



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**BRENDA DE NAZARÉ DO CARMO BRITO**

**AMINAS BIOATIVAS E COMPOSTOS FENÓLICOS NO CACAU  
(*Theobroma cacao* L.): INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE  
FERMENTAÇÃO**

BELÉM - PA

2013

**BRENDA DE NAZARÉ DO CARMO BRITO**

**AMINAS BIOATIVAS E COMPOSTOS FENÓLICOS NO CACAU  
(*Theobroma cacao* L.): INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE  
FERMENTAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dra Alessandra Santos Lopes

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

BELÉM - PA

2013

# BRENDA DE NAZARÉ DO CARMO BRITO

## AMINAS BIOATIVAS E COMPOSTOS FENÓLICOS NO CACAU (*Theobroma cacao* L.): INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dra. Alessandra Santos Lopes

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

BANCA EXAMINADORA:

Conceito: \_\_\_\_\_

---

Prof. Dra. Alessandra Santos Lopes - Orientadora (PPGCTA/ITEC/UFPA)

---

Prof. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória - Co-orientadora (PPGCA/UFMG)

---

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza - Membro (PPGCTA/ITEC/UFPA)

---

Prof. Dr. Heronides Adonias Dantas Filho – Membro (PPQ/ICEN/UFPA)

*Dedico ao meu pai e avó, Jacinto Ferreira de Brito (in memoriam),  
minha mãe e avó, Maria de Nazaré do Carmo Brito  
minha mãe, Elizabete de Nazaré do Carmo Brito,  
Dedico com todo meu amor, carinho, admiração e gratidão que tenho por eles...*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a DEUS por estar sempre presente na minha vida.

**Minha mãe** (Elizabeth), que em todos os momentos da minha vida foi e é minha amiga, meu pai, minha irmã e conselheira, minha verdadeira alma gêmea. Minha maior incentivadora, cujo amor é incondicional, torce por mim a cada batalha enfrentada e comemora cada vitória. Minha **mãe-avó** (Maria de Nazaré), meu exemplo de mulher, admiro sua força, sua forma de encarar o mundo. Nada me faz mais feliz do que conhecer a vida através dos seus exemplos.

Ao Marcel, por ser a luz em nossas vidas, sua alegria nos contagia, meu irmãozinho querido! Sempre estarei contigo! Ao Alessandro, por ser um grande amigo e companheiro em nossa família.

Ao meu **pai-avô** (Jacinto), que infelizmente não pode estar comigo fisicamente, mas sei que sua presença em minha vida se faz constante! Ao meu **tio** (Roberto) e **tias** (Regina e Andrea) que não estão mais entre nós, mas sei o quanto torciam por mim e que estão muito felizes por essa vitória! Amo vocês! Aos meus **primos**, tios e tias, pelo carinho, apoio e convivência!

À minha madrinha Clarice, a qual considero uma mãe, obrigada por todo carinho que me tem dedicado, todo apoio na minha jornada acadêmica e em minha vida!

Aos amigos do LAFAMI, Diego, Mayara, Juliana, Joyce, Giselle, Flávia, Claudia, Thaise, Thais, Silvana, Aline, Leilane, Renan, aos amigos do LAPESCA, por serem prestativos e receptivos, Milena, Rafela, Luã, e aos amigos da minha pequena, mas não menos importante turma de mestrado Wanessa, Rutelene, Márlia e Michele, obrigada a todos pela convivência, toda ajuda dada, pelos momentos de estudo, de muita diversão, companheirismo e amizade! De alguma forma todos colaboraram com a elaboração deste trabalho! Meu muito obrigado!

À minha orientadora Alessandra Santos Lopes, obrigada pela confiança em mim depositada e por todos esses anos de amizade e convivência, desde a minha graduação em até o mestrado. Seus ensinamentos foram essenciais para meu crescimento profissional, obrigada por sempre me incentivar a acreditar que tudo daria certo.

Agradeço em especial a Dra. Maria Beatriz Abreu Glória pela co-orientação deste trabalho, pelas análises realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos. Obrigada por toda a disponibilidade manifestada, pela ajuda e interesse demonstrados, pela revisão crítica do texto, pelos proveitosos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela acessibilidade, cordialidade, apesar da distância e de sua intensa vida profissional. Seu profissionalismo é digno de minha grande admiração.

Dirijo um agradecimento especial à Prof. Dr. Heronides Dantas e ao Dr. Jesus Souza que compuseram a minha Banca de Qualificação, pela leitura atenta do trabalho e pelas valiosas contribuições.

Aos técnicos de laboratório, Mario Carneiro e Saulo Edgar, obrigada pelos reagentes e pela ajuda concedida nas análises.

Obrigada ao secretário Antônio Favacho do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por me atender sempre com boa vontade e educação.

E finalmente à Universidade Federal do Pará (UFPA) que, juntamente com o de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Tecnologia (ITEC), ofereceram suporte ao desenvolvimento das atividades acadêmicas importantes para a minha formação através dos bons professores do curso de mestrado. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
<b>1. BENEFICIAMENTO DO CACAU</b> .....	<b>19</b>
1.1. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU.....	20
<b>1.1.1. Colheita, seleção e quebra do fruto.</b> .....	<b>20</b>
<b>1.1.2. Fermentação das sementes</b> .....	<b>20</b>
<b>2. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>3. COMPOSTOS FENÓLICOS</b> .....	<b>27</b>
3.1. Aspectos gerais .....	27
3.2. Compostos Fenólicos Presentes no Cacau .....	31
3.3. Antocianinas no Cacau .....	33
3.4. Fatores Relacionados à Redução dos Fenólicos Durante o Beneficiamento do Cacau .....	34
<b>4. AMINAS BIOATIVAS</b> .....	<b>37</b>
4.1. Aspectos Gerais .....	37
4.2. Biossíntese .....	40
4.3. Importância Fisiológica .....	42
4.4. Aspectos Tóxicológicos .....	44
4.5. Aminas Bioativas nos alimentos .....	46
<b>4.5.1. Aminas bioativas no cacau</b> .....	<b>49</b>

<b>5. CINÉTICA DA REAÇÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO II - MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE CACAU .....</b>	<b>68</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>70</b>
2.1. MATERIAL.....	70
2.1.1. Amostras .....	70
2.2. MÉTODOS.....	70
2.2.1. Obtenção das sementes de cacau .....	70
2.2.2. Fermentação natural das sementes de cacau.....	71
<b>3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
4.1. Fermentação do Cacau .....	75
4.1.1. Temperatura da massa.....	75
4.1.2. Umidade.....	80
4.1.3. pH.....	83
4.1.4. Acidez total titulável .....	86
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO III - MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NA FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU (<i>Theobroma cacao L.</i>).....</b>	<b>95</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>97</b>
2.1. MATERIAL.....	97
2.2. MÉTODOS.....	97



2.2.1. Determinação dos Teores de Compostos fenólicos ao Longo da Fermentação .....	97	
2.2.2. Determinação dos Teores de Antocianinas Durante a Fermentação .....	98	
2.2.3. Determinação de Flavan-3-ols .....	99	
2.2.3.1. ....Método da vanilina-HCl para a determinação de flavan-3-ols .....		99
2.2.4. Determinação da Atividade Antioxidante .....	100	
<b>3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>	
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>102</b>	
4.1. Teores de Compostos fenólicos Durante a Fermentação .....	102	
4.2. Teores de Antocianinas Totais Durante a Fermentação .....	108	
4.3. Determinação de flavan-3-ols.....	111	
4.4. Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS <sup>o+</sup> .....	114	
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>118</b>	
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>	
<b>CAPÍTULO IV - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS NAS SEMENTES DE CACAU FERMENTADAS (<i>Theobroma cacao</i> L.).....</b>	<b>124</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>124</b>	
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>126</b>	
2.1. MATERIAL .....	126	
2.1.1. Amostras.....	126	
2.1.2. DETERMINAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS .....	126	
2.1.3. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS .....	127	
<b>3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....</b>	<b>128</b>	
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>128</b>	

<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>133</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>134</b>

# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela I.1.</b> Classe de compostos fenólicos em plantas. ....	27
<b>Tabela I.2.</b> Principais grupos de flavonóides e fontes alimentícias .....	30
<b>Tabela I.3.</b> Estrutura química de algumas aminas bioativas. ....	39
<b>Tabela I.4.</b> Efeitos farmacológicos de algumas aminas .....	44
<b>Tabela I.5.</b> Importantes alterações nos alimentos que seguem cinéticas de ordem zero ou primeira ordem.....	50
<b>Tabela I.6.</b> Tempos de meia-vida para as diferentes ordens de reação.....	51

## CAPÍTULO II - MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE CACAU

<b>Tabela II.1.</b> Temperatura média da massa durante a fermentação das sementes de cacau.....	76
<b>Tabela II.2.</b> Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de temperatura da massa durante a fermentação de sementes de cacau. ....	78
<b>Tabela II.3.</b> Parâmetros encontrados para regressão do modelo quadrático da variação de temperatura da massa durante a fermentação de sementes de cacau .....	79
<b>Tabela II.4.</b> Teor de umidade médio das sementes de cacau durante a fermentação. .	81
<b>Tabela II.5.</b> Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação do teor de umidade durante a fermentação das sementes de cacau.....	81
<b>Tabela II. 6.</b> Valores médios de pH das sementes durante a fermentação. ....	83
<b>Tabela II.7.</b> Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de pH durante a fermentação de sementes de cacau. ....	85
<b>Tabela II.8.</b> Acidez total titulável* médio das sementes de cacau durante a fermentação. ....	87
<b>Tabela II.9.</b> Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de acidez total titulável durante a fermentação de sementes de cacau. ....	88
<b>Tabela II.10.</b> Parâmetros encontrados para regressão do modelo quadrático da variação de acidez total titulável durante a fermentação de sementes de cacau .....	89

### **CAPÍTULO III - MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NA FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)**

**Tabela III.1.** Teores médios de compostos fenólicos\* das sementes de cacau durante a fermentação..... 103

**Tabela III.2.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de compostos fenólicos com resultados expressos catequina durante a fermentação de sementes de cacau. 105

**Tabela III.3.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de compostos fenólicos com resultados expressos em ácido gálico durante a fermentação de sementes de cacau..... 106

**Tabela III. 4.** Teor de antocianinas totais das sementes durante a fermentação..... 109

**Tabela III. 5.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de antocianinas totais durante a fermentação de sementes de cacau. .... 110

**Tabela III.6.** Teor médio de flavan-3-ols das sementes de cacau fermentadas..... 111

**Tabela III.7.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de Flavan-3-ol durante a fermentação de sementes de cacau. .... 113

**Tabela III. 8.** Valores médios da atividade antioxidante total das sementes de cacau fermentadas..... 115

**Tabela III.9.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação da atividade antioxidante durante a fermentação de sementes de cacau. .... 117

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura I.1.</b> Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por Grimaldi (1978).....	22
<b>Figura I.2.</b> Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides .....	28
<b>Figura I.3.</b> Estrutura da (-)-epicatequina e (+)-catequina. ....	29
<b>Figura I.4.</b> Principais polifenóis encontrados nas sementes de cacau. ....	31
<b>Figura I.5.</b> Antocianina majoritária da semente de cacau (3- $\alpha$ -L-arabinosidil-cianidina) 33	
<b>Figura I.6.</b> Precursores de algumas aminas bioativas .....	37
<b>Figura I.7.</b> Formação das aminas pela descarboxilação (1) e pela aminação de aldeídos (2) .....	40
<b>Figura I.8.</b> Biossíntese de aminas bioativas em vegetais. ....	42

## CAPÍTULO II - MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE CACAU

<b>Figura II. 1.</b> Frutos de cacau .....	70
<b>Figura II.2.</b> Sementes de cacau .....	70
<b>Figura II.3.</b> Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por Grimaldi (1978) (a) e Caixa de fermentação baseada na caixa T-60 com dimensões reduzidas (largura e comprimento) (b) .....	71
<b>Figura II. 4.</b> Folhas de bananeira cortadas misturadas às sementes de cacau .....	72
<b>Figura II. 5.</b> Amêndoas de cacau no sétimo dia de fermentação .....	72
<b>Figura II.6.</b> Comportamento da temperatura da massa de sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.....	75
<b>Figura II.7.</b> Comportamento quadrático da variação de temperatura da massa durante a fermentação de sementes de cacau. ....	79
<b>Figura II.8.</b> Comportamento da umidade das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.....	80
<b>Figura II.9.</b> Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de umidade das sementes de cacau durante a fermentação.....	82
<b>Figura II.10.</b> Comportamento do pH das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.....	83

**Figura II.11.** Modelo cinético de primeira ordem e distribuição aleatória de resíduos da variação de pH das sementes e cacau durante a fermentação. .... 85

**Figura II.12.** Comportamento da acidez total titulável das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações. .... 86

**Figura II.13.** Comportamento quadrático da variação de acidez total titulável durante a fermentação de sementes de cacau. .... 89

### **CAPÍTULO III - MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NA FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)**

**Figura III.1.** Comportamento dos compostos fenólicos, expressos em catequina e ácido gálicos das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações. .... 102

**Figura III.2.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de compostos fenólicos totais expressos em catequina das sementes de cacau durante a fermentação. .... 107

**Figura III.3.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de compostos fenólicos totais expressos em ácido gálico das sementes de cacau durante a fermentação. .... 107

**Figura III.4.** Comportamento das antocianinas totais das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações. .... 108

**Figura III.5.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de antocianinas totais das sementes de cacau durante a fermentação. .... 110

**Figura III.10.** Comportamento do flavan-3-ol das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações, e a média das mesmas. .... 111

**Figura III.7.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de flavan-3-ol das sementes de cacau durante a fermentação. .... 113

**Figura III.8.** Comportamento da atividade antioxidante das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações. .... 114

**Figura III.9.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação da atividade antioxidante das sementes de cacau durante a fermentação ... 117

### **CAPÍTULO IV - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS NAS SEMENTES DE CACAU FERMENTADAS (*Theobroma cacao* L.)**

**Figura IV. 1.** Aminas bioativas detectadas nas sementes de cacau fermentadas.. 128

**Figura IV. 2.** Contribuição de poliaminas e de aminas biogênicas ao teor total em função do tempo de fermentação. .... 131

## RESUMO

### **Aminas bioativas e compostos fenólicos no cacau (*Theobroma cacao* L.): Influência do processo de fermentação**

Foi verificada a influência da fermentação, com duração de (7) sete dias, no perfil e os teores de compostos fenólicos, atividade antioxidante e aminas bioativas, sendo que compostos fenólicos e a atividade antioxidante foram submetidos a modelos cinéticos para avaliar uma tendência ou prever um comportamento para garantir um maior controle do processo. Ocorreu elevação de temperatura e acidez total titulável, com máxima 41,4°C (5º dia) e redução de pH (6,46-5,13). Houve redução de 31% dos compostos fenólicos; 79% de antocianinas totais, 51% de flavan-3-ol e 39% na atividade antioxidante, apesar da perda dos compostos fenólicos durante a fermentação, a concentração restante nas sementes foi suficiente para produzir uma considerável atividade antioxidante. É importante ressaltar que a fermentação é a primeira etapa empregada na fabricação de chocolate, nesta etapa foi identificada espermidina, espermina, tiramina e triptamina, destaca-se o fato que as sementes fermentadas ainda precisam passar por outros processos tecnológicos, como a secagem e torração, podendo ocorrer elevação ou diminuição de aminas bioativas, por isso a realização de estudos sobre como estes compostos se comportam ao longo do beneficiamento do cacau até chegar aos seus inúmeros subprodutos, é essencial para garantir a presença destes compostos em níveis seguros para o consumidor, pois segurança alimentar é requisito básico que deve sempre ser satisfeito na produção de alimentos.

**Palavras-chave:** Cacau, fermentação, compostos fenólicos, aminas bioativas .

## ABSTRACT

### **Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.): Influence of the fermentation process.**

The influence of fermentation was observed, with a duration of (7) seven days, in profile and the contents of phenolic compounds, antioxidant activity and bioactive amines, whereas phenolic compounds and antioxidant activity were submitted to kinetic models to evaluate a tendency or predict behavior to ensure more control of the process. There was an increase of temperature, with maximum 41.4 ° C (day 5) and the total acidity, the pH was reduced (6.46 to 5.13). There was a 31% reduction of the phenolic compounds; 79% of total anthocyanins, 51% of flavan-3-ol and 39% antioxidant activity, despite loss of phenolic compounds during fermentation, the remaining concentration in seeds was sufficient to produce a considerable antioxidant activity. Is worth mentioning that the fermentation is the first stage made in manufacturing chocolate, in this step was identified spermidine, spermine, tyramine and tryptamine, stands out fact that the fermented seeds still need to undergo other technological processes such as drying and roasting, increase or decrease bioactive amines, increase or decrease in bioactive amines may occur, thus the conducting studies on how these compounds behave in along the beneficiation cocoa until reaching its numerous by-products, it is essential to ensure the presence of these compounds in levels safe for the consumer, because food security is a basic requirement that must always be satisfied in food production.

**Keywords:** Cocoa, fermentation, bioactive amines, polyphenolic compounds



## INTRODUÇÃO

Aminas bioativas estão presentes em diversos alimentos, seja de origem vegetal ou animal, sejam bebidas fermentadas, sendo que na maioria dos alimentos que contenham proteínas ou aminoácidos livres, pode ser esperada a formação de aminas biogênicas, onde a quantidade e o tipo de aminas formadas irão depender da natureza e origem do alimento, assim como dos microrganismos presentes (LANGE; WITTMANN, 2002; INNOCENTE et al., 2007). O perfil e os teores de aminas bioativas em um alimento irão depender do processo de produção, processamento, fermentação, armazenagem e condições de higiene que está sendo submetido (ASKAR; TREPTOW, 1986; BRINK et al., 1990; GLÓRIA, 2005).

As aminas bioativas exercem diversas funções importantes, dentre elas, as poliaminas atuam como fator de crescimento celular, antioxidantes e as aminas biogênicas são vasoativas ou neuroativas (SHALABY, 1996), por isso são associadas tanto à saúde como a algumas patologias, logo estudos voltados para sua formação ou degradação são de elevada importância. Se estiverem em concentrações elevadas, são indesejáveis em alimentos, pois, dependendo da quantidade ingerida podem causar efeitos adversos, como intoxicação por histamina, enxaqueca, disfunções respiratórias, palpitação, hiper ou hipotensão e uma série de desordens alérgicas, principalmente em pessoas mais sensíveis (LOUNVAUD-FUNEL, 2001).

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

Assim como as aminas, os compostos fenólicos, por sua vez, têm 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 (JACOB; BURRI, 1996; OSAKABE et al., 1998; REIN et al., 2000; SCHNORR et al., 2008, RUSCONI; CONTI, 2010).

Apesar da elevada importância econômica do cacau e do vasto conhecimento científico sobre o mesmo, até o presente momento, os relatos na literatura sobre o perfil e teores de amins bioativas na fermentação das sementes de cacau são bastante escassos. Enquanto que o número de estudos sobre os compostos fenólicos presentes no cacau tem aumentado consideravelmente cada vez mais, principalmente relacionando-os aos benefícios à saúde humana, devido a isto é importante saber como o processamento afeta tanto os compostos fenólicos do cacau como as amins bioativas.

A realização da modelagem de um processo fermentativo permite uma discussão sobre as hipóteses que visam à elucidação das tendências gerais do sistema estudado e permite fazer comparações quantitativas, fornecendo uma ideia geral do comportamento do sistema estudado (LABUZA; RIBOH, 1982; CUNHA-SANTINO, 2003).

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a influência da fermentação de sementes de cacau nas modificações químicas, atividade antioxidante, perfil e os teores das amins bioativas, assim como avaliar o comportamento das modificações químicas e atividade antioxidante através de modelos cinéticos, sendo que a fermentação foi realizada por 7 (sete) dias.

Os objetivos específicos foram: (i) Monitorar o processo fermentativo das sementes de cacau e avaliar o comportamento cinético das variações de temperatura da massa, umidade, pH e acidez total titulável durante a fermentação das sementes de cacau; (ii) Avaliar a degradação dos compostos polifenólicos totais durante a fermentação; (iii) Avaliar os principais parâmetros de quantificação da atividade antioxidante durante a fermentação; (iv) Determinar o comportamento cinético das variações dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante durante o período de fermentação das sementes de cacau da Amazônia; (v) Identificar as possíveis amins presentes em sementes fermentadas de cacau e determinar o perfil e os teores de amins bioativas ao longo de sete (7) dias de fermentação.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. BENEFICIAMENTO DO CACAU

Em termos econômicos, as sementes do cacau destacam-se como principal produto do fruto (*Theobroma cacao* L.) e representam cerca de 10% do seu peso. Após seu beneficiamento originam diversos produtos semimanufaturados, como por exemplo, a massa (*liquor*), a manteiga de cacau e produtos manufaturados, como os chocolates, aromas naturais e extratos com fins farmacêuticos, sendo que sua maior aplicação está na fabricação do chocolate (DRUMMOND, 1998; LECUMBERRI et al., 2007).

A qualidade do chocolate está atrelada não apenas a fatores genéticos e ambientais, mas também à forma como o mesmo é beneficiado, ou seja, desde a abertura do fruto até o seu processamento industrial. As características sensoriais do chocolate são influenciadas pelas técnicas de pré-processamento, onde o desenvolvimento potencial dessa característica depende principalmente dos processos de fermentação e secagem (ROHAN, CONNELL, 1964; SCHWAN; WHEALS, 2004; AFOAKWA et al., 2008).

A produção de chocolate pode ser dividida em duas grandes fases, o pré-processamento e o processamento:

- O pré-processamento do cacau abrange as seguintes etapas: colheita, abertura dos frutos, retiradas das sementes, extração da polpa ou do exudado, fermentação das sementes, secagem e armazenamento das amêndoas.
- O processamento inicia-se com a torração, que irão fornecer amêndoas torradas para a obtenção das principais matérias-primas liquor, manteiga e pó de cacau, e a fabricação do chocolate e produtos achocolatados

## 1.1. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU

O pré-processamento do cacau inicia-se com a seleção e abertura dos frutos para a remoção das sementes envolvidas pela polpa mucilaginosa logo após sua colheita, seguido das operações de fermentação, secagem e armazenagem (ROHAN; STEWART, 1967).

### 1.1.1. Colheita, seleção e quebra do fruto.

O desenvolvimento do fruto, desde a fecundação até a maturação, demora cerca de seis meses. Estudos realizados relataram que a maturidade do fruto é muito importante para assegurar uma fermentação adequada, pois amêndoas oriundas de frutos sobremaduros podem apresentar germinação, ocasionando risco de contaminação interna devido ruptura da casca fina. Sementes de frutos colhidos antes da maturidade plena irão conter uma polpa com reduzido teor de açúcares, onde os cotilédones terão forte adstringência e acidez elevada, logo não irá fermentar satisfatoriamente, apresentando um baixo rendimento (BRAUDEAU, 1969; LAJUS, 1982).

É importante que haja um período intermediário de espera entre a colheita e a fermentação, pois certos fenômenos bioquímicos ocorrem nesse período, como a liberação de açúcares contidos na polpa, os quais são indispensáveis à fermentação (BAREL, 1987; BECKETT, 1994; HASHIM, et al., 1998; CAMU et al., 2008). Alguns autores afirmam que o tempo de espera entre a colheita e a quebra do fruto se dá entre o quinto e sexto dia, assim irão se obter melhores resultados (BAREL, 1987; PORTILLO et al., 2005; ORTIZ DE BERTORELLI et al., 2009).

### 1.1.2. Fermentação das sementes

A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de boa qualidade. 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 (ROHAN; CONNELL,

1964; SCHWAN; WHEALS, 2004; VALLE, 2007; AFOAKWA et al., 2008). Segundo Minifie (1989), a fermentação e a secagem das sementes de cacau são de vital importância, sendo que nenhum outro processamento posterior é capaz de corrigir falhas nestas etapas.

A fermentação ajuda a separar a polpa mucilaginosa ao redor da semente e causa a morte do cotilédone (GÁLVEZ et al., 2006). Isso propicia mudanças bioquímicas dentro das sementes, o que contribui com a redução do amargor e adstringência e o desenvolvimento dos precursores do sabor (BAREL, 1997; GÁLVEZ et al., 2006).

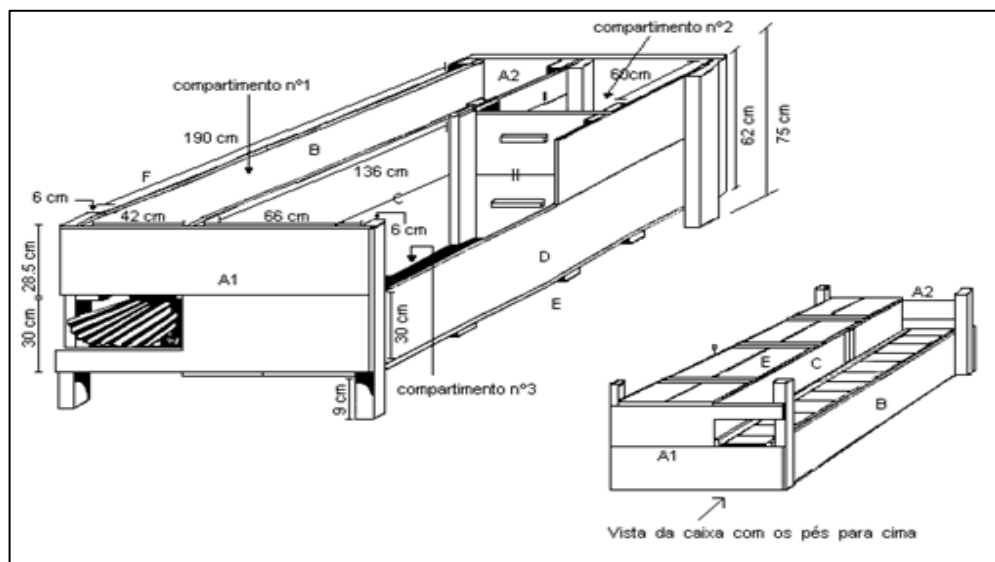
No processo de fermentação, considera-se como fatores importantes o sistema de fermentação (caixa, monte, cesto etc.), a temperatura ambiente e da massa, o pH e a acidez da polpa e do cotilédone, o tempo de processo, o revolvimento da massa bem como a microflora presente são fatores de grande importância (ROHAN; CONNEL, 1964; LOPEZ; QUESNEL, 1973; BISPO, 1999; LOPES, 2000; EFRAIM, 2004).

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. A fermentação em montes é usada principalmente em Gana, Nigéria e Costa do Marfim. As sementes são amontoadas no chão sobre folhas de bananeira e recobertas com o mesmo material. Para facilitar a drenagem do líquido exsudado (mel), formam-se montes sobre estrados de fibras vegetais, bambu ou madeira. O revolvimento da massa geralmente é feito no segundo e no quarto dia (ROHAN; CONNEL, 1964; BAKER et al., 1994)

No Brasil, a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) recomenda o uso de caixas de madeira, denominada de cochos de fermentação, eles são dotados de paredes divisórias removíveis facilitando 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 I.1). 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.



**Figura I.1.** Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por Grimaldi (1978).

O tempo recomendável de duração da fermentação está entre cinco e sete dias, não sendo recomendável menos que cinco e mais que sete dias (FERNÁNDEZ-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 (FREIRE et al., 1992; DIAS, 2001).

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. Alguns estudos utilizaram culturas starters para auxiliar nesse processo fermentativo e obtiveram resultados satisfatórios (SAMAH et al., 1992; SCHWAN, 1998; LEAL et al., 2008), porém esta técnica não foi amplamente implementada no campo (LEFEBER et al., 2011), pois a maioria das fermentações são conduzidas em caixas de madeira ou sobre folhas de bananeira, que facilita a contaminação por microbiota natural existentes na superfície desta folha (microbiota selvagem) (LOPES et al., 2003).

A massa de sementes deve sofrer revolvimentos ao longo 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 (SCHWAN et al., 1996). Ceplac (1980) e Lajus (1982) indicam períodos de 24, 48, 96, 120 e 144 horas, porém de acordo com Dias (1987), os tempos seriam 48, 72, 96, 120 e 144 horas após o início do processo.

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). Logo após, o processo de fermentação, inicia-se a secagem, que além de eliminar 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 (LUNA et al., 2002; COUNET; COLLIN, 2003). A secagem é também responsável pela redução da acidez das amêndoas (CUNHA; SERÔDIO, 1991; GARCÍA-ALAMILLA, 2007). A taxa de umidade das amêndoas deve ser reduzida de 40-50% para 6-8% (ROHAN; STEWART, 1967; LOPEZ; QUESNEL, 1973; FAGUNWA et al., 2009).

## **2. BIOQUIMICA DA FERMENTAÇÃO**

A fermentação do cacau é um processo complexo que consiste em uma série de atividades microbianas bem definidas que são inicialmente dominadas por leveduras e, posteriormente, por bactérias lácticas, onde estas espécies, após 48 h de fermentação, reduzem sua atividade e são substituídas por bactérias acéticas. Várias espécies de *Bacillus*, outras bactérias e fungos filamentosos também podem crescer ao longo da fermentação (ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004; GARCIA-ARMISEN et al., 2010; LIMA et al., 2011).

Estas atividades microbianas geram metabólitos e condições que propiciam a morte da semente desencadeando assim uma série de reações bioquímicas e alterações químicas dentro dela, sendo essenciais para o desenvolvimento do sabor, aroma e cor do chocolate (PEREIRA et al., 2012).

Há duas fases definidas e distintas de reações que ocorrem no interior do cotilédone durante a fermentação (FORSYTH; QUESNEL, 1957, EFRAIM, 2004):

- **Fase I (Hidrólise Anaeróbica):** Inicia-se no momento em que os frutos são partidos e pode durar até 48 horas. No primeiro dia, a polpa aderida começa a se tornar líquida, sendo então drenada, e a temperatura aumenta gradativamente. Nestas condições anaeróbicas, microrganismos produzem álcool etílico, e em seguida, ácido acético, sendo esses responsáveis conjuntamente pela morte do gérmen com conseqüente perda da capacidade de germinação. É a partir deste momento que as sementes podem ser chamadas de amêndoas de cacau. Este processo contribui para modificações estruturais, como a remoção da compartimentalização celular das enzimas e de seus substratos (proteínas, compostos fenólicos, entre outros). Líquidos celulares se movem através das paredes, se espalhando por todo o grão de cacau. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50 °C. Nessa fase, há uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor da semente. A difusão dos ácidos para o interior do cotilédone contribui para reações enzimáticas, propiciando ainda proteção contra bactérias putrefativas, evitando prejuízos ao sabor devido à produção de ácidos graxos voláteis C3 à C5.
- **Fase II (Condensação Oxidativa):** Fase posterior à hidrólise anaeróbica e que freqüentemente se sobrepõe a esta. Ressalta-se a oxidação dos polifenóis que formam ou não complexos com as proteínas e peptídeos levando a redução da adstringência e do amargor. A oxidação observada nesta fase continua na etapa de secagem até que a umidade atinja um ponto mínimo no qual cessa a atividade da polifenoloxidase.

A polpa do fruto é rica em açúcares fermentáveis como a glicose, frutose e sacarose, e tem um baixo pH em torno de 3,0 - 3,5, principalmente devido a presença de ácido cítrico. Durante a fermentação a polpa do cacau sofre a ação de microrganismos presentes naturalmente no meio, estas condições selecionam o crescimento inicial de leveduras e bactérias do ácido láctico. Uma diversidade de leveduras tem sido reportada como colonizadores primários na fermentação do cacau, sendo *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* e *Pichia* os gêneros predominantes (BOEKHOUT; ROBERTS, 2003; MOREIRA et al., 2013).



As bactérias lácticas consomem glicose e ácido cítrico, provenientes da polpa de cacau para a produção de ácido láctico (THOMPSON et al., 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004;). Lagunes-Gálvez et al. (2007) relataram que o maior teor de ácido láctico foi encontrado no 5º dia de fermentação. A presença de ácido láctico não é favorável para a qualidade do cacau, pois o teor de ácido láctico gerado durante a fermentação permanece no chocolate mesmo após seu processamento, obtendo um chocolate com sabor indesejável (THOMPSON et al., 2001).

Bactérias acéticas (*Acetobacter* e *Gluconobacter* spp.) crescem, oxidando o etanol, inicialmente produzido pelas leveduras, para ácido acético. *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter senegalensis*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter fabarum*, *Gluconobacter oxydans*, e *Gluconobacter xylinus* foram as principais espécies de bactérias do ácido acético isoladas durante fermentações de cacau no Brasil e nos estudos de Camu et al. (2007), Papalexandratou et al. (2011) e Pereira et al. (2013).

Durante a fermentação, o ácido acético é difundido para o interior das sementes, o que provoca uma diminuição do pH de 6,5 a 4,5 (THOMPSON et al., 2001). Se as sementes de cacau têm um pH alto (5,5 - 5,8) após a fermentação, eles são considerados pouco fermentados, enquanto que sementes de cacau com menor pH (4,75 - 5,19) são considerados bem fermentados (AFOAKWA et al., 2008).

Diferentes compostos voláteis e não-voláteis, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos, pirazinas e açúcares são produzidos como consequência da atividade microbiana durante a fermentação do cacau (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011).

Além dos açúcares redutores, os peptídeos e aminoácidos livres hidrofóbicos são os precursores específicos do sabor de chocolate (VOIGT; BIEHL; HEINRICH, 1993; KRATZER et al., 2009; NOOR-SOFFALINA et al., 2009). 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 (MOHR et al., 1976; BRITO 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) (KIRCHHOFF et al., 1989; HASHIM et al., 1998; YUSEP et al., 2002). 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 (OTHMAN et al., 1992; PINTO; CHICHESTER, 1996). 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 (ROHAN; CONNEL, 1964; MOHR et al., 1976; KIRCHHOFF et al., 1989; HASHIM et al., 1998; YUSEP et al., 2002).

O acúmulo desses aminoácidos durante a fermentação está ligado à 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 (VOIGT; BIEHL; HEINRICHS, 1993; BRITO; AMANCIO; GARCIA, 2004).

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) (KOEHLER et al., 1969; SILWAR, 1988; MAGA, 1992; MISNAWI et al., 2004). Esses compostos também são produzidos durante a fermentação, sendo detectadas em altas concentrações em alguns alimentos fermentados (BESSON et al., 1997; MISNAWI et al., 2004; BELITZ et al., 2009).

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

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. COMPOSTOS FENÓLICOS

#### 3.1. Aspectos gerais

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 (NYCHAS, 1995). A diversidade estrutural dos compostos fenólicos se deve 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 I.1 (HARBORNE, 1989; ANGELO; JORGE, 2007).

Dentre os fenólicos destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, as proantocianidinas e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (SHAHIDI; NACZK, 1995; KING; YOUNG, 1999). 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 I.1.** Classe de compostos fenólicos em plantas.

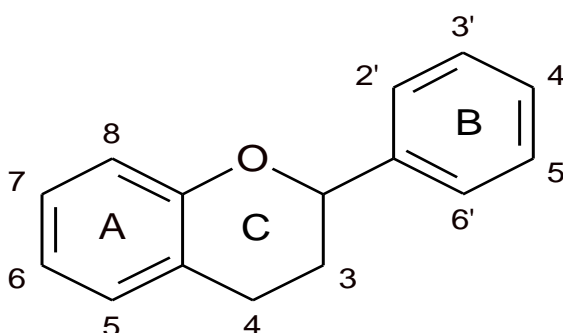
<b>Classe</b>	<b>Estrutura</b>
<b>Fenólicos simples, benzoquinonas</b>	$C_6$
<b>Ácidos hidroxibenzóicos</b>	$C_6-C_1$
<b>Acetofenol, ácidos fenilacéticos</b>	$C_6-C_2$
<b>Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides</b>	$C_6-C_3$
<b>Nafitoquinonas</b>	$C_6-C_4$
<b>Xantonas</b>	$C_6-C_1-C_6$
<b>Estilbenos, antraquinonas</b>	$C_6-C_2-C_6$
<b>Flavonóides, isoflavonóides</b>	$C_6-C_3-C_6$
<b>Lignanas, neolignanas</b>	$(C_6-C_3)_2$
<b>Biflavonóides</b>	$(C_6-C_3-C_6)_2$
<b>Ligninas</b>	$(C_6-C_3)_n$
<b>Proantocianidinas</b>	$(C_6-C_3-C_6)_n$

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

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

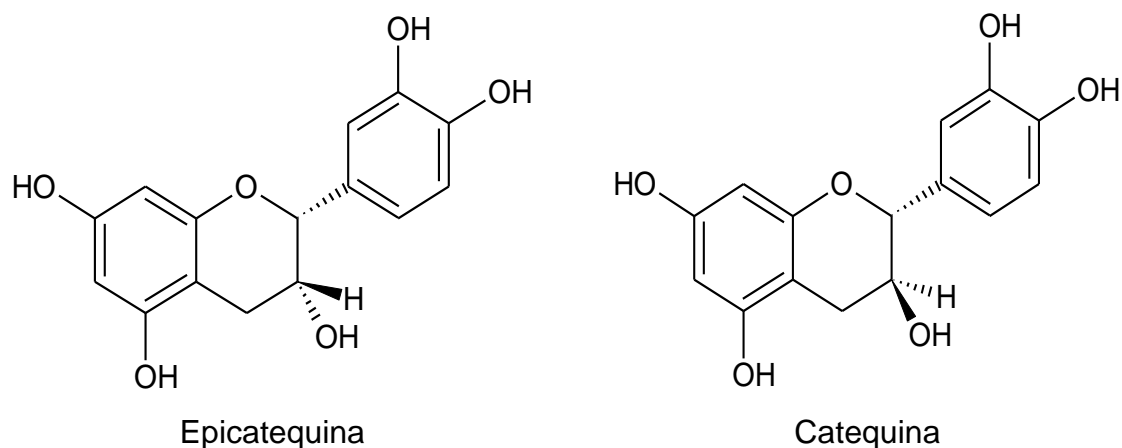
resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, formado a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostas em *meta* (BRUNETON, 1991; CARVALHO et al., 2001; ALMEIDA, 2007).

Dos polifenóis vistos na Tabela 1, o foco dos estudos neste trabalho foram os flavonóides, presentes em elevadas quantidades no cacau. Os polifenóis podem ser divididos em, pelo menos, 10 diferentes classes, dependendo da sua estrutura básica. Onde os flavonóides representam a maior classe de compostos fenólicos e apresentam uma estrutura em comum de difenilpropano –C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (PIETTA, 1999 ; FINE, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002), como pode ser observado na Figura I.2. São divididos em sete famílias em função do grau de oxidação da cadeia de três carbonos. As mais importantes são as flavonas, flavonols, as flavanonas, as antocianinas e os flavanols (Tabela I.2)



**Figura I.2.** Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides

A classe que será foco do estudo é a classe dos flavanols, encontrada em grandes quantidades em sementes de cacau na forma de catequina e epicatequina (Figura I.3), podendo juntas representar até 37% do total de compostos fenólicos presentes na mesma (BONVEHÍ; COLL, 1997; WOLLGAST; ANKLAN, 2000; HATANO et al., 2002; ZHU et al., 2002).



**Figura I.3.** Estrutura da (-)-epicatequina e (+)-catequina.

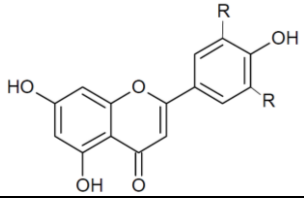
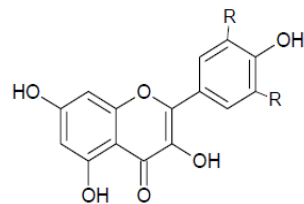
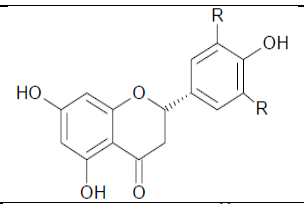
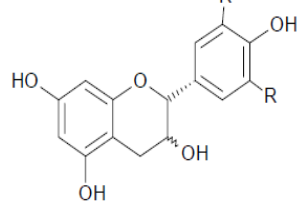
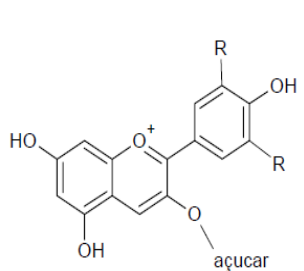
Além da catequina e epicatequina, as antocianinas e as proantocianidinas estão presentes em grandes quantidades no cacau, chegando a cerca de 4 e 58% do total de compostos fenólicos da semente, respectivamente (WOLLGAST; ANKLAN, 2000; ROSS; KASSUM, 2002).

Os flavanols são comumente associados aos benefícios para a saúde cardiovascular, que incluem menores taxas de mortalidade por acidente vascular cerebral e ataque cardíaco, melhora a função endotelial vascular, reduz a pressão sanguínea e aumenta os níveis de colesterol HDL (HOOPER et al., 2012; REID et al., 2012).

Flavanols, tais como catequina ou quercetina podem capturar diretamente espécies reativas de oxigênio, como  $O_2$ ,  $H_2O_2$  (BINSACK et al., 2001) ou HClO. Quercetina e miricetina, seguido por campferol, são os flavonóides com maior atividade de neutralização dos radicais livres (COTELLE et al., 1996).

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).

**Tabela I.2.** Principais grupos de flavonóides e fontes alimentícias

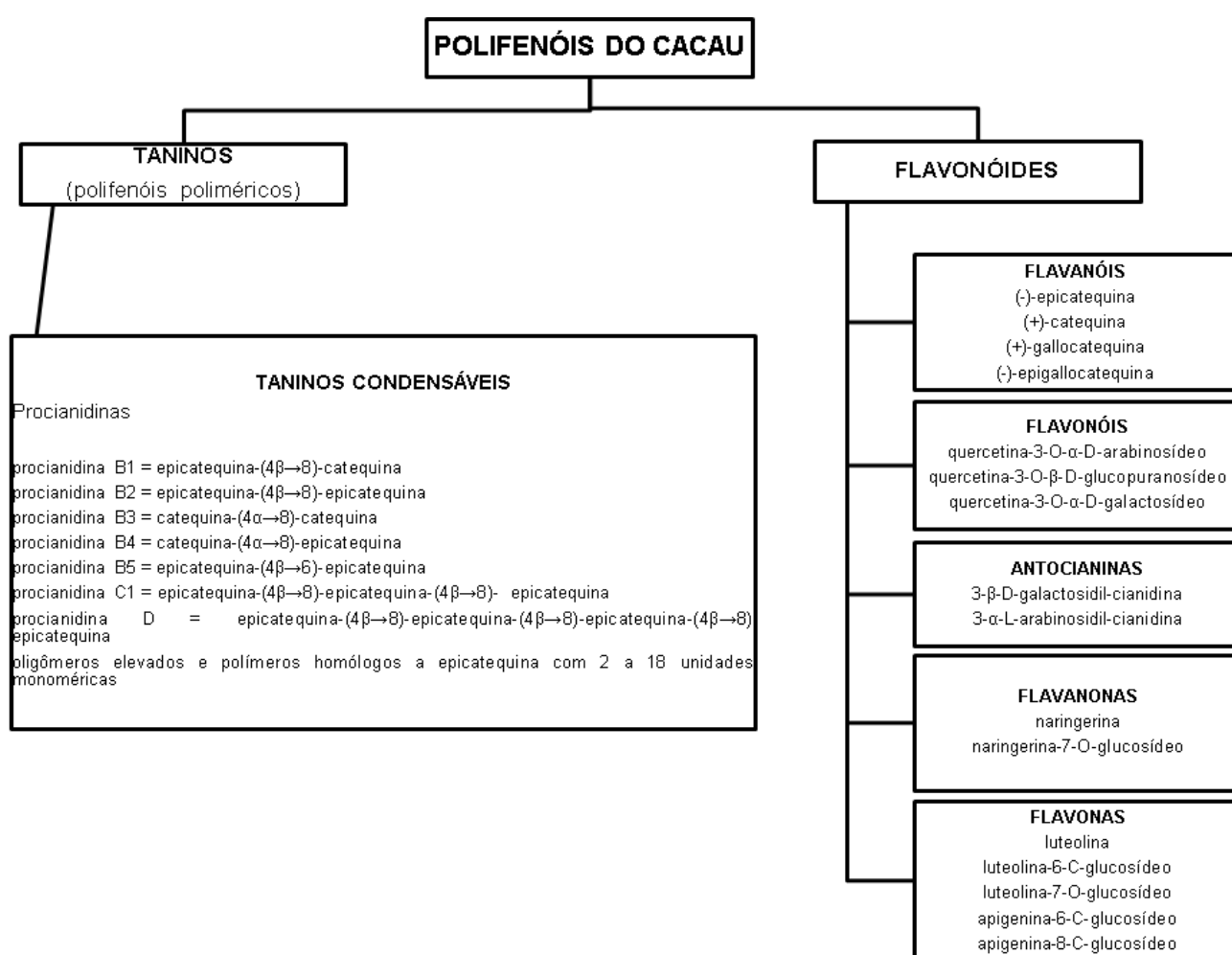
Grupo	Estrutura química	Exemplo de composto	Fonte
Flavona		Apigenina	Casca de maçã, aipo,
		Luteolína	Morango, pimenta
		Tricetina	Brócolis
Flavonol		Campferol	Aipo, maçã, ameixa, pêra, pêssego
		Miricetina	Cascas de frutas, vinho tinto
		Rutina	Uvas, chá, cebola
		Quercetina	Alface, azeitonas, cebola
Flavanona		Hesperidina	Frutos cítricos
		Narigina	Casca de cítricos
Flavanol		Epicatequina	Vinho tinto, maçã
		Catequina	Chá, vinho, maçã, chocolate
		Galocatequina	Chá
Antocianina		Cianidina	Amora, açaí
		Delfinidina	Cerejas
		Malvidina	Uvas
		Perlagonidina	Framboesa
		Peonidina	Vinho tinto
		Petunidina	Chá, morango, cascas de frutas com pigmentos escuros

Fonte: Adaptado de Rice-Evans, Millar e Paganga, (1996); Rogez (2000); Nijveldt et al. (2001), Pennington (2002).

### 3.2. Compostos Fenólicos Presentes no Cacau

Os polifenóis do cacau são armazenados nas células de pigmentos dos cotilédones das sementes. A quantidade total de polifenóis solúveis presentes em farinha desengordurada de sementes frescas de cacau corresponde de 15 a 20%. Em sementes fermentadas, esse valor cai para 5% (KEALEY et al., 1998; BRITO, 2000).

Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau são listados na Figura I. 4, estando dentro das classes dos taninos e dos flavonóides.



**Figura I.4.** Principais polifenóis encontrados nas sementes de cacau.

Fonte: PORTER; MA; CHEN (1991); SANBONGI et al. (1998); SANCHEZ-RABANEDA et al. (2003); COUNET et al. (2006).

As sementes do cacau também contêm uma série complexa de procianidinas, formadas a partir da condensação de unidades individuais de catequinas ou epicatequinas, chamados monômeros; por isso, são também conhecidas como taninos condensados. Procianidinas, flavan-3-ols, também desempenham um papel importante em produtos derivados do cacau, uma vez que contribuem para o seu sabor e aceitabilidade, pois ambos afetam tanto o amargor como a adstringência (KOMES et al., 2012; SUN-WATERHOUSE; WADHWA, 2012). Por serem moléculas altamente hidroxiladas, podem formar compostos insolúveis ao se complexarem com carboidratos e proteínas. Durante a degustação de alimentos com alto teor destes compostos, pode ocorrer a complexação das procianidinas com proteínas da saliva, o que confere a sensação de adstringência (WOLLGAST; ANKLAN, 2000).

Produtos de cacau e de chocolate são, de fato, ricos em polifenóis flavan-3-ol, também conhecidos como flavonóis, que possuem atividade antioxidante e foram relatados que exercem um efeito protetor contra doenças cardiovasculares, câncer e processos inflamatórios no corpo humano (SERAFINI et al., 2003; ENGLER et al., 2004; HEISS et al., 2005; JOURDAIN et al., 2006; COOPER et al., 2008; CORTI et al., 2009). O cacau é conhecido por conter níveis elevados de flavan-3-óis (flavonóides) que ocorrem tanto quanto monômeros de catequina e epicatequina como flavonol polimerizadas ou procianidinas (KIM; KEENEY, 1984; PORTER; MA; CHANG; 1991; HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; PAYNE et al., 2010)

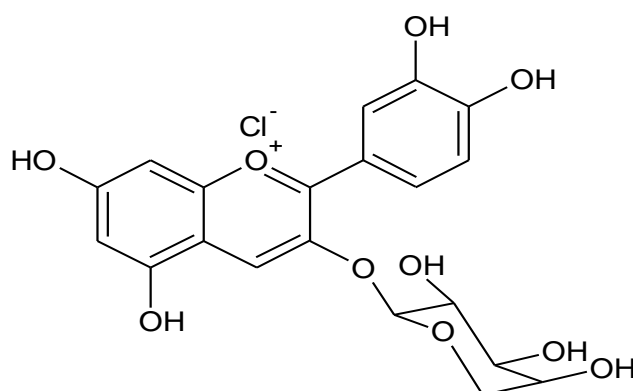
Em sementes frescas de cacau os compostos fenólicos representam 15 a 20% do peso da semente fresca (seca e desengordurada), podendo chegar a valores de 120 a 180 g/Kg. Já em amêndoas fermentadas, secas e desengorduradas, com cerca de 6% de umidade, valores de fenólicos totais próximos a 11% são indicativos 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 (vacúolos). Dependendo da quantidade de antocianinas nas as células de pigmento, em polifenóis são brancas ou purpuras. (DREOSTI, 2000; WOLLGAST; ANKLAN, 2000).



### 3.3. 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. Como produtos da hidrólise da antocianina obtêm-se um açúcar e uma antocianidina (aglicona). As antocianinas representam um significativo papel na prevenção ou retardamento do aparecimento de várias doenças por suas propriedades antioxidantes (MARTÍNEZ-FLÓREZ, 2002; KUSKOSKI et al., 2004).

Hansen, Del-Olmo e Burri (1998) atribuem a hidrólise das antocianinas pelas enzimas  $\beta$ -galactosidase e pela  $\alpha$ -arabinosidase, que apresentam pronunciada estabilidade no decorrer da etapa de fermentação. As sementes de cacau in natura contêm pigmentos antociânicos roxos, 3- $\beta$ -D-galactosidil-cianidina e 3- $\alpha$ -L-arabinosidil-cianidina. Durante fermentação, estes pigmentos são hidrolisados por glicosidases, resultando num branqueamento dos cotilédones (FORSYTH; QUESNEL, 1957). Segundo Niemenak et al. (2006), a antocianina majoritária da semente de cacau é 3- $\alpha$ -L-arabinosidil-cianidina (Figura I.5).



**Figura I.5.** Antocianina majoritária da semente de cacau (3- $\alpha$ -L-arabinosidil-cianidina).

A estabilidade das antocianinas ao descoramento 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, aminoácidos, taninos, dentre alguns outros, também conferem aumento na estabilidade da molécula. (GALVANO et al., 2004; MARÇO; POPPI, 2008).

Durante o processo de fermentação, as antocianinas são hidrolisadas a antocianidinas. Os compostos polimerizam com catequinas simples para formar proantocianidinas. As antocianinas geralmente desaparecem rapidamente durante o processo de fermentação (perda de 93% após 4 dias). Assim, o teor de antocianinas pode ser considerado um bom índice para determinação do grau de fermentação das amêndoas de cacau (LANGE; FINCKE, 1970; PETTIPHER, 1986; SHAHIDI; NACZK, 1995).

#### 3.4. Fatores Relacionados à Redução dos Fenólicos Durante o Beneficiamento do Cacau

Durante as etapas do beneficiamento são gerados não apenas os precursores do sabor característico dos produtos de cacau, como também compostos que não mais sofrerão modificações e que contribuirão para esse sabor. Os compostos fenólicos têm sido estudados há várias décadas devido à influência negativa que exercem no sabor, conferindo o amargor e a adstringência verificados em produtos com elevados teores desses compostos (FORSYTH; QUESNEL, 1957; ROHAN; CONNELL, 1964; CROSS; VILLENEUVE; VINCENT, 1982; VILLENEUVE; CROSS; MACHEIX, 1985; SHAUGHNESSY, 1992; BRITO, 2000). Por outro lado, descobertas sobre os efeitos benéficos desses compostos à saúde humana têm provocado interesse em mantê-los durante o processamento dos produtos obtidos do cacau, sem prejuízo do sabor (KEALEY et al., 1998; EFRAIM, 2004; RIZO, 2006).

A quantidade total de polifenóis solúveis em sementes in natura desengorduradas e secas é de 15 a 20% (corresponde aproximadamente à 6% em da semente seca em ar, contendo 54% gordura e 6% de água), em sementes fermentadas aproximadamente 5% (mais de 10% é indicativo de uma má fermentação). Estes valores são válidos para sementes do cacau da variedade Forasteiro, a variedade Criollo tem aproximadamente 2/3 da quantidade de polifenóis, e as antocianinas, não foram encontradas (LANGE; FINCKE, 1970). Estudos realizados, de acordo com Zumbé (1998) e Brito (2000), mostram que as sementes de cacau não fermentadas possuem de 6 a 8 % de seu peso seco de compostos fenólicos.

Durante a fermentação das sementes, uma das primeiras etapas do processamento para obtenção de derivados de cacau, ocorre a morte do embrião ou gérmen. Com isso, os compostos fenólicos entram em contato com enzimas como a polifenoloxidase e glicosidases presentes nas sementes (FORSYTH; QUESNEL, 1957), sofrendo reações de oxidação, complexações com proteínas, formação de compostos denominados quinonas, que por sua vez sofrem condensação covalente com os grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras (CROSS; VILLENEUVE; VINCENT, 1982; BRITO, 2000). Dessa forma, durante a etapa de fermentação, o teor de compostos fenólicos diminui cerca de 70%, e o teor de epicatequina, composto fenólico do grupo dos flavanóis, diminui cerca de 90%.

Ao longo da fermentação, a combinação de atividades enzimáticas endógenas e exógenas juntamente com a difusão de metabólitos dentro e fora dos cotilédones, permite a polimerização dos polifenóis ocorrendo reações com outros compostos para formar complexos. Estas reações diminuem a solubilidade dos polifenóis, reduzindo assim a amargor e a adstringência, além de contribuir para a cor típica das sementes fermentadas. (HANSEN; DEL-OLMO; BURRI, 1998; LIMA et al., 2011).

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

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

Devido à ação da polifenoloxidase (PPO) enzima os polifenóis presentes são oxidados e grande parte formam polímeros de altos pesos moleculares chamados de polifenóis condensados (HANSEN; DEL-OLMO; BURRI, 1998; EFRAIM, 2010). Segundo Bonvehí e Coll (1997) 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).

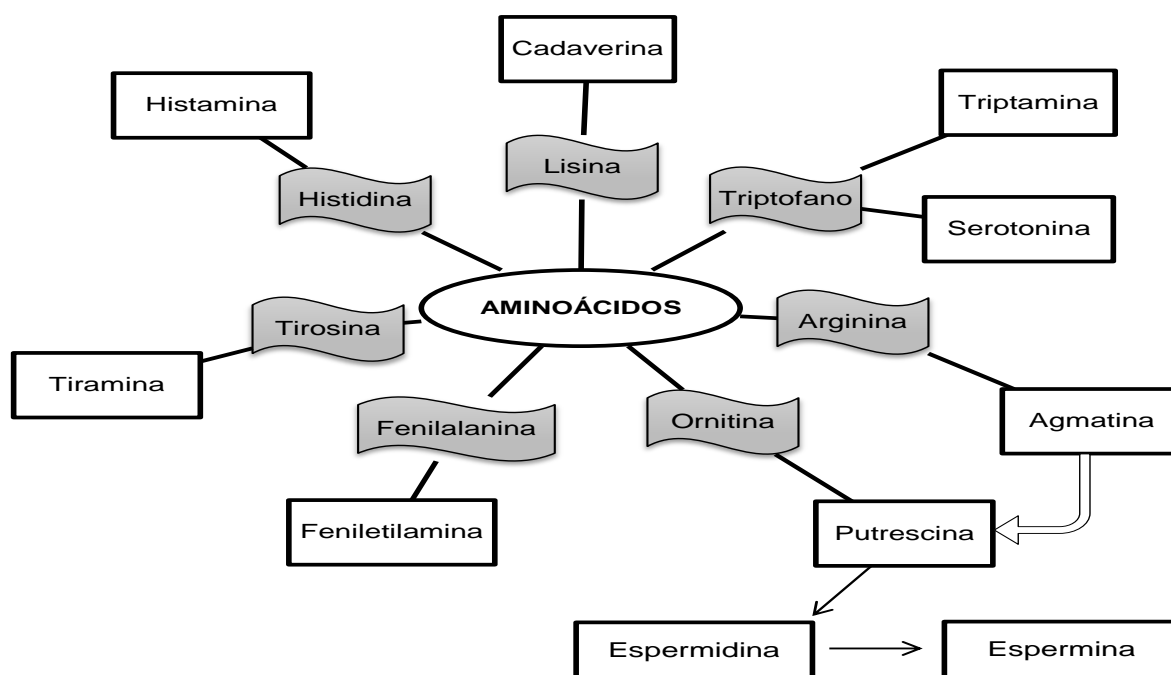
Uma baixa atividade da polifenoloxidase e da peroxidase, ou condições que podem levar a uma redução da atividade das mesmas, têm sido apontadas como fatores responsáveis pela cor violácea em amêndoas mal fermentadas. Ocasionalmente a oxidação enzimática é inibida pela falta de aeração na massa (REEVES et al., 1988; BRITO et al., 2001; EFRAIM, 2004).

## 4. AMINAS BIOATIVAS

### 4.1. Aspectos Gerais

As aminas bioativas podem ser definidas como compostos orgânicos nitrogenados, nos quais um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia são substituídos por grupos alquila ou arila. Podem ser alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas e possuem baixo peso molecular. Sua síntese é realizada através da descarboxilação dos aminoácidos ou por aaminação e transaminação de aldeídos e cetonas (SMITH, 1980-1981; BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994; SOUSADIAS; SMITH, 1995; SILLA-SANTOS, 1996; LIMA; GLÓRIA 1999; GLÓRIA, 2005).

Aminoácidos dão origem à denominação das aminas bioativas, ou seja, aminoácidos precursores, como histidina, tirosina, triptofano, originam respectivamente, histamina, tiramina, triptamina, como pode ser visualizado na Figura I.6. Cadaverina e a putrescina são encontradas em produtos em fase de decomposição ou putrefação, enquanto que a espermina e a espermidina foram isoladas pela primeira vez no fluido seminal, dando, assim, origem aos seus nomes (FLORES et al., 1989, LIMA; GLÓRIA, 1999; GLÓRIA 2005).



**Figura I.6.** Precursores de algumas aminas bioativas

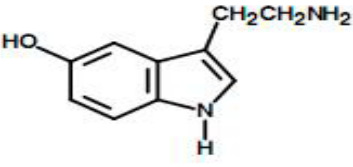
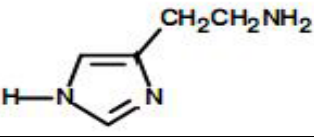
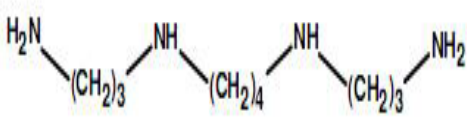
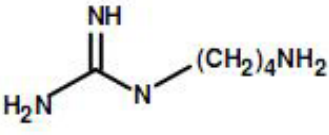
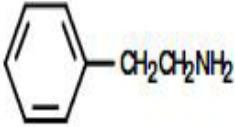
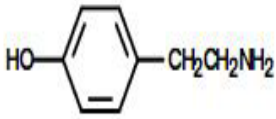
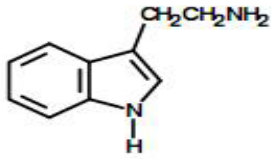
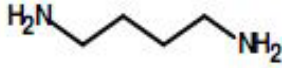

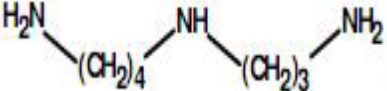
Fonte: ANCIN-AZPILICUETA et al. (2008).

As aminos bioativas podem ser classificadas em função do (a):

- **Número de grupamentos amina:** monoaminas (tiramina e feniletilamina), as diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e as poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996);
- **Estrutura química:** alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina e serotonina) (SILLA-SANTOS, 1996) e, em função do grupo químico como catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e como imidazolaminas (histamina) (BARDÓCZ, 1995);
- **Via Biosintética:** aminos naturais e aminos biogênicas. As aminos naturais (putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina) são formadas in situ nas células à medida que são requeridas e, estarão presentes quando estas forem transformadas em produtos alimentícios., já as aminos biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (LIMA; GLÓRIA, 1999; SANCHES-CASCADO, 2005; BOVER-CID et al., 2006);
- **Função que exercem:** baseado na função fisiológica, as aminos são classificadas em poliaminas e aminos biogênicas. As poliaminas são bases orgânicas alifáticas e hidrossolúveis, que, em pH fisiológico, atuam como polications. Pertencem ao grupo das poliaminas, a espermidina (EPD), a espermina (EPM) (BARDÓCZ, 1995) e a agmatina (AGM) (MOINARD et al., 2005). Por serem polications, as poliaminas estão envolvidas em diversas funções metabólicas e fisiológicas em animais, vegetais e microorganismos (HOET; NEMERY, 2000; GUGLIUCCI, 2004; GARCIA-FAROLDI et al., 2009). As aminos biogênicas são vasoativas e neuroativas (tiramina, histamina e serotonina) devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ, 1995).

Na Tabela I.3, estão representadas as estruturas químicas de algumas aminos bioativas.

**Tabela I.3.** Estrutura química de algumas aminos bioativas.

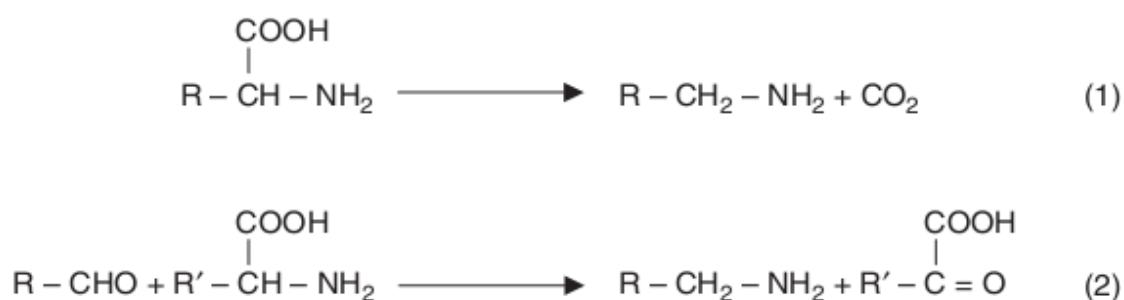
AMINAS BIOATIVAS	ESTRUTURA QUÍMICA
Serotonina	
Histamina	
Espermina	
Agmatina	
2-Feniletilamina	
Tiramina	
Triptamina	
Putrescina	
Cadaverina	
Espermidina	

Fonte: LIMA; GLÓRIA (1999).

## 4.2. Biossíntese

A síntese das aminas biogênicas histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina ocorrem através da descarboxilação do aminoácido precursor, no caso, histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina e lisina, respectivamente (HALÁSZ et al., 1994, GLÓRIA, 2005). Na síntese da serotonina, o triptofano é convertido pela triptofano-hidrolase em 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) em 5-hidroxitriptamina ou serotonina. A tirosina é precursora de aminas fenólicas como a octopamina e a dopamina (NAGATSU, 1991; GLÓRIA; VIEIRA, 2007).

A reação geral para a descarboxilação de aminoácidos e a aminação de aldeídos para a síntese de aminas está representada na Figura 7. A descarboxilação de aminoácidos pode ser resultado de altas temperaturas ou da ação de enzimas microbianas. Microrganismos descarboxilase-positivos podem constituir parte da população microbiana normal ou serem provenientes de contaminação antes, durante ou depois do processamento. (GLÓRIA; VIEIRA, 2007).



**Figura I.7.** Formação das aminas pela descarboxilação (1) e pela aminação de aldeídos (2)

Fonte: GLÓRIA (2005).

Pré-requisitos para formação das aminas nos alimentos são a disponibilidade de aminoácidos livres, que podem ocorrer naturalmente em alimentos, mas também são liberados de proteínas, como resultado da atividade proteolítica ou degradação térmica; elevadas temperaturas de processamento ou a presença de microrganismos descarboxilases-positivos, que podem constituir parte da população microbiana normal ou serem provenientes da contaminação antes, durante ou depois do processamento (MAGA, 1978; HALÁSZ, 1994; GLÓRIA, 2005; GLÓRIA; VIEIRA, 2007).

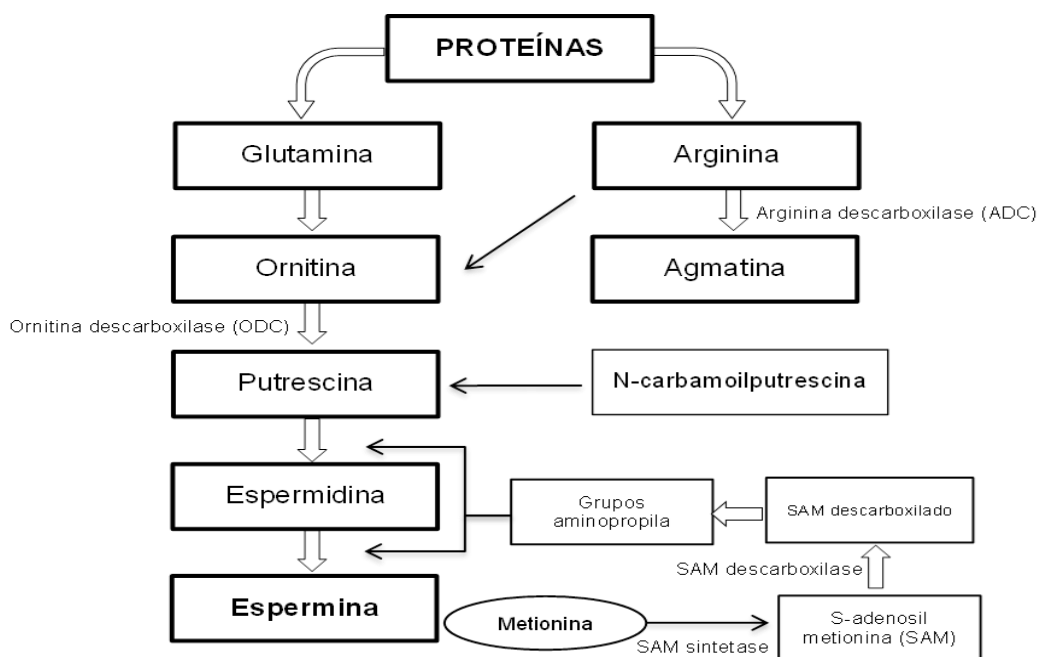


As poliaminas são formadas a partir da descarboxilação de ornitina e da arginina pelas respectivas enzimas, ornitina descarboxilase (ODC) e arginina descarboxilase (ADC) (MEDINA et al., 2003). Existem várias vias biossintéticas responsáveis pela produção de poliaminas, onde os aminoácidos ornitina e arginina são os precursores destas. A putrescina é considerada um intermediário obrigatório na síntese de poliaminas e sua via de formação pode ser diferente entre os organismos vivos.

Em animais e fungos a principal via é pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), promovendo a descarboxilação da ornitina e, conseqüentemente, formação da putrescina (PUT). Já em plantas e microorganismos, a arginina descarboxilase (ADC) é a principal enzima responsável por promover a descarboxilação de arginina e conseqüente formação de agmatina, esta será convertida em N-carbamoilputrescina e, posteriormente, em PUT, pela enzima agmatina urea-hidrolase (agmatinase). (SMITH, 1984; FLORES et al., 1989; BARDÓCZ, 1995; WALTERS, 2003; HILLARY; PEGG, 2003).

Para que ocorra a conversão de putrescina em espermidina e esta em espermina uma série de reações envolvendo transferases, descarboxilases e sintetases acontecem paralelamente. A metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM) e, pela ação da S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), forma a S-adenosil metionina descarboxilada, usada como doadora de aminopropila para a formação de espermidina catalisada pela espermidina sintase, formando assim a espermidina. De modo semelhante, ocorre a formação da espermina, pela ação da espermina sintase, a partir da espermidina e do SAM como doador de grupo aminopropila (SMITH, 1984; FLORES et al., 1989; WALTERS, 2003; GLÓRIA, 2005).

Na Figura I.8, de forma resumida estão as vias biosintéticas para aminas bioativas.



**Figura I.8.** Biossíntese de aminas bioativas em vegetais.

Fonte: CHITARRA; CHITARRA (2005).

### 4.3. Importância Fisiológica

As aminas bioativas participam de importantes processos fisiológicos e metabólicos nos organismos de animais e plantas. Aceleram o processo metabólico, promovem a conversão enzimática; atuam como hormônios ou fatores de crescimento e são biomoduladores (SMITH, 1980-1981; NAGATSU, 1991; STRATTON et al., 1991).

As aminas biogênicas são geralmente psicoativas, neuroativas ou vasoativas (vasodilatadoras e vasoconstritoras). Aminas psicoativas, tais como a histamina e serotonina afetam o sistema nervoso central. A histamina possui uma função biológica importante, pois atua como um mediador primário dos sintomas imediatos percebidos em respostas alérgicas (SILLA-SANTOS, 1996); aminas vasoativas agem diretamente ou indiretamente no sistema vascular; aminas vasoconstritoras como a tiramina, triptamina e feniletilamina causam um aumento na pressão sanguínea devido à constrição do sistema cardiovascular, aumentando o ritmo cardíaco (GLÓRIA, 2005).

Além de seu papel biológico como fonte de nitrogênio e serem precursores na síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucléicos e proteínas, as aminas são importante componentes do aroma de alimentos e precursores potenciais de compostos N-nitroso (SILLA-SANTOS, 1996).

As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são essenciais ao crescimento e metabolismo celular, sendo rapidamente requeridas em tecidos em crescimento (BARDÓCZ et al., 1993; SOUSADIAS; SMITH, 1995), interagem eletrostaticamente com várias macromoléculas, especialmente DNA, RNA e proteínas estando envolvidas no estímulo e regulação de suas sínteses, proliferação e crescimento celular; interagem com componentes da membrana celular carregados negativamente, tais como fosfolípidios, sendo importantes na permeabilidade e estabilidade da membrana; devidos a estes fatores estudos constataram que as poliaminas agiam como promotoras de crescimento em concentrações não tóxicas (DROLET et al., 1986; BARDOCZ, 1995; SILLAS-SANTOS, 1996; JEEVANANDAM et al., 1997; LÖSER, 2000).

Segundo SILLA-SANTOS (1996), as poliaminas espermina, espermidina e a diamina putrescina inibem a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados. Este efeito antioxidante é correlacionado com o grupo  $NH_3^+$  presente na estrutura química das poliaminas. Drolet et al. (1986) e Bardócz (1995) afirmam que a espermina e a espermidina são eficientes estabilizadores de radicais livres in vitro. Desta forma, podem inibir a peroxidação lipídica e prevenir a senescência em vegetais, tendo efeitos também no aumento da firmeza, no retardamento das alterações na cor da fruta, na inibição da peroxidação lipídica e na diminuição nas taxas de emissão de etileno e respiração (PANDEY et al., 2000; VALERO et al., 2002).

As aminas serotonina, triptamina, histamina, agmatina e cadaverina estão presentes em frutas, e por isso acabam agindo como protetores contra possíveis predadores (BOUCHEREAU et al., 2000).

#### 4.4. Aspectos Tóxicológicos

As aminas são metabolizadas no organismo por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e poliaminoxidases (PAO) e, geralmente não representam qualquer perigo para a saúde dos indivíduos, entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das aminas é inibido, podem causar efeitos tóxicos (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005). Podem causar intoxicações quando há inibição das aminoxidases ou ocorrerem efeitos sinérgicos ou potencializadores ou se houver deficiência genética (HALÁSZ et al., 1994).

Aminas biogênicas em altas concentrações são indesejáveis em alimentos, pois conforme a quantidade ingerida podem causar dores de cabeça, disfunções respiratórias, palpitação, hiper ou hipotensão e uma série de desordens alérgicas (Tabela I.4) (LOUNVAND-FUNEL, 2001).

**Tabela I.4.** Efeitos farmacológicos de algumas aminas

<b>Amina</b>	<b>Efeitos Farmacológicos</b>
Histamina	Libera adrenalina e noradrenalina Excita a musculatura lisa do útero, intestino e trato respiratório. Estimula neurônios sensores e motores Controla a secreção de ácido gástrico
Tiramina	Vasoconstrição periférica Aumenta o fluxo cardíaco Causa salivação e lacrimejamento Aumenta taxa respiratória Aumenta o nível de glicose sanguínea Libera noradrenalina do sistema nervoso simpático Causa enxaqueca
Putrescina e cadaverina	Hipotensão Braquicardia Paresia das extremidades Potencializa o efeito de outras aminas Espasmos mandibulares
$\beta$ -Feniletilamina	Libera noradrenalina do sistema nervoso simpático Aumenta a pressão sanguínea Causa enxaqueca
Triptamina	Aumenta a pressão sanguínea

Fonte: Shalaby (1996).

De acordo com Stratton et al. (1991) e Lima e Glória (1999), o efeito de algumas aminas no organismo pode ainda ser potencializado pela presença concomitante de outras aminas, como putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermidina e espermina. Segundo Chu e Bjeldanes (1981), a putrescina e a cadaverina podem potencializar a toxicidade da histamina por inibir as enzimas DAO e histaminametil-transferase (HMT), aumentando assim seu transporte através da parede gastrintestinal. A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida sozinha (TAYLOR, 1986; SOARES; GLÓRIA, 1994; LIMA; GLÓRIA, 1999). O efeito tóxico da histamina também pode ser potencializado também pela presença de etanol (RADLER; FATH, 1991).

A histamina é a principal amina envolvida em intoxicações alimentares, em segundo está a tiramina, onde em concentrações elevadas pode causar dor de cabeça, enxaqueca, hemorragia intracraniana, febre, vômito, transpiração e aumento da pressão sanguínea (LIMA; GLÓRIA, 1999).

O elevado teor de serotonina nos alimentos pode causar o aparecimento de transtornos intestinais, fibrose do miocárdio e enxaqueca (LIMA; GLÓRIA, 1999). A espermina possui toxicidade renal, e influi na coagulação e pressão sanguínea, na pulsação e na respiração (FUZIKAWA et al., 1999; LIMA; GLÓRIA, 1999).

A diamina putrescina e as poliaminas espermina e espermidina podem acelerar o crescimento de tumores. A putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina podem também reagir com nitrito, sob condições ácidas, formando nitrosaminas heterocíclicas, nitrosopirrolidina e nitrosopiperidina (SILLAS-SANTOS, 1996). Sabe-se que as nitrosaminas são compostos cancerígenos, logo é importante prevenir o acúmulo de aminas capazes de produzir nitrosaminas em alimentos (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA; IZQUIERDO-PULIDO, 1999; LIMA; GLÓRIA, 1999).

A determinação da dose tóxica das aminas é difícil de ser estabelecida, pois depende das características individuais e da presença de outras aminas. Diferentes doses tóxicas vêm sendo sugeridas na literatura para a histamina. De acordo com LIMA e GLÓRIA (1999), concentrações de 5 a 10 mg/100 g de alimento podem causar sintomas em indivíduos mais sensíveis e consideram doses acima de 100 mg/100 g com toxicidade elevada.

Putrescina, espermina, espermidina, e cadaverina não possuem efeitos adversos, mas podem potencializar o efeito da histamina e tiramina, pois competem com as enzimas detoxificantes. Além de poder reagir com nitrito, formando N-nitrosaminas carcinogênicas, e serem utilizadas como parâmetros de deterioração. As aminas putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO, aumentando o seu transporte através da parede gastrointestinal. (TAYLOR, 1986; SHALABY, 1996; MORET et al., 2005).

A dose tóxica da tiramina é de 10 a 80 mg/100 g de alimento. Entretanto, a ingestão de alimentos contendo 6 mg de tiramina pode causar enxaqueca e de 10 a 25 mg pode provocar crise hipertensiva e hemorragia intracraniano em indivíduos em tratamento com inibidores da MAO (HALÁSZ et al., 1994; LIMA; GLÓRIA, 1999).

#### 4.5. Aminas Bioativas nos alimentos

Aminas bioativas estão presentes em frutas e vegetais, carne e produtos cárneos, leite e produtos lácteos, peixe e bebidas fermentadas, sendo que na maioria dos alimentos que contenham proteínas ou aminoácidos livres, pode ser esperada a formação de aminas biogênicas, onde a quantidade e o tipo de aminas formadas dependem da natureza e origem do alimento, assim como microrganismos presentes (LANGE; WITTMANN, 2002, INNOCENTE et al., 2007). As aminas biogênicas podem estar presentes numa vasta gama de alimentos tais como, chocolate, queijo curado, vinho tinto, cerveja, peixes e produtos à base de peixe (VIDAL-CAROU et al., 2009; KALAČ et al., 2009). As possíveis mudanças que ocorrem nas aminas são provenientes do processo de produção, processamento, fermentação, armazenagem e condições de higiene (ASKAR; TREPTOW, 1986; BRINK et al, 1990; GLÓRIA, 2005).

As aminas em alimentos podem estar naturalmente presentes no produto, ou serem formadas por microrganismos adicionados (culturas iniciadoras) ou contaminantes, introduzidos devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitárias durante a fabricação de certos produtos. (HALÁSZ et al., 1994; KALAČ et al., 2002; GLÓRIA, 2005). Uma vantagem do uso de aminas como critério

de qualidade reside no fato destas serem termo-resistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico (LIMA; GLÓRIA, 1999).

Todos os alimentos que se originam de plantas ou animais contêm espermina, espermidina e putrescina, além destas, outras aminas também podem ocorrer naturalmente. Durante a fermentação ou deterioração, o teor de espermina pode diminuir, porque ele pode ser usado como fonte de nitrogênio para alguns microrganismos, mas também ocorre a formação e acumulação de diferentes tipos de aminas biogênicas (GLÓRIA, 2005).

A maioria dos dados sobre a concentração de aminas em produtos alimentares refere-se a aminas específicas, como histamina e tiramina em peixes, carnes, queijo, bebidas alcoólicas. Vale e Glória (1997) investigaram os níveis de aminas biogênicas em queijos brasileiros pela primeira vez; Silva e Glória (2002) determinaram o nível de aminas bioativas na carne de frango, González-Marco e Ancín-Azpilicueta (2006) observaram a evolução das aminas biogênicas durante o armazenamento de vinhos em garrafa, em diferentes temperaturas, Bandeira et al. (2012) estudaram os tipos e os níveis de aminas bioativas em diferentes produtos de milho, Guidi e Glória (2012) investigaram os níveis de aminas bioativas no molho de soja.

Independente do tipo de alimento, altos níveis de aminas biogênicas têm sido apontados em produtos resultantes da fermentação (embutidos fermentados, queijo e bebidas alcoólicas fermentadas). A produção de aminas biogênicas em alimentos é característica de uma série de microrganismos capazes de descarboxilar aminoácidos, como Enterobacterias, Pseudomonas spp, Micrococcus, Enterococcus e bactérias lácticas (LORET et al., 2005) e no processo fermentativo, essa produção é facilitada, pois na maioria das vezes oferece substrato (aminoácidos livres) e condições favoráveis para a sua formação (ROMERO et al., 2003).

As decarboxilases são enzimas que estão presentes em muitos microorganismos. Elas foram encontradas em espécies dos gêneros Bacillus (RODRIGUEZ- JEREZ et al., 1994a), Pseudomonas (TIECCO et al., 1986), Photobacterium (MORII et al., 1988; JØRGENSEN et al., 2000) bem como nos gêneros da família Enterobacteriaceae, tais como Citrobacter, Klebsiella, Escherichia, Proteus, Salmonella e Shigella (EDWARDS et al., 1987; BUTTURINI et al., 1995; ROIG-SAGUÉS et al., 1996; MARINO et al., 2000) e da Micrococcaceae,

como *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* (RODRIGUEZ-JEREZ et al., 1994b; MARTUSCELLI et al., 2000).

As atividades descarboxilases não estão distribuídas amplamente entre as bactérias, porém algumas bactérias ácido lácticas (LAB) são descritas como capazes de produzir enzimas descarboxilases, podendo-se destacar os gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (MAIJALA et al., 1993; EDWARDS, SANDINE, 1981; DE LLANO et al., 1998; BOVER-CID, HOLZAPFEL, 1999; LONVAUND-FUNEL, 2001). Em produtos em que ocorre o crescimento de bactérias lácticas, há quantidades consideráveis de putrescina, cadaverina, histamina e tiramina (BRINK et al. 1990), sendo que recentemente foram identificados por Linares et al (2010) genes produtores de aminas biogênicas em bactérias ácido lácticas.

Vários fatores podem influenciar a produção de aminas pelas bactérias, dentre eles estão: pH do meio, a temperatura, a tensão de oxigênio, a presença de coenzimas e vitaminas, a concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis. Com relação ao pH, é importante ressaltar que em meio ácido, pH 2,5 a 6,5 é a faixa de pH ótimo para ocorrência da descarboxilação de aminoácidos, a produção de aminas é estimulada como um mecanismo de proteção da bactéria (LIMA; GLÓRIA, 1999), devido ao fato de que altas concentrações do íon H<sup>+</sup> são prejudiciais ao microrganismo, fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases (VOIG; EITENMILLER, 1977; HUDSON-ARNOLD; DUANE-BROWN, 1978; HALÁSZ et al., 1994; SILLA-SANTOS, 1996).



#### 4.5.1. Aminas bioativas no cacau

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é considerado um fruto com grande expressão econômica no Brasil e no mundo e sua maior aplicação está no fato de suas amêndoas, mundialmente conhecidas, serem empregadas na fabricação de chocolate, mas para o chocolate adquirir sabor antes precisa ser beneficiado, ou seja, passar pelos processos de fermentação, secagem e torração, onde pode ocorrer a formação de aminas bioativas.

Jalon et al. em 1983, analisou tiramina no cacau e seus derivados. Em 1986, Coutts et al., verificou vários gêneros alimentícios identificou e avaliou o conteúdo e significância de aminas psicoativas e seus precursores, e foi observado que sementes de cacau contêm quantidades relativamente baixas de feniletilamina e tiramina, mas durante a fermentação, há um aumento nos níveis dessas aminas, enquanto que na torração, os níveis de feniletilamina aumentam substancialmente.

Estudos realizados recentemente informam que aminas como tiramina, serotonina, 2-feniletilamina e dopamina podem ser modificadas durante os processos tecnológicos do cacau e as suas condições de higiene (PASTORE et al., 2005). Pastore et al. (2005) e Herraiz (2000) detectaram baixos níveis de serotonina no chocolate. O conteúdo de serotonina no chocolate depende do tipo de chocolate e do tipo de cacau, chocolates amargos com mais de 60% de cacau é uma boa fonte de serotonina e concentrações de  $1,4 - 5 \mu\text{g.g}^{-1}$  tem sido reportados (GOIHL, 2006).

Apesar da elevada importância econômica do cacau e do vasto conhecimento científico sobre o mesmo, até o presente momento, os relatos na literatura sobre o perfil e teores de aminas bioativas na fermentação precisam ser mais investigados. A pesquisa sobre o tipo e a quantidade de aminas bioativas formadas na fermentação pode auxiliar na definição do tempo/sistema de fermentação para garantir a presença destes compostos em níveis seguros para o consumidor.

## 5. 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 ordem zero, primeira ou segunda. 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 (LABUZA; RIBOH, 1982; CUNHA-SANTINO, 2003).

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 I.5.

**Tabela I.5.** Importantes alterações nos alimentos que seguem cinéticas de ordem zero ou primeira ordem.

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

Fonte: TAOUKIS; LABUZA; SAGUY, 1997.

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).

Em uma reação de ordem zero, a taxa de alteração de uma variável 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 (para  $t=0$ ) ;  $C$  = 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; LABUZA; SAGUY, 1997).

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.

O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) é o tempo necessário para que a concentração da espécie considerada diminua para metade do seu valor inicial. Os tempos de meia-vida para as diferentes ordens de reação cinética podem ser encontrados utilizando as equações descritas na tabela I.6.

**Tabela I.6.** Tempos de meia-vida para as diferentes ordens de reação.

Ordem aparente da reação	Tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ )	Referência
0	$t_{1/2} = C_0/(2.k)$	TAOUKIS; LABUZA; SAGUY (1997)
1	$t_{1/2} = \ln 2/k$	TAOUKIS; LABUZA; SAGUY (1997)
2	$t_{1/2} = 1/(k.C_0)$	TAOUKIS; LABUZA; SAGUY (1997)

$C_0$  = Concentração inicial;  $k$  = constante de velocidade da reação de degradação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOAKWA; E.O. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.48, n.9, p.840-57, 2008.

ALMEIDA, A.A.P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. Universidade Federal de Minas Gerais. 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.151-183, 2009.

ANCIN-AZPILICUETA, M.; GONZALEZ-MARCO, A.; JIMENEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amine in wines. **Critical reviews Food Science Nutrition**, n. 48, p. 257-275, 2008.

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.

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.

ASKAR, A.; TREPTOW, H. Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. **Ulmer, Stuttgart**, 1986.

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

BAKER, D.M.; TOMLINS, K.I.; GAY, C. Survey of Ghanian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour. **Food Chemistry**, v. 51, p. 425–431, 1994.

BANDEIRA, C.M.; EVANGELISTA, W.P.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1355–1359, 2012.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.

BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D. S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food - implications for growth and health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 66-70, 1993.

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.

BAREL, M. La fermentation du cacao: le moyen de l'apprécier et de la maîtriser. **Revue des Industries Alimentaires et Agricoles**, v.14, p. 211–214, 1997.

BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 2 ed. London: Chapman and Hall, 408 p., 1994.

BELITZ, H-D. SCHIEBERLE, P. GROSCH W. **Food Chemistry**, p.383, 4<sup>a</sup>ed, Springer, 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<sup>a</sup> ed, p. 489-495, 1997.
- BINSACK R., BOERSMA B.J., PATE R.P., KIRK M., WHITE C.R., DARLEY-USMAR V., BARNES S., ZHOU F., PARKS D.A. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.25, p.434-443, 2001.
- 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.
- BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects **Behr's Verlag**, Hamburg, 2003.
- 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.
- BOUCHEREAU, A.; GUÉNOT, P.; LARHER, F. Analysis of amines in plant materials. **Journal of Chromatography B**, v. 747, p. 49-67, 2000.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 53, p. 33-41, 1999.
- BOVER-CID, S.; MIGUELEZ-ARIZADO, M.J.; MORATALLA, L.L.L.; VIDAL-CAROU, M.C. Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausage. **Meat Science**, Amsterdam, v.72, p. 62-68, 2006.
- BRAUDEAU, J. **Le cacaoyer**. Maisonneuve et Larose, Paris, p.304, 1969.
- BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.L.J.; VELD, J.H.J.H. Occurrence and formation of biologically active amines in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p.73-84, 1990.
- BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas.
- BRITO, E.S.; PEZOA GARCIA, N.H.; GALLÃO, M.I.; CORTELAZZO, A.L.; FEVEREIRO, P.S.; BRAGA, M.R. 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. **Braslian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n.4, p. 533-558, 2004.
- BRUNETON, J. **Fitoquímica y farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1<sup>a</sup> ed, 594p, 1991.
- BUTTURINI, A.; ALOISI, P.; TAGLIAZUCCHI, R.; CANTONI, C. Ammine biogene prodotte da enterobatteri e batteri lattici. **Industrie Alimentaria**, v. 24, p. 105 – 107, 1995.

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

CAMU, N.; DE WINTER, T.; ADDO, S.K.; TAKRAMA, J.S.; BERNAERT, H.; DE VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, 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. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**, p.443-459. 3ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, p.821, 2001.

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

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

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: FISILOGIA e manuseio. 2ª ed. Lavras: UFLA, 2005.

CHU, C.H.; BJELDANES, F.L. Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 79-88, 1981.

COOPER, K.A.; DONOVAN, J.L.; WATERHOUSE, A.L.; WILLIAMSON, G. Cocoa and health: a decade of research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 1–11, 2008.

CORTI, R.; FLAMMER, A.J.; HOLLENBERG, N.K.; LUSCHER, T.F. Cocoa and cardiovascular health. **Circulation**, v. 108, p. 1433–1441, 2009.

COTELLE, N.; BERNIER, J.L.; CATTEAU, J.P.; POMMERY, J.; WALLET, J.C.; GAYDOU, E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 20, p. 35–43, 1996.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, Barking, v. 98, n. 4, p. 649-657, 2006.

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.

COUTTS, RT.; GLEN, B.B.; PASUTTO, F.M. Foodstuffs as source of psychoactive amines and their precursors: content, significance and identification. **Advanced Drug Research**, v. 15, p. 169-233, 1986.

CROSS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J.C. Recherche d'un índice de fermentation du cacau. **Café, Cacau Thé**, v. 16, n. 2, p. 109-113, 1982.

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

CUNHA-SANTINO, M.B. **Atividade enzimática, cinética e modelagem matemática da decomposição de *Utricularia breviscapa* da lagoa do Oleo (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.

DE LLANO G.G.; CUESTA, V.; RODRÍGUEZ, A. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 4, p.270–274, 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, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: Funape, p.578, 2001.

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

DROLET, G.; DUMBROFF, E.B.; LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. **Phytochemistry**, v. 25, n.2, p. 367–371, 1986.

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

EDWARDS, R.A.; DAINTY, R.H.; HIBBARD, C.M.; RAMANTANIS, S.V. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs in chilled temperature, **Journal of Applied Bacteriology**, v. 63, p. 427– 434, 1987.

EDWARDS, S.T.; SANDINE, W.E. Public health significance of amines in cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 431-2438, 1981.

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.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N.H.; JARDIM, D.C.P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, p. 142-150, 2010. Suplemento 1.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M.; CHEN, C.Y.; MALLOY, M.J.; BROWNE, A.; CHIU, E.Y.; KWAK, H.K.; MILBURY, P.; PAUL, S.M.; BLUMBERG, J.; MIETUS-SNYDER, M.L. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 23, n. 3, p.197–204, 2004.

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.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) 76p, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, 1999.

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.; QUESNEL, V.C. Cacao glycosidase and color changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, n. 9, p. 505-509, 1957.

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

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.

FUZIKAWA, C.S.; HARA, C.; GLÓRIA, M.B.A.; ROCHA, F.L. Monoamine oxidase inhibitors and diet – Update and practical recommendations for clinical use. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 48, n.10, p. 453–460, 1999.

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

GÁLVEZ, S.L.; LOISEAU, G.; PAREDES, J.L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J.P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, p. 124-130, 2006.

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.

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

GARCIA-FAROLDI, G.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; FAJARDO, I. The polyamine and histamine metabolic interplay in câncer and chronic inflammation. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 12, p. 59-65, 2009.

GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering.** Ed. Marcel Dekker, v.4, p. 1-38, 2005.

GLÓRIA, M.B.A.; IZQUIERDO-PULIDO, M. Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. *J. Food Comp. Anal.*, v. 12, n. 2, p. 129-136, 1999.

GLÓRIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food**, v. 1, n. 2, p. 258–270, 2007.



- GOIHL, J. Tryptophan can lower aggressive behavior. **Feedstuffs**, v.78, p.12-22, 2006.
- GONZÁLEZ-MARCO, A.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Influence of Lees Contact on Evolution of Amines in Chardonnay Wine. **Journal of Food Science**, v.71, n.9, p.544-548, 2006.
- 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.
- GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? **Life Sciences**, v. 23, p. 2603-2616, 2003.
- GUIDI, L.R.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in soy sauce: Validation of method, occurrence and potential health effects. **Food Chemistry**, v. 133, p. 323–328, 2012.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42–49, 1994.
- HANSEN, C.E.; DEL-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*. **Plant Phenolics**, Academic Press, Londres, v.1, p. 1–28, 1989.
- HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical Dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. 2nd edition. London, United Kingdom: Taylor and Francis, 1999.
- 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.; MIYATAKE, H.; NATSUME, M., OSAKABE, N., TAKIZAWA, T., ITO, H.; YOSHIDA, T. 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.
- HEISS, C.; KLEINBONGARD, P.; DEJAM, A.; PERRÈ, S.; SCHROETER, H. Acute consumption of flavonoid-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. **Journal of the American College of Cardiology**, v.46, p.1276–1283, 2005.
- HERRAIZ, T. Tetrahydro-beta-carbolines, potential neuroactive alkaloids, in chocolate and cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.10, p. 4900-4904, 2000.
- HILLARY, A.R.; PEGG, A.E. Decarboxylases involved in polyamines biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1647, p. 161-166, 2003.

- HOET, P. H.; NEMERY, B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamineliked pathological or toxicological conditions. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 278, p. 417-433, 2000.
- HOOPER, L.; KAY, C.; ABDELHAMID, A.; KROON, P.A.; COHN, J.S.; RIMM, E.B.; CASSIDY, A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.95, p.740-751, 2012.
- HUDSON-ARNOLD, S.; DUANE-BROWN, W. **Advanced Food Research**. London: Academic Press, v. 24, 1978.
- IBANOGLU, S.; IBANOGLU, E. Modelling of natural fermentation in cowpeas using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, n.48, p. 277-281, 2001.
- INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. "Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract", **Food Chemistry**, v.101, p. 1285–1289, 2007.
- JACOB, R.A.; BURRI, B.J. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, p. 985, 1996.
- JALON, M.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C.; MARINÉ-FONT, A. Tyramine in cocoa and derivatives. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 545–547, 1983.
- JEEVANANDAM, M.; HOLADAY, B.S.; BEGAY, C.K.; PETERSEN, S.R. Nutrition efficacy of a spermidine supplemented diet. **Nutrition**, v.13, n. 9, p. 788-794, 1997.
- JØRGENSEN, L.V.; HUSS, H.H.; DALGAARD, P. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 920– 934, 2000.
- JOURDAIN, C., TENCA, G., DEGUERCY, A., TROPLIN, P., POELMAN, D. In vitro effects of polyphenols from cocoa and [beta] - sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. **European Journal of Cancer Prevention**, v.15, n.4, p. 353–361, 2006.
- KALAČ, P.; DADÁKOVÁ, E.; PELIKÁNOVÁ, T. Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. **European Food Research and Technology**, v. 230, p. 163-17, 2009.
- KALACĚ, P.; ŠVECOVÁ, S.; PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chemistry**, v. 77, p.349–351, 2002.
- KEALEY, K.S.; SNYDER, R.M.; ROMACZYK, L.J.; GEYER, H.M.; MEYERS, M.E.; WHITHCARE, E.J.; HAMMERSTONE, J.F.; SCHMITZ, H.H. **Cocoa Components, Edible Products Having Enhanced Polyphenol Content, Methods of Making Same and Medical Uses**. WO n. PI 98/09533. 1998.
- 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, P.M.; BIEHL, B.; ZIEGELER-BERGHAUSEN, H., HAMMOOR, M.; LIEBEREI, R. Kinetics of the Formation of Free Amino Acids in Cocoa Seeds during Fermentation. **Food Chemistry**, v. 34, p. 161-179, 1989.

KOEHLER, P.E.; MASON, M.E.; NEWELL, J.A. Formation of pyrazine compounds in sugar-amino acid model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 17, p. 393-396, 1969.

KOMES, D.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; HORŽIĆ, D.; DRMIĆ, H., ŠKRABAL, S., & MILIČEVIĆ, B. Bioactive and sensory properties of herbal spirit enriched with cocoa (*Theobroma cacao* L.) polyphenolics. **Food and Bioprocess Technology**, 2012.

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<sup>a</sup> ed., p. 306-14, 2008.

KRATZER, U.; FRANK, R.; KALBACHER, H.; BIEHL, B.; WÖSTEMEYER, J.; VOIGT, J. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 113, p. 903-913, 2009.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **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.

LAGUNES-GÁLVEZ, S.; LOISEAU, G.; PAREDES, J.L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J.P.; Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, v.114, p.124–130, 2007.

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

LANGE H.; 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.

LANGE, J.; WITTMANN, C. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n. 2, p. 276-83, 2002.

LEAL Jr., G.A.; GOMES, L.H.; EFRAIM, P.; TAVARES, F.C.; FIGUEIRA, A.; Fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 788–798, 2008.

- LECUMBERRI, E.; MATEOS, R.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; RUPÉREZ, P.; GOYAA, L.; BRAVO, L. Dietary fiber composition, antioxidant capacity and physicochemical properties of a fiber rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v.104: p. 948-954, 2007.
- LEFEBER, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; GOBERT, W.; CAMU, N.; DE VUYST, L. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. **Food Microbiology**, v. 30, p. 379–392. 2011.
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 1, p.70-79, 1999.
- LIMA, L.J.R., ALMEIDA, M.H., ROB NOUT, M.J., ZWIETERING, M.H., *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans, with Particular Reference to the Impact of Fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.731–761, 2011.
- LIMA, L.J.R.; KAMPHUIS, H. J.; NOUT, M.J. R.; ZWIETERING, M.H. Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. **Food Microbiology**, v. 28, p. 573 – 582, 2011.
- LINARES, D.M.; CRUZ MARTÍN, M.; LADERO, V.; ALVARES, M.A.; FERNÁNDEZ, M. Biogenics amines in dairy products. **Critical reviews Food Science Nutrition (in press)**. 2010
- 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, 112p, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2000.
- 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.; QUESNEL, V.C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 24, n. 3, p. 319-324, 1973
- LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: data from Belgian samples. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 519-525, 2005.
- LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, Suppl. 1, p. 55-58, 2000.
- LOUNVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. **Microbiology Letters**, v.199, p. 9 –13, 2001.
- LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3527–3532, 2002.
- MAGA, J.A. Amines in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 10, p. 373-403, 1978.

- MAGA, J.A. Pyrazine update. **Food Reviews International**. Colorado, EUA, v.8, 4ª ed., p.479-558, 1992.
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.H.; AHO, M.A.; HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.125-129, 1993.
- 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.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. **Letters of Applied Microbiology**, v. 31, p. 169-173, 2000.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v.17, n.6, p.271-278, 2002.
- MARTUSCELLI, M.; CRUDELE, M.A.; GARDINI, F.; SUZZI, G. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosum* strains from artisanal fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p. 228– 232, 2000.
- MEDINA, M.A.; URDIALES, J.L.; RORÍGUEZ-CASO, C.; RAMIREZ, F.J.; SANCHÉZ-JIMÉNEZ, F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biochemical applications. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 23-59, 2003.
- 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. Zurspezifität des kakaoaromas. **FetteSeifenAnstrichmittel**, v. 78, n.2, p. 88-95, 1976
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 184 –197, 2005.
- MOREIRA, I.M.V.; MIGUEL, M.G.C.P.; DUARTE, W.F., D.; DIAS, R.; SCHWAN, R.F. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. **Food Research International**, v.54, p.9–17, 2013.
- MORET, S.; SMELA, D.; POPULIN, T.; CONTE, L.S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. **Food Chemistry**, v. 89, p. 355-361, 2005.
- MORII, H.; CANN, D.C.; TAYOR, L.Y. Histamine formation by luminous bacteria in mackarel stored at low temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 54, p. 299 – 305, 1988.

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

NAGATSU, T. Application of high-performance liquid chromatography to the study of biogenic amine – related enzymes. **Journal of Chromatography.**, v. 566, p. 287-30,1991.

NAZARUDDIN, R.; SENG, L.K.; HASSAN, O.; SAID, M. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) 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.

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, C.; 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**, San Diego, v. 19, p. 612-619, 2006.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.; BOELENS, P.G.; VAN NOOREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n.4, p. 418-425, 2001.

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.

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

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.

OSAKABE, N.; YAMAGISHI, M.; SANBONGI, C.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; OSAWA, T. Antioxidative substances in cacao liquor. **Journal of Nutritional Science Vitaminology**, Tokyo, v. 44, n. 2, p. 313-21, 1998.

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.

PANDEY, S.; RANADE, S.A.; NAGAR, P.K.; KUMAR, N. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 25, n. 3, p. 291-299, 2000.

- PAPALEXANDRATOU, Z.; VRANCKEN, G.; DE BRUYNE, K.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L. Spontaneous organic cocoa bean fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 28, p.1326 e1338, 2011.
- PASTORE, P.; FAVARO, G.; BADOCCO, D.; TAPPARO, A.; CAVALLI, S.; SACCANI, G. Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode. **Journal of Chromatography A**, v.1098: p. 111-115, 2005.
- PAYNE, M.J.; HURST, W.J.; MILLER, K.B.; RANK, C.; STUART, D.A. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cocoa beans and cocoa ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10518–10527, 2010.
- PENNINGTON, J.A.T. Food composition databases for bioactive food components. **Journal of food composition and analysis**, v. 15, p. 419-434, 2002.
- PEREIRA, G.V.M.; MIGUEL, M.G.C.P.; RAMOS, C.L.; SCHWAN, R. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5395–5405, 2012.
- PEREIRA, G.V.M.; MAGALHÃES, K.T.; ALMEIDA, E.G.; COELHO, I.S.; SCHWAN, R.S. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 121–133, 2013.
- 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<sup>a</sup> ed., p. 297-309, 1986.
- PIETTA, P.G. Flavonols as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Itália, n.63, p.1035-1042, 2000.
- 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.
- PORTER, L.J.; MA, Z.; CHANG, G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 5, p. 1657-1663, 1991.
- PORTILLO, E.; GRAZIANI DE FARIÑAS, L.; BETANCOURT, Y.E. 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.
- RADLER, F.; FATH, K.P. Histamine and other biogenic amines in wines. In JM Rantz. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grape and Wine. **American Society for Enology and Viticulture**, Davies, California, p.185–195, 1991.
- REEVES, S.G.; MCDOWELL, I.; BEHN, K.; DENCH, J. Biochemical studies of cocoa bean o-diphenol O<sub>2</sub> oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chemistry**, Oxford, v.29, p.209-219, 1988.

- REID, K.; FAKLER, T.R.; FRANK, O.R.; STOCKS, N.P. Effect of cocoa on Blood Pressure (Review). The Cochrane Collaboration. **John Wiley Press**, p.1–83, 2012.
- REIN, D.; PAGLIERONI, T.G.; WUN, T.; PEARSON, D.A.; SCHMITZ, H.H.; GOSSELIN, R.; KEEN, C.L. Cocoa inhibits platelet activation and function. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 72, n. 1, p. 30-35, 2000.
- RICE- EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933- 956, 1996.
- RIZO, D.C. Barry Callebaut confirma el poder de los polifenoles en el chocolate. **Dulcelandia**, v. 65, n. 789, p. 33-37, 2006.
- RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.; OROZCO-AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cocoa L.*) during fermentation and drying process using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, p. 250–258, 2011.
- RODRIGUEZ-JEREZ, J.J.; COLAVITA, G.; GIACCONE, V.; PARISI, E. Bacillus macerans, a new potential histamine producing bacteria isolated from Italian cheese. **Food Microbiology**, v. 11, p. 409– 415, 1994a.
- RODRIGUEZ-JEREZ, J.J.; MORA-VENTURA, M.T.; LOPEZ-SABATER, E.I.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in salted semi-preserved anchovies. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 784– 787. 1994b.
- ROGEZ, H. Açai: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: ED UFPA, 2000.
- 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.
- ROIG-SAGUÉS, A.X.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; LÓPEZ-SABATER, E.I.; RODRIGUEZ-JEREZ, J.J.; MORA-VENTURA, M.T. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salsichon, a Spanish cured sausage. **Journal of Food Protection**, v. 59, p.516–520, 1996.
- ROMERO, R.; BAGUR, M.G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M.; GÁZQUEZ, D. Influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 162-167, 2003.
- ROSS, J.A.; KASSUM, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review Of Nutrition**, v.22, p.19-34, 2002.
- 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.
- SAMAH, O.A.; PTIH, M.F.; SELAMAT, J. Biochemical changes during fermentation of cocoa beans inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (wild strain). **Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p. 341–343, 1992.
- SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n.2, p. 454-457, 1998.
- SANCHES-CASCADO, S. P. **Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (Engraulis encrasicolus) y sus derivados**. España, 2005. Tese (Doutorado) - Universitat de Barcelona - UB.
- SANCHEZ-RABANEDA, O.; JAUREGUI, I.; CASALS, C.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Mass Spectrometry**, New York, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.
- SCHNORR, O.; BROSSETTE, T.; MOMMAB, T.Y.; KLEINBONGARD, P.; KEEN, C. L.; SCHROETER, H.; SIES, H. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 476, n.2, p. 211-215, 2008.
- SCHWAN, R. F., Microbiology of cocoa fermentation; A study to improve quality. In: **12ª CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS EM CACAU**. Salvador – BA, Novembro, 1996.
- SCHWAN, R.F., WHEALS, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.1-17, 2004.
- SCHWAN, R.F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p.1477–1483, 1998.
- SERAFINI, M.; BUGIANESI, R.; MAIANI, M.; VALTUEÑA, S.; DE SANTIS, S.; CROZIER, A. Plasma antioxidants from chocolate. **Nature**, v. 424, p. 1013, 2003.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: **Sources, Chemistry, Effects, Applications**, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster PA., p. 231- 245, 1995.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675-690, 1996.
- SHAUGHNESSY, W. J. Cocoa beans: planting through fermentation. Its effect on flavor. **Manufacturing Confectioner**, n. 72, p. 51-58, 1992.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2/3, p. 213-231, 1996.
- SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4±1°C and in chicken-based meat products. **Food Chemistry**, v.78, p.241-248, 2002.
- SILWAR, R. **Café Cacao Thé**, Paris, v.32, n.3, p.187-200 e 243-250, 1988.

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.

SMITH, T. A. Putrescine and inorganic ions. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 18, p. 46-54, 1984.

SMITH, TA. Amines in food. **Food Chemistry**, v. 6, p.169–200, 1980–1981.

SOARES, V.F.M.; GLÓRIA, M.B.A. Histamine level in canned fish available in the retail market of Belo Horizonte, MG, Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 7, p. 102-107, 1994.

SOUSADIAS, M.G.; SMITH, T.K. Toxicity and growth-promoting potential of spermine when fed to chicks. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2375-2381, 1995.

STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 6, p. 460-470, 1991.

SUN-WATERHOUSE, D.; WADHWA, S.S. Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: a review. **Food and Bioprocess Technology**, 2012.

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.

TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning, toxicology and clinical aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, v.17, p. 91- 128, 1986

THOMPSON, S.S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A.S. COCOA AND COFFEE. IN M. P. DOYLE, M. P. BEUCHAT, & T. J. MONTVILLE (Eds.), *Food microbiology, fundamentals and frontier*. **Washington, DC: American Society for Microbiology.**, p. 721–733, 2001.

TIECCO, G.; TANTILLO, G.; FRANCIOSO, E.; PAPARELLA, A.; DE NATALE, G.1 Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogene in insaccati nel torso delli stagionatura. **Industrie Alimentaire**, v.5, p. 209-213, 1986.

VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International**, Arlington, v. 80, p. 1006-1012, 1997.

VALERO, D.; MATÍNEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 228-234, 2002.

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

VIDAL-CAROU, M.C., LATORRE-MORATALLA, M.L., BOVER-CID S., VECIANA-NOGUÉS, T. Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4128-4132, 2009.

VILLENEUVE, F.; CROS, E.; MACHEIX, J. J. Effet de la fermentation sur les activités peroxidasiques et polyphenoloxidasiques de la fève e cacao. **Café, Cacao, Thé**, v. 33, n. 2, p. 113-120, 1985.

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.

VOIG, M.N.; EITENMILLER, R.R. Production of tyrosine and histidine decarboxylase by dairy-related bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 40, n. 4, p. 241-245, 1977.

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.

WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. **Phytochemistry**, v. 64, p. 97-107, 2003.

WALTERS, H.E.; PROTACIO, C.M.; SIGNS, M. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 23, p. 329-393, 1989.

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

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.

ZHU, Q.Y.; HOLT, R.R.; LAZARUS, S.A.; ENSUNSA, J.L.; HAMMERSTONE, J.F.; SCHMITZ, H.H.; KEEN, C.L. 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.

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

## CAPÍTULO II

### MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE CACAU

#### 1. INTRODUÇÃO

A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de boa qualidade. De acordo com Minifie (1989), a fermentação e a secagem das sementes de cacau são de vital importância, sendo que nenhum outro processamento posterior é capaz de corrigir falhas nestas etapas. No processo de fermentação, o sistema, a temperatura do ambiente e da massa, o pH e a acidez da polpa e do cotilédone, o tempo de processo, o revolvimento da massa bem como a microflora presente são fatores de grande importância (ROHAN; CONNELL, 1964; LOPEZ; QUESNEL, 1973; EFRAIM, 2004; HILL et al., 2009.).

Durante a fermentação a polpa do cacau sofre a ação de leveduras, na sequência, bactérias acéticas e, em partes, as lácticas, oxidam o etanol a ácido acético e láctico e liberam energia (calor). Com o aumento da concentração dos ácidos produzidos durante essa primeira etapa, esses 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; SNITKJAER; VAN DEN BERG, 2008; HONORÉ et al., 2010).

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. Wollgast e Anklam (2000) observaram que a partir do terceiro dia de fermentação, a temperatura das sementes alcança entre 45 e 50°C permanecendo assim até o final da fermentação.

Atribui-se, principalmente, aos ácidos láctico e acético difundidos para os cotilédones, os decréscimos de pH durante a fermentação de cacau (DIAS, 1998; DIAS; ÁVILA, 1994; QUESNEL, 1965).

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 de como o mesmo é beneficiado. Algumas etapas, dentre elas a fermentação, 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.

A modelagem de um processo fermentativo é a representação através de equações matemáticas das transformações bioquímicas que ocorrem no processo e das velocidades com que estas transformações se processam. 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).

O objetivo deste capítulo foi monitorar o processo fermentativo das sementes de cacau ao longo de 7 (sete) dias e avaliar o comportamento cinético das através das variações da temperatura da massa; umidade, pH e acidez total titulável dos cotilédones de cacau.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. Amostras

Frutos de cacauero (n=420) (Figura II.1) provenientes da Ilha do Combu, Belém (01°31'S, 48° 29'W), onde tiveram um intervalo de 24 horas entre a colheita e o envio ao Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados (LAFAMI) da Universidade Federal do Pará (UFPA).



**Figura II. 1.** Frutos de cacau  
Fonte: BRITO (2013)

### 2.2. MÉTODOS

#### 2.2.1. Obtenção das sementes de cacau

Os frutos de cacau foram abertos com auxílio de lâmina de aço inoxidável e as sementes foram retiradas manualmente. Foram utilizados em cada replicata da fermentação, cerca de 140 frutos, onde o rendimento médio foi de 15 kg de sementes de cacau (Figura II.2).

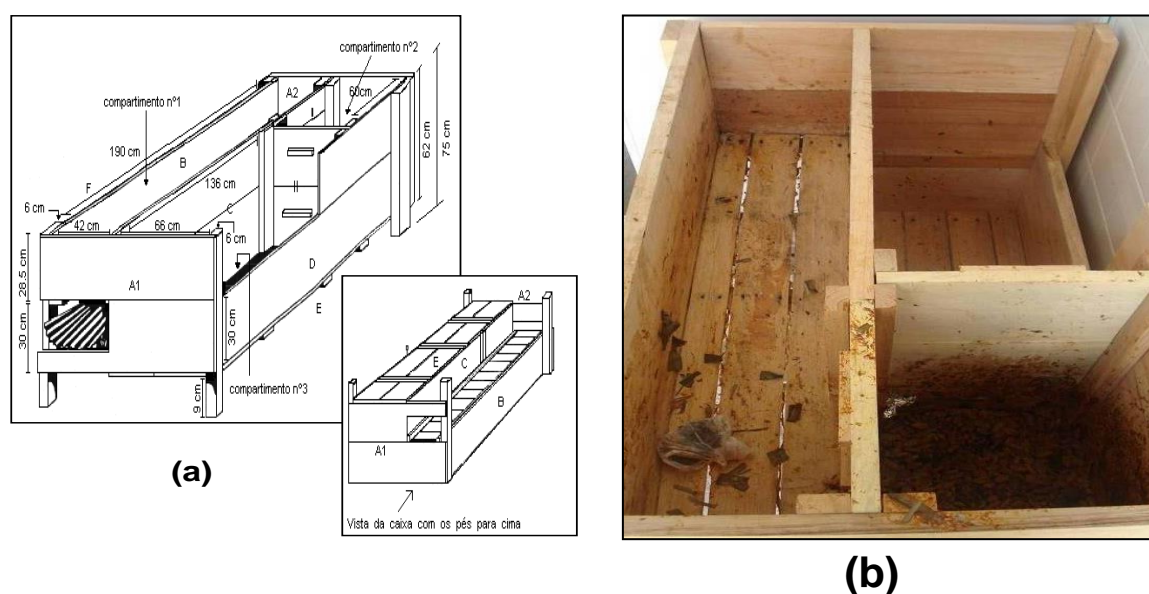


**Figura II.2.** Sementes de cacau  
Fonte: BRITO (2013)

## 2.2.2. Fermentação natural das sementes de cacau

Foi utilizado o sistema de fermentação em caixa de madeira T-60 (Figura II.3), construída de acordo com Grimaldi (1978), com as devidas adaptações para quantidades em menor escala. A caixa possui três compartimentos com forma e volume adequados para as fases aeróbia e anaeróbia da fermentação, sendo colocada sob o abrigo de chuva e sol.

O processo fermentativo foi realizado em triplicata ( $n=3$ ), no Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados (LAFAMI), da Universidade Federal do Pará, no mês de março (2013), onde as repetições da fermentação ocorreram em intervalos de tempo que garantissem a alimentação semi-contínua das sementes de cacau na caixa de fermentação.



**Figura II.3.** Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por Grimaldi (1978) (a) e Caixa de fermentação baseada na caixa T-60 com dimensões reduzidas (largura e comprimento) (b)

O processo teve início com o acondicionamento no primeiro compartimento da mistura de sementes (15 kg) e folhas de bananeira cortadas (2 kg), as folhas de bananeira foram coletadas de plantas existentes no Campus da Universidade Federal do Pará (Latitude 01°27'21", Longitude 48°30'16"), sendo que estas são utilizadas como fonte de leveduras para acelerar a primeira etapa da fermentação (48 horas).

Para minimizar a entrada de oxigênio no sistema, criar um ambiente anaeróbico, impedir o ressecamento da superfície da massa e a perda de calor da mesma, o compartimento foi revestido com folhas de bananeira (Figura II.4).



**Figura II. 4.** Folhas de bananeira cortadas misturadas às sementes de cacau  
Fonte: BRITO (2013)

A etapa de fermentação foi realizada ao longo de 7 (sete) dias, onde foram realizados revolvimentos diários por cerca de 5 (cinco) minutos, a partir do segundo dia de fermentação. As sementes ficam 48 horas no primeiro compartimento, após esse período são transferidas para o segundo e após 48 horas são transferidas para o terceiro e permanecem neste por 72 horas, ou seja até o término do processo (168 horas ou 7 dias) (GRIMALDI, 1978).

Ao término da etapa de fermentação 7º(sétimo) dia, as amêndoas apresentavam uma coloração vermelho-castanho intensa, como pode ser visualizado na Figura II.5.



**Figura II. 5.** Amêndoas de cacau no sétimo dia de fermentação  
Fonte: BRITO (2013)



As temperaturas diárias da massa foram registradas através do termômetro tipo espeto, em diferentes níveis: superfície, meio e fundo, e foi considerada a média dessas três leituras. As fermentações foram monitoradas também através de medidas de pH (método AOAC n° 31.1.07) e o teor de acidez total titulável foi expresso em mEq NaOH/100g (método AOAC n° 31.1.06).

As amostras foram coletadas em intervalos de 24 h durante o período de fermentação de sete dias, foram retiradas cerca de 200g dos diferentes pontos das caixas (meio, fundo e superfície – regiões centrais e diagonais) a fim de se obter uma amostra representativa do processo de fermentação, totalizando aproximadamente 1kg de amostra, sendo acondicionados em sacos de polietileno de baixa densidade a -18°C, até a realização das análises.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises foram realizadas em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão), e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, com o auxílio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 2004) empregando as seguintes metodologias estatísticas: Análise de variância (ANOVA) a 5% de significância; Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

Para modelagem cinética, os resultados obtidos foram tratados estatisticamente com o auxílio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 2004), onde os critérios utilizados para avaliar o modelo cinético (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 abaixo:

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|V_{obs} - V_{pred}|}{V_{obs}}$$

Onde:

**n** = número de observações; **V<sub>obs</sub>** = valor observado experimentalmente;

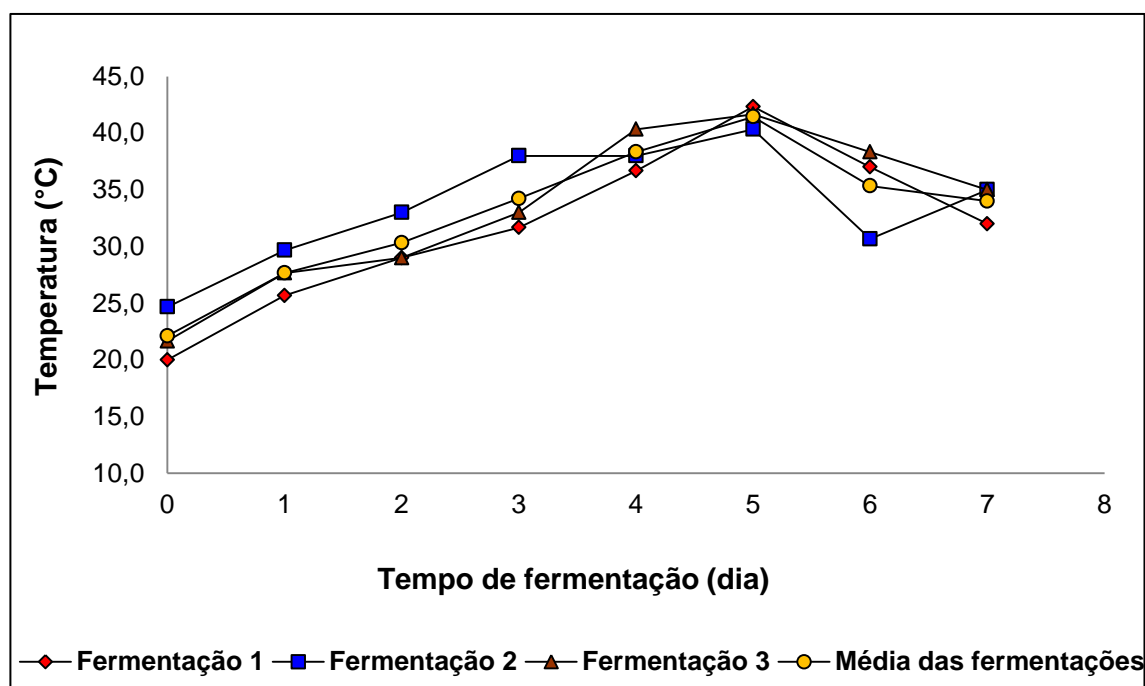
**V<sub>pred</sub>** = valor predito pelo modelo de regressão linear.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Fermentação do Cacau

#### 4.1.1. Temperatura da massa

A temperatura final obtida foi a média de 3 (três) fermentações, e por terem sido fermentações espontâneas, cada fermentação obteve um comportamento, como pode ser observado na Figura II.6.



**Figura II.6.** Comportamento da temperatura da massa de sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.

Na Tabela II.1, encontram-se os valores médios das 3 (três) fermentações, onde observa-se que houve um aumento gradativo da temperatura durante o processo de fermentação das sementes de cacau ( $p \leq 0,05$ ). É importante ressaltar que os valores dos desvios padrão foram elevados, pelo fato das fermentações terem comportamentos diferenciados.

**Tabela II.1.** Temperatura da massa média durante a fermentação das sementes de cacau.

Tempo de Fermentação (dia)	Temperatura*(°C)
0	22,1 ± 2,36 <sup>f</sup>
1	27,7 ± 2,00 <sup>e</sup>
2	30,3 ± 2,31 <sup>d</sup>
3	34,2 ± 3,34 <sup>c</sup>
4	38,3 ± 1,86 <sup>b</sup>
5	41,4 ± 1,02 <sup>a</sup>
6	35,3 ± 4,10 <sup>c</sup>
7	34,0 ± 1,37 <sup>c</sup>

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

Durante o monitoramento da temperatura, a temperatura máxima atingida foi de 41,4°C no 5º dia de fermentação, esse comportamento se difere ao obtido por Lagunes-Gálvez et al. (2007) que observaram a temperatura máxima de 51°C após 48 h de fermentação (2º dia), esse comportamento corresponde ao que tem sido reportado por diversos autores como Carr (1982); Lehrian e Patterson (1984); Barel (1998); Ardhana e Fleet (2003), Schwan e Wheals (2004).

Barel (1997) considera satisfatório quando ocorre um aumento da temperatura para 45°C em 48 horas de fermentação, e correlaciona este fato à uma boa qualidade final no cacau.

Os valores de temperatura encontrados neste estudo foram abaixo dos considerados ótimos para uma boa fermentação, essa diferença pode ser explicada pelas características físicas (tamanho e morfologia das sementes, espessura da testa, teor de polpa) e físico-químicas (pH da polpa, composição e quantidade de açúcares e ácidos), assim como pela diferença de metabolismo dos microorganismos presentes, altura do leito da massa de sementes e também devido as condições climáticas no mês em que foi realizada a fermentação (março), onde esse período na região é caracterizado por intensas chuvas e, conseqüente menor temperatura (25 a 30°C).

Lagunes-Gálvez et al. (2007) afirmam que variações na temperatura ambiente, influenciam fortemente na temperatura da massa de fermentação.

A temperatura na fermentação é influenciada pela quantidade da massa e pela aeração que é conferida e permitida pelo método utilizado no processo fermentativo, em sementes de cacau (CHATT, 1953). Pereira et al. (2013), realizaram fermentações espontâneas em um tanque de aço inoxidável e em paralelo utilizou métodos tradicionais brasileiro (caixas de madeira), com diferentes capacidade (40 e 600 kg), e com relação a temperatura observaram que a caixa com maior quantidade de massa de sementes de cacau alcançou temperatura de 51,16°C em 70 horas de fermentação, enquanto que a com menor capacidade atingiu 50,38 °C somente em 137 horas e o tanque de aço inoxidável atingiu 43,21°C e 144 horas.

Papalexandratou et al. (2011) compararam sistemas de fermentação espontânea, realizado na Costa do Marfim (pilha e caixa) e no Brasil (caixas), e observaram que a temperatura da massa se elevou em todos os sistemas, alcançando temperaturas finais de 42-48°C. Sendo que no Brasil, a temperatura da massa se elevou mais rapidamente alcançando 50° C após 72 horas de fermentação, isto foi devido ao baixo pH da polpa (altas concentrações de ácido cítrico), o que resultou numa intensa atividade microbiana. Comportamento semelhante foi encontrado por Ardhana e Fleet (2003).

A elevação de temperatura da massa durante a fermentação é atribuído à atividade metabólica dos microrganismos. A polpa das sementes de cacau é rica em açúcares fermentáveis e possui baixo pH (3,0-3,5), principalmente devido a presença de ácido cítrico. Estas condições selecionam para o crescimento inicial leveduras e bactérias lácticas, espécies de leveduras como *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Kluyveromyces* proporcionam uma fermentação alcoólica, considerada uma reação exotérmica leve (93,3 kJ por molécula de glucose consumida). isso leva a um aumento moderado da temperatura da massa, o qual atinge de 35 a 40 ° C. Com a transformação dos açúcares da polpa em álcool e o aumento do pH, devido às bactérias lácticas, como *Lactobacillus* e *Lb. plantarum*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Pediococcus*, as condições na massa de cacau ficam inadequadas para o crescimento de levedura e com o aumento dos níveis de oxigênio (ar) provocado pelo revolvimento da massa e a elevação da temperatura (acima de 35°C) as condições dentro dos cochos ficam ideais para o crescimento de de bactérias acéticas, que por oxidação convertem o etanol produzido pelas

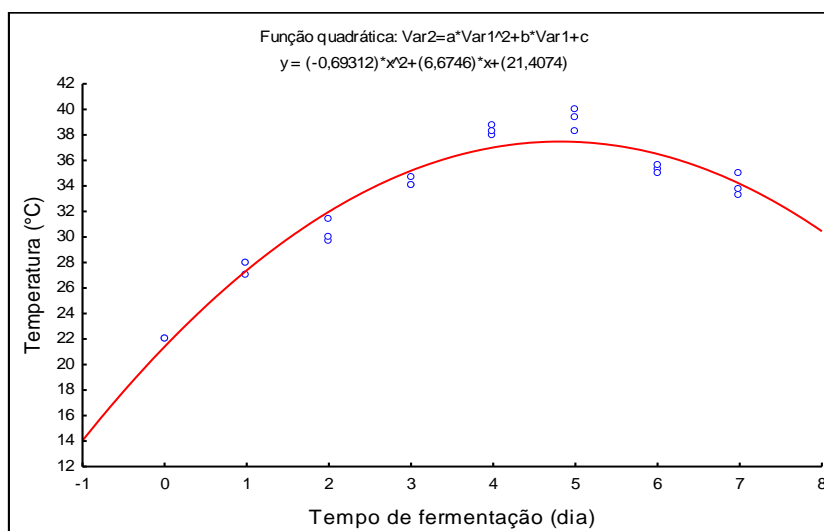
leveduras, através de uma reação altamente exotérmica (496 kJ por molécula de etanol convertido em ácido acético), onde a temperatura da massa alcança temperaturas de 45-50°C (OSTOVAR; KEENEY, 1973; CARR; DAVIES; DOUGAN, 1979; PASSOS; LOPEZ; SILVA, 1984; THOMPSON et al., 2001; LAGUNES-GÁLVEZ, 2002; ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004; DELLAGLIO; TORRIANI; FELIS, 2004).

Para a determinação do comportamento cinético, foram utilizados modelos para a reação de ordem zero e primeira ordem. De acordo com os parâmetros cinéticos e estatísticos obtidos (Tabela II.2), nenhum modelo utilizado se adequou aos dados, pois o parâmetro utilizado para a escolha do modelo ficou abaixo do considerado ideal, pois de acordo com Labuza (1982) e Taoukis, Labuza e Saguy (1997) as alterações do parâmetro avaliado devem ser acima de 75%. É importante ressaltar que coeficiente de determinação revela o quanto o modelo consegue explicar os valores observados (experimentais), ou seja, quanto maior o  $R^2$  (coeficiente de determinação) mais explicativo é modelo, e melhor ele se ajusta aos dados.

**Tabela II.2.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de temperatura da massa durante a fermentação de sementes de cacau.

Ordem da reação	$C_0$	$k$ (dia <sup>-1</sup> )	$R^2$	P
Ordem zero	26,30	1,89	56,86%	9,72
Primeira ordem	27,22	0,05	52,05%	10,52

Pelo fato da variável não ter obedecido a nenhum dos modelos propostos, então foi aplicado uma análise de regressão quadrática e pela figura II.7, observa-se que esta variável comportou-se de forma quadrática em função do tempo ( $p \leq 0,05$ ), onde o obteve-se um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 90,52%.



**Figura II.7.** Comportamento quadrático da variação de temperatura da massa durante a fermentação de sementes de cacau.

Na Tabela II.3 encontram-se os parâmetros para regressão do modelo quadrático, onde obteve-se um elevado coeficiente de determinação ( $R^2$ ) aliado a um baixo valor do desvio relativo médio (P), pois de acordo Lomauro; Bakshi; Labuza (1985), um valor de P menor que cinco corresponde a um bom ajuste da equação aos dados experimentais.

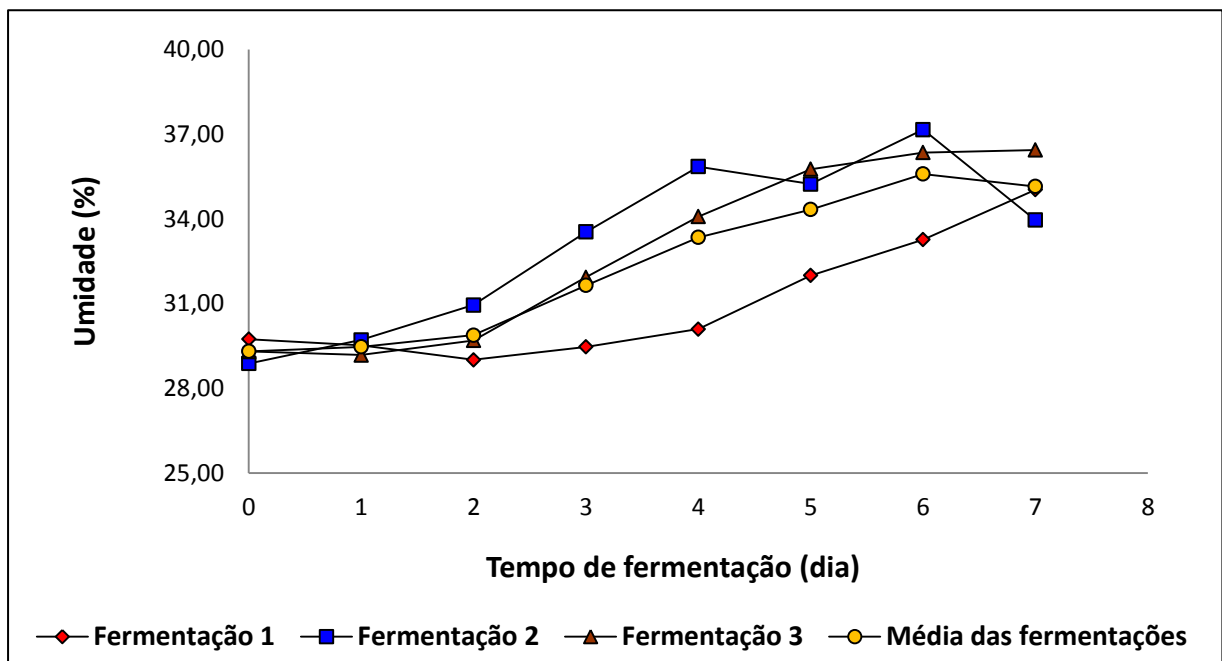
É importante ressaltar o difícil controle desta variável, pelo fato de ser uma fermentação espontânea e terem muitos interferentes como a temperatura ambiente, o metabolismo dos microorganismos, características físicas e químicas do fruto, devido a isto, não há relatos na literatura sobre a utilização de modelos matemáticos para prever o comportamento da temperatura da massa de sementes de cacau no processo fermentativo.

**Tabela II.3.** Parâmetros encontrados para regressão do modelo quadrático da variação de temperatura da massa durante a fermentação de sementes de cacau

Regressão	a	b	c	$R^2$	P
$Y = -0,73X^2 + 6,99X + 21,21$	-0,73	6,99	21,21	90,52%	4,31

#### 4.1.2. Umidade

Na Figura II.8, pode ser observado os comportamentos da umidade nas fermentações das sementes de cacau realizada no estudo, assim como ocorreu na temperatura da massa, o comportamento das fermentações foram diferenciados, porque as fermentações realizadas no estudo foram espontâneas, ou seja sem um controle microbiológico do processo.



**Figura II.8.** Comportamento da umidade das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.

Os valores médios da umidade durante a fermentação podem ser visualizados na Tabela II.4. Os cotilédones de cacau apresentaram teor inicial de 29,31% de umidade, com uma elevação da umidade do 2º para o 3º dia de fermentação ( $p \leq 0,05$ ). A partir do segundo dia houve absorção de água, devido à 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, ocasionando sua morte e a perda da capacidade de germinação, aliado a isso capacidade de reter ou impedir a entrada de água nas células acaba, e assim ocorre o inchamento das sementes (CAMU et al., 2008).



**Tabela II.4.** Teor de umidade médio das sementes de cacau durante a fermentação.

Tempo de Fermentação (dia)	Umidade* (%)
0	29,31 ± 0,43 <sup>e</sup>
1	29,47 ± 0,27 <sup>e</sup>
2	29,88 ± 0,99 <sup>e</sup>
3	31,65 ± 2,05 <sup>d</sup>
4	33,35 ± 2,95 <sup>c</sup>
5	34,33 ± 2,04 <sup>b</sup>
6	35,60 ± 2,06 <sup>a</sup>
7	35,15 ± 1,25 <sup>a</sup>

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

Os resultados encontrados neste estudo ficaram abaixo dos resultados referentes ao valor da umidade encontrada por Mattietto (2001), que obteve valores de 33,69% para o 1º dia e 40,44% para o último dia de fermentação, respectivamente.

Na Tabela II.5 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação de variação do teor de umidade durante a fermentação das sementes de cacau.

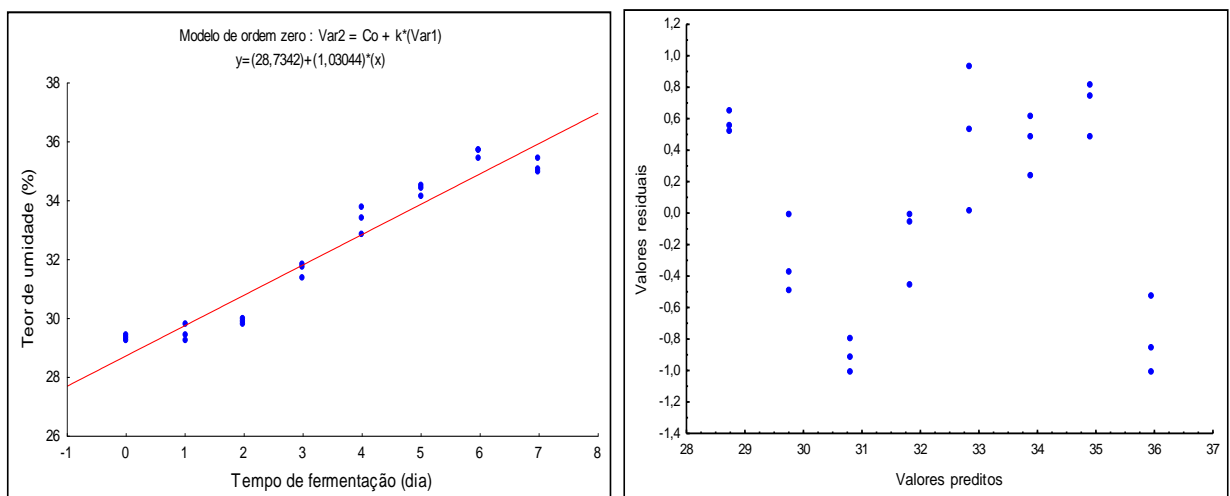
**Tabela II.5.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação do teor de umidade durante a fermentação das sementes de cacau.

Ordem da reação	C <sub>o</sub>	k (dia <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	P
Ordem zero	28,73	1,03	93,44%	1,69
Primeira ordem	28,86	0,03	93,22%	1,71

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da regressão linear, em muitos casos, é suficiente para a determinação da ordem aparente de reação e da equação de melhor ajuste, mas como se pode observar na Tabela II.5, os valores de  $R^2$  são muito próximos para ambos os modelos, então utiliza-se o valor do desvio relativo médio (P) para a escolha, porém estes também foram muito próximos, então o critério utilizado, foi escolha do modelo matematicamente mais simples (de ordem zero), pois podem ser mais rapidamente trabalhados, proporcionando dados que, apesar de menos precisos, fornecem uma ideia geral do comportamento de uma alteração.

A reação de primeira ordem quando comparada com a de ordem zero apresentou valores de resíduos mais elevados, apresentando distribuição com comportamento não-aleatório (ou viciado), ou seja, os resíduos foram dependentes dos valores preditos, e, por extensão, dos valores observados e do tempo do experimento.

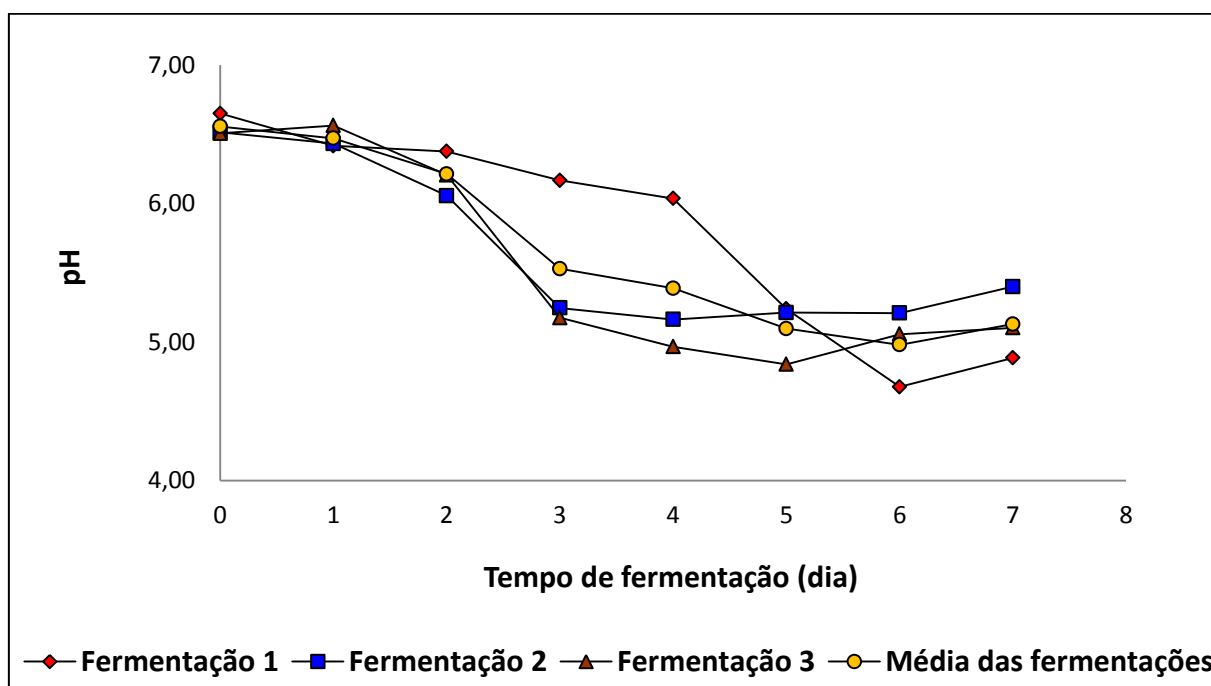
O modelo de reação e a distribuição de resíduos do modelo de ordem zero proposto para representar adequadamente o perfil de umidade, pode ser visualizado na Figura II.9.



**Figura II.9.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de umidade das sementes de cacau durante a fermentação.

### 4.1.3. pH

Na Figura II.10, pode-se observar o comportamento do pH nas 3 (três) fermentações realizadas no estudo, onde cada fermentação revelou um comportamento de pH.



**Figura II.10.** Comportamento do pH das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.

Os valores de médios de pH durante a fermentação podem ser visualizados na Tabela II.6. Observa-se que ocorreu um decréscimo do pH, desde o 1º dia de fermentação (6,56) até 7º dia de fermentação (5,13) ( $p \leq 0,05$ ).

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

Tempo de Fermentação (dia)	pH*
0	6,56 ± 0,08 <sup>a</sup>
1	6,47 ± 0,08 <sup>b</sup>
2	6,21 ± 0,16 <sup>c</sup>
3	5,53 ± 0,55 <sup>d</sup>
4	5,39 ± 0,57 <sup>e</sup>
5	5,10 ± 0,22 <sup>f</sup>
6	4,98 ± 0,27 <sup>g</sup>
7	5,13 ± 0,26 <sup>f</sup>

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

Rodriguez-Campos et al. (2011) observaram que o pH diminuiu de 6,4 para 4,5, em 8 (oito) dias de fermentação. Já Nazaruddin et al. (2006) relataram uma diminuição do valor de pH 6,54 - 4,35 em 4 (quatro) dias. Tem sido relatado em diversas pesquisas que esta diminuição é devido à difusão de ácidos produzidos por bactérias lácticas e acéticas, durante o processo de fermentação (THOMPSON et al., 2001, AFOAKWA et al., 2008). Atribuem-se esses decréscimos dos valores de pH observados, principalmente ao ácido acético absorvido pelos cotilédones, durante a fermentação, (QUESNEL, 1965; BIEHL, 1984; DIAS, 1998).

O pH final foi de 5,13, onde a elevação de pH do 6º para o 7º dia é devido a diminuição a cerca de 55% da concentração de ácido cítrico da polpa (ARDHANA ; FLEET, 2003) e também porque houve uma migração do etanol, ácido láctico, ácido acético e outros ácidos orgânicos diversos produzido por atividades microbianas a partir do exterior para o interior de sementes de cacau (THOMPSON et al., 2001)

Se as amêndoas de cacau apresentarem um pH elevado (5,5-5,8) após a fermentação, eles são considerados pouco fermentadas, enquanto que amêndoas de cacau com pH menor (4,75 - 5,19) são considerados bem fermentadas (AFOAKWA et al., 2008). Como amêndoas obtidas no estudo apresentaram pH final de 5,13 logo considera-se que as estas foram bem fermentadas, levando em consideração este parâmetro.

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. (DIAS, 1987; MEYER et al., 1989)

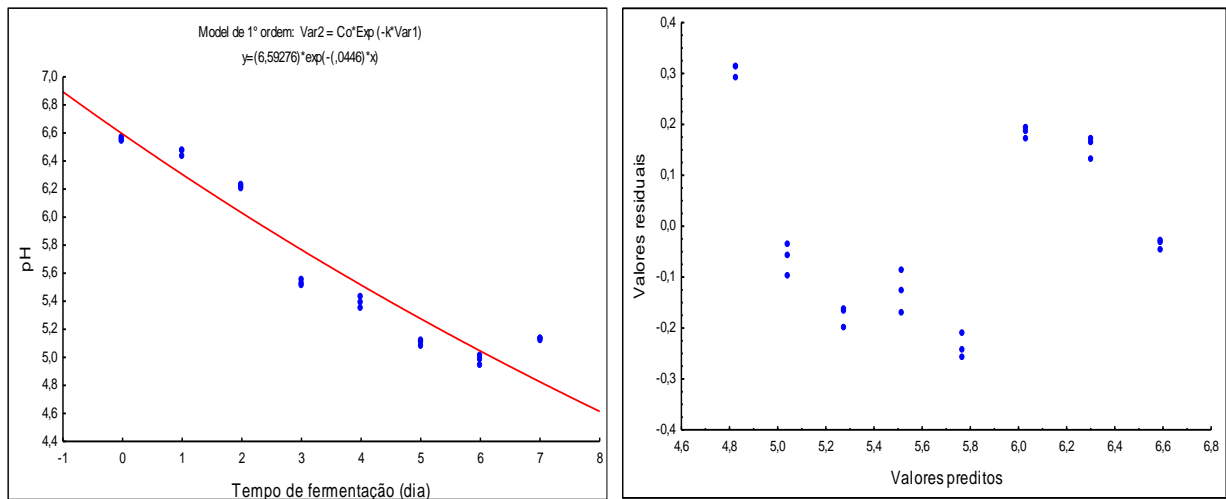
Estudos realizados por Voigt e Biehl (1995), Amin et al. (2002) reportam que o alto potencial de sabor pode ser correlacionado com moderada acidificação (pH 5,5 - 5,0) durante a fermentação.

Na Tabela II.7 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação da variação de pH, esta variável foi mais bem ajustada ao modelo de primeira ordem, pois apresentou o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) com melhor exatidão (90,86%), além de ter uma diferenciação melhor em relação ao valor do desvio relativo médio (2,93), segundo Lomauro; Bakshi; Labuza (1985), um valor de P menor que cinco corresponde a um bom ajuste da equação aos dados experimentais.

**Tabela II.7.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de pH durante a fermentação de sementes de cacau.

Ordem da reação	$C_0$	$k$ (dia <sup>-1</sup> )	$R^2$	P
Ordem zero	6,54	0,25	89,28%	3,14
Primeira ordem	6,59	0,04	90,86%	2,93

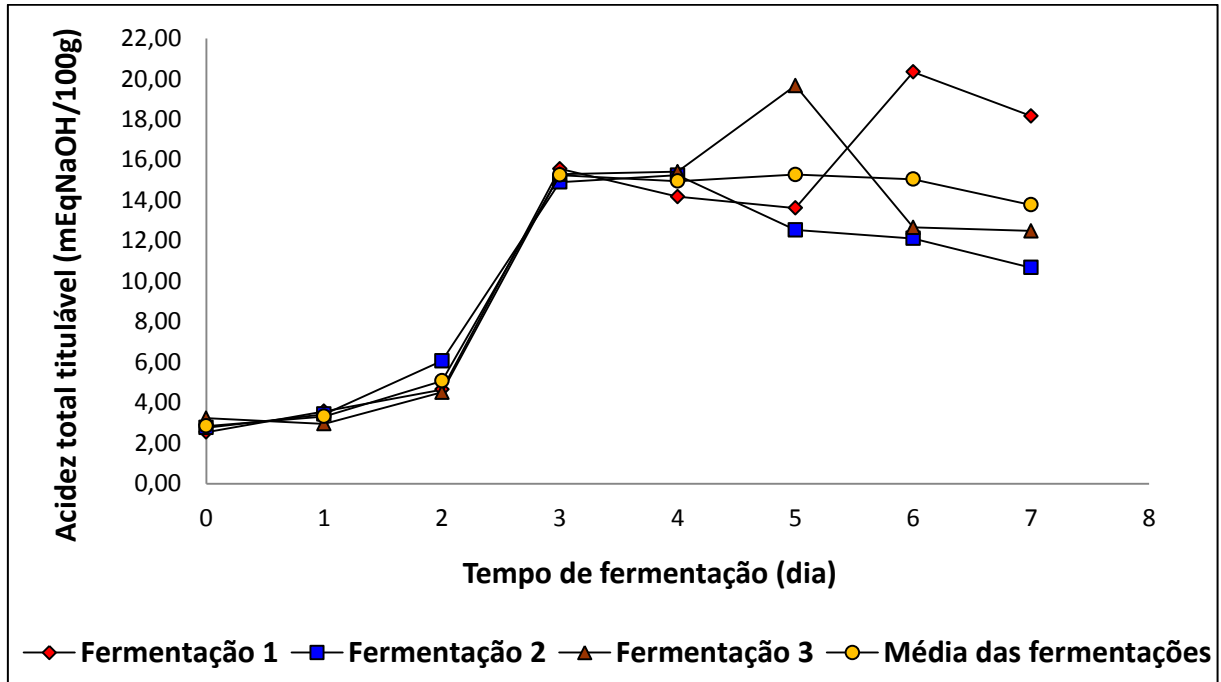
O comportamento cinético e a distribuição de resíduos modelo de primeira ordem proposto para representar adequadamente o perfil de variação de pH pode ser visualizado na Figura II.11.



**Figura II.11.** Modelo cinético de primeira ordem e distribuição aleatória de resíduos da variação de pH das sementes e cacau durante a fermentação.

#### 4.1.4. Acidez total titulável

Na Figura II.12, pode-se observar o comportamento da acidez total titulável nas 3 (três) fermentações realizadas no estudo, onde cada fermentação revelou um comportamento de acidez.



**Figura II.12.** Comportamento acidez total titulável das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.

Neste estudo foram observados valores de acidez para a semente “in natura” de 2,85 mEqNaOH/100g, e a partir do 3º dia ao 6º dia houve uma estabilização desta variável ( $p \leq 0,05$ ), ocorrendo um decréscimo do 6º (15,04 mEqNaOH/100g) para o 7º dia (13,78 mEqNaOH/100g), de acordo com a Tabela II.8. 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, onde comportamento semelhante foi observado no estudo.

**Tabela II.8.** Acidez total titulável médio das sementes de cacau durante a fermentação.

Tempo de Fermentação (dia)	Acidez total titulável * ** °
0	2,85 ± 0,35 <sup>d</sup>
1	3,32 ± 0,32 <sup>d</sup>
2	5,08 ± 0,86 <sup>c</sup>
3	15,25 ± 0,33 <sup>a</sup>
4	14,95 ± 0,67 <sup>ab</sup>
5	15,28 ± 3,85 <sup>a</sup>
6	15,04 ± 4,60 <sup>a</sup>
7	13,78 ± 3,91 <sup>b</sup>

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

\*\* Resultados expressos em Base seca.mEqNaOH/100g

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).

A faixa de acidez desejada pela indústria situa-se entre 12 a 15 mEq NaOH/100g, esse parâmetro foi definido para produção de chocolates com baixos níveis de acidez. O cacau com baixo teor de acidez é denominado usualmente como cacau fino e possui alto valor de mercado. Teores de acidez superiores a 12 - 15 mEq NaOH/100g não inviabilizam a comercialização das amêndoas, no entanto as mesmas terão menor valor comercial. (LOPEZ, 1984; DIAS, 1987), e o teor de acidez obtido neste estudo encontra-se dentro da faixa estabelecida.

Guehi et al. (2010) comparou três métodos de fermentação, e a sua duração, a fim de saber se esses fatores tinham influência na qualidade do cacau. Foi observado que sementes de cacau fermentadas em caixa de madeira, houve uma perda de compostos ácidos que levou um aumento de pH e um decréscimo na acidez titulável, nas em sementes fermentadas, segundo estes autores, isso foi devido a presença de pequenos orifícios na caixa que levaram à exudação da polpa.

Nazaruddin et al. (2006) observaram comportamento semelhante ao de Guehi et al. (2010), afirmando que acidez titulável, é um melhor indicador de acidez do que o pH. Tal comportamento foi diferenciado para este estudo, mas 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 Tabela II.9 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação de variação da acidez total titulável.

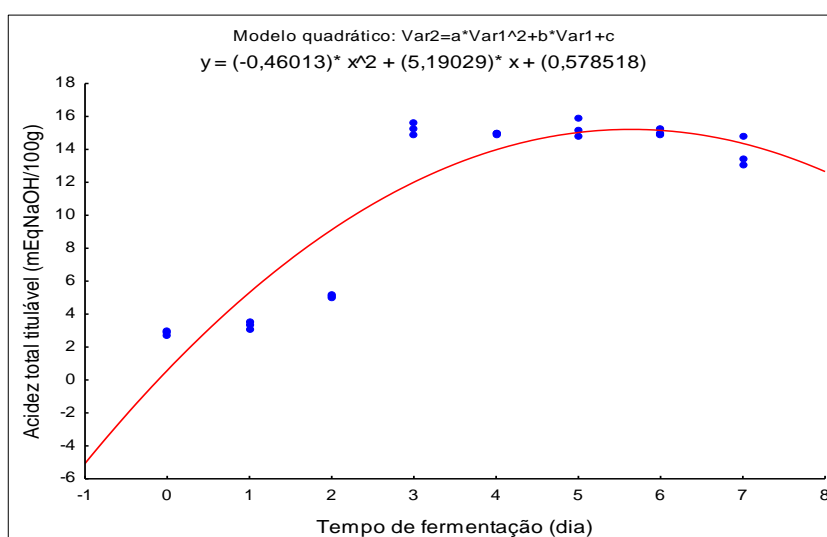
**Tabela II.9.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de acidez total titulável durante a fermentação de sementes de cacau.

<b>Ordem da reação</b>	<b>C<sub>o</sub> (Acidez)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
Ordem zero	3,80	1,97	68,82%	32,61
Primeira ordem	6,02	0,15	57,12%	48,89

Para a determinação do modelo cinético da variação de acidez total titulável durante a fermentação de sementes de cacau, foram aplicados modelos de ordem zero e primeira ordem. De acordo com os parâmetros cinéticos e estatísticos obtidos (Tabela II.9), nenhum modelo utilizado se adequou aos dados, pois o parâmetro utilizado para a escolha do modelo ficou abaixo do considerado ideal, pois de acordo com Labuza (1982) e Taoukis, Labuza e Saguy (1997) as alterações do parâmetro avaliado devem ser acima de 75%.

Pelo fato da variável não ter obedecido a nenhum dos modelos propostos, então foi aplicado uma análise de regressão quadrática e pela figura II. 13 observa-se que esta variável apresentou comportamento quadrático em função do tempo ( $p \leq 0,05$ ), onde o obteve-se um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 83,85%.





**Figura II.13.** Comportamento quadrático da variação de acidez total titulável durante a fermentação de sementes de cacau.

Vale ressaltar a importância de se ter um coeficiente de determinação elevado, pois este revela o quanto o modelo consegue explicar os valores observados (experimentais), ou seja, quanto maior o  $R^2$  (coeficiente de determinação) mais explicativo é modelo, e melhor ele se ajusta aos dados. Na Tabela II.10 encontram-se os parâmetros para regressão do modelo quadrático.

**Tabela II.10.** Parâmetros encontrados para regressão do modelo quadrático da variação de acidez total titulável durante a fermentação de sementes de cacau

Regressão	a	b	c	$R^2$	P
$Y = -0,46X^2 + 5,19X + 0,57$	-0,46	5,19	0,57	83,85%	32,18

## 5. CONCLUSÃO

O pH e a umidade foram as variáveis dependentes que apresentaram melhor descrição da variação dos dados experimentais e, por isso, podem ser utilizadas para avaliar uma tendência ou prever um determinado comportamento no intuito de garantir um maior controle do processo.

A temperatura e a acidez total titulável, apresentaram um comportamento quadrático em função do tempo.

A faixa de acidez situou-se entre 12 a 15 mEq NaOH/100g, faixa desejada para a indústria, considerando as amêndoas obtidas neste estudo como um cacau fino, garantindo a produção de um chocolate com baixos níveis de acidez.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOAKWA, E.O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 1–18, 2008.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; HARIKRISNA, K.; BIEHL, B. Analysis of vicilin (7S) - class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 28-732, 2002.

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

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.

BAREL, M. La fermentation du cacao: le moyen de l'apprécier et de la maîtriser. **Revue des Industries Alimentaires et Agricoles**, v. 14, p. 211–214, 1997.

BAREL, M. La première transformation du cacao. **Cahiers des Ingénieurs Agronomes**, v. 448, p.14–15, 1998.

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

BIEHL, B. Cocoa fermentation and problem of acidity, overfermentation and low flavour. In **Proceedings of the International Conference on Cocoa and Coconut**, Kuala Lumpur, Malaysia: The Incorporated Society of Planters, p. 167–171, 1984.

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.

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

CARR, J.G.; DAVIES, P.A.; DOUGAN, J. Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia I. Chatham, UK: **Natural Resources Institute**, 1979.

CARR, J.G. Cocoa. In: Rose, A.H. (Ed.), **Fermented Foods: Economic Microbiology**, vol. 7. **Academic Press**, London, p. 275–292, 1982.

CHATT, E.M. **Cocoa cultivation processing Analysis**. Interscience Publishers. Inc. New York and London, p. 302, 1953.

CUNHA-SANTINO, M.B. **Atividade enzimática, cinética e modelagem matemática da decomposição de *Utricularia breviscapa* da lagoa do Oleo (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.

DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S.; FELIS, G.E. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p. 809-812, 2004.

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.

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

GRIMALDI, J. Les Possibilités D'amélioration des Techniques D'ecabossage et de Fermentation dans le Processus Artisanal de le Préparation du Cacau. **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, 2010.

HII, C.L.; LAW, C.L.; CLOKE, M.; SUZANNAH, S. Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. **Biosystems Engineering**, v.102, p.153–161, 2009.

HONORÉ, G.O.; SYLVIE, R.; SÉBASTIEN L.N.; WILLIAM N. Biochemical Properties of Pectate Lyases Produced by Three Different *Bacillus* Strains Isolated from Fermenting Cocoa Beans and Characterization of Their Cloned Genes, **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.15, p. 5214–5220, 2010.

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

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.

LAGUNES GÁLVEZ, S.; LOISEAU, G.; PAREDES, J.L., BAREL, M.; GUIRAUD, J.P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p.124–130, 2007.

LAGUNES-GÁLVEZ, S.G. **Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao**. DEA. Ecole Doctorale Science et Procédé et Biologiques et Industriels. Université de Montpellier II, Montpellier, p.34, 2002.

LEHRMAN, D.W.; PATTERSON, G.R. Cocoa fermentation. In: Reed, G. (Ed.), **Biotechnology**, Verlag Chemie, Basel, Switzerland, v.5, p. 529–575, 1984.

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 and Technologies**, v.18, p.112-22, 1985

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

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.

MEYER, B.; BIEHL, B.; SAID, M.B.; SAMARAKODDY, R.J. Post harvest pod storage: A method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.48, p. 285-304, 1989.

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

NAZARUDDIN, R.; SENG, L.; 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.

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.

OSTOVAR, K.; KEENEY, P.G. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. **Journal of Food Science**, v. 38, p. 611–617, 1973.

PAPALEXANDRATOU, Z.; VRANCKENA, G.; DE BRUYNEB, K.; VANDAMMEB, P.; DE VUYS, L. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p. 964 - 973, 2011

PASSOS, F.M.; LOPEZ, A.S.; SILVA, D.O. Aeration and its influence on the microbial sequence in cacao fermentations in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1470–1474, 1984.

PEREIRA, G.V.M.; KARINA, T.M.; ALMEIDA, E.G.; COELHO, I.S.; SCHWAN, R.F. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties, **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p.121–133, 2013.

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.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.; OROZCO-AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M.E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cocoa L.*) during fermentation and drying process using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, p. 250–258, 2011.

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.

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

STATSOFT, INC. **STATISTICA (data analysis software system)**, versão 7.0 [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), 2004.

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.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, M. P. Beuchat, T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology, fundamentals and frontiers* Washington, DC: **American Society for Microbiology**, p. 721–733, 2001.

VOIGT, J.; BIEHL, B. Precursors of cocoa specific aroma components are derived from vicillin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. **Botanica Acta**, v. 108, p.11-17, 1995.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, p. 423–447, 2000.

## CAPÍTULO III

### MODELAGEM CINÉTICA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NA FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)

#### 1. INTRODUÇÃO

Estudos mostram que o consumo de cacau e produtos de chocolate tem efeitos benéficos para a saúde, pois exercem um efeito protetor contra doenças cardiovasculares, câncer e processos inflamatórios no corpo humano, estes efeitos na saúde têm sido associados à alta atividade antioxidante dos flavonóides do cacau (LEE et al, 2003; SERAFINI et al., 2003; ENGLER et al., 2004; HEISS et al., 2005;; JOURDAIN et al., 2006; CORTI et al., 2009; COOPER et al., 2008).

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 (WOLLGAST; ANKLAN, 2000).

Os polifenóis epicatequina e catequina são oxidados em quinonas e a condensação de proteína e polifenóis resultam na redução da adstringência e do sabor amargo (KOMES et al., 2012; SUN-WATERHOUSE; WADHWA, 2012). Sementes de cacau in natura contêm pigmentos antociânicos roxos, cianidina 3- $\beta$ -galactosil e cianidina 3- $\alpha$ -L-arabinosil que durante a fermentação, são hidrolisadas por glicosidases, sendo transformadas em antocianidinas (compostos incolores) (FORSYTH; QUESNEL, 1957).

O conteúdo e a concentração de fenólicos dependem da variedade da semente de cacau (genótipo), grau de maturação, processamento e armazenamento (NAZARUDDIN et al., 2006). Cada fase do processamento altera sua composição química (AFOAKWA et al., 2008). A fermentação é a primeira etapa e é considerada a fase que mais afeta o conteúdo fenólico (COOPER et al., 2008).

Na fermentação ocorre uma diminuição do teor de flavan-3-ol, (-)-epicatequina, em particular, que é muitas vezes utilizada como um índice da amplitude de processamento. Essa redução é atribuída aos processos de oxidação e a difusão dos polifenóis na exudação (KIM; KEENE, 1984; BRITO et al., 2001; CAMU et al., 2008; PAYNE et al., 2010).

A modelagem de um processo fermentativo é a representação através de equações matemáticas das transformações bioquímicas que ocorrem no processo e das velocidades com que estas transformações se processam. 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).

Assim o objetivo geral deste trabalho foi avaliar durante a fermentação de cacau as alterações químicas que influenciam a qualidade das amêndoas fermentadas e os objetivos específicos foram: (i) Avaliar a degradação dos compostos fenólicos durante a fermentação; (ii) Avaliar os principais parâmetros de quantificação da atividade antioxidante durante a fermentação. (iii) Determinar o comportamento cinético das variações dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante durante a fermentação das sementes do cacau da Amazônia.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

Foram utilizados frutos de cacau colhidos em março de 2013, provenientes da Ilha do Combu (01°31'S, 48° 29'W). Os frutos foram partidos após 24 horas da colheita, as sementes com polpa foram separadas, misturadas a folhas de bananeira proveniente do Campus da Universidade Federal do Pará (Latitude 01°27'21", Longitude 48°30'16"), e submetidas imediatamente à fermentação, durante 7 (sete) dias. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 h durante o período de fermentação em diferentes pontos das caixas (meio, fundo e superfície – regiões centrais e diagonais) a fim de se obter uma amostra representativa do processo de fermentação, foram congeladas e liofilizadas até cerca de 6,0% de umidade. Para análise de compostos fenólicos, antocianinas totais, atividade antioxidante e flavan-3-ol, as amostras (cotilédones das sementes liofilizadas *in natura* e fermentadas), foram trituradas em processador de alimentos, moídas em almofariz e peneiradas, em peneiras de 40 mesh para que fosse obtida uma granulometria mais homogênea.

### 2.2. MÉTODOS

#### 2.2.1. Determinação dos Teores de Compostos fenólicos ao Longo da Fermentação

Para a determinação de polifenóis pesou-se 1 g de amostra, 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 compostos fenólicos foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu (FC) (SINGLETON et al. 1999). Para a extração dos compostos fenólicos, 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 foram diluídos em água destilada, onde 500 µL do extrato diluído foram adicionadas a 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (previamente diluído em água destilada à proporção de 1:1, v/v) e após 5 min adicionou-se 1250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (70 g/L). A mistura foi deixada em temperatura ambiente e após 30 minutos, foi realizada a leitura em um espectrômetro a 750nm, os resultados foram expressos como miligrama de equivalente catequina por grama de cacau seco e desengordurado (mgEqC/gCSD) e miligrama de equivalente ácido gálico por grama de cacau seco e desengordurado (mgEqAG/gCSD).

### 2.2.2. Determinação dos Teores de Antocianinas Durante a Fermentação

Foi realizada de acordo com o método descrito por Fuleki e Francis (1968) posteriormente revisado por Lees e Francis (1972), onde 0,5 g de amostra foi adicionado a 4 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 nº1, e o resíduo foi lavado repetidamente com a solução extratora até extração completa das antocianinas.

A solução resultante foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, 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 triplicata (n=3) e para cálculo da concentração utilizou-se a Equação 1, proposta por Fuleki e Francis (1968):

$$\text{Antocianinas totais (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs}_{\lambda_{\text{máx}}} \cdot xFdx100}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, Abs<sub>λ<sub>máx</sub></sub> é a absorbância no comprimento de onda máximo (535nm); *fd* é o fator de diluição; E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> (absortividade molar à 535nm) = 98.2.

### 2.2.3. Determinação de Flavan-3-ols

#### 2.2.3.1. Método da vanilina-HCl para a determinação de flavan-3-ols

Os extratos utilizados para determinar os conteúdos de flavan-3-ols das sementes *in natura* e fermentadas foram os mesmos utilizados para quantificar os compostos fenólicos. O método utilizado para determinar flavan-3-ols foi o descrito por Di Stefano, Cravero, e Gentilini (1989) modificado.

Para a análise, soluções de vanilina 4% em metanol foram preparadas diariamente. 500 µL do extrato foram adicionados à 3 mL do reagente vanilina e após 5 minutos, 1,5 mL de HCl concentrado. A mistura permaneceu em repouso em banho de gelo e após 15 minutos, a absorbância foi lida à 500 nm contra o branco. Para o branco, metanol foi utilizado no lugar do reagente vanilina. A absorbância do branco foi subtraída à absorbância do conteúdo correspondente de vanilina e os resultados foram expressos em mg (+)-catequina/g de cotilédone seco e desengordurado.

Para o cálculo da quantidade de flavan-3-ols, utilizou-se a equação abaixo:

$$(+)\text{-catequina} = 290,8 \times \Delta E$$

Onde:

**ΔE** = absorbância do conteúdo correspondente de vanilina (500 nm) - absorbância do branco

## **2.2.4. Determinação da Atividade Antioxidante**

### **2.2.4.1. Preparo do Extrato**

Em tubos de centrífuga com tampa, 0,5 g de amostra, 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 foram acondicionados em garrafas âmbar em freezer.

### **2.2.4.2. Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>**

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-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, quatro 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. Foi utilizado para o branco, metanol.

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 para cada extrato.

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  $\mu\text{M}$  trolox / g de cotilédone.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises foram realizadas em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão), e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, com o auxílio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 2004) empregando as seguintes metodologias estatísticas: Análise de variância (ANOVA) a 5% de significância; Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

Para modelagem cinética - os resultados obtidos foram tratados estatisticamente com o auxílio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 2004), onde 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 abaixo:

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|V_{obs} - V_{pred}|}{V_{obs}}$$

Onde:

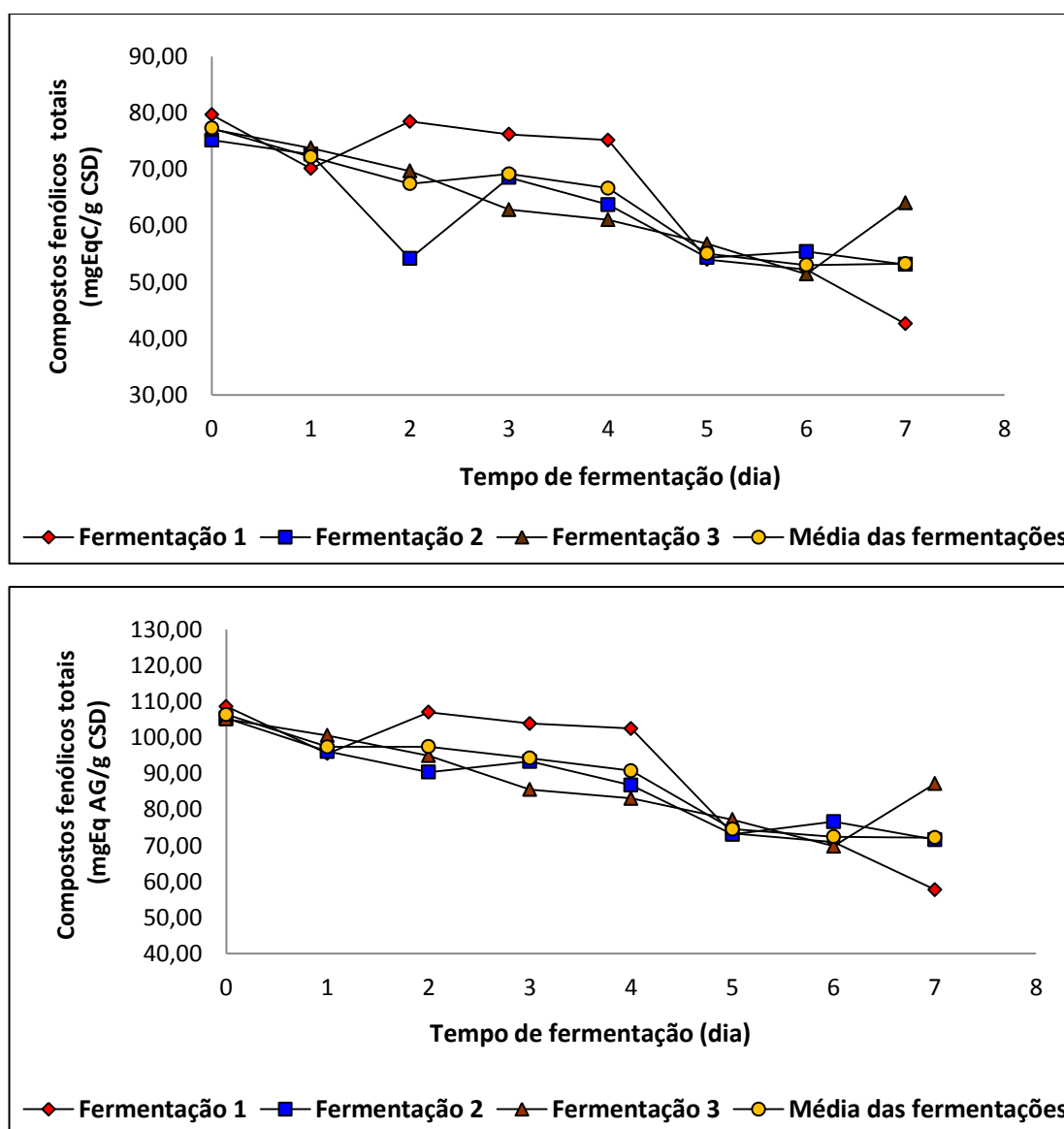
**n** = número de observações; **V<sub>obs</sub>** = valor observado experimentalmente.

**V<sub>pred</sub>** = valor predito pelo modelo de regressão linear.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Teores de Compostos fenólicos Durante a Fermentação

Na Figura III.1, pode-se observar o comportamento dos compostos fenólicos expressos em catequina e ácido gálico, respectivamente, nas 3 (três) fermentações realizadas no estudo, onde cada fermentação apresentou um comportamento de compostos fenólicos, pelo fato de ter sido uma fermentação espontânea.



**Figura III.1.** Comportamento compostos fenólicos, expressos em catequina e ácido gálicos das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.

Na Tabela III.1 estão apresentados os valores médios obtidos na determinação de compostos fenólicos das sementes de cacau durante a fermentação.

**Tabela III.1.** Teores médios de compostos fenólicos\* das sementes de cacau durante a fermentação.

<b>Compostos fenólicos*</b>		
<b>Tempo de Fermentação (dia)</b>	<b>mgEqcatequina / g cotilédone seco e desengordurado (mgEqC/gCSD)</b>	<b>mgEqácido gálico / g cotilédone seco e desengordurado (mgEqAG/gCSD)</b>
0	$77,31 \pm 2,25^a$	$106,40 \pm 1,95^a$
1	$72,20 \pm 1,86^b$	$97,43 \pm 2,74^b$
2	$67,45 \pm 12,30^c$	$97,47 \pm 8,59^b$
3	$69,19 \pm 6,70^c$	$94,27 \pm 9,20^c$
4	$66,66 \pm 7,50^c$	$90,80 \pm 10,31^d$
5	$55,06 \pm 1,51^d$	$74,58 \pm 2,27^e$
6	$53,03 \pm 2,12^d$	$72,49 \pm 3,63^e$
7	$53,26 \pm 10,72^d$	$72,21 \pm 14,74^e$

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

Como se pode observar na Tabela III.1, ocorreu uma redução de compostos fenólicos ao longo da fermentação, sendo de 31% para os resultados expressos em mg de catequina e 32% para o ácido gálico, é importante ressaltar que não é possível fazer comparação entre o teor de polifenóis expressos em mg de catequina com o de mg de ácido gálico, pois segundo Rice-Evans, Miller e Paganga (1996), o ácido gálico apresenta atividade antioxidante superior à da catequina, que conta com cinco grupos hidroxilas em sua estrutura, essa afirmação pode ser confirmada através dos resultados obtidos, onde o teor de compostos fenólicos para a semente “in natura” foi de 77,31 mgEqC/gCSD e 106,40 mgEqAG/gCSD .

A redução dos compostos fenólicos ao longo do processo de fermentação tanto nos resultados expressos em catequina, quanto no expresso em ácido gálico, era esperada, pois se deve em parte a perda de líquido gerado durante a fermentação (exudado) (LUNA et al., 2002; WOLLGAST; ANKLAM, 2000; CAMU et al., 2008). Além da perda pelo 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; DEL-OLMO; BURRI, 1998).

Niemenak et al. (2006) observou variação no teor total de compostos fenólicos (67 a 149,2 mgEqEpicatequina/g) em sementes de cacau “in natura” secas e desengorduradas.

CROZIER et al. (2011), afirma que conteúdo total de compostos fenólicos de cacau em pó ( $48,2 \pm 2,1$  mg ácido gálico/ g) é superior ao encontrado no açai, mirtilo em pó, no entanto estas diferenças não foram significativas estatisticamente ( $p < 0.05$ ).

Di Mattia et al. (2012) determinaram o efeito da fermentação e secagem de sementes de cacau da variedade Trinitário, oriundas da Costa Rica, no conteúdo e perfil de procianidinas, assim como nas propriedades antioxidantes e observaram que com o decorrer do tempo de fermentação o teor de compostos fenólicos decresceu de forma não linear ( $p \leq 0,05$ ) e de acordo com estes autores, este comportamento pode estar relacionado tanto com a polimerização e as reações enzimáticas que ocorrem simultaneamente, como consequência das mudanças no pH, na temperatura e umidade durante a fermentação de cacau (THOMPSON et al., 2001;. WOLLGAST; ANKLAM, 2000), juntamente com as mudanças estruturais que permitem um difusão de reagentes (BRITO et al., 2001).

Kealey et al. (2001) quantificaram os teores de compostos fenólicos nas sementes de cacau durante o processamento e, observaram perdas de 32, 47, 57 e 87% destes compostos em relação aos teores iniciais de sementes não fermentadas nas etapas de fermentação, torração, obtenção de *liquor* natural e obtenção de *liquor* alcalinizado, respectivamente. Jolic et al. (2011) monitoraram as mudanças nos compostos fenólicos, assim como a atividade antioxidante durante o processamento e encontraram teor de compostos fenólicos de 15,21 mgEqepicatequina/g.

Carrillo, Londoño-Londoño e Gil (2013) estudaram a influência de áreas geográficas no conteúdo de polifenóis, metilxantinas e atividade antioxidante em sementes de cacau de diferentes áreas de cultivo do cacau na Colômbia e observaram a influência deste parâmetro nos valores de polifenóis, que variaram de 44,94 a 70,09 mg Eqácido gálico /g.

Tomás-Barberán et al.(2007) analisaram o cacau de diferentes países, como Costa do Marfim, Guiné Equatorial, Venezuela, Peru, República Dominicana,



Equador e Colômbia e observaram que o cacau colombiano é o terceiro mais rico em teor de compostos fenólicos (81,4 mg Eqácido gálico /g).

Com relação à sua origem geográfica, por exemplo, concentrações de (+) - catequina em sementes de cacau fermentados e desengordurados varia de 16,52 mg/g de cacau na Costa Rica para 2,66 mg/g em cacau cultivado na Jamaica (ANDÚJAR et al., 2012).

As variações nos teores de compostos fenólicos encontrados em cacau e nos seus derivados podem ser atribuídas às diferenças nas metodologias analíticas empregadas para extração e quantificação dos compostos, além da influência genética, variedade das sementes de cacau, do grau de maturação (safra) e, mais importante, a origem geográfica, condições de pós-colheita, devido aos processos tecnológicos utilizados para a obtenção dos produtos avaliados como a fermentação, secagem, torração, processamento e armazenamento (WOLLGAST; ANKLAM, 2000, JALIL; ISMAIL, 2008)

Na Tabela III.2 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação de variação da compostos fenólicos com resultados expressos em catequina e na Tabela III.3 estão os resultados obtidos para os compostos fenólicos expressos em ácido gálico.

**Tabela III.2.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de compostos fenólicos com resultados expressos catequina durante a fermentação de sementes de cacau.

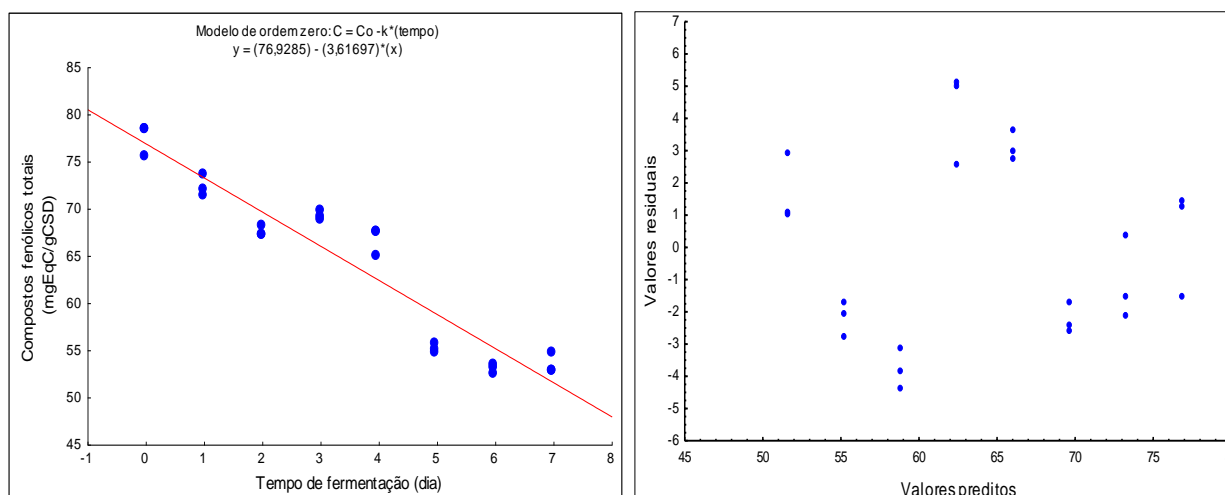
Ordem da reação	Compostos fenólicos (mgEqC/gCSD)				
	Parâmetros cinéticos			Parâmetros estatísticos	
	C <sub>o</sub>	k (dia <sup>-1</sup> )	T <sub>1/2</sub> (dias)	R <sup>2</sup>	P
Ordem zero	79,93	3,62	10,63	89,94%	3,99
Primeira ordem	77,53	0,06	12,39	89,39%	3,88

**Tabela III.3.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de compostos fenólicos com resultados expressos em ácido gálico durante a fermentação de sementes de cacau

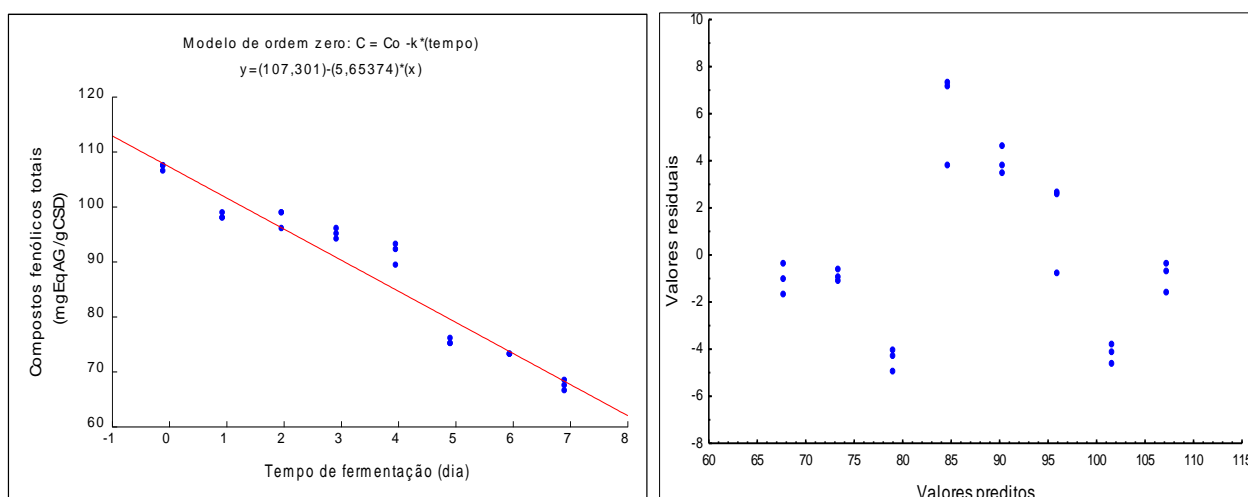
Ordem da reação	Compostos fenólicos (mgEqAG/gCSD)				
	Parâmetros cinéticos			Parâmetros estatísticos	
	C <sub>o</sub>	k (dia <sup>-1</sup> )	T <sub>1/2</sub> (dias)	R <sup>2</sup>	P
Ordem zero	106,38	5,19	10,24	91,31%	3,79
Primeira ordem	107,23	0,06	11,89	90,44%	3,84

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da regressão linear, em muitos casos, é suficiente para a determinação da ordem aparente de reação e da equação de melhor ajuste, mas como se pode observar na Tabela III. 2 e Tabela III. 3 , os valores de  $R^2$  foram muito próximos para ambos os modelos, então utiliza-se o valor do desvio relativo médio (P) para a escolha, porém estes também foram muito próximos, então o critério utilizado, foi escolha do modelo matematicamente mais simples (de ordem zero), pois podem ser mais rapidamente trabalhados, proporcionando dados que, apesar de menos precisos, fornecem uma ideia geral do comportamento de uma alteração. E os desvios médios relativos obtidos apresentaram valores de P menores que cinco o que corresponde a um bom ajuste da equação aos dados experimentais (LOMAURO; BAKSHI; LABUZA, 1995).

Logo, o modelo da reação de ordem zero foi escolhido para representar melhor o ajuste dos dados experimentais da cinética de degradação de compostos fenólicos expressos em catequina, assim como os compostos fenólicos expressos em ácido gálico, onde o comportamento cinético e a sua distribuição com comportamento aleatório, podem ser visualizados na Figura III.2 e Figura III.3 .



**Figura III.2.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de compostos fenólicos totais expressos em catequina das sementes de cacau durante a fermentação.



**Figura III.3.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de compostos fenólicos totais expressos em ácido gálico das sementes de cacau durante a fermentação.

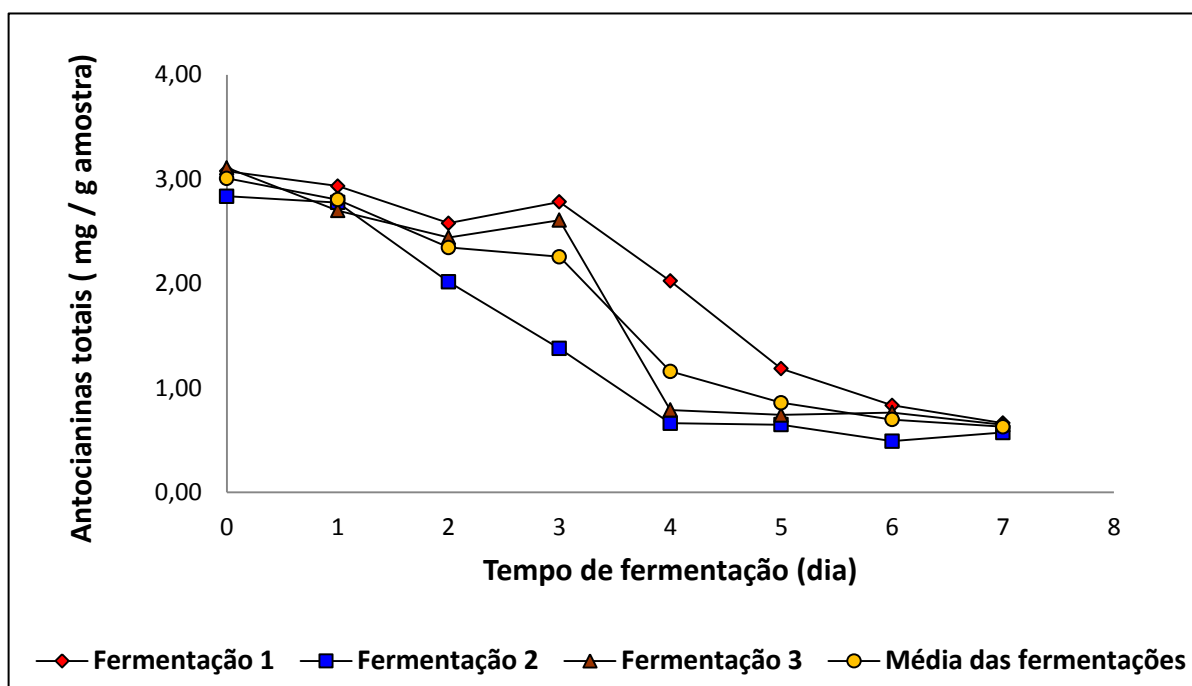
Foram estimados a ordem aparente da reação, a constante de velocidade da reação de degradação dos compostos fenólicos ( $k$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ). Sendo assim, adotando a reação de ordem zero como a ordem aparente da reação de degradação dos compostos fenólicos das sementes de cacau ao longo da fermentação, a constante de velocidade da reação de degradação é de  $3,62 \text{ dia}^{-1}$  e o tempo de meia-vida é de 10,63 dias (aproximadamente 11 dias) para os compostos

fenólicos expressos em catequina e  $k = 5,19 \text{ dia}^{-1}$  e  $t_{1/2} = 10,24$  dias (aproximadamente 10 dias), para os compostos fenólicos expressos em ácido gálico.

O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) é definido como o tempo necessário para uma redução de 50% do valor inicial do parâmetro avaliado, sendo que matematicamente quanto maior o valor da constante, menor será o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ). Nas tabelas III. 2. e III. 3, esta afirmação pode ser observada.

#### 4.2. Teores de Antocianinas Totais Durante a Fermentação

Na Figura III.4, pode-se observar o comportamento das antocianinas totais das sementes de cacau nas 3 (três) fermentações realizadas no estudo, onde cada fermentação revelou um comportamento de compostos fenólicos.



**Figura III.4.** Comportamento antocianinas totais das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações.

Na Tabela III.4 estão os valores de antocianinas nas sementes de cacau ao longo da fermentação, onde ao longo da fermentação houve uma perda de antocianinas nas sementes de cacau. Segundo Lange e Fincke (1970), Pettipher, (1986), Shahidi e Naczck (2003) as antocianinas geralmente desaparecem rapidamente durante processo de fermentação (93% de perda após 4 dias) e por isso têm sido consideradas como um bom índice para a determinação do grau de fermentação das sementes de cacau.

**Tabela III. 4.** Teor de antocianinas totais das sementes durante a fermentação.

<b>Tempo de Fermentação (dia)</b>	<b>Antocianinas totais* (mg/g)</b>
0	3,01 ± 0,15 <sup>a</sup>
1	2,80 ± 0,12 <sup>b</sup>
2	2,35 ± 0,29 <sup>b</sup>
3	2,26 ± 0,77 <sup>c</sup>
4	1,16 ± 0,75 <sup>d</sup>
5	0,86 ± 0,29 <sup>e</sup>
6	0,70 ± 0,18 <sup>f</sup>
7	0,63 ± 0,05 <sup>f</sup>

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

Os teores de antocianinas totais do primeiro ao sétimo dia de fermentação diminuíram cerca de 79%, essa redução é devido a elevação da temperatura da massa e ao meio ácido, as sementes de cacau perdem sua capacidade de germinar, logo a parede celular torna-se permeável, e ocorre uma mistura de conteúdos celulares, as antocianinas, dentre os compostos polifenólicos são as primeiras a serem transformadas, libertando a aglicona (cianidina de cor violácea) e o açúcar a que estava ligada, formando as antocianidinas que se forem rapidamente decompostas formarão compostos incolores ou se condensarem, formarão os chamados «taninos flavónicos» (FERRÃO, 2008).

Forsyth e Quesnel (1957) reportam que durante fermentação, as antocianinas são hidrolisadas por enzimas glicosidases, resultando num clareamento dos cotilédones.

Niemenak et al. (2006) relatam que as antocianinas majoritárias na semente de cacau in natura são cianidina-3-arabinosídeo, onde o teor varia de 0,47 – 4,55 mg/g de cotilédone seco desengordurado, e a cianidina-3-galactosídeo variando de 0,29 a 2,81mg/g de cotilédone seco desengordurado.

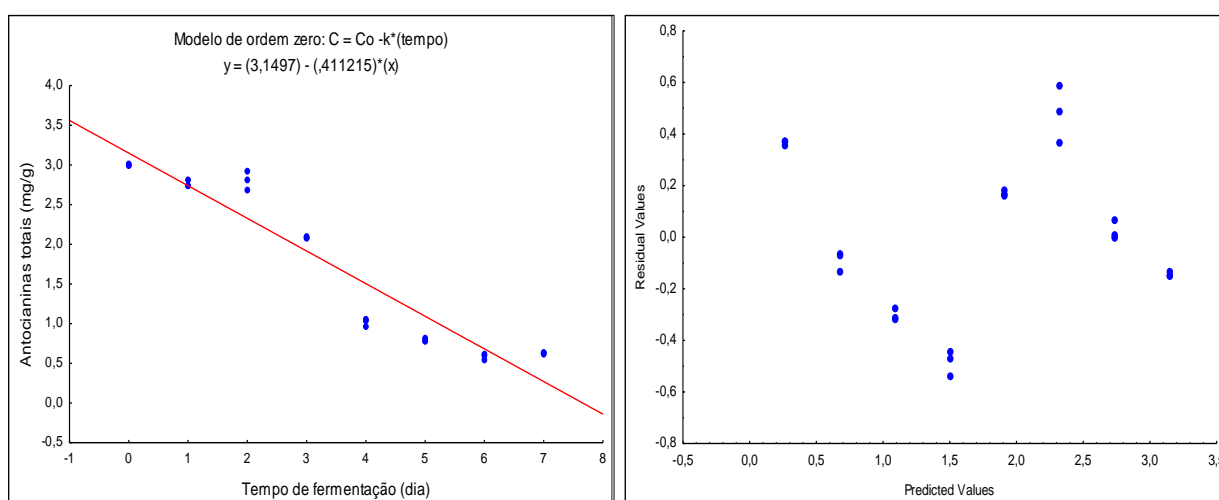
Elwers et al. (2009) identificaram as antocianinas cianidina-3- $\alpha$ -L-arabinosídeo variando entre 0 e 0,0077 mg/g e o conteúdo da cianidina-3- $\beta$ -D-galactosídeo variou de 0 a 0,0042 mg/g nas sementes de cacau de diferentes variedades.

Na Tabela III.5 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação da variação das antocianinas totais durante a fermentação de sementes de cacau, esta variável foi mais bem ajustada ao modelo de ordem zero, pois apresentou o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) com melhor exatidão (90,33%), além de ter uma diferenciação melhor em relação ao valor do desvio relativo médio (22,60).

**Tabela III. 5.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de antocianinas totais durante a fermentação de sementes de cacau.

Ordem da reação	Parâmetros cinéticos			Parâmetros estatísticos	
	$C_o$	$k$ (dia <sup>-1</sup> )	$T_{1/2}$ (dias)	$R^2$	P
Ordem zero	3,37	0,41	3,04	90,33%	22,60
Primeira ordem	3,15	0,23	3,83	87,07%	23,86

O comportamento cinético e a distribuição aleatória dos resíduos do modelo de ordem zero proposto para representar adequadamente o perfil de antocianinas totais, pode ser visualizado na Figura III.5.

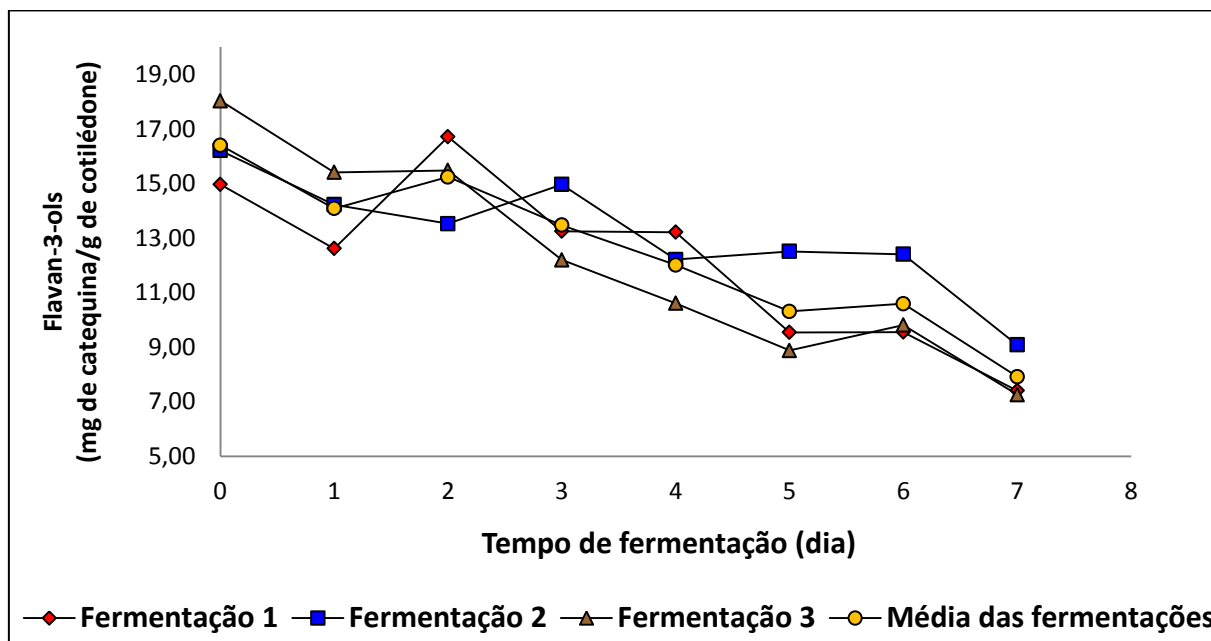


**Figura III.5.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de antocianinas totais das sementes de cacau durante a fermentação.

Sendo assim, adotando a reação de ordem zero como a ordem aparente da reação de degradação das antocianinas totais das sementes de cacau ao longo da fermentação, a constante de velocidade da reação de degradação é de 0,41 dia<sup>-1</sup> e o tempo de meia-vida é de 3,04 dias (aproximadamente 3 dias), quanto menor for o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) maior será o valor da constante.

### 4.3. Determinação de flavan-3-ols

Na Figura III.6 pode-se observar o comportamento do flavan-3-ol nas 3 (três) fermentações realizadas no estudo, onde cada fermentação revelou um comportamento diferenciado.



**Figura III.6.** Comportamento flavan-3-ol das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações, e a média das mesmas.

Na Tabela III.6 são apresentados os valores encontrados de acordo com a metodologia da Vanilina-HCL para flavan-3-ols durante a fermentação, que variaram de 16,28 a 7,92 mg de catequina/g de cotilédones, havendo uma redução ( $p \leq 0,05$ ), cerca de 51%.

**Tabela III.6.** Teor médio de flavan-3-ols das sementes de cacau fermentadas.

Tempo de Fermentação (dia)	Vanilina-HCl <sup>1*</sup>
0	16,28 ± 1,54 <sup>a</sup>
1	14,08 ± 1,40 <sup>c</sup>
2	15,24 ± 1,61 <sup>b</sup>
3	13,47 ± 1,39 <sup>d</sup>
4	12,01 ± 1,31 <sup>e</sup>
5	10,31 ± 1,93 <sup>g</sup>
6	10,59 ± 1,58 <sup>f</sup>
7	7,92 ± 1,01 <sup>h</sup>

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

<sup>1</sup> mg de catequina/g de cotilédone.

Elwers et al. (2009) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos em sementes do cacau Criollo, Forastero e Trinitário e reportaram que durante a fermentação e secagem foi observada redução de catequinas nas sementes do cacau Criollo. De acordo com outros estudos, uma perda semelhante de (-)-epicatequina acontece, porém essa perda só foi significativa quando o tempo de fermentação era muito extenso, acima de 7 (sete) dias (KIM; KEENEY, 1984; KEALEY et al. , 1998).

Payne et al. (2010) investigaram os níveis de catequina e epicatequina em sementes de cacau in natura, fermentadas e processadas através da secagem, torração e alcalinização, havendo reduções (80%) de catequina e epicatequina nas amêndoas fermentadas quando comparadas com uma não fermentada. Etapas de processamento comuns, tais como a fermentação reduz tanto o nível total de procianidinas, como o nível de flavanols de baixo peso molecular (KIM; KEENEY, 1984; PORTER; MA; CHEN, 1991).

A redução de catequina ao longo da fermentação diminui o nível de adstringência das sementes de cacau, de acordo com Nazaruddin et al. (2006), a razão dessa redução, em 2 dias após a fermentação, pode ser devido à inativação da polifenoloxidase como resultado da polimerização da catequina, já que esta serve de substrato para essa enzima.

Andujar et al. (2012), reportam que a variação da concentração de catequina no cacau depende da sua origem, por exemplo, concentração de (+)-catequina em amêndoas fermentadas e desengorduradas da Costa Rica é 16,52 mg/g enquanto que na Jamaica a concentração é 2,66 mg/g. Segundo Belščak et al. (2009) sementes de cacau de vários países contém de 1,20 a 10,66 mg (+)-catequina/g de cotilédones desengordurados.

Carrillo et al. (2013) avaliaram a influência da área geográfica no conteúdo de flavan-3-ols ((+)-catequina) em sementes de cacau de diferentes áreas da Colômbia e encontraram valores que variaram de 2,49 a 11,29 mg/g.

Em sementes de cacau in natura, há cerca de 12 a 18% de flavanols (KIM; KEENEY, 1984, LEA; FORD, 1990; PORTER; MA; CHEN, 1991), porém durante o processamento, como por exemplo, durante a etapa de fermentação, foi observado num estudo realizado por Kealey et al. (1998) perdas de 53 a 74% de flavanols e



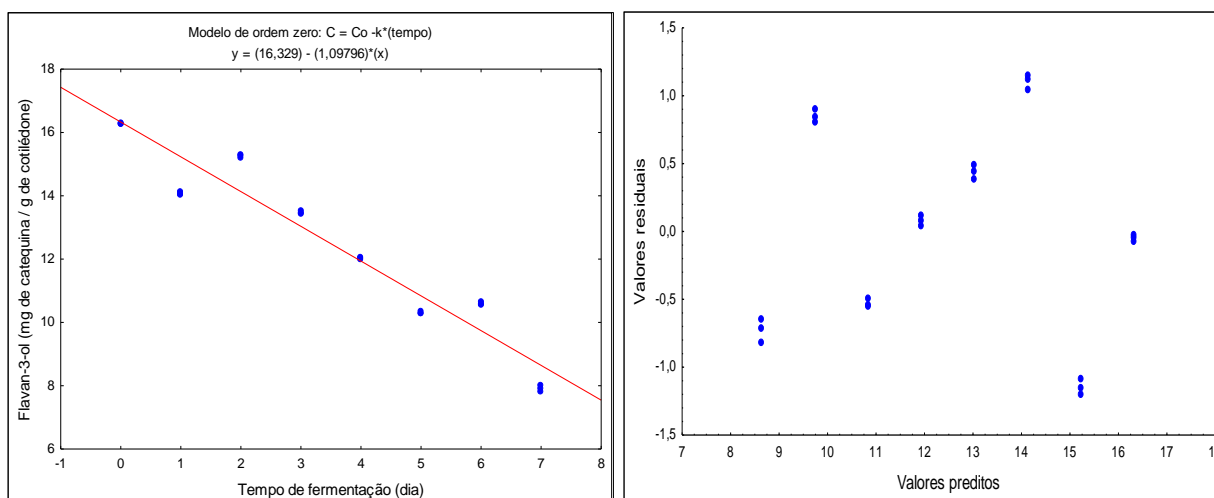
procianidinas, enquanto que Payne et al.(2010), reportaram que há uma diminuição de mais de 80% nos níveis de catequina e epicatequina , ao comparar uma semente in natura com uma semente fermentada.

Na Tabela III.7 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação de variação de Flavan-3-ol durante a fermentação de sementes de cacau.

**Tabela III.7.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação de Flavan-3-ol durante a fermentação de sementes de cacau.

Ordem da reação	Parâmetros cinéticos			Parâmetros estatísticos	
	C <sub>0</sub>	k (dia <sup>-1</sup> )	T <sub>1/2</sub> (dias)	R <sup>2</sup>	P
Ordem zero	16,33	1,10	7,44	92,21%	5,24
Primeira ordem	16,54	0,09	8,09	89,84%	6,39

Na Tabela III.7 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação da variação de flavan-3-ol durante a fermentação de sementes de cacau, esta variável teve um melhor ajuste ao modelo de ordem zero, pois apresentou o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) com melhor exatidão (92,21%), além de ter uma diferenciação melhor em relação ao valor do desvio relativo médio (5,24). O comportamento cinético e distribuição com comportamento aleatório podem ser visualizados na Figura III.7.

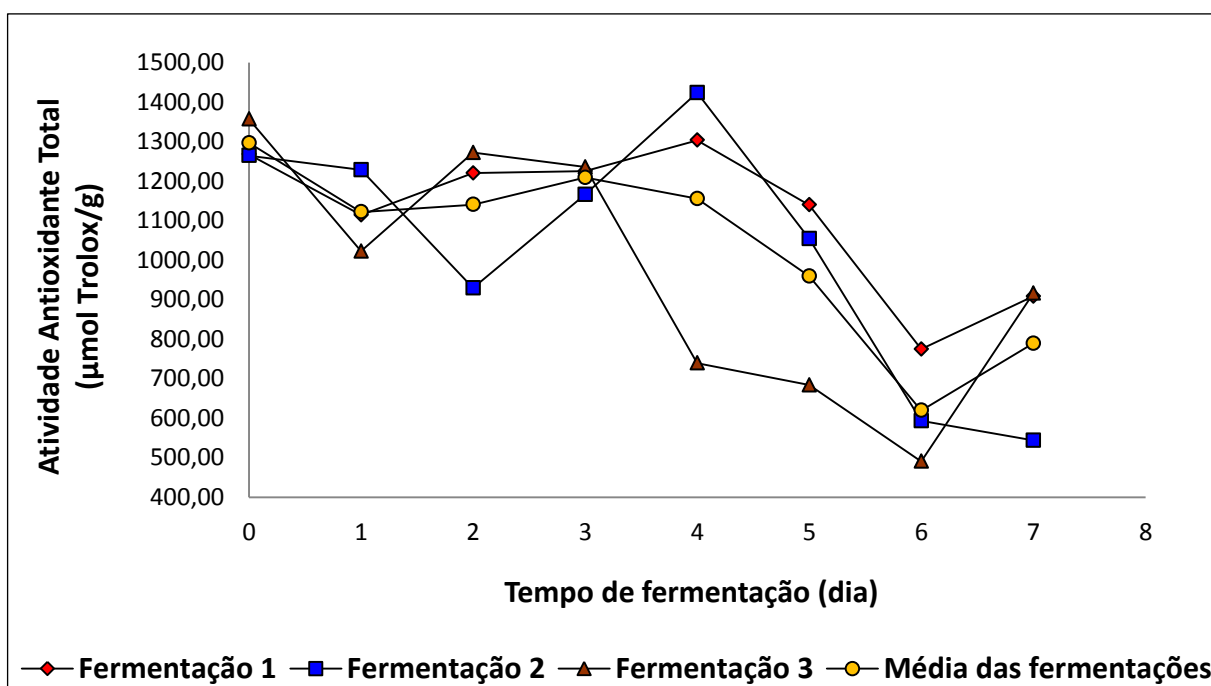


**Figura III.7.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação de flavan-3-ol das sementes de cacau durante a fermentação.

Sendo assim, adotando a reação de ordem zero como a ordem aparente da reação de degradação de flavan-3-ol durante a fermentação de sementes de cacau, a constante de velocidade da reação de degradação é de  $1,10 \text{ dias}^{-1}$  e o tempo de meia-vida é de 7,44 dias (aproximadamente 7 dias). Matematicamente quanto maior o valor da constante, menor será o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), essa afirmação pode ser observada na Tabela III. 7.

#### 4.4. Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>o+</sup>

A figura III.8 apresenta o comportamento obtidos nas 3 (três) fermentações realizadas no estudo, e pode observar que houve uma irregularidade neste comportamento pelo fato de terem sido fermentações espontâneas.



**Figura III.8.** Comportamento da atividade antioxidante das sementes de cacau observado nas 3 (três) fermentações, e a média das mesmas.

Na tabela III.8 são mostradas as mudanças na ocorridas na atividade antioxidante total ao longo da fermentação, onde houve uma redução de 39% dessa atividade ao longo da fermentação.

**Tabela III. 8.** Valores médios da atividade antioxidante total das sementes de cacau fermentadas.

Tempo de Fermentação (dia)	Atividade Antioxidante Total <sup>1*</sup>
0	1296,57 ± 52,50 <sup>a</sup>
1	1122,09 ± 103,10 <sup>e</sup>
2	1140,90 ± 184,49 <sup>d</sup>
3	1209,29 ± 37,52 <sup>b</sup>
4	1155,81 ± 365,23 <sup>c</sup>
5	959,69 ± 242,02 <sup>f</sup>
6	620,01 ± 143,79 <sup>h</sup>
7	789,85 ± 212,58 <sup>g</sup>

\* Base seca. Letras iguais para a mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p≤0,05).  
<sup>1</sup> μmol Trolox/g

Di Mattia et al. (2012), observaram que com o decorrer do tempo de fermentação a atividade antioxidante (ABTS) decresceu de forma não linear (p<0,05) e foi observado que em fermentações espontâneas ocorre uma evolução irregular desta atividade antioxidante, com uma elevação no final do processo fermentativo, do 6º para o 7º dia. Esse comportamento foi semelhante ao encontrado neste estudo, onde foram observadas oscilações no decorrer do processo, com uma elevação da atividade antioxidante do 6º dia (620,01 μmol Trolox/g) para o 7º (789,85 μmol Trolox/g), ou seja, ao final do processo.

Compostos fenólicos do cacau têm sido considerados como os principais agentes quimiopreventivos, principalmente devido à sua elevada antioxidante atividade (WOLLGAST; ANKLAM, 2000, CARNESECCHI et al., 2002; SUN et al., 2007; MARTÍN et al., 2008; ARLORIO et al., 2008).

Produtos de cacau contêm alta atividade antioxidante e elevados teores de flavonóides assim como o chá ou vinho tinto (LEE et al., 2003; STEINBERG, BEARDEN; KEEN, 2003). Estudo realizado por Andújar et al., 2012, revelaram que o cacau possui mais compostos fenólicos e maior atividade antioxidante do que o chá verde, chá preto, ou vinho tinto .

Arlorio et al. (2008) reportam que alta capacidade sequestrar radicais livres, não é exclusivamente dos fenóis dos extratos de cacau. Os resultados encontrados por Arlorio et al. (2008) corroboram com os relatados por Othman et al. (2007), que

sugerem que essa capacidade pode ser influenciada pela presença de metilxantinas (teobromina e cafeína) e antocianinas.

Othman et al. (2007) investigaram a atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em sementes de cacau provenientes de diferentes países, e correlacionaram essa atividade antioxidante com o conteúdo de fenólicos, onde eles puderam concluir que a capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de sementes de cacau da Malásia eram comparáveis aos de Gana, Costa do Marfim Costa e Indonésia. Este estudo foi de extrema importância, pois a Malásia, apesar de ser o quinto maior produtor amêndoas de cacau em todo o mundo, suas amêndoas são vendidos a um preço mais baixo quando comparados com as amêndoas do Oeste Africano, diante do exposto a capacidade antioxidante, além de fornecer qualidade no sabor, é uma informação adicional a ser considerada, para promover o consumo de amêndoas de cacau.

Carrillo et al. (2013) analisaram regiões produtoras de cacau e reportaram que houveram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) no teor de compostos fenólicos, flavan-3-ol, epicatequina, catequina, cafeína e teobromina e na atividade antioxidante, evidenciando um efeito significativo da região produtora de cacau nesses parâmetros.

Aikpokpodion e Dongo (2010) estudaram o perfil da atividade antioxidante do primeiro ao sexto dia de fermentação, quando os compostos fenólicos são reduzidos. O conteúdo de catequina das sementes de cacau não reduziu durante a fermentação e os resultados mostraram que, apesar da perda dos compostos fenólicos durante a fermentação, a concentração restante nas sementes é suficiente para produzir uma alta atividade antioxidante.

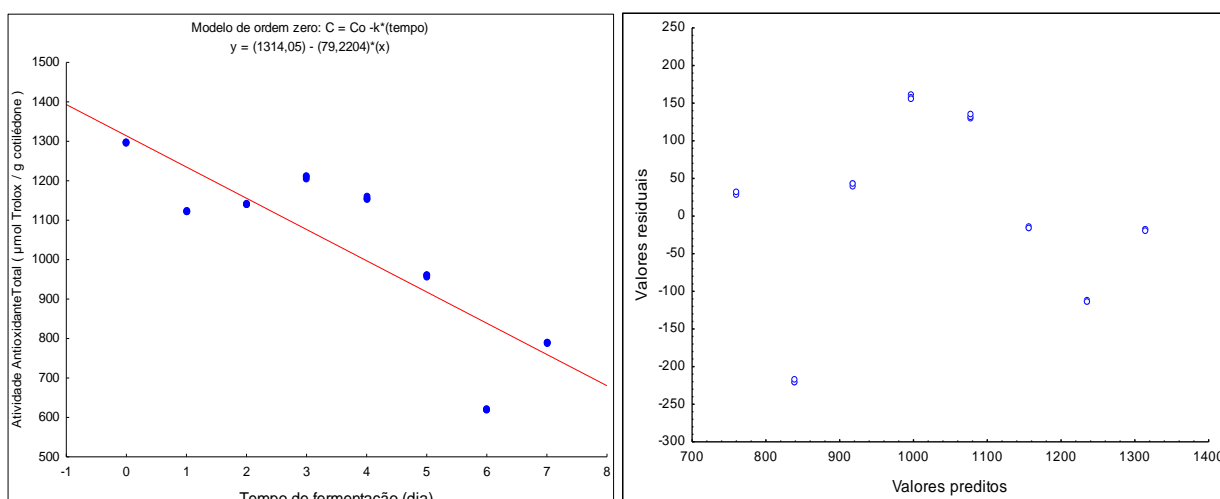
Foram encontradas neste estudo elevadas correlações entre atividade antioxidante e compostos fenólicos  $R^2 = 0,8241$  (mgEqácidogálico/CDS) e  $R^2 = 0,9022$  (mgEqcatequina/CDS) permitindo sugerir que os compostos dominantes que contribuem para atividade antioxidante têm estrutura fenólica. Altas correlações também foram reportadas por Sun et al. (2007) e Jolic´et al. (2012).

Na Tabela III.9 encontram-se os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação de variação da atividade antioxidante durante a fermentação de sementes de cacau.

**Tabela III.9.** Parâmetros cinéticos e estatísticos da variação da atividade antioxidante durante a fermentação de sementes de cacau.

Ordem da reação	Parâmetros cinéticos			Parâmetros estatísticos	
	C <sub>o</sub>	k (dia <sup>-1</sup> )	T <sub>1/2</sub> (dias)	R <sup>2</sup>	P
Ordem zero	1314,05	79,22	8,29	71,21%	10,11
Primeira ordem	1320,98	0,07	9,50	68,04%	10,08

Os parâmetros de ajuste utilizados na escolha do melhor modelo matemático para classificação da ordem da reação da variação da atividade antioxidante durante a fermentação de sementes de cacau revelaram que esta variável teve um melhor ajuste ao modelo de ordem zero, pois apresentou o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) com melhor exatidão (71,21%). O comportamento cinético e distribuição com comportamento aleatório podem ser visualizados na Figura III.9.



**Figura III.9.** Modelo cinético de ordem zero e distribuição aleatória de resíduos da variação da atividade antioxidante das sementes de cacau durante a fermentação

Sendo assim, adotando a reação de ordem zero como a ordem aparente da reação da redução da atividade antioxidante durante a fermentação de sementes de cacau, a constante de velocidade da reação de degradação é de 71,21 dia<sup>-1</sup> e o tempo de meia-vida é de 10,11 dias (aproximadamente 10 dias). Matematicamente quanto maior o valor da constante, menor será o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), essa afirmação pode ser observada na Tabela III. 9.

## 5. CONCLUSÕES

A fermentação influenciou nas modificações químicas e na atividade antioxidante das sementes de cacau, onde houve uma redução de todos os parâmetros analisados, sendo que essas reduções são desejáveis sob o ponto de vista de sabor, pois reduzem a adstringência e o amargor, mas altamente indesejáveis em relação às propriedades antioxidantes.

Foi observado que apesar da perda dos compostos fenólicos durante a fermentação, a concentração restante nas sementes foi suficiente para produzir uma elevada atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos, as antocianinas totais e flavan-3-ol foram as variáveis dependentes que apresentaram melhor descrição da variação dos dados experimentais e, por isso, podem ser utilizadas para avaliar uma tendência ou prever um determinado comportamento no intuito de garantir um maior controle do processo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOAKWA, E.O. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.48, n.9, p.840-57, 2008.

AIKPOKPODION, P. E.; DONGO, L. N. Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. **International Journal of Sustainable Crop Production**, Bangladesh, v. 5, n. 4, p. 66-70, 2010.

ANDÚJAR, I.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; RÍOS, J.L. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p.23, 2012.

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

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.

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.

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

CARNÉSECCHI, S.; SCHNEIDER, Y.; LAZARUS, S.A.; COELHO, D.; GOSSÉ, F.; RAUL, F. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells, **Cancer Letters**, v. 175, p.147–155, 2002.

CARRILLO, L.C.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; GIL, A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia, **Food Research International** (2013).

COOPER, K.A. et al. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.1, p.260–265, 2008.

CORTI, R.; FLAMMER, A. J.; HOLLENBERG, N. K.; LÜSCHER, T. F. Cocoa and Cardiovascular Health. **Circulation**, v.119, p.1433-1441, 2009.

CROZIER, S.J.; PRESTON, A.G.; HURST, J.W.; MARK, J.P.; MANN, J.; HAINLY, L.; MILLE, D.L. Cacao seeds are “Super Fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products. **Chemistry Central Journal**, v.5, (5), 2011.

CUNHA-SANTINO, M.B. **Atividade enzimática, cinética e modelagem matemática da decomposição de *Utricularia breviscapa* da lagoa do Oleo (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.

DI MATTIA, C.; MARTUSCELLI, C.; SACCHETTI, G.; SCHEIRLINCK, I.; BEHEYDT, B.; MASTROCOLA, D.; PITTIA, P. Effect of Fermentation and Drying on Procyanidins, Antiradical Activity and Reducing Properties of Cocoa Beans. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1-13, 2012.

DI STEFANO, R.; CRAVERO, M. C.; GENTILINI, N. **Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini**. *L'Enotecnico*, v. 25, p. 83–89, 1989.

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**, v. 229, p. 937-948, 2009.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M.; CHEN, C.Y.; MALLOY, M.J.; BROWNE, A.; CHIU, E.Y.; KWAK, H.K.; MILBURY, P.; PAUL, S.M.; BLUMBERG, J.; MIETUS-SNYDER, M.L. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, p.197-204, 2004.

FERRÃO, J.E.M. A «morte da semente» sua importância na tecnologia pós-colheita do cacau. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 31, n.1, jan. 2008.

FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. Cacao glycosidase and color changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, n. 9, p. 505-509, 1957.

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.

HANSEN, C. E.; DEL-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.

HEISS, C., KLEINBONGARD, P., DEJAM, A., PERRÉ, S., SCHROETER, H. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, p. 1276-1283, 2005.

JALIL, A.M.M., ISMAIL, A. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? **Molecules**, vol. 13, p. 2190-2219, 2008.



JOLIC', S. M., REDOVNIKOVIC', I. R., MARKOVIC', K., S'IPUS'IC', D. I., DELONG, K. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p.1793–1800, 2011.

JOURDAIN, C.; TENCA, G.; DEGUERCY, A.; TROPLIN, P.; POELMAN, D. In-vitro effects of polyphenols from cocoa and beta-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 4, p. 353-61, 2006.

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

KEALEY, K.S.; SNYDER, R.M.; ROMACZYK, L.J.; GEYER, H.M.; MEYERS, M.E.; WHITHCARE, E.J.; HAMMERSTONE, J.F.; SCHMITZ, H.H. **Cocoa Components, Edible Products Having Enriched Polyphenol Content, Methods of Making Same and Medical Uses**. USA n. PI 6.015.913. 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.

KOMES, D.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; HORŽIĆ, D.; DRMIĆ, H.; KRABAL, S.; MILIČEVIĆ, B. Bioactive and sensory properties of herbal spirit enriched with cocoa (*Theobroma cacao L.*) polyphenolics. **Food and Bioprocess Technology**, 2012.

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.

LANGE, H.; 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.

LEA, A.G.H.; FORD, G.D. **Characterization of the Polyphenols of Cocoa**, Bioflavour Conference, Glasgow; Elsevier Scientific Ltd.:London, September, p. 26-28, 1990.

LEE, K.W.; KIM, Y.J.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7292-7295, 2003.

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

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.

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.

MARTÍN, M.A.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; GRANADO-SERRANO, A.B.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7765-7772, 2008.

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

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.

OTHTMAN, A.; ISMAIL, A.; GHANI, N.A.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans, **Food Chemistry**, v. 100, p. 1523-1530, 2007.

PAYNE, M.J.; HURST, W.J.; MILLER, K.B.; RANK, C.; STUART, D.A. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cocoa beans and cocoa ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10518-10527, 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<sup>a</sup> ed., p. 297-309, 1986.

PORTER, L.J.; MA, Z.; CHEN, B.C. Cocoa procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, v. 20, p. 1657-1663, 1991.

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.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, J. M., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, n.20, p. 933-956, 1996.

SERAFINI, M.; BUGIANESI, R.; MAIANI, G.; VALTUENA, S.; DE SANTIS, S.; CROZIER, A. Plasma antioxidants from chocolate - Dark chocolate may offer its consumers health benefits the milk variety cannot match. **Nature**, v. 424, p. 1013, 2003.

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

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

STATSOFT, INC. **STATISTICA (data analysis software system)**, versão 7.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), 2004.

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

SUN, T.; XU, Z.; WU, C.T.; JANES, M., PRINYAWIWATKUL, W., NO, H.K. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 98–102, 2007.

SUN-WATERHOUSE, D.; WADHWA, S.S. Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: a review. **Food and Bioprocess Technology**, Doi:10.1007/s11947-012-0829-2, 2012.

THOMPSON, S.S.; MILLER, K.B., LOPEZ, A.S. COCOA AND COFFEE. IN M. P. DOYLE, M. P. BEUCHAT, & T. J. MONTVILLE (Eds.), **Food microbiology, fundamentals and frontier**, p. 721–733, 2001.

TOMÁS-BARBERÁN, F.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; MARÍN, A.; MUGUERZA, B.; GIL-IZQUIERDO, A.; CERDÁ, B.; ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J., IBARRA, A.; PASAMAR, M.A.; RAMÓN, D.; ESPÍN, J.C. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3926–3935, 2007.

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

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

## CAPÍTULO IV

### IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS NAS SEMENTES DE CACAU FERMENTADAS (*Theobroma cacao* L.)

#### 1. INTRODUÇÃO

As aminas biogênicas, assim como as poliaminas, fazem parte de um grupo maior denominado de aminas bioativas. São compostos orgânicos nitrogenados que participam de processos metabólicos normais de animais, plantas e microrganismos (HALÁSZ et al., 1994; BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996). Sua formação ocorre durante o metabolismo normal em todos os seres vivos, sendo que sua principal via de formação é a descarboxilação de aminoácidos, seja por hidrólise ou decomposição térmica de compostos nitrogenados (HALÁSZ et al., 1994; BARDÓCZ, 1995). As aminas bioativas exercem diversas funções importantes, dentre elas, as poliaminas atuam como fator de crescimento celular e as aminas biogênicas são vasoconstritoras ou neuroativas (SHALABY, 1996).

Independente do tipo de alimento, altos níveis de aminas biogênicas têm sido apontados em produtos resultantes de fermentação. A produção destas aminas em alimentos é característica de uma série de microrganismos capazes de descarboxilar aminoácidos e de bactérias lácticas (LORET et al., 2005). No processo fermentativo, essa produção é facilitada, pois na maioria das vezes oferece substrato (aminoácidos livres) e condições favoráveis para a sua formação (ROMERO et al., 2003). Dentre as classificações feitas para as aminas bioativas, a que possui relevância para a saúde humana são as do grupo funções fisiológicas, poliaminas e aminas biogênicas, as quais serão abordadas neste estudo.

Durante a fermentação do cacau, várias modificações químicas e bioquímicas responsáveis pela formação dos precursores do sabor de chocolate ocorrem (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; LUNA et al., 2002; NIELSEN et al., 2008). A presença de poliaminas no chocolate pode ser benéfica pelas propriedades antioxidantes que estas oferecem. Ainda a presença de pequenas quantidades de feniletilamina, tem sido associada a propriedades afrodisíacas do chocolate. Entretanto, a presença desta amina aromática e de outras como tiramina, triptamina podem causar enxaqueca (COCHRANE, 1970; SANDLER; YODIM; HANINGTON,

1974; HALÁSZ et al., 1994; LIMA; GLÓRIA, 1999) se estiverem em concentrações elevadas.

Baseado no exposto, o conhecimento da possibilidade de formação de aminos bioativas durante a fermentação do cacau se faz necessário, principalmente pelo fato de se ter escassez de estudos sobre o perfil e os teores de aminos bioativas no processo de fermentação das sementes de cacau. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi identificar as possíveis aminos presentes em sementes fermentadas de cacau e determinar o perfil e os teores de aminos bioativas dessas sementes ao longo de sete (7) dias de fermentação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. MATERIAL**

#### **2.1.1. Amostras**

Foram utilizados frutos de cacauzeiro colhidos em março de 2013 e provenientes da Ilha do Combu (01°31'S, 48° 29'W). Os frutos foram partidos após 24 horas da colheita e as sementes com polpa foram separadas, misturadas a folhas de bananeira proveniente do Campus da Universidade Federal do Pará (Latitude 01°27'21", Longitude 48°30'16"), e submetidas imediatamente à fermentação, durante 7 (sete) dias. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 h durante o período de fermentação em diferentes pontos das caixas (meio, fundo e superfície – regiões centrais e diagonais) a fim de se obter uma amostra representativa do processo de fermentação e foram congeladas (-18°C). A amostra utilizada para a realização da análise foram os cotilédones da semente de cacau fermentada, que foram triturados em processador de alimentos, moídos em almofariz e peneirados com peneiras de 40 mesh, a fim de se obter uma granulometria mais homogênea.

#### **2.1.2. DETERMINAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS**

As aminas foram extraídas da seguinte forma: 5 g de amostra foram pesadas em balança analítica Sartorius Basic (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha) e, em seguida, adicionou-se 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. As amostras foram homogeneizadas e levadas a agitação em mesa agitadora (Tecnal, modelo TE-140, Piracicaba, Brasil) durante 5 minutos, seguida de centrifugação em centrífuga refrigerada Jouan Thermo MR23i (França) a 11180 g a 4 °C por 10 minutos. O processo foi repetido por mais duas vezes adicionando-se ao resíduo, 7 e 6 mL de TCA, respectivamente. Após as centrifugações e filtrações, os sobrenadantes foram combinados, em balão volumétrico de 25 mL, o volume foi ajustado e filtrado em papel filtro qualitativo (ADÃO; GLÓRIA, 2005).

### 2.1.3. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS

Dez aminas bioativas foram pesquisadas, são elas: espermidina, espermina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina. A metodologia utilizada para a separação, detecção e quantificação das aminas foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa. O cromatógrafo utilizado foi o modelo LC-10AD com câmara de mistura à alta pressão, conjunto de lavagem automática de pistão e injetor automático modelo SIL-10AD VP (Shimadzu, Kioto, Japão). As amostras foram filtradas imediatamente antes da injeção, utilizando-se membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA).

Para a separação das aminas foram empregadas duas fases móveis: fase móvel A, solução tampão contendo acetato de sódio 0,2 mol/L e octanossulfonato de sódio 15 mmol/L, com pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial; e fase móvel B – acetonitrila (ADÃO; GLÓRIA, 2005).

A quantificação foi feita por fluorimetria utilizando 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, após derivação com *o*-ftalaldeído. A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna em um tubo de teflon de 2m de comprimento conectando a câmara de mistura ao detector de fluorescência. A solução derivante, preparada diariamente e mantida sob abrigo da luz, consistia de 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol, diluídos em solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio para 500 mL de água (pH 10,5 a 11,0). Foram adicionados a esta solução 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol (ADÃO; GLÓRIA, 2005).

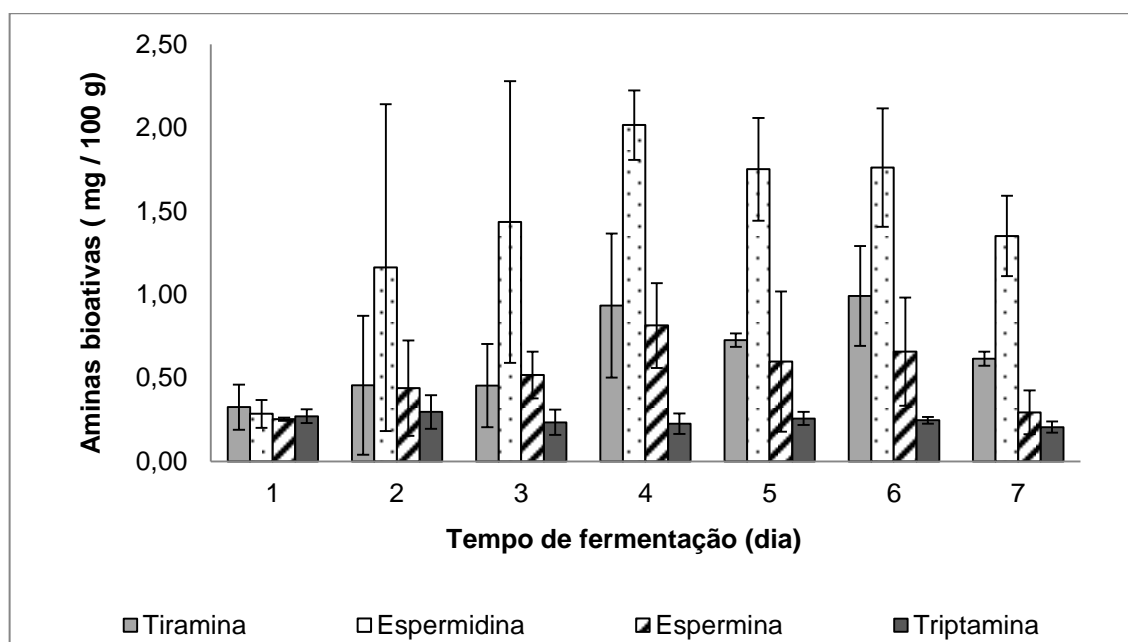
A identificação das aminas foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. Soluções padrão foram também analisadas, intercaladas às amostras. A quantificação de aminas foi feita por interpolação em curva padrão externa baseada na relação área do pico versus concentração obtida para cada amina, sendo os resultados expressos em mg/100 g.

### 3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As análises foram realizadas em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão), e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, com o auxílio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 2004) empregando as seguintes metodologias estatísticas: Análise de variância (ANOVA) a 5% de significância; Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as dez aminas bioativas investigadas nas sementes de cacau fermentadas, somente 4 (quatro) foram identificadas, são elas, espermidina, espermina, tiramina e triptamina. Na Figura IV.1, estão os teores destas aminas encontrados na semente de cacau fermentada. As demais aminas pesquisadas – putrescina, serotonina, feniletilamina, cadaverina, histamina e agmatina – não foram detectadas em nenhuma das amostras.



**Figura IV. 1.** Aminas bioativas detectadas nas sementes de cacau fermentadas

A presença de aminas biogênicas no cacau, cacau ralado e chocolate foram relatados por Pastore et al. (2005), Herraiz (2000), Kosman et al. (2007). Oracz e Nebesny (2014) reportam que a amina predominante em sementes de cacau secas e fermentadas foi tiramina, o que representou cerca de 32% do total



níveis de aminas biogênicas e verificou que o cacau Forasteiro do Brasil apresenta 0,083 mg/100g em base seca e desengordurada desta amina.

A triptamina possui ação farmacológica similar à tiramina. Altos níveis podem exercer efeitos diretos na musculatura lisa, causar dor de cabeça e aumentar a pressão sanguínea pela constrição do sistema vascular (VANDERKERCKHOVE, 1977; SMITH, 1980-1981). Assim como a tiramina, os teores de obtidos na semente de cacau ao longo da fermentação ficaram abaixo das doses consideradas tóxicas.

Schwan e Wheals (2004) afirmam que para se ter uma boa fermentação, leveduras, bactérias lácticas e as bactérias acéticas são cruciais para esse processo. Os teores de tiramina encontrados na semente de cacau fermentada ficaram abaixo das doses consideradas tóxicas, mas é importante ressaltar que a fermentação é a primeira etapa a ser empregada na fabricação de chocolate, pois o mesmo ainda precisa passar pelos processos de secagem e torração para adquirir sabor. Por isso, poder haver ainda uma elevação nos teores de tiramina, assim como da triptamina, aminas biogênicas encontradas no estudo. Brink et al. (1990) relataram que produtos em que ocorre o crescimento de bactérias lácticas, há quantidades consideráveis de putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, sendo que recentemente foram identificados por Linares et al. (2010), genes produtores de aminas biogênicas em bactérias ácido lácticas. Devido a esses fatores, a fermentação das sementes de cacau pode ser considerada um meio propício para a formação de aminas biogênicas.

Oracz e Nebesny (2014) avaliaram a relação do pH com o conteúdo de aminas biogênicas, os resultados revelaram que amostras com um valor de pH no intervalo de 5,10 - 5,29 tinham um teor significativamente mais elevado de aminas biogênicas, em comparação com as amostras com pH superior a 5,58. Neste estudo, o pH variou de 4,98 - 6,56 e as maiores quantidades de aminas biogênicas foram formadas no pH 4,98 e 5,39. Glória (2005) relata que em meio ácido (pH 2,5 a 6,5), a produção de aminas é estimulada como mecanismo de proteção da bactéria ao ambiente ácido. Shukla et al., (2010) reportam que as aminas biogênicas são formadas principalmente por microorganismos, através da atividade das enzimas descarboxilases num meio ácido, com um pH ótimo entre 4,0 e 5,5.

Outro fator que ocasiona formação de amins biogênicas é a presença de aminoácidos livres, os quais servem de substrato para os microrganismos descarboxilases positivo. Glória e Vieira (2007) reportaram que aminoácidos livres podem ocorrer naturalmente em alimentos, mas também são liberados de proteínas, como resultado da atividade proteolítica ou degradação térmica. Ao longo da fermentação do cacau, os aminoácidos livres e peptídeos são formados por reações enzimáticas proteolíticas (VOIGT; BIEHL; HEINRICHS, 1993) e o acúmulo de destes, tais como leucina, alanina, fenilalanina, e tirosina contribuem para a formação do sabor do cacau e são desenvolvidos durante a fermentação do cacau (MOHR; LANDSCHREIBER; SEVERIN, 1976; KIRCHHOFF et al., 1989). Nas sementes de cacau fermentadas deste estudo foi identificada a tiramina, proveniente possivelmente da descarboxilação da tirosina (aminoácido livre).

A identificação das poliaminas, espermidina e espermina era esperada, pois de acordo com Bardócz (1995) e Eliassen et al. (2002) essas amins são predominantes em vegetais. Interessante observar que em todas as amostras analisadas, a precursora putrescina não foi detectada, o que indica que esta amina se mantém em níveis muito baixos, inferiores ao limite de detecção da técnica.

Em alimentos fermentados, triptofano é transformado em amins biogênicas tais como triptamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) (SILLA-SANTOS, 1996; KANG et al. 2007) essas, são substâncias psicoativas e vasoativas que podem afetar as funções do sistema nervoso central (SHALABY, 1996). A presença dessas duas amins tem sido reportadas no cacau (BAKER et al., 1987; HURST; TOOMEY, 1981; PASTORE et al., 2005), porém no presente estudo somente a triptamina foi identificada.

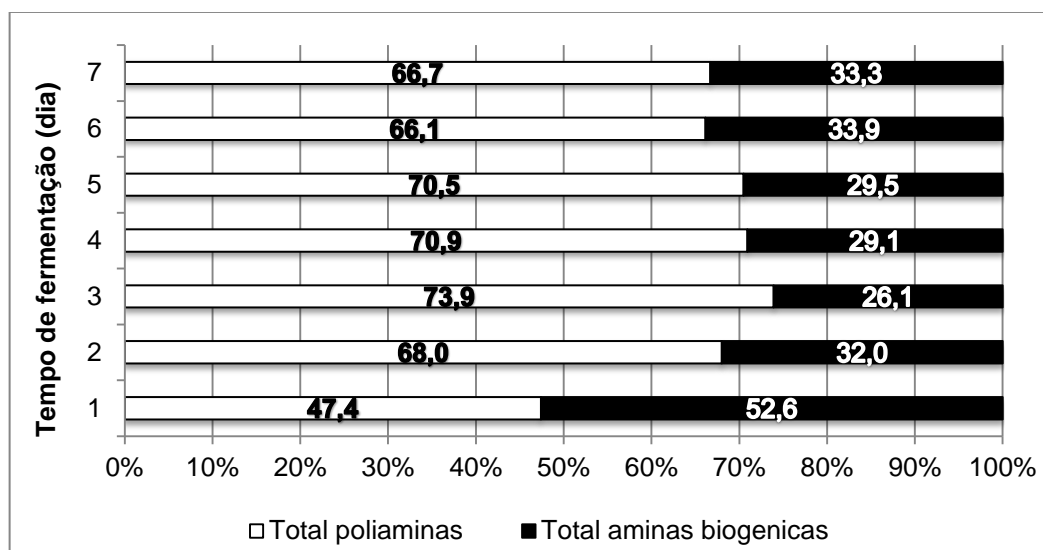
A presença de poliaminas em alimentos é importante, pois participam de processos fisiológicos em animais e vegetais, sendo que espermina e a espermidina são indispensáveis às células vivas por estarem diretamente envolvidas com o crescimento, renovação e metabolismo celular (LIMA; GLÓRIA, 1999). E também pelo fato de apresentarem um caráter antioxidante, onde essa atuação como antioxidante está diretamente correlacionada com a quantidade de aminogrupos, aumentando da espermidina para a espermina grupamentos amino. Desta forma,

as frutas que são fontes significativas das poliaminas podem atuar como importantes antioxidantes na dieta (LOVAAS, 1997).

Alguns estudos têm demonstrado que as poliaminas presentes, por exemplo, no leite humano podem estimular a proliferação e a maturação do epitélio do trato gastrintestinal em recém-nascidos (BLACHIER et al., 1992; BUTS, 1998; DELOYER; PEULEN; DANDRIFOSSE, 2001), estes benefícios destacam a importância de sua presença em alimentos.

Estudo realizado por Carnésecchi et al. (2002) revela que o metabolismo de poliaminas pode ser um alvo importante nos efeitos anti-proliferativos dos polifenóis de cacau em células cancerígenas do cólon humano.

Na Figura IV.2, pode ser visualizada a contribuição de poliaminas e de aminos biogênicas ao teor total em função do tempo de fermentação, e pode-se concluir que as poliaminas contribuíram mais do que as aminos biogênicas ao teor total no processo fermentativo.



**Figura IV. 2.** Contribuição de poliaminas e de aminos biogênicas ao teor total em função do tempo de fermentação.

Pelo fato das poliaminas terem maior contribuição que as aminas biogênicas nas sementes de cacau fermentadas, é importante destacar que poliaminas também atuam como fatores de crescimento, por isso é necessário verificar se nas outras etapas do processamento do cacau (secagem e torração) haverá o aumento ou a diminuição destes compostos, alimentos ricos com estas substâncias são importantes no crescimento e na manutenção da saúde, entretanto, no caso do indivíduo ter câncer, os fatores de crescimento devem ser retirados da dieta, e, desta forma, alimentos ricos em poliaminas devem ser evitados (BARDÓCZ, 1995; LIMA; GLÓRIA, 1999; ELIASSEN et al., 2002; CIPOLLA; HAVOUIIS ; MOULINOX, 2010). A combinação de tratamentos farmacológicos com um inibidor da ornitina descarboxilase (ODC) (GAMET et al, 1991; SLOTKIN et al., 2000) e dieta livre de poliaminas, pode ser crucial para redução do crescimento tumoral (BACHRACH, 2004).

As poliaminas podem ter contribuído mais, mas a presença de aminas biogênicas, é algo a ser discutido, onde o consumo de alimentos com estes compostos podem induzir a ocorrência de enxaqueca, por isso indivíduos em tratamento com medicamentos inibidores da monoaminoxidase (IMAO), como os antidepressivos, o antituberculose devem evitar o consumo de alimentos com essas substâncias, pois pode ocorrer crise hipertensiva (GLÓRIA, 2005).

## 5. CONCLUSÃO

Dentre as dez aminas pesquisadas, foram encontradas nas sementes de cacau fermentadas, as poliaminas espermidina e espermina e as aminas biogênicas tiramina e triptamina.

A espermidina foi a amina predominante nas sementes de cacau analisadas, seguida da tiramina, espermina e triptamina.

As poliaminas contribuíram de forma mais significativa na fermentação das sementes de cacau, essa presença pode ser benéfica devido às propriedades antioxidantes que estas oferecem.

Os teores de tiramina obtidos na semente de cacau ao longo da fermentação ficaram abaixo das doses consideradas tóxicas.

Os relatos na literatura sobre o perfil e teores de aminas bioativas na fermentação são bastante escassos, por isso esta pesquisa foi de suma importância. Mas é importante ressaltar que a fermentação é apenas uma das etapas para obtenção de produtos derivados de cacau, pois as sementes fermentadas precisam ainda passar por outros processos tecnológicos, como a secagem e torração onde nessas etapas pode ocorrer a elevação ou diminuição de aminas bioativas, por isso é interessante que sejam realizados outros estudos sobre como as aminas bioativas se comportam ao longo do beneficiamento do cacau até chegar aos seus inúmeros subprodutos para garantir a presença destes compostos em níveis seguros para o consumidor, já que segurança alimentar é requisito básico que deve sempre ser satisfeito na produção de alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÃO, R.C.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of Prata Banana (*Musa acuminata* X *Musa Balbisiana*). **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 705-711, 2005.

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.

BACHRACH U. Polyamines and cancer: minireview article. **Amino Acids**, v. 26, n.9, p. 307, 2004.

BAKER, G.B.; WONG, J.T.F.; COUTTS, R.T.; PASUTTO, F.M. Simultaneous extraction and quantitation of several bioactive amines in cheese and chocolate. **Journal of Chromatography**, v. 392, p. 317-33, 1987.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.

BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D. S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food - implications for growth and health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 66-70, 1993.

BLACHIER, F.; M'RABET-TOUIL, H.; POSHO, L.; MOREL, M.T.; BERNARD, F., DARCY-VRILLON, B., DUEE, P.H. Polyamine metabolism in enterocytes isolated from newborn pigs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.6, n.21 p. 1175, 1992.

BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.L.J.; VELD, J.H.J.H. Occurrence and formation of biologically active amines in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p.73-84, 1990.

BUTS, J.P. Les facteurs trophiques du lait. **Arch Pediatr**, v. 5, p. 298–306, 1998.

CAMU, N.; WINTER, T.; VERBRUGGHE K.; CLEENWERCK I.; VANDAMME P.; TAKRAMA, J.S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n.6, p. 1809-1824, 2007.

CARNÉSECCHI, S.; SCHNEIDER, Y.; LAZARUS, S.A.; COELHO, D.; GOSSÉ, F.; RAUL, F. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells, **Cancer Letters**, v. 175, p.147–155, 2002.

CIPOLLA, B.G.; HAVOUIIS, R.; MOULINOX.J.P. Polyamine reduced diet (PRD) nutrition therapy in hormone refractory prostate cancer patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 2, p. 1010-1016, 2010.

COCHRANE, A. L. **Editor**, "Background to Migraine, 3rd Migraine Symposium," Heinemann, London, 1970, p. 113.

DELOYER, P.; PEULEN, O.; DANDRIFOSSE, G. Dietary polyamines and non-neoplastic growth and disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, p.1027-32, 2001.

ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H.F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v. 78, p. 273-280, 2002.

GAMET, L.; CAZENAVE, Y.; TROCHERIS, V.; DENIS-POUXVIEL, C.; MURAT, J.C. Involvement of ornithine decarboxylase in the control of proliferation of the HT29 human colon cancer cell line. Effect of vasoactive intestinal peptide on enzyme activity. **International Journal of Cancer**, v.8, n. 47, p. 633, 1991.

GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v.4, p. 1-38, 2005.

GLÓRIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food**, v. 1, n. 2, p. 258–270, 2007.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42–49, 1994.

HURST, W.J.; TOOMEY, P.B. Analysis of phenylethylamine and other biogenic amines in chocolate. **Analyst**, v. 106, p. 394-402, 1981.

KANG, S.; KANG, K.; LEE, K.; BACK, K. Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 2009–2015, 2007.

KIRCHHOFF P.M.; BIEHL, B.; ZIEGELER-BERGHAUSEN, H.; HAMMOOR, M.; LIEBEREI, R. Kinetics of the Formation of Free Amino Acids in Cocoa Seeds during Fermentation. **Food Chemistry**, v.34, p. 161-179, 1989.

KOSMAN, V.M.; STANKEVICH, N.M.; MAKAROV, V.G.; TIKHONOV, V.P. Biologically active substances in grated cocoa and cocoa butter. **Voprosy Pitaniia**, v. 76, n. 3, p. 62–67, 2007.

LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, v. 23, n. 01, p. 87-95, 2007.

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 1, p.70-79, 1999.

LINARES, D.M.; CRUZ MARTÍN, M.; LADERO, V.; ALVARES, M.A.; FERNÁNDEZ, M. Biogenics amines in dairy products. **Critical reviews Food Science Nutrition (in press)**. 2010

LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: data from Belgian samples. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 519-525, 2005.

LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. **British Journal of Nutrition**, v.84, p. 55-58, 2000.

LOVAAS, E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. **Advance in Pharmacology**, v.38, p.119–149, 1997.

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

MENDONÇA, A.C. Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2009. 86p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

MOHR, W.; LANDSCHREIBER, E.; SEVERIN, T. Zurspezifität des kakaoaromas. **FetteSeifenAnstrichmittel**, v. 78, n.2, p. 88-95, 1976

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases, *Clinical Nutrition*, v. 24, p. 184 –197, 2005.

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.

ORACZ, J., NEBESNY, E. Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different Theobroma cacao cultivars. **Food Research International**, v. 55, p. 1–10, 2014.

PASTORE, P.; FAVARO, G.; BADOCCO, D.; TAPPARO, A.; CAVALLI, S.; SACCANI G. Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode. **Journal of Chromatography A**, v.1098, p.111–115, 2005.

ROMERO, R.; BAGUR, M.G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M.; GÁZQUEZ, D. Influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 162-167, 2003.

SANDLER, M.; YODIM, M.B.H.; HANINGTON, E. **Nature (London)**, v. 250, p. 335, 1974,

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

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

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675-690, 1996.



SHUKLA, S.; PARK, H.K.; KIM, J.K.; KIM, M. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1191–1195, 2010.

SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2/3, p. 213-231, 1996.

SLOTKIN, T.A.; FERGUSON, S.A.; CADA, A.M.; MCCOOK, E.C.; SEIDLER, F.J. Neonatal polyamine depletion by difluoromethylornithine: effects on adenylyl cyclase cell signaling are separable from effects on brain region growth. **Brain Research**, v. 22, n. 16, p. 887, 2000.

SMITH, T.A. Amines in food. **Food Chemistry** v. 6, p.169–200, 1980–1981.

STATSOFT, INC. **STATISTICA (data analysis software system)**, versão 7.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), 2004.

THOMPSON, S.S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A.S. COCOA AND COFFEE. IN M. P. DOYLE, M. P. BEUCHAT, & T. J. MONTVILLE (Eds.), Food microbiology, fundamentals and frontier. **Washington, DC: American Society for Microbiology**, p. 721–733, 2001.

VANDERKERCKHOVE, P. Amines in dry fermented sausage. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 83-285, 1977.

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

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, p. 423–447, 2000.