization of calf-brain microtubule protein by sucrose*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.153, p.58-589, 1972.

FU, B.; LABUZA, T.P. Shelf life of frozen foods. In: LABUZA, T.P.; FU, B.; **Shelf life testing: procedures and prediction methods**. Denver: CRC Press, cap.19, p.377-415, 1997.

FULEKI, T., FRANCIS, F.J. *Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, p.72-77, 1968.

FÜLLER, T. N. **Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de *Elionurus sp.* Humb. & Bompl ex Willd (capim-limão)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. 2008.

FURTUNATO, A. A. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectina esterase e peroxidase presente na polpa de cajá (*Spondias lútea*)**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Rio Grande do Norte, 74p, 2002.

GALVANO F, LA FAUCI L, LAZZARINO G, FOGLIANO V, RITIENI A, CIAPPELLANO S, et al. *Cyanidins: metabolism and biological properties*. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, n.1, p.2-11, 2004.

GARCÍA-ALAMILLA, P., SALGADO-CERVANTES, M. A., BAREL, M., BERTHOMIEU, G., RODRÍGUEZ JÍMENES, G. C., & GARCÍA-ALVARADO, M. A. *Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying*. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.1159–1165, 2007.

GERLSMA, S. Y. *Reversible denaturation of ribonuclease in aqueous solutions as influenced by polyhydric alcohols and some other additives*. **Journal of Biological Chemistry**, v.243, p.957-961, 1968.

GILABERT, E. M. V. **Comparação das propriedades reológicas da massa de cacau torrada convencionalmente e por microondas**. Dissertação (Mestrado), UNICAMP, 88p, 1997.

GRIMALDI, J. *Les Possibilités D'amélioration des Techniques D'ecabossage et de Fermentation dans le Processus Artisanal de le Préparation du Cacao*. **Café Cacao Thé**, v.22, p.3060-316, 1978.

GUEHI, T.S.; ADJÉHI, T. D.; KOFFI, K. B. P.; DABONNE, S.; BAN-KOFFI, L.; KEDJEBO, K. D.; NEMLIN, G. J. *Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, ed.12, p.2508-2514, Dezembro, 2010.

HANSEN, C. E.; OLMO, M.; BURRI, C. *Enzyme activities in cocoa beans during fermentation*, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, n.2, p.273-281, 1998.

HARBORNE, J.B. *General procedures and measurement of total phenolics*. Em: **Methods in Plant Biochemistry**, HARBORNE, J. B., *Plant Phenolics*, Academic Press, Londres, v.1, p.1–28, 1989.

HASHIM, P.; SELAMAT J.; MUHAMMAD, S. K. S.; ALI, A. *Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.78, p.535-542, 1998.

HATANO, T. et al. *Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects*. **Phytochemistry**, n.59, p.749-758, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n.13, p.572-584, 2002.

IBANOGLU, S.; IBANOGLU, E. *Modelling of natural fermentation in cowpeas using response surface methodology*. **Journal of Food Engineering**, n.48, p.277-281, 2001.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível na internet: <http://www.ibge.net>, em Agosto de 2010.

JINAP S.; SITI, M. H.; NORSIATI, M. G. *Formation of methyl pyrazine during cocoa bean fermentation*. *Pertanika*. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v.17, p.27-32, 1994.

JINAP, S; DIMICK, P.S. *Acidic characteristics of fermented dried cocoa beans from different countries of origin*. **Journal of Food Science**, v.55, p.547–550, 1990.

KAVRAYAN, D. AND AYDEMIR, T. *Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*)*. **Food Chemistry**, v.74, p.147-154, 2001.

KIM, H. & KEENEY, P. G. *(-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, p.1090-1092, 1984.

KIM, H.-S.; CÔTÉ, J.-C.; FRÉCHETTE, S.; CHUNG, Y.S. *Isolation and characterization of mutants of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.234-239, 1994.

KING A.; YOUNG, G. *Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals*. **Journal of the American Dietetic Association**, v.50, n.2, p.213-218, 1999.

KIRCHHOFF, M; BIEHL, B.; CRONE, G. *Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation*. **Food Chemistry**, v.31, p.295–311, 1989.

KOEHLER et al., *Formation of pyrazine compounds in sugaramino model systems*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.17, n.2, p.393-396, 1969.

KOSTINEK M.; BAN-KOFFI L.; OTTAH-ATIKPO M.; TENIOLA D.; SCHILLINGER U.; HOLZAPFEL W. H.; FRANZ C. M. A. P. *Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria*. **Current Microbiology**. v.56, 4^a ed., p.306-14, 2008.

KRATZER, U., FRANK, R., KALBACHER, H., BIEHL, B., WÖSTEMEYER, J. AND 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**, v.113, p.903-913, 2009.

KUSKOSKI EM, ASUERO AG, GARCÍA-PARILLA MC, TRONCOSO AM, FETT R. *Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.24, n.4, p.691-693, 2004.

LABUZA, T.P. *Application of chemical kinetics to deterioration of foods.* **Journal of Chemical Education**, Easton, PA, US: American Chemical Society, Division of Chemical Education, v.61, p.348-358, 1984.

LABUZA, T.P.; RIBOH, D. *Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient loss in foods.* **Food Technology**, v.36, n.10, p.66-74, 1982.

LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 81p, 1982.

LANE, J. H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator.** Normam Rodge, London, 8p, 1934.

LANGE H. AND FINCKE A. Kakao und Schokolade. In: L. ACKER, K.G. BERGNER, & W. DIEMAIR, **Handbuch der Lebensmittel** Band VI: Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz, New York: Berlin, Heidelberg Springer Verlag, p.210–309, 1970.

LEAL JB, SANTOS LM, SANTOS CAP, PIRES JL, et al. *Genetic diversity among farm and germplasm bank accessions of cacao in Bahia, Brazil.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.851-858, 2008.

LEES, D.H., FRANCIS, F J. *Standardization of pigment analyses in cranberries.* **HortScience**, Alexandria, v.7, n.1, p.83-84, 1972.

LERCETEAU, E. et al. *Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis.* **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, n.4, p.619-625, 1999.

LOMAURO, C.J.; BAKSHI, A.S.; LABUZA, T.P.; *Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: fruit, vegetable and meat products.*

Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie, Londres, Academic Press, v.18, p.111-117, 1985.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 112p, 2000.

LOPES, A. S.; GARCIA, N. H. P.; AMAYA-FARFAN, J. Qualidade nutricional das proteínas de cupuaçu e de cacau. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, 2008.

LOPES, A. S.; GARCIA, 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 of Food Technology**, v.6, n.2, p.309-316, 2003.

LOPEZ, A. S. Limitação da “prova de corte” no controle de qualidade do cacau comercial. **Revista Theobroma**, v.14, p.199-207, 1984.

LOPEZ, A. S., DIMICK, P. S. *Cocoa fermentation*. In: REED, G., NAGODAWITHANA, T. W. (Eds.), *Enzymes, Biomass, Food and Feed*, 2ª ed. **Biotechnology**, VCH, Weinheim, v.9, p.561-577, 1995.

LOPEZ, A.S & QUESNEL, V.C., *Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v.24, n.3, p.319-324, 1973.

LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. *Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.3527-3532, 2002.

MAGA, J. A.; *Pyrazine update*. **Food Reviews International**. Colorado, EUA, v.8, 4ª ed., p.479-558, 1992.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1218-1223, 2008.

MARTÍNEZ-FLÓREZ S, GONZÁLEZ-GALLEGO J, CULEBRAS JM, TUÑÓN MJ. *Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes*. **Nutrición Hospitalaria**. v.17, n.6, p271-278, 2002.

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Campinas, 163p, 2001.

MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa and confectionary: science and technology**. 3ª ed. Nova Iorque, na AVI Book publicado por Van Nostrand Reinhold, 940p., 1989.

MISNAWI, J. S. JAMILAH, B. NAZAMID, S. *Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting*. **Food Chemistry**, v.85, p.73-80, 2004.

MISNAWI, J. S.; JAMILAH, B; NAZAMID, S. *Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.559-566, 2002.

MOHR, W; LANDSCHREIBER, E; SEVERIN, T. *On the specificity of cocoa aroma*. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.78, p.88-95, 1976.

MOTAMAYOR, J.C. LACHENAUD, P. da SILVA e MOTA, J. W. LOOR, R. KUHN, D.N. et al. *Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree*. **Plos One**, v.3, n.10, p.3311, 2008.

MÜLLER, R; RAPPERT, S. *Pyrazines: occurrence, formation and biodegradation*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.85, n.5, p.1315-1320, 2010.

NAZARUDDIN, R, SENG, LK, HASSAN, O; SAID, M. *Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation*. **Industrial Crops and Products**, v.24. p.87-94, 2006.

NDOUMOU, D. O., DJOCGOUE, P. F., NANA, L., & DEBOST, M. *Variation and inheritance of peroxidase activity and phenol and saccharide content in cacao in relation to susceptibility to black pod disease*. **Biologia Plantarum**, v.37, p.429-436, 1995.

NEUCERE, N. J., & ANGELO, A. J. *Physicochemical properties of peanut proteins in sucrose*. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.80-89, 1972.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v.34, p.109-157, 1994.

NIELSEN, D.S.; SNITKJAER, P.; VAN DEN BERG, F. *Investigating the fermentation of cocoa by correlating Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles and Near Infrared spectra*. **International Journal of Food Microbiology**. v.125, p.133-140, 2008.

NIEMENAK, N; ROHSIUS, M.; ELWERS, S.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. *Comparative study of different cocoa (Theobroma cacao L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.612-619, 2006.

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 and Technology**, v.44, p.168-180, 2009.

NORSHAZILA, S., SYED ZAHIR, I., MUSTAPHA SULEIMAN, K., 'AISYAH, M. R. AND KAMARUL RAHIM, K. *Antioxidant Study of Selected Seeds of Malaysian Tropical Fruits*. **Malaysian Journal of Nutrition**, v.16, n.1, p.149-159, 2010.

NYCHAS, G. J. E. *Natural antimicrobials from plants*. In: **New Methods of Food Preservation**, Londres, Blackie Academic Professional, p.58-59, 1995.

OLIVEIRA AC, VALENTIM IB, GOULART MOF. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009a.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; DE BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F.; *Vegetals as natural sources of antioxidants*. **Food Chemistry**, v.115, p.469, 2009b.

OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (Theobroma cacao)**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 72p, 2005.

ORTEGA, N.; ROMERO, M.; MACIÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J.; MOTILVA, M. *Obtention and Characterization of Phenolic Extracts from Different Cocoa Sources*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.56, p. 9621-9627, 2008.

ORTIZ DE BERTORELLI, L, ROVEDAS L, G. GRAZIANI DE FARINAS, L. *Influence of several factors on physical indexes of cocoa seeds in fermentation*. **Agronomía Tropical**, v.59, n.1, p.81-88, 2009.

OTHMAN, A. S., MOHD, F, P.; JINAP, S; LEE, C. H. *Free amino acids in fresh and fermented cocoa beans inoculated with (*Saccharomyces cerevisiae* - wild strain)*. **The Planter K L**, p.683-686, 1992.

OTHMAN, A.; JALIL, A. M. M.; WENG, K. K.; ISMAIL, A.; ABD.GHANI, N.; ADEMAN. I. *Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries*. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.7, p.1052-1059, 2010.

PETTIPHER, G. L. *Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.37, 3^a ed., p.297-309, 1986.

PEZOA, G. N. H. ***Contribution a l'étude d'un capteur por controlar en continu le procédé de torréfaction***. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos. *Université de Technologie de Compiègne*, França, 170p., 1989.

PIETTA, P. G. *Flavonols as antioxidants*. **Journal of Natural Products**, Itália, n.63, p.1035-1042, 2000.

PIMENTEL, F. A.; NITZKE, J. A.; KLIPEL, C. B.; JONG, E. V. *Chocolate and red wine – A comparison between flavonoids content*. **Food Chemistry**, v.120, p.109-112, 2010.

PINTO, A; CHICHESTER, C. O. *Changes in the content of free amino acids during roasting of cocoa beans*. **Journal of Food Science**, v.31, p.726-732, 1966.

PORTILLO, E., L. GRAZIANI DE FARIÑAS Y E. BETANCOURT. *Efecto de los tratamientos post-cosecha sobre la temperatura y el índice de fermentación en la calidad del cacao criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L) en el sur del Lago de Maracaibo*. **Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)**, v.22, n.4, p.394-406, 2005.

QUESNEL, V. C. *Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.16, p.441-474, 1965.

RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, I.; DELONGA, K.; MAZOR, S.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; CARIĆ, M.; VORKAPIĆ-FURAČ, J. *Polyphenolic Content and Composition and Antioxidative Activity of Different Cocoa Liquors*. **Czech Journal of Food Science**, v.27, n.5, p.330–337, 2009.

RAMÔA, A. G. A. **Influência do tipo de secagem e tempo de torração nos parâmetros de qualidade do liquor de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 57p. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UFPA, Belém, 2008.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REEVES, S.G.; MCDOWELL, I.; BEHN, K.; DENCH, J. *Biochemical studies of cocoa bean o-diphenol O₂ oxidoreductase (catechol oxidase)*. **Food Chemistry**, Oxford, v.29, p.209-219, 1988.

REINECCIUS, G. A.; ANDERSEN, D. A.; KAVANAGH, T.; KEENEY, P. G. *Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, p.199–202, 1972.

ROELOFSEN, P. A. *Fermentation, drying and storage of cacao beans*. **Advanced Food Research**, v.8, p.225–296, 1958.

ROHAN, T. A. *The chemistry of flavor*. In: J. B. Harborne (ed.). *Phytochemical Ecology*. **Proceedings of the Phytochemical Society Symposium**, Academic Press, Londres, v.8, p.57-69, 1972.

ROHAN, T.A & CONNELL, M. *The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.29, p.460-463, 1964.

ROHAN, T.A.; STEWART, T. *The precursors of chocolate aroma: Production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans*. **Journal of Food Science**, v.32, p.399-402, 1967.

ROURA, E.; ANDRES-LACUEVA, C.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. *Total polyphenol intake estimated by a modified Folin–Ciocalteu assay of urine. Clinical Chemistry*, v.52, p.749-752, 2006.

RUSCONI, M., CONTI, A. *Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. Pharmacological Research*, v.61, n.1, p.5-13, 2010.

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

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.76, p.270-276, 1998.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.333-365, 2002.

SCHWAN RF, WHEALS AE. *The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.44, p.205-221, 2004.

SCHWAN, R. F., *Microbiology of cocoa fermentation; A study to improve quality*. In: **12ª CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS EM CACAU**. Salvador – BA, Novembro, 1996.

SHAHIDI F, NACZK M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press LLC: Nova Iorque, 2003.

SIGNORI, C. A.; VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, O. Biossensor amperométrico para determinação de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). **Química Nova**, São Paulo, v.17, n.1, p.38-42, 1994.

SILVA, M. V.; ROSA, C. I. L. F. ; VILLAS BOAS, E. V. B. Conceitos e Métodos de Controle do Escurecimento Enzimático no Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.27, p.83-96, 2009.

SILWAR, R. **Café Cacao Thé**, Paris, v.32, n.3, p.187-200 e 243-250, 1988.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. **Methods in Enzymol**, v.299, p.152, 1999.

SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G.R. *Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems*. **Critical Reviews in Plant Science**, v.10, n.1, p.63-121, 1991.

STATSOFT, INC. **STATISTICA (data analysis software system)**, versão 6.5. www.statsoft.com, 2004.

SUN, B. S.; DA SILVA, J. M. R.; SPRANGER, I. *Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4267-4274, 1998.

TABERNERO, M.; SERRANO, J; SAURA-CALIXTO, F. *The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.28-32, 2006.

TAOUKIS, P.S.; LABUZA, T.P.; SAGUY, I.S.; *Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction*. In: VALENTAS, K.J.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R.P. **The handbook of food engineering practice**. Boca raton: CRC Press LLC, p.361-402, 1997.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V.; *Indicadores Naturais de pH: Usar Papel ou Solução?*. **Química Nova**, v.25, n.4, p.685, 2002.

THOMPSON, S.S., MILLER, K.B., LOPEZ, A.S. *Cocoa and coffee*. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. (Eds.), **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, DC, p.721-736, 2001.

VALLE, R. R. **Ciência, tecnologia e manejo do cacauero**. Ihéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIS, 467p, 2007.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 114p, 1999.

VERZELLONI E, TAGLIAZUCCHI D & CONTE A. *Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar*. **Food Chemistry**, v.105, p.564-571, 2007.

VITALI, A.A.; TEIXEIRA NETO, R.O.; Introdução à cinética de reação em alimentos. In: **Manual do curso de reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, cap. 2, 2002.

VOIGT, J; BIEHL B; HEINRICHS, H. *Proteolytic formation of cocoa Ñavour precursors* In: **Progress in Flavour Precursors Studies**, ed. Schreier P. Allured Publ Corp, Wheaton, USA, p.213-216, 1993.

WEISBURGER, J. H. *Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases*. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.10, p.891-897, 2001.

WILLEMSSEN, J.H.A.; KATTENBERG, H.R. *Aroma extracts from cocoa and coffee for a natural fresh flavour*. **Asia Pacific Food Industry**, p.40-46, 2001.

WOLLGAST, J; ANKLAN, E. *Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?* **Food Research International**, n.33, p.449-459, 2000.

WOOD, G. A. R., LASS, R. A. **Cocoa**. 4a. ed. Longman, Nova Iorque, 1985.

YUSEP, I. JINAP, S. JAMILAH, B. NAZAMID, S. *Influence of carboxypeptidases on free amino acid, peptide and methylpyrazine contents of under-fermented cocoa beans*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, n.13, p.1584-1592, 2002.

ZAMALLOA, C.W.A. **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**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 111p, 1994.

ZHU, Q. Y. et al. *Stability of the Flavan-3-ols epicatechin and Catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.50, p.1700-1705, 2002.