



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
Departamento de Ciências Naturais
Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74 –
Fábricas, São João del-Rei – MG CEP 36301-160
Secretaria: Sala A-2.17 Tel.: (32) 3379-5143
E-mail: ppgmq@ufs.edu.br



**PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO
EM QUÍMICA
DE MINAS GERAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

GABRIELA CRISTINA ELIAS

**MELHORIA DE *FLAVOR* DE AMÊNDOAS DE CACAU VIA
PROCESSO FERMENTATIVO**

DIVINÓPOLIS-MG
AGOSTO/2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
Departamento de Ciências Naturais
Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74 –
Fábricas, São João del-Rei – MG CEP 36301-160
Secretaria: Sala A-2.17 Tel.: (32) 3379-5143
E-mail: ppgmq@ufs.edu.br



**PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO
EM QUÍMICA
DE MINAS GERAIS**

GABRIELA CRISTINA ELIAS

MELHORIA DE *FLAVOR* DE AMÊNDOAS DE CACAU VIA PROCESSO FERMENTATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Ferreira Perez Villar.

DIVINÓPOLIS

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E42m Elias, Gabriela Cristina .
MELHORIA DE FLAVOR DE AMÊNDOAS DE CACAU VIA
PROCESSO FERMENTATIVO / Gabriela Cristina Elias ;
orientador JOSÉ AUGUSTO FERREIRA PEREZ VILLAR. --
Divinópolis, 2023.
64 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Química de Minas Gerais) --
Universidade Federal de São João del-Rei, 2023.

1. Cacau, Fermentação, Polifenóis, Chocolate.. I.
FERREIRA PEREZ VILLAR, JOSÉ AUGUSTO, orient. II.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS GERAIS

HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado Nº 21 / 2023 - PPGMQ-MG (13.31)

Nº do Protocolo: 23122.034989/2023-79

São João del-Rei-MG, 05 de setembro de 2023.

A dissertação **?MELHORIA DE FLAVOR DE AMÊNDOAS DE CACAU**

VIA PROCESSO FERMENTATIVO?, elaborada por **Gabriela Cristina Elias** e aprovada por

todos os membros da banca examinadora, foi aceita pelo Programa de Pós-graduação Multicêntrico

em Química de Minas Gerais, da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito parcial à

obtenção do título de

MESTRE EM QUÍMICA

(Assinado digitalmente em 05/09/2023 14:44)
JOAQUIM MAURICIO DUARTE ALMEIDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CCO (10.02)
Matrícula: 1908201

(Assinado digitalmente em 06/09/2023 13:10)
JOSE AUGUSTO FERREIRA PEREZ VILLAR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGCS (13.06)
Matrícula: 1675886

(Assinado digitalmente em 05/09/2023 17:46)
BRUNO GONÇALVES BOTELHO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 068.384.256-02

Visualize o documento original em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **21**, ano: **2023**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE**
MESTRADO, data de emissão: **05/09/2023** e o código de verificação: **9cfaade9ee**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Wandeir e Andréa e aos meus irmãos Leandro e Cristiane pelo amor, incentivo e por todo apoio de sempre em tudo que proponho a fazer.

Ao meu noivo Marco Aurélio pelo companheirismo, dedicação, incentivo e paciência durante esses anos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Augusto Ferreira Perez Villar pelos inúmeros ensinamentos, pela amizade, pela paciência durante todos esses anos de mestrado e por aceitar me orientar nessa área que era um sonho mesmo antes de me inscrever para o programa.

Agradeço à minha tia Michele que acreditou em mim desde o começo e sempre me incentivou nos estudos.

Agradeço à minha amiga Carol que estudou comigo para a prova, me auxiliou nas correções com todo seu conhecimento da área acadêmica e que me apoiou durante todo mestrado e não me deixou desistir no meio do caminho.

Agradeço às minhas amigas Andrea, Taly e Daiane pela paciência e palavras de consolo nos momentos difíceis.

Agradeço aos colegas China, Luciano e Gustavo por me auxiliar no laboratório e nas disciplinas do programa, pela nossa amizade e troca de informações.

Agradeço à Maria Juliana pelo acompanhamento na central analítica, pela amizade e por todo conhecimento compartilhado ao longo desse tempo.

Agradeço ao Prof. Dr. Joaquim, aos seus alunos Brayan e Lucas que me auxiliaram nas análises de fenólicos totais e HPLC. E ao Prof. Diogo do Departamento de Química da UFMG que me auxiliou na extração dos compostos voláteis.

Agradeço à Adriana Reis e à equipe do Centro de Inovação do Cacau que se disponibilizaram a realizar a análise sensorial dos lotes de chocolate. Gratidão por antes de tudo, me ensinar a fabricar chocolate e a instigar minha curiosidade para que agora eu pudesse realizar este estudo e seguir produzindo chocolates da minha própria marca.

Agradeço à Kênia e Débora do setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa – Campus Florestal que realizaram as análises físico-químicas

dos chocolates e às agências CNPq e FAPEMIG, financiadoras dos equipamentos utilizados para tal.

À minha colega de trabalho e parceira Cíntia Palhares que me apoiou moralmente durante esses anos e foi meu exemplo de persistência diante das dificuldades. Obrigada por dividir o trabalho para que pudesse me dedicar à pesquisa e me auxiliar com toda sua experiência na área acadêmica.

Por fim, agradeço também ao PPGMQ/Rede Mineira de Química pela minha formação científica e pelo excelente trabalho prestado para a sociedade.

RESUMO

O presente estudo propõe uma fermentação secundária em amêndoas já fermentadas e secas pelo processo tradicional em fazenda da região sul da Bahia com o intuito de promover a melhoria do *flavor* e, conseqüentemente, o sensorial de chocolates com alto teor de cacau. O procedimento de fermentação foi conduzido com amêndoas de cacau da variedade forastero utilizando cana-de-açúcar como meio de cultura e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que são popularmente utilizadas em fabricação de bebidas alcoólicas, sendo realizado em temperatura ambiente. Após a fermentação, as amêndoas foram torradas e secas para a fabricação de duas bateladas de chocolates 70% cacau: a primeira elaborada com amêndoas de cacau refermentadas e a segunda com amêndoas de cacau fermentadas somente pelo processo tradicional das fazendas. Posteriormente à fabricação do chocolate, foram realizados os doseamentos dos fenólicos e taninos totais no qual foi percebido um aumento nas quantidades desses compostos após o procedimento desenvolvido. Análises sensoriais para os dois lotes de chocolate apontaram melhorias como redução de *off-flavors*, atributos especiais de sabor e redução do amargor. Além disso, foram realizadas análises qualitativas por cromatografia líquida de alta eficiência para identificação dos principais compostos fenólicos e alcaloides presentes no chocolate. Tais compostos são objeto de estudo atualmente devido às suas propriedades benéficas em relação à saúde e interferência diretamente em características sensoriais negativas para os chocolates com alto teor de cacau. Análises físico-químicas não apresentaram diferenças significativas nos percentuais de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos. Além disso, foi possível analisar a capacidade antioxidante de ambos os lotes de chocolate sendo que a segunda fermentação não interferiu no potencial antioxidante dos produtos.

Palavras-chave: Cacau, Fermentação, Polifenóis, Chocolate.

ABSTRACT

The present study proposes a secondary fermentation in almonds already fermented and dried by the traditional process on a farm in the southern region of Bahia in order to promote the improvement of the flavor and, consequently, the sensory of chocolates with high cocoa content. The fermentation procedure was carried out with cocoa beans of the forastero variety using sugar cane as a culture medium and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts that are popularly used in the manufacture of alcoholic beverages, being carried out at room temperature. After fermentation, the beans were roasted and dried to manufacture two batches of 70% cocoa chocolates: the first made with refermented cocoa beans and the second with cocoa beans fermented only by the traditional process on the farms. After the manufacture of chocolate, the dosages of phenolics and total tannins were carried out, in which an increase in the amounts of these compounds was noticed after the procedure developed. Sensory analyzes for the two batches of chocolate showed improvements such as reduction of off-flavors, special flavor attributes and reduction of bitterness. In addition, qualitative analyzes were carried out using high performance liquid chromatography to identify the main phenolic compounds and alkaloids present in chocolate. Such compounds are currently the subject of study due to their beneficial properties in relation to health and direct interference in negative sensory characteristics for chocolates with high cocoa content. Physical chemical analyzes did not show significant differences in the percentage of moisture, ash, proteins and lipids. In addition, it was possible to analyze the antioxidant capacity of both batches of chocolate and that the second fermentation did not interfere with the antioxidant potential of the products.

Keywords: Cocoa, Fermentation, Polyphenols, Chocolate.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BA	Bahia
BPA	Bisfenol A
Bx	Brix
Ca	<i>Circa</i> (aproximadamente)
CD	Chocolate Desengordurado
CIC	Centro de Inovação do Cacau
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos
°C	Graus celsius
CuSO₄	Sulfato de cobre II
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG	Equivalente Ácido Gálico
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (por exemplo)
E	Extrato alcoólico de polifenóis
g	Grama
G	Giro
H	Hora
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
H₂BO₃	Ácido Bórico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kg	Quilograma
L	Litro
mAU	Absorbância da luz UV
mg	Miligramas
min	Minutos
mm	Milímetros
mL	Mililitros
m³	Metros cúbicos
nm	Nanômetros

N	Nitrogênio
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
Na₂SO₄	Sulfato de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH₃	Amônia
Pet	Polietileno tereftalato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
rpm	Rotação por minuto
RT	Retention Time
STD	Standards (padrões)
TFA	Ácido Trifluoracético
UV-vis	Ultravioleta – visível
%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
μm	Micrômetros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cacaueiro com frutos da variedade CEPEC 2022 (forastero)	14
Figura 2 - Processo de fermentação de sementes de cacau em cochos de madeira cobertos com folhas de bananeira	17
Figura 3 - Secagem de amêndoas de cacau em barcaças (plataformas de madeira)	18
Figura 4 - Fluxograma de fabricação de chocolate a partir de amêndoas fermentadas e secas de cacau.....	19
Figura 5 - Estrutura molecular (+)-catequina, (-)-epicatequina, proantocianidina B1 e proantocianidina B2.....	23
Figura 6 - Moléculas de teobromina e cafeína	25
Figura 7 - Esquema de reação de formação de iminas durante a reação de Maillard.....	26
Figura 8 - Resultado da análise sensorial da relação de atributos e notas para amostra de chocolate processado com amêndoas tradicionais (lote 01921).	30
Figura 9 - Resultado da análise sensorial da relação de atributos e notas para amostra de chocolate processado com amêndoas refermentadas (lote 01721)..	30
Figura 10 - Perfil cromatográfico das amostras de extratos fenólicos dos lotes de chocolate 01721 (refermentado) e 01921 (tradicional).....	32
Figura 11 - Perfil cromatográfico dos padrões de teobromina, catequina, cafeína e epicatequina.	33
Figura 12 - Cromatograma do lote de chocolate 01721 (refermentado) e o mesmo lote adicionado dos padrões (STD) de teobromina (1), catequina (2), cafeína (3) e epicatequina (4).....	33
Figura 13 - Cromatograma do lote de chocolate 01921 (tradicional) e o mesmo lote adicionado dos padrões (STD) de teobromina (1), catequina (2), cafeína (3) e epicatequina (4).....	34
Figura 14 - Densidade ao longo do processo de fermentação de amêndoas secas de cacau forastero.....	39
Figura 16 – Espectro UV-vis do padrão de teobromina.....	61
Figura 17 - Espectro UV-vis do padrão de catequina.....	61
Figura 18 - Espectro UV-vis padrão de epicatequina	61

Figura 19 - Espectro UV-vis padrão de cafeína.....	61
Figura 20 - Espectro UV-vis do pico 1 da amostra de chocolate do lote 01721 (refermentado), característico de teobromina.....	62
Figura 21 - Espectro de UV-vis do pico 2 da amostra de chocolate do lote 01721, característico de catequina.....	62
Figura 22 - Espectro UV-vis do pico 3 da amostra de chocolate do lote 01721, característico de cafeína	62
Figura 23 - Espectro UV-vis do pico 4 da amostra de chocolate do lote 01721, característico de epicatequina.....	62
Figura 24 - Espectro UV-vis do pico 1 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de teobromina	63
Figura 25 - Espectro UV-vis do pico 2 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de catequina.....	63
Figura 26 - Espectro UV-vis do pico 3 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de cafeína.....	63
Figura 27 - Espectro UV-vis do pico 4 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de epicatequina	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores de Fenólicos e Taninos Totais de amostras de chocolates e extratos de chocolate antes e depois das amêndoas refermentadas.....	31
Tabela 2 - Área dos picos dos cromatogramas referente às amostras de chocolate analisadas via CLAE-DAD.....	34
Tabela 3 – Capacidade antioxidante pela redução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) pelas amostras de chocolate em diferentes concentrações.....	35
Tabela 4 - Análises físico-químicas das amostras de chocolate com amêndoas refermentadas (01721) e com amêndoas tradicionais (01921)	36

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Manejo pós-colheita e processamento do cacau	16
1.2 Fermentação	20
1.3 Polifenóis e alcaloides do cacau	22
1.4 Compostos voláteis do cacau	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1 Refermentação.....	28
3.2 Análise Sensorial	29
3.3 Análise Química	31
3.3.1 Doseamento de fenólicos totais e taninos totais	31
3.3.2 Análise qualitativa de fenólicos e alcaloides via CLAE-DAD	32
3.3.3 Capacidade antioxidante	35
3.3.4 Composição físico-química dos chocolates	36
3.3.5 Determinação de compostos voláteis	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Fermentação	37
4.1.1 Procedimento.....	38
4.2 Secagem.....	40
4.3 Torra	40
4.4 Fabricação do Chocolate	40
4.5 Análise Sensorial	41
4.6 Extração de compostos fenólicos e alcaloides.....	42
4.7 Análise CLAE-DAD de Teobromina, cafeína, epicatequina e catequina.....	43
4.8 Doseamento de fenólicos totais e taninos totais	43

4.9	Análise da capacidade antioxidante.....	44
4.10	Análises físico-químicas.....	44
4.10.1	Determinação de perda por dessecação (umidade)	45
4.10.2	Determinação de cinzas (resíduo por incineração).....	45
4.10.3	Extração direta de lipídeos em Soxhlet.....	45
4.11	Extração de compostos voláteis.....	48
5	CONCLUSÕES	48
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7	ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

O cacau é um fruto obtido a partir da árvore da espécie *Theobroma cacao* L. Suas sementes fermentadas e secas são o principal ingrediente para fabricação de chocolates. Possui uma série de variedades sendo as mais comuns o tipo Forastero, que apresenta notas mais fortes e possui sabor amargo e adstringente; Criollo e Nacional (este segundo cultivado especialmente na região do Equador) com desenvolvimento de notas mais suaves e classificados como cacau fino; e o Trinitário, um híbrido de Forastero e Criollo que possui características intermediárias das duas variedades.¹⁻³ A figura 1 apresenta um cacaueiro carregado de frutos da variedade forastero.

Figura 1 – Cacaueiro com frutos da variedade CEPEC 2022 (forastero)



Fonte: Fazenda Estrela do Sul, Belmonte/BA (2022)

O tipo Forastero é a variedade mais comum sendo cultivado no Oeste da África, Ásia e América do Sul. Representa certa de 85 a 90% da produção mundial por ser uma variedade mais resistente a pragas e doenças como a

Vassoura de bruxa causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, sendo considerada um dos principais problemas fitossanitários da cacauicultura mundial⁴. Por possuir forte sabor amargo e adstringente, necessita de uma fermentação mais prolongada podendo chegar até 7 dias.⁵

A produção de cacau no Brasil cresceu ao longo dos séculos XVIII a XX através da boa adaptação da cacauicultura nos estados do Nordeste⁶. Na década de 80, o país se tornou um dos maiores produtores de cacau do mundo sendo o estado da Bahia um dos destaques devido à influência da cultura no desenvolvimento socioeconômico e cultural do estado⁷. No entanto, no final da década de 80 e início de 90, houve um declínio da produção motivado por vários fatores, entre eles o plantio desordenado, ausência de controle de pragas, esgotamento do solo por técnicas tradicionais de cultivo, ausência de desenvolvimento de pesquisas para melhoria da produtividade, baixa qualificação de mão de obra, más condições de trabalho, salários aos trabalhadores nas fazendas de cacau e queda dos preços internacionais, dentre outros^{8,9}.

Atualmente o Brasil é o sétimo maior produtor de cacau do mundo com cerca de 265 mil toneladas por ano sendo responsável por cerca de 4% da produção mundial, ficando atrás de Costa do Marfim (maior produtor mundial representando cerca de 39% da produção mundial), Gana, Indonésia, Nigéria, Equador e Camarões^{10,11}. Essa produção é concentrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste, entretanto, existe uma pequena parcela da produção nacional (ca. 2,8%) com plantio de cacau no Norte do Espírito Santo e de Minas Gerais. Apesar de ser o estado com maior área de plantio, a Bahia (único produtor de cacau da região Nordeste) vem sendo superado pelo estado do Pará em volume de produção devido a vários fatores, dentre eles a proliferação de pragas nas lavouras cacauíferas ocorridos desde a década de 90¹¹.

O fruto do cacauíeiro pode ser consumido de diversas formas, como por meio de sua polpa, cacau em pó, chocolates, ingredientes para misturas, etc^{12,13}. A cacauicultura vem buscando alternativas para melhorar a rentabilidade da produção nas fazendas. Uma das possibilidades que surgiram ao longo dos últimos anos foi a industrialização das amêndoas de cacau para produção de cacau fino que tem como característica aroma e sabor especial, ou seja,

desenvolvem notas de frutas, nozes, flores, etc, e que é matéria prima para a fabricação de chocolates finos.¹⁴

Chocolates com alto teor de cacau (e.g. 70% cacau) têm alta tendência de mercado devido à procura dos consumidores por produtos saudáveis e que proporcionem benefícios à saúde¹⁴. No entanto, esse tipo de chocolate possui amargor e adstringência acentuados devido à quantidade de determinados compostos, como os polifenóis e alcaloides, presentes na estrutura química da amêndoa que conferem essas características.

O desenvolvimento de culturas iniciadoras para o processo de fermentação tem ganhado destaque devido aos benefícios proporcionados como a padronização dos processos e obtenção de chocolates de elevada qualidade sensorial¹⁵. Estudos sobre algumas espécies de leveduras, como as do gênero *Saccharomyces*, demonstraram alta capacidade de produzir etanol e gerar compostos nitrogenados, relevantes precursores para a formação do aroma e sabor de chocolates especiais, por meio de hidrólise da pectina e proteínas¹⁶.

Neste sentido, a pesquisa busca desenvolver uma segunda fermentação com baixo custo e que proporcione a melhoria do *flavor* de amêndoas para fabricação de chocolates com alto teor de cacau.

1.1 Manejo pós-colheita e processamento do cacau

O beneficiamento do cacau para fabricação de chocolates inicia-se nas fazendas. Após a colheita e abertura dos frutos, as sementes juntamente com a poupa são direcionadas para rumas (amontoado de sementes de cacau sobre folhas de bananeira), caixas ou cestos para iniciar o processo de fermentação que pode durar até 6 dias dependendo da variedade de cacau.¹ A figura 2 demonstra um processo de fermentação convencional em cochos de madeira.

Figura 2 - Processo de fermentação de sementes de cacau em cochos de madeira cobertos com folhas de bananeira



Fonte: Fazenda Santa Rita, Ilhéus/BA (2022)

Durante esse processo uma sucessão de reações promovidas pelas bactérias e leveduras conferem sabor, aroma e texturas desejáveis ao produto final¹⁷. Dentre essas reações bioquímicas é possível citar a hidrólise de açúcares e proteínas, oxidação e hidrólise de polifenóis, biossíntese de alcaloides, aminoácidos e álcoois e quebra de ácidos graxos^{3,18}. Como produto dessas reações é possível citar vários compostos de sabor, como aromáticos, alifáticos, terpenos, lactonas, O-heterocíclis e compostos contendo enxofre e nitrogênio ¹⁹.

Aminoácidos livres, formados por meio da hidrólise das proteínas (e.g. leucina, alanina, fenilalanina e tirosina)²⁰ e açúcares redutores contribuem para a formação dos compostos de sabor durante as reações de Maillard que acontecem posteriormente no processo de torrefação. Ao metabolizarem os açúcares da polpa de cacau, os microorganismos proporcionam uma elevação de temperatura da massa fermentada e produção de ácidos acético e láctico. Esse aumento de temperatura promove a morte do gérmen, fazendo com que o grão perca a capacidade de germinação, geralmente nas primeiras 24 a 48h da fermentação. Neste instante, os compostos se difundem no interior da célula dando início uma sequência de reações enzimáticas que produzirão os precursores de sabor e aroma.²¹

A secagem dos grãos ocorre após a fermentação e tem como objetivo reduzir a umidade (6 a 8%), para que sejam armazenados e transportados sem a incidência de mofo, e eliminação de compostos voláteis indesejáveis como o

ácido acético. No decorrer do processo, os precursores de aroma e sabor continuam a ser formados bem como o desenvolvimento da cor dos grãos³. Nas fazendas, o processo ocorre em plataformas de madeira denominadas barcaças, onde os grãos são espalhados durante o dia para realização da secagem natural ao sol por 7 a 8 dias. Nesta etapa ocorre reações de oxidação dos polifenóis catalisadas pela enzima polifenoloxidase gerando compostos que vão contribuir para a formação do sabor na etapa subsequente.¹

Vale ressaltar que a secagem deve ser bem conduzida e realizada imediatamente após a fermentação para evitar resultados indesejáveis ao produto. Caso seja lenta, pode facilitar o crescimento de fungos que causarão toxinas prejudiciais à saúde; e se for demasiadamente rápida, com emprego de elevadas temperaturas, pode comprometer o teor de manteiga de cacau do grão fazendo com que seja migrada para testa (película que envolve o grão), sendo ambas as possibilidades interferências negativas no sabor e aroma das amêndoas¹⁸. A figura 3 representa a secagem em barcaças, uma das formas tradicionais de secagem utilizada nas fazendas de cacau.

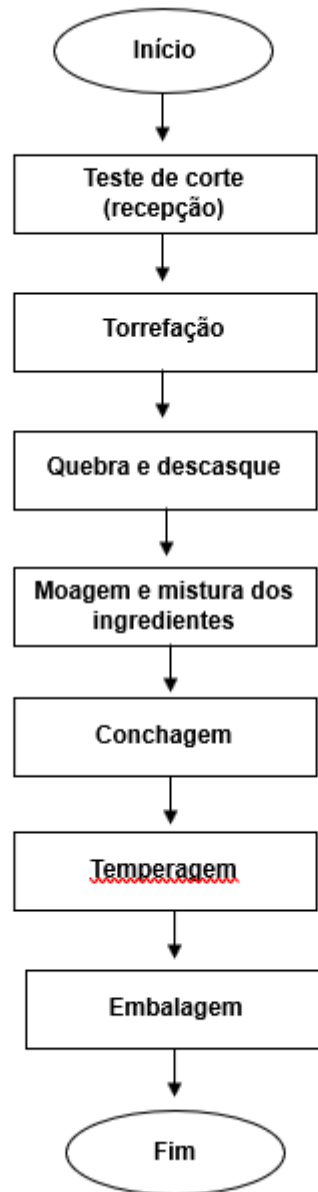
Figura 3 - Secagem de amêndoas de cacau em barcaças (plataformas de madeira)



Fonte: Fazenda Santa Rita, Ilhéus/BA (2022)

Posterior à secagem, as amêndoas são embaladas e direcionadas para as indústrias processadoras que produzirão chocolates ou produtos derivados do cacau (manteiga, cacau em pó, liquor etc.). O processo de fabricação segue do chocolate segue conforme a figura 4 a seguir.

Figura 4 - Fluxograma de fabricação de chocolate a partir de amêndoas fermentadas e secas de cacau



Ao chegar nas indústrias, o cacau recepcionado e pré-selecionado passa pelo processo de torrefação. Esta etapa tem como objetivo transformar os precursores de sabor em componentes químicos que irão caracterizar o chocolate além de eliminar potenciais microorganismos patogênicos através da alta temperatura empregada no processo e facilitar a separação da casca do nibs (conteúdo do interior da casca da amêndoa de cacau)².

Os nibs separados da casca são triturados inicialmente para posterior moagem. Ambos os processos são essenciais para quebra e liberação da gordura

de dentro das células para que estas possam revestir partículas sólidas não gordurosas do chocolate proporcionando uma mudança nas características físicas do liquor tornando-o mais espesso. A moagem ideal deve reduzir o tamanho das partículas sólidas até menos de 30 microns².

Rudi Lindt, na Suíça, inventou a concha em 1878 que deu nome ao processo de conchagem, etapa importante na fabricação do chocolate uma vez que proporciona a eliminação de compostos voláteis indesejáveis, redução da umidade e mudanças na textura e cor do chocolate como consequência da emulsificação das partículas sólidas e da gordura. O sabor é dependente do tempo e da temperatura empregada na etapa. Geralmente temperaturas mais altas requer um tempo de conchagem menor.²

O chocolate atingindo a textura adequada deve passar pelo processo de temperagem. Esta etapa consiste na cristalização controlada necessária para induzir a formação sólida da manteiga de cacau através do seu cristal mais estável. Nestas condições, a manteiga de cacau apresenta maior temperatura de fusão e diminuição de volume proporcionado pela organização dos cristais na gordura.²²

O fluxograma contido no anexo A representa o processamento do grão de cacau desde a colheita até obtenção do chocolate.

1.2 Fermentação

A fermentação é considerada um dos processos principais na fabricação de chocolate, onde acontece a morte do germen no interior dos grãos e facilita a remoção da polpa²³. Por meio dela é que os principais compostos precursores de sabor e aroma característicos do chocolate serão formados, além do desenvolvimento da cor e redução do amargor e adstringência^{17,23}. Vários fatores interferem no resultado do produto como clima, genética do fruto, microbiota da região, substrato utilizado, métodos de fermentação entre outros^{1,17,24}.

No cacau, a fermentação apresenta uma sucessão microbiana complexa e bem definida protagonizada por três principais grupos de microorganismos: leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido acéticas²⁵. Atualmente alguns fungos filamentosos tem despertado interesse por produzirem hidrolases auxiliando no processo de fermentação²⁶.

Com duração entre 48 e 72 horas após quebrar e abrir os frutos, a fase anaeróbica da fermentação é conduzida pelas leveduras, na qual ocorre o consumo de alguns ácidos orgânicos como cítrico e málico e a metabolização dos açúcares da polpa em etanol e dióxido de carbono, com aumento da temperatura e pH. A sacarose da massa de cacau é convertida em glicose e frutose através da enzima invertase, produzida por algumas leveduras.²⁷ Enzimas liberadas por esses microorganismos atacam os constituintes da pectina da parede celular das células da polpa de cacau. Com o rompimento das membranas celulares, os constituintes fluidos são liberados e ocorre o escoamento da polpa de cacau. A contínua liquefação da polpa promove vazios entre a massa de cacau ocasionando a entrada de oxigênio. A condição aeróbica da massa, elevação do pH (à medida que o ácido cítrico é consumido) e aumento do teor alcóolico levam à inibição da atividade das leveduras e finalização da fase anaeróbica.¹

O aumento da temperatura da massa também promove a oxidação dos polifenóis através da ativação da enzima polifenoloxidase, compostos naturalmente encontrados nas sementes de cacau. Durante esta fase as metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) sofrem degradação sendo exsudadas pela casca dos grãos e liberadas com os revolvimentos.^{25,28}

Alterações nos cotilédones promovidas pela degradação da parede celular das sementes e, conseqüente liberação e difusão dos compostos intracelulares liberam enzimas que possuem diferentes estabilidades e podem ser inativadas pelo calor, ácidos, polifenóis, dentre outros fatores. Durante a fermentação as enzimas aminopeptidase, invertase do cotilédone, invertase da polpa e polifenoloxidase são inativadas, a carboxipeptidase é parcialmente inativada e as endoprotease e glicosidase permanecem ativas. Na fase anaeróbica, a glicosidase participa de reações de hidrólise transformando o complexo de pigmentos em açúcares e cianidinas, a invertase hidrolisa a sacarose em frutose e glicose, a proteinase participa da reação para formação de peptídeos e aminoácidos a partir de proteínas e ocorre a conversão de polifenóis a quinonas pela polifenoloxidase. Ao final da fase anaeróbica os produtos das reações enzimáticas continuam participando de reações posteriores^{29, 1,30}

Com a diminuição das leveduras e condições favoráveis ao crescimento de bactérias do ácido láctico inicia-se a fase de condensação oxidativa, ou fase

aeróbica. O aumento da atividade microbiana provoca também o aumento de temperatura até atingir 45°C devido às reações exotérmicas, condições adequadas para o crescimento das bactérias do ácido acético que oxidam o etanol à ácido acético e posterior oxidação deste a dióxido de carbono e água. A acidez nos grãos e a alta temperatura da massa causam a morte do gérmen com difusão de componentes celulares nos cotilédones e início de uma série de reações que formarão os precursores de aroma e sabor.^{1,31,32}

Na fase aeróbica, as cianidinas e os complexos formados de proteínas e fenólicos sofrem reações oxidativas transformando a coloração violeta dos cotilédones em marrom à medida que os compostos de pigmento (cianidinas) vão reagindo. As quinonas reagem com compostos de hidrogênio, que por sua vez formam complexos com aminas, ácidos e compostos com enxofre levando à diminuição do amargor e adstringência durante a etapa de torrefação.³⁰

Alguns países utilizam técnicas variadas de fermentação de grãos de cacau. No Brasil e Malásia utilizam-se caixas de madeiras, Gana e Costa do Marfim normalmente pilhas (amontoados) de sementes de cacau, em Gana também são utilizadas bandejas e no Equador plataformas de fermentação.³³

Nos últimos anos, a utilização de leveduras como culturas iniciadoras para fermentação de cacau tem sido alvo de interesse, principalmente em relação à algumas espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida* e *Torulaspora*^{16,31,34}. A espécie de levedura que mais tem sido utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, que tem a capacidade de absorver e metabolizar açúcares redutores produzindo compostos aromáticos entre outras substâncias, além de possuir alta atividade pectinolítica e prevenir crescimento de microorganismos patogênicos^{17,35,36}.

1.3 Polifenóis e alcaloides do cacau

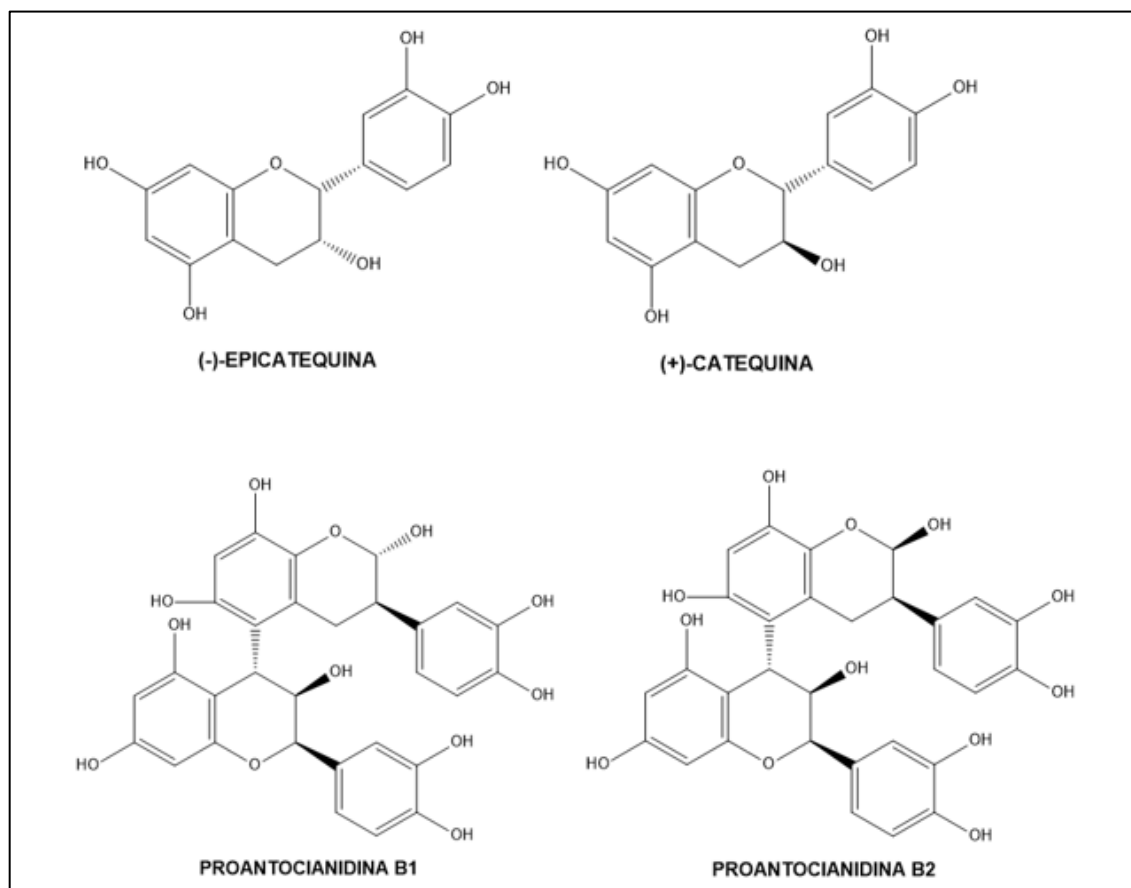
Os polifenóis ou compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas e são sintetizados por meio de duas vias principais: via do chiquimato e via do acetato. Durante décadas, despertaram interesses nos cientistas por serem essenciais à fisiologia das plantas e por suas diversas aplicabilidades como na indústria alimentícia, produção de tintas, papel etc. Alguns polifenóis, como os flavonoides têm sido aplicados como antibióticos,

agentes antidiarreicos, antiulcerosos e anti-inflamatórios assim como no tratamento de doenças como hipertensão, fragilidade vascular, alergias e hipercolesterolemia dentre outras.³⁷

Estes compostos se apresentam em suas formas simples, como os ácidos fenólicos, até formas altamente polimerizadas como os taninos, ocorrendo principalmente na forma conjugada com um ou mais resíduos de açúcar (e.g. monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos) ligados a grupos hidroxilas ou por meio de ligações diretas do açúcar ao átomo de carbono do anel aromático.³⁷

Amêndoas de cacau são ricas em polifenóis (*circa* 14 a 20% do peso do grão seco), compostos com função antioxidante³⁸. Dentre esses compostos destacam-se em maiores quantidades os flavonoides como monômeros de catequinas e epicatequinas (ca. 37%), proantocianidinas (ca. 58%) e em menor quantidade as antocianinas (ca. 4%)^{23,39,40}. A figura 5 apresenta a estrutura molecular das moléculas de (+)-catequina e (-)-epicatequina.

Figura 5 - Estrutura molecular (+)-catequina, (-)-epicatequina, proantocianidina B1 e proantocianidina B2

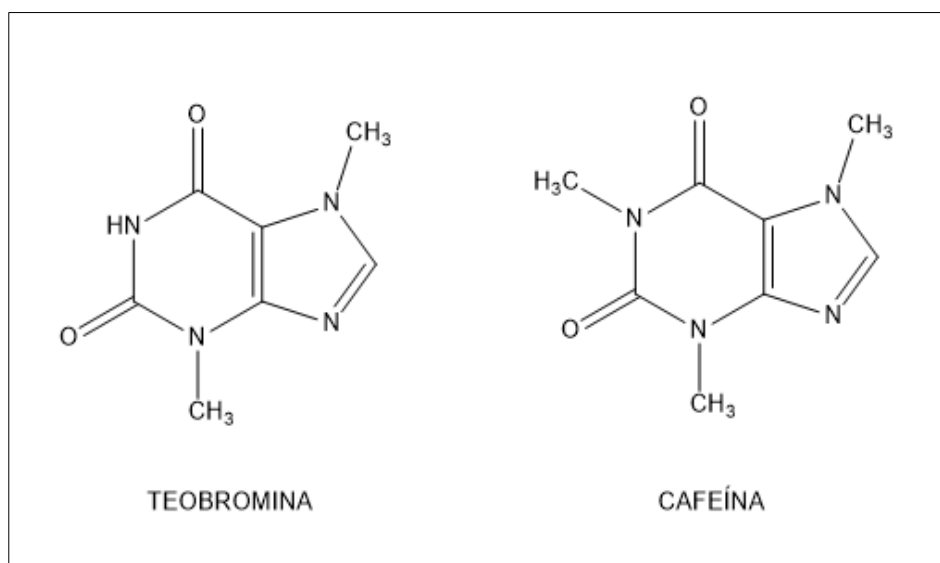


Os flavonoides (e.g. catequina, epicatequina, galocatequina) são comuns como monômeros livres e constituintes dos taninos condensados. Os taninos (e.g. proantocianidinas) são moléculas hidroxiladas capazes de complexar com proteínas e carboidratos formando compostos insolúveis sendo responsáveis pela adstringência dos alimentos ricos dessas moléculas, devido à precipitação de proteínas salivares. As antocianinas, responsáveis pela cor, representam o grupo mais importante de pigmentos de plantas e frutos. Estas por sua vez podem se condensar com outros flavonoides dando origem a pigmentos poliméricos.³⁷

As células de pigmento presentes nos cotilédones dos grãos de cacau possuem um único vacúolo contendo polifenóis e alcaloides (cafeína, teobromina e teofilina)⁴¹. Estes compostos, especialmente as proantocianidinas e flavan-3-óis (catequina e epicatequina) conferem amargor e adstringência ao cacau^{1,42,43}.

Alcaloides e polifenóis juntamente com proteínas e carboidratos participam de várias reações de formação de sabor durante o processamento do cacau. A variabilidade desses componentes nos grãos é determinada por fatores como o genótipo da planta, cultivo e as condições do ambiente.⁴⁴

Grãos de cacau crus contém cerca de 4% de alcaloides sendo a teobromina a principal metilxantina representando 2 a 3% do total desses compostos^{44,45}. Em seguida, a cafeína (ca. 0,2%) em menor proporção e a teofilina apenas como vestígios. Possuem atividades farmacológicas como a estimulação do sistema nervoso, efeitos cardiovasculares, broncodilatação, diurese, estimulação da secreção gástrica e em altas doses pode proporcionar a estimulação dos músculos esqueléticos.⁴⁶ A figura 6 representa a estrutura molecular da teobromina e cafeína, principais alcaloides presentes no cacau.

Figura 6 - Moléculas de teobromina e cafeína

Durante a fermentação há uma redução significativa do amargor e adstringência dos grãos como resultado da liberação dos alcaloides (ca. 30%) e polifenóis (ca. 20%) das células de armazenamento. Esses últimos se difundem com os demais componentes presentes no meio e sofrem oxidação e complexação em alta massa molecular formando principalmente taninos insolúveis. Estes complexos podem ocorrer entre polifenóis, quinonas, proteínas e peptídeos fazendo com que ocorra uma diminuição da adstringência e solubilidade. As antocianinas são hidrolisadas em antocionidinas resultando em um branqueamento da cor roxa dos cotilédones. A enzima polifenoloxidade, ativa nesse processo, converte os polifenóis em quinonas.²⁹

O estudo realizado por Jinap e colaboradores (2005)⁴⁷ indicou que a redução da adstringência em produtos de cacau é consequência também de interações dos polifenóis com proteínas ao longo do processo por reduzirem a capacidade dos polifenóis de precipitar proteínas salivares ricas em prolina diminuindo a sensação adstringente.

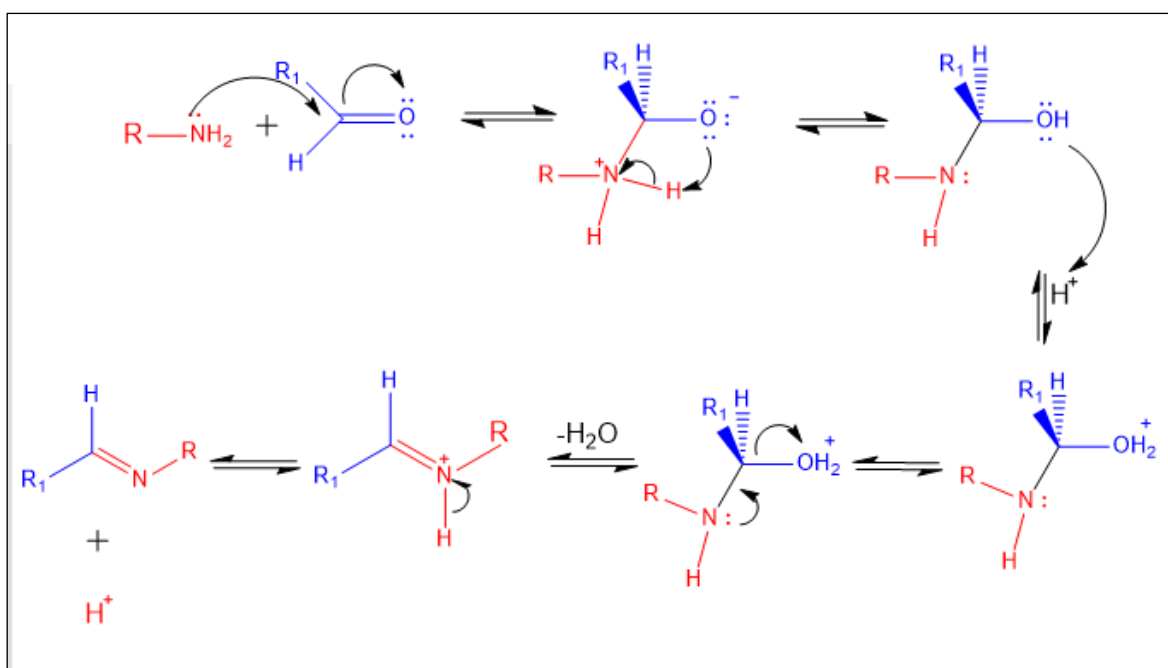
No decorrer da fermentação há redução de cerca de 70% no teor de polifenóis e 90% de epicatequina¹⁸. Ryan e colaboradores (2016)⁴⁸ demonstraram que a perda de flavonoides e compostos fenólicos totais durante o processamento do cacau não está relacionado à redução da bioatividade e consequente perda de seus benefícios à saúde. Aikpokpodion e Dongo (2010)⁴⁹ ao estudarem a capacidade antioxidante do primeiro ao sexto dia de fermentação puderam

concluir que mesmo ao final do processo, quando há uma redução na quantidade de polifenóis totais do sistema, a concentração final desses compostos ainda é suficiente para garantir uma alta capacidade antioxidante nas amêndoas de cacau.

1.4 Compostos voláteis do cacau

As principais reações químicas responsáveis pelo desenvolvimento do sabor e aroma do chocolate ocorrem durante a fermentação, secagem, torra e conchagem dos grãos de cacau.⁵⁰ Dentre essas reações, a principal e a que dá ao cacau o sabor e aroma característico de chocolate é a Reação de Maillard, que acontece entre o grupo carbonila dos açúcares redutores e grupo amino dos aminoácidos livres e proteínas^{51,52}, conforme demonstrado na figura 7.

Figura 7 - Esquema de reação de formação de iminas durante a reação de Maillard



A formação destes compostos é dependente da composição química do grão de cacau cru que varia conforme o genótipo da planta, manejo de cultivo e pós-colheita e o meio ambiente. Alcaloides, polifenóis, proteínas e carboidratos são os principais componentes químicos dos grãos que participam dessas reações.⁴⁴

Baixos teores de aldeídos são sintetizados durante as etapas de fermentação e secagem⁵¹. Três principais aldeídos que dão característica ao aroma de chocolate são produzidos a partir de aminoácidos na etapa de torrefação dos grãos de cacau, sendo eles 2-metilpropanal (derivado da valina), 2-metilbutanal (derivado da isoleucina) e 3-metilbutanal derivado da (leucina)^{51,53,54}.

Os ésteres contribuem para o perfil aromático dos chocolates e são sintetizados no processo de fermentação através do metabolismo de leveduras, sendo associados a *flavor* frutado. O acetato de etila é um dos compostos dessa classe sendo produzido por meio do etanol e ácido acético sintetizados inicialmente nesta etapa⁵¹. Além deste, outros ésteres são produzidos como o acetato de isobutil, acetato de isoamila, acetato de feniletila, isopentanoato de metila e isovalerato de metila^{44,55}.

As cetonas também contribuem para o sabor do cacau e são produzidas durante a fermentação sendo as principais encontradas no chocolate a 2-heptanona, 2-pentanona, 2-nonanona, acetofenona e acetoína. Estes compostos carbonílicos, assim como os aldeídos geralmente são formados através da degradação de Strecker a partir de aminoácidos durante a etapa de torrefação.⁴⁴

Outros compostos voláteis de grande importância na formação do aroma e sabor do cacau são as pirazinas sendo a maioria produzida durante a torrefação por meio da Reação de Maillard e Degradação de Strecker. Metilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, 2-etil-5-metilpirazina, trimetilpirazina, 2,5-dimetil-3-etilpirazina, 2,6-dimetil-3-etilpirazina e tetrametilpirazina são as principais pirazinas identificadas no aroma do chocolate⁵¹.

Os álcoois são produzidos a partir da fermentação dos grãos. Contribuem significativamente para reações de esterificação com formação de acetatos. Os principais álcoois identificados ao longo do processamento são 2-fenetiletanol e 2,3-butanodiol.⁵⁵

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é promover a melhoria do *flavor* de amêndoas de cacau do tipo forastero para fabricação de chocolates com alto teor de cacau, a partir de um processo biotecnológico de baixo custo e aproveitar os subprodutos

gerados para síntese de um produto inovador.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Conduzir fermentação extra (segunda fermentação) em um lote de amêndoas de cacau secas já fermentadas por processo tradicional na fazenda de origem, por meio de inoculação de levedura comercial e meio de cultura diferentes dos que estão presentes na poupa natural do fruto de cacau;
- ❖ Realizar extração de fenólicos e alcaloides objeto de estudo;
- ❖ Realizar análise sensorial do lote antes e após refermentação;
- ❖ Desenvolver metodologia de análise no CLAE para identificação de compostos fenólicos e alcaloides presentes na matriz do chocolate;
- ❖ Determinar fenólicos e taninos totais presentes no chocolate feito com amêndoas do processo tradicional e no chocolate feito com amêndoas que foram submetidas ao segundo processo de fermentação;
- ❖ Determinar a capacidade antioxidante dos dois lotes;
- ❖ Determinar composição físico-química dos lotes por meio de análises de proteínas, lipídeos, carboidratos, cinzas e umidade;
- ❖ Determinar o perfil dos compostos voláteis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Refermentação

A refermentação ocorreu em um período relativamente rápido (3 dias), considerando o seu início até a estabilização do processo, indicativo de boa atividade biológica das leveduras mesmo em condições adversas, ou seja, em temperaturas mais elevadas.

Após a fermentação as amêndoas foram secas em estufa, torradas e posteriormente utilizadas na produção dos chocolates para realização das análises de interesse. Houve um rendimento considerando o peso inicial das amêndoas antes da fermentação (1,1 kg) e após a lavagem e secagem (1,262 kg) o que demonstra uma certa absorção da garapa utilizada no processo. Ao final do processo de torra, as amêndoas apresentaram uma perda de cerca de 4% do peso anterior à fermentação.

Foram feitas duas bateladas de chocolate sendo uma com as amêndoas refermentadas (lote 01721) e outra com as amêndoas secas de mesmo lote de cacau, porém fermentadas apenas pelo processo tradicional das fazendas (lote 01921).

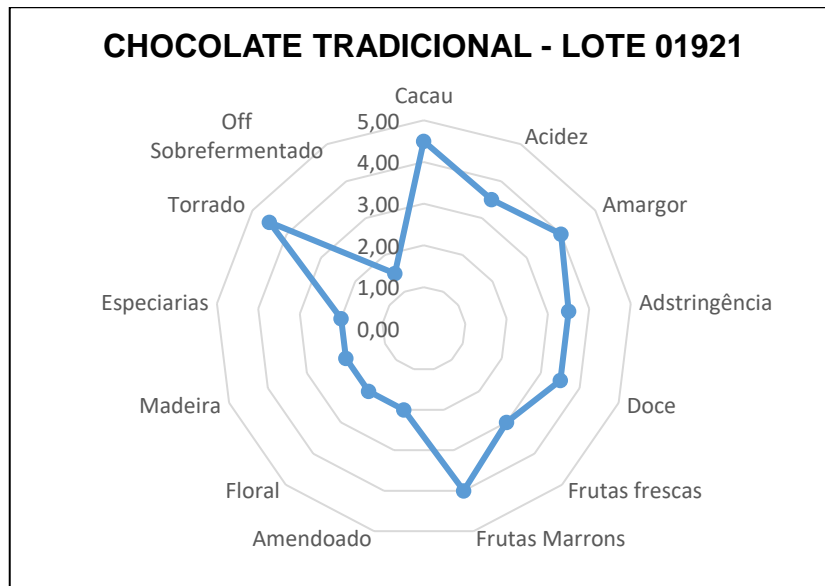
3.2 Análise Sensorial

Conforme relatórios de análise 417 (lote 01721) e 418 (lote 01921) (anexo B) é possível inferir uma melhora na característica de amargor, a qual possuía amargor fenólico residual no lote de chocolate elaborado pelo processo tradicional e que era esperado possuir maior quantidade de compostos fenólicos que o lote processado com amêndoas refermentadas. Nota-se também a eliminação de *off-flavor* (defeito) sobrefermentado/ pútrido presente no lote tradicional de chocolate, parâmetro este muito comum quando ocorre uma fermentação por mais tempo do que o necessário para as amêndoas em questão. Sendo assim, sugere-se que a segunda fermentação pode ser capaz de corrigir defeitos causados por uma fermentação excessiva das amêndoas de cacau.

Houve também alteração no perfil dos aromas e sabores perceptíveis pelos avaliadores, além de uma melhora no quesito “nota para sabor cacau” o qual apresentou nota ótima para o lote que passou pelo processo desenvolvido, sendo que o lote feito com as amêndoas processadas por meio do processo tradicional apresentou boa nota para sabor cacau. É possível constatar também que algumas notas permaneceram inalteradas.

Por fim, tem-se que a nota de qualidade global para o lote de chocolate tradicional sugere a presença de *off-flavor* em baixa intensidade e atributos básicos (cacau, amargor, adstringência e acidez) sem muita complexidade o que leva a um sabor simples para este lote. Já o lote refermentado apresentou nota para qualidade global mais elevada sendo classificada com ausência de *off-flavor* e destaque de alguns atributos complementares. As figuras 8 e 9 apresentam o gráfico aranha referente ao perfil sensorial dos lotes de chocolate tradicional (amostra 418/ lote 01921) e chocolate com amêndoas refermentadas (amostra 418/ lote 01721), respectivamente.

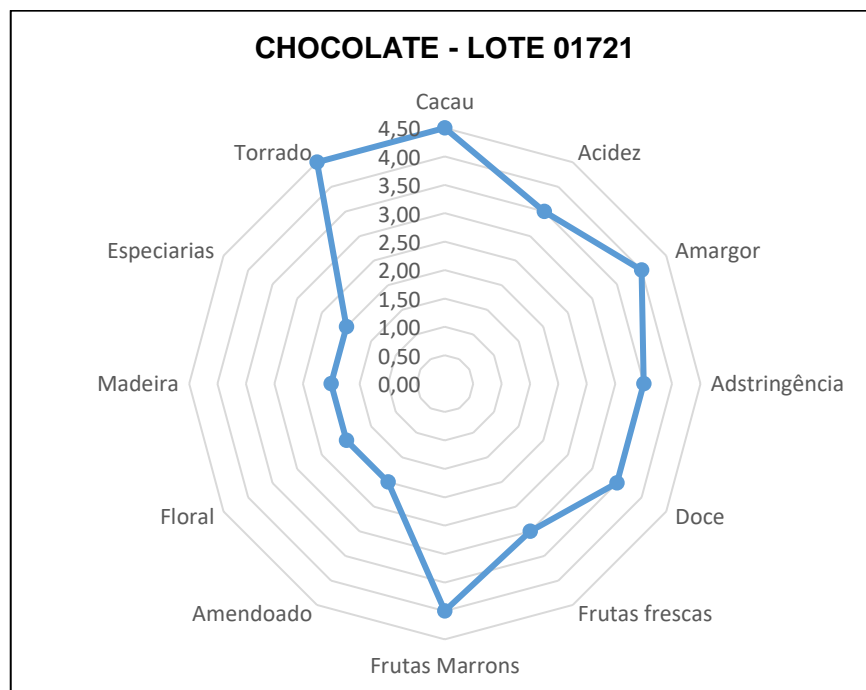
Figura 8 - Resultado da análise sensorial da relação de atributos e notas para amostra de chocolate processado com amêndoas tradicionais (lote 01921).



Cacau: 4,5; acidez: 3,5; amargor: 4,0; adstringência: 3,5; doce: 3,5; frutas frescas: 3,0; frutas marrons: 4,0; amendoado: 2,0; floral: 2,0; madeira: 2,0; especiarias: 2,0; torrado: 4,5; *off-flavor* sobrefermentado: 1,5. Notas 0-10.

Fonte: CIC, 2022.

Figura 9 - Resultado da análise sensorial da relação de atributos e notas para amostra de chocolate processado com amêndoas refermentadas (lote 01721).



Cacau: 5,0; acidez: 4,0; amargor: 3,5; adstringência: 3,0; doce: 4,5; frutas frescas: 3,0; frutas marrons: 4,0; amendoado: 3,0; floral: 1,5; madeira: 2,0; especiarias: 2,0; torrado: 5,0. Notas 0 a 10.

Fonte: CIC, 2022.

3.3 Análise Química

3.3.1 Doseamento de fenólicos totais e taninos totais

Os resultados demonstraram um aumento no teor de fenólicos totais de cerca de 20% no lote de chocolate feito com amêndoas de cacau refermentadas passando de $2,31 \pm 0,06$ a $2,78 \pm 0,02$ mg EAG/g, considerando as amostras de chocolate desengordurado e cerca de 6% (de $3,46 \pm 0,09$ para $3,75 \pm 0,09$ mg EAG/g) no extrato fenólico obtido a partir do chocolate desengordurado.

Tabela 1 - Teores de Fenólicos e Taninos Totais de amostras de chocolates e extratos de chocolate antes e depois das amêndoas refermentadas.

Amostras de chocolates e extratos	Fenólicos Totais (mg ¹ EAG/g de amostra)	Taninos Totais (mg ¹ EAG/g de amostra)
² CD 017	$2,78 \pm 0,02^a$	$2,46 \pm 0,09^a$
³ E 017	$4,04 \pm 0,10^b$	$3,75 \pm 0,09^b$
CD 019	$2,31 \pm 0,06^c$	$1,45 \pm 0,09^c$
E 019	$3,78 \pm 0,14^d$	$3,46 \pm 0,09^d$

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: ¹Equivalente ácido gálico por grama; ²Chocolate desengordurado e ³Extrato fenólico concentrado.

²médias e desvios padrão seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Anova/ Tuckey $p > 0,05$)

A variação na quantidade de polifenóis pode ser explicada pela utilização do caldo de cana como substrato considerando que, apesar de possuir açúcares em maiores proporções na sua composição, apresenta também polifenóis presentes em sua matriz podendo ter sido retido nos cotilédones durante a segunda fermentação. Theodorovski e colaboradores (2014)⁵⁶ caracterizaram o caldo de cana líquido e obtiveram valor de catequina de $602,01 \pm 21,87$ mg.L⁻¹, o que corrobora com a hipótese inicialmente levantada sobre a composição do caldo de cana interferir nos resultados.

Pode-se sugerir também baixa atividade da enzima polifenoloxidase durante a fermentação, não comprometendo os polifenóis resultantes da fermentação convencional realizada nas fazendas. A enzima polifenoloxidase é responsável pela degradação dos compostos fenólicos por meio de sua atividade em reações enzimáticas de escurecimento e pela coloração marrom dos grãos de cacau¹⁵. Esta enzima possui boa atividade em temperaturas entre 42 a 45°C, sendo que outros fatores como a polimerização e exsudação dos líquidos

formados durante a fermentação podem diminuir sua função^{57,58}.

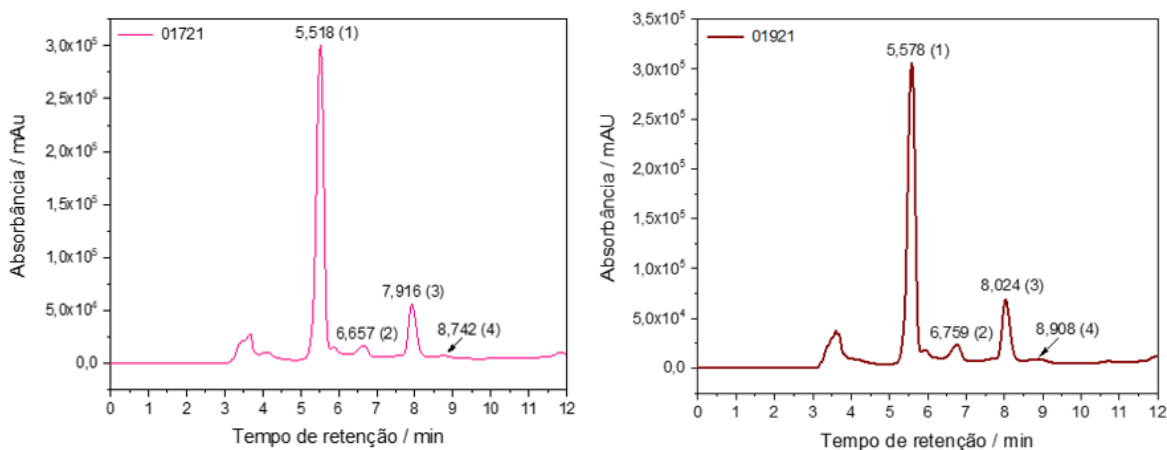
A presença de fenólicos totais em maiores quantidades nos chocolates é desejável devido às suas capacidades antioxidantes, mas estes compostos estão relacionados ao amargor e adstringência, características indesejáveis ao produto.⁵⁹ No entanto, nota-se que apesar do aumento na quantidade dos compostos no lote refermentado, têm-se uma melhora no perfil sensorial o que torna ainda mais interessante a considerar a capacidade antioxidante do produto.

O aumento nas concentrações de taninos totais verificado por meio da análise sugere polimerização dos fenólicos durante o segundo processo de fermentação.

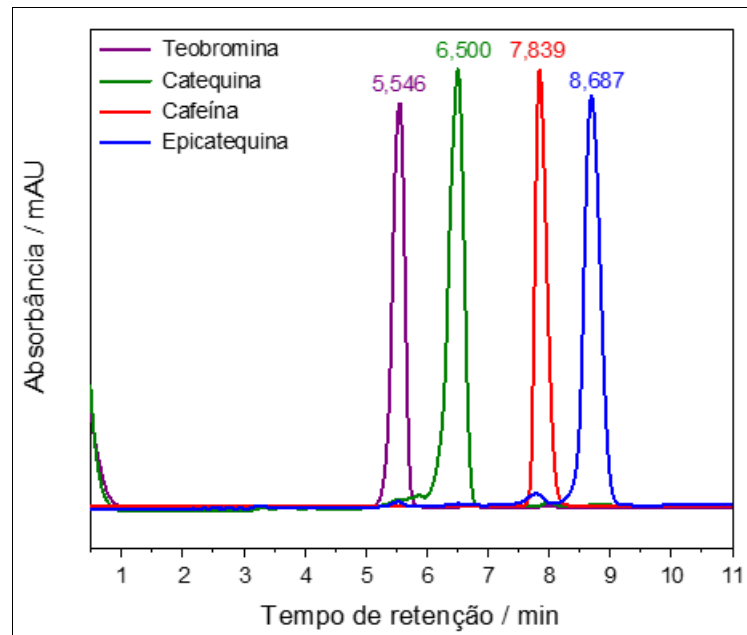
3.3.2 Análise qualitativa de fenólicos e alcaloides via CLAE-DAD

A figura 10 mostra os perfis cromatográficos das amostras de chocolate avaliadas quanto a seus extratos fenólicos analisadas em 254 nm. É possível observar que os picos 1-4 possuem tempos de retenção e absorção similares sugerindo a presença dos mesmos compostos em ambas as amostras.

Figura 10 - Perfil cromatográfico das amostras de extratos fenólicos dos lotes de chocolate 01721 (refermentado) e 01921 (tradicional)



Os compostos foram determinados com auxílio dos padrões de teobromina, catequina, epicatequina e cafeína que foram analisados isoladamente e posteriormente eluídos juntos em ambas as amostras de chocolate. A figura 11 apresenta o cromatograma dos padrões de teobromina, catequina, epicatequina e cafeína, respectivamente.

Figura 11 - Perfil cromatográfico dos padrões de teobromina, catequina, cafeína e epicatequina.

Ao eluir os padrões e as amostras juntos é possível notar um aumento na intensidade dos picos 1 a 4, sendo possível correlacioná-los aos padrões de teobromina, catequina, cafeína e epicatequina respectivamente, conforme mostra figuras 12 e 13.

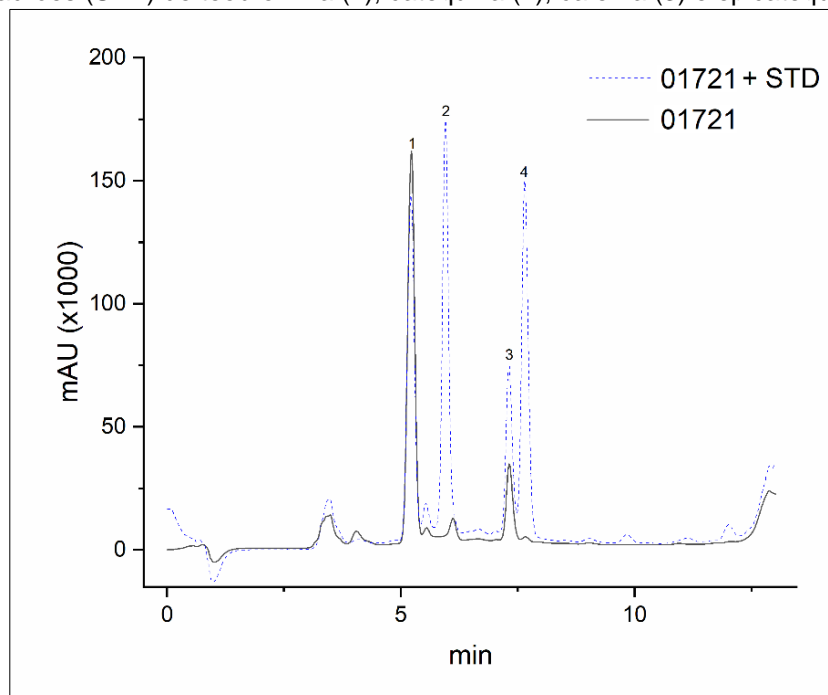
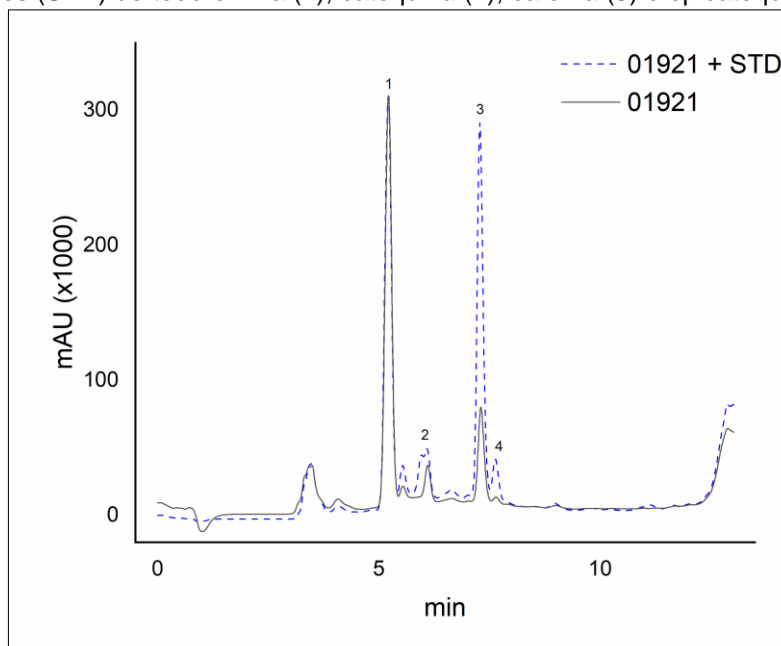
Figura 12 - Cromatograma do lote de chocolate 01721 (refermentado) e o mesmo lote adicionado dos padrões (STD) de teobromina (1), catequina (2), cafeína (3) e epicatequina (4).

Figura 13 - Cromatograma do lote de chocolate 01921 (tradicional) e o mesmo lote adicionado dos padrões (STD) de teobromina (1), catequina (2), cafeína (3) e epicatequina (4).



Também foram obtidos os espectros de UV-vis de cada um dos picos indicados nos cromatogramas e correlacionados com os padrões utilizados (ANEXOS) para correlacionar com os dados apresentados por CLAE.

A amostra de chocolate do lote 01921 apresentou áreas relativamente maiores que a amostra do lote 01721 do chocolate refermentado conforme dados da tabela 2. As diferenças nas áreas dos picos sugerem concentrações de teobromina, catequina, cafeína e epicatequina no lote tradicional (01921) relativamente maior que no lote de amêndoas de cacau refermentadas. Estes compostos contribuem com a capacidade antioxidante, amargor e adstringência conferidos aos chocolates¹⁸. Considera-se positiva a redução destes compostos do ponto de vista sensorial pelo fato de trazer ao produto atributos negativos.

Tabela 2 - Área dos picos dos cromatogramas referente às amostras de chocolate analisadas via CLAE-DAD

Picos	Amostra 01721	Amostra 01921
1	4293849	4386991
2	372866	519976
3	847765	1047622
4	150719	187232

Fonte: Elaborado pela autora

Considerando os resultados da análise por CLAE é possível notar uma redução dos principais compostos fenólicos (monômeros de catequina e epicatequina). Correlacionando estes dados aos obtidos através do doseamento de fenólicos e taninos totais é possível sugerir reações de polimerização desses compostos, uma vez que o lote refermentado apresentou uma dosagem maior (ca. 1,01 mg EAG/g) de taninos totais o que pode ter contribuído para a redução do amargor e adstringência do chocolate.

3.3.3 Capacidade antioxidante

Com base nos resultados da atividade antioxidante dos dois lotes de chocolate foi possível constatar que a diferença de percentual entre eles não foi estatisticamente significativa, após Análise de Variância (ANOVA) para comparação das médias e teste de Tukey realizado com nível de significância mínimo de 5% ($p > 0,05$). Os resultados dos ensaios das amostras de chocolate estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Capacidade antioxidante pela redução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) pelas amostras de chocolate em diferentes concentrações

Amostras	Atividade de redução de DPPH (%)		
	5 µg/mL	50 µg/mL	500 µg/mL
01721	18,88 ± 3,03 ^a	23,104 ± 2,25 ^b	33,33 ± 0,50 ^c
01921	18,45 ± 0,30 ^a	24,464 ± 0,61 ^b	34,33 ± 1,06 ^c

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: médias e desvios padrão seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Anova/ Tuckey $p > 0,05$)

Através da análise realizada nas três concentrações da amostra (5, 50 e 500 µg/mL) nota-se que é necessária uma quantidade maior de amostra para inibir a concentração inicial do DPPH visto que na concentração de 5 µg/mL a amostra apresentou potencial antioxidante menor.

A capacidade antioxidante dos chocolates está relacionada à compostos presentes como os polifenóis. Esses compostos são capazes de neutralizar radicais livres no organismo, moléculas altamente instáveis que podem provocar danos celulares proporcionando o surgimento de doenças crônicas como consequência do estresse oxidativo como doenças neurodegenerativas,

cardiovasculares, câncer, diabetes etc⁶⁰. Quanto maior o teor de cacau no chocolate, maior a capacidade antioxidante sendo esta, propriedade benéfica proporcionada pela composição química do cacau.

Os resultados demonstraram que o segundo processo de fermentação não influenciou significativamente o potencial antioxidante do chocolate, sendo considerado um ponto positivo visto que foi possível melhorar as características sensoriais do produto sem interferência negativa nas propriedades do chocolate.

3.3 4 Composição físico-química dos chocolates

Ambos os lotes de chocolates foram analisados quanto ao teor de umidade, gordura, cinzas e proteínas conforme resultados apresentados na tabela 4 a seguir.

Tabela 4 - Análises físico-químicas das amostras de chocolate com amêndoas refermentadas (01721) e com amêndoas tradicionais (01921)

Amostras	Cinzas (%)	Umidade (%)	Gordura (%)	Proteínas (%)
01721	0,22 ± 0,03 ^a	3,74 ± 0,31 ^b	63,20 ± 0,03 ^c	4,97 ± 0,02 ^d
01921	0,54 ± 0,20 ^a	3,55 ± 0,31 ^b	63,19 ± 0,15 ^c	5,21 ± 0,00 ^d

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: Médias e desvios padrão seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Anova/ Tuckey $p > 0,05$).

Os dados foram comparados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey e não apresentaram diferenças significativas entre os parâmetros analisados o que demonstra que o processo de refermentação das amêndoas não influenciou os parâmetros físico-químicos dos chocolates.

Os valores de umidade, cinzas e lipídeos obtidos foram comparados com os padrões estabelecidos pela legislação (Resolução n°12/1978)⁶¹ de no máximo 2,5%, máximo 3% e mínimo 20% respectivamente. Apenas o valor de umidade está acima do preconizado pela legislação demonstrando a necessidade de ajustes nas etapas de secagem e torra das amêndoas.

Os valores de proteína obtidos se assemelham ao estudo da composição centesimal realizado por Jamile⁶² com valores cerca de 5%.

3.3 5 Determinação de compostos voláteis

Foi realizada a extração dos compostos voláteis via metodologia *headspace* porém a metodologia de análises por cromatografia gasosa – espectrometria de massas não foi totalmente definida impossibilitando ser realizada análise do perfil dos compostos voláteis nesse estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fermentação

Para o processo de fermentação foram usados:

- ❖ Amêndoas de cacau secas;
- ❖ Caldo de cana;
- ❖ Levedura de cerveja belga ABBAYE (*Saccharomyces cerevisiae*)

As amêndoas foram obtidas na Fazenda Santa Rita situada em Ilhéus – BA a qual utiliza um processo convencional de manejo pós-colheita, realizando fermentação natural em coxos construídos em madeira cobertos com folhas de bananeira no estágio inicial da fermentação e secagem natural ao sol/estufa.

A fermentação foi conduzida a partir de amêndoas secas já fermentadas por processo tradicional nas fazendas. Optou-se por utilizar amêndoas de cacau da variedade Forastero. Esta variedade e seus descendentes possuem características como forte amargor e adstringência, devido à quantidade de compostos fenólicos presentes em suas células (ca. 30 a 60% comparado à variedade Criollo).⁶³ Levou-se em consideração também a variedade que é menos aromática e sua proporção de produção mundial em relação à outras variedades visando obter melhores resultados em relação ao perfil químico e sensorial.

O caldo de cana foi obtido da plantação particular em um sítio da região de Pará de Minas, Minas Gerais. As canas foram cortadas e o caldo extraído no mesmo dia, peneirado e conservado em geladeira por um período máximo de 12 horas após extração até sua utilização.

Nos últimos anos, quatro espécies de leveduras têm sido alvo de estudos sobre a identificação desses microorganismos no processo de fermentação do cacau: *Saccharomyces cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, *Pichia manshurica* and *Hanseniaspora opuntiae*, sendo a primeira possivelmente a mais comum²⁵.

Saccharomyces cerevisiae e *P. kudriavzevii* se destacaram pela capacidade de produzir compostos voláteis como ésteres, álcoois e aldeídos responsáveis por aromas frutados, florais e doces, desejáveis ao chocolate⁶⁴. Outras características importantes dessas espécies são a capacidade de adaptação às condições ambientais e inibição do crescimento de microorganismos putrefativos³¹.

Para a escolha do microrganismo foi levado em consideração o estudo feito por Meersman e colaboradores (2016)⁶⁵ em que utilizaram híbridos de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que combinavam características importantes de termotolerância e grande produção de ésteres aromáticos voláteis, álcoois e aldeídos, como culturas iniciais para fermentação da polpa de cacau, sendo estas capazes de modular o sabor e aroma dos chocolates. Além disso, tal espécie produz toxinas que evitam a proliferação de microorganismos indesejáveis²⁵. Neste sentido, esperava-se obter um processo fermentativo eficiente relacionado ao aspecto sensorial e com um custo reduzido, considerando a realização do processo em temperatura ambiente, sem a necessidade de equipamento de controle de temperatura.

4.1.1 Procedimento

Inicialmente foi realizado a sanitização de todos os utensílios utilizados no processo com Iodophor (1% em água), sanitizante muito usado na indústria de alimentos pela sua ampla ação germicida e por não necessitar enxágue, não deixando resíduos que possam afetar o processo e impactar a saúde negativamente.

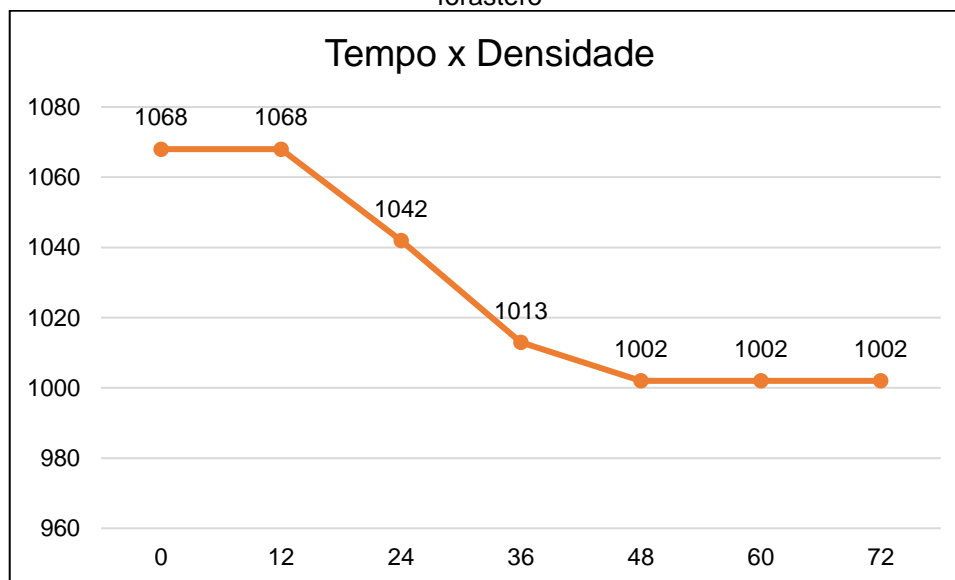
O processo de fermentação foi realizado em baldes (capacidade 3,5 L) de polipropileno 100% alimentício e livre de Bisfenol A (BPA). O balde foi adaptado com uma torneira na parte inferior e abertura na tampa para inserção de um *airlock*.

As alterações foram necessárias para evitar a entrada de oxigênio no mosto durante processo de fermentação. Após a higienização do recipiente, foram acrescentados 3 litros de caldo de cana, devidamente peneirados para eliminação de resíduos sólidos da extração. Em seguida, foi adicionado 1,1 kg de amêndoas de cacau secas e fermentadas pelo processo de fermentação convencional da fazenda. As amêndoas permaneceram imersas no caldo de cana por um período

de 15 minutos até a inclusão da levedura.

A preparação da *Saccharomyces cerevisiae* ocorreu conforme especificado pelo fabricante (Danstar Ferment A. G.), com hidratação em 100 mL de água mineral por 15 minutos e posterior agitação do recipiente para homogeneização, aguardando por mais 15 minutos. Em seguida, a levedura foi inoculada no recipiente da fermentação e o balde fechado hermeticamente. O processo foi conduzido em temperatura ambiente (25 a 30°C) e controlado por um refratômetro a cada 12 horas. Os resultados seguiram conforme Figura 14. Após homogeneização dos produtos da fermentação foi feita a medição inicial do Brix o qual apresentou valor de 17°Bx ou densidade de 1068 kg/m³. Com o progresso da fermentação ocorre a transformação dos açúcares do caldo de cana em etanol pelas leveduras e conseqüentemente há a redução da densidade do mosto. A fermentação finalizou após 48 horas. Com o intuito de confirmar o processo final da fermentação foram realizadas mais duas medições para verificar a estabilização do processo em 7°Bx ou 1028 kg/m³.

Figura 14 - Densidade ao longo do processo de fermentação de amêndoas secas de cacau forastero



Após o término da fermentação as amêndoas foram lavadas e o produto gerado da refermentação (aguardente de cacau) segregado em garrafa pet devidamente higienizada e congelado em freezer para posterior destilação.

4.2 Secagem

O método de secagem foi realizado em estufa mantida a uma temperatura constante de 40°C em um período de 36 horas afim de permitir melhor controle das variações de temperatura do processo sobre o produto.

4.3 Torra

O processo de torra foi conduzido em estufa mantida à temperatura constante de 120°C para eliminação de compostos voláteis indesejáveis e redução da umidade do grão abaixo de 7%. Ao final do processo as amêndoas atingiram temperatura média de 111°C. Esse processo além de proporcionar o desenvolvimento dos compostos de aroma e sabor que darão características ao chocolate, auxilia na próxima etapa de fabricação facilitando a quebra das amêndoas e separação da casca.

4.4 Fabricação do Chocolate

Após processo de torra, as amêndoas foram dispostas em pedra de granito por cerca de 24h para um resfriamento rápido que tem por objetivo interromper as reações que continuam acontecendo em altas temperaturas, mesmo após a retirada do forno. Em seguida, foi realizada a quebra e o descasque em equipamento próprio desenvolvido para a obtenção do *nibs* de cacau utilizado na receita do chocolate e separação deste da casca.

Os *nibs* de cacau passaram então por uma pré-moagem em liquidificador ARNO modelo doméstico, para redução da granulometria e transformação do *nibs* em pó, possibilitando maior eficiência no processo seguinte. Em seguida o produto foi direcionado para a *melanger* (moinho de pedras utilizado para realizar o refino e conchagem do chocolate) para fazer com que a massa de chocolate atinja granulometria inferior a 20µm em menor tempo.

A receita do chocolate foi balanceada para 1kg de produto, considerando a capacidade mínima de moagem da *melanger* marca Premir – capacidade 4,5kg. Como se pretendia obter um produto com alto teor de cacau e que atingisse maior aceitação sob o aspecto sensorial pela maioria dos consumidores, optou-se por elaborar uma receita de chocolate 70% cacau que tem como ingredientes 70% de *liquor* de cacau (*nibs* moídos formando uma pasta fluida) e 30% de açúcar

demerara orgânico. Essa mistura permaneceu por 48 horas em processo de refino, até que a textura do chocolate não apresentasse grânulos de tamanho sensível ao perceptível pela língua.

Ao finalizar o processo de refino e conchagem, o chocolate foi retirado da *melanger* para o processo de têmpera realizado de forma manual, onde a massa foi depositada em uma superfície de granito devidamente higienizada e o produto agitado por meio de espátulas até atingir temperatura de 30°C, monitorada por termômetro a *laser*, com posterior aquecimento até 31°C utilizando um secador próprio marca Arno para tal finalidade. Em seguida, o chocolate foi distribuído em moldes de barras de 40g e inseridos em geladeira a uma temperatura média de 10°C para finalização da cristalização, até desprendimento das barras do molde. Posteriormente, as barras foram retiradas da geladeira para estabilização da temperatura e embaladas.

Foram realizadas duas bateladas de chocolate: a primeira, após o processo de fermentação detalhado acima. A segunda realizada a partir de amêndoas secas sem passar pelo processo de refermentação. Ambas foram analisadas quimicamente e sensorialmente para avaliação dos resultados do processo desenvolvido. Vale ressaltar que a partir do processo de torra, ambos os lotes de chocolate respeitaram os mesmos parâmetros de torra e fabricação até a produção final das barras.

4.5 Análise Sensorial

Duas amostras de cada um dos lotes de chocolate foram enviadas ao Centro de Inovação do Cacau (CIC) em Ilhéus/Bahia para realização de análise sensorial (teste afetivo/ teste de aceitação). O laboratório trabalha desde 2017 realizando análises em cacau e chocolate prestando serviços a produtores de variados portes até indústrias processadoras. A análise foi conduzida pela gerente de qualidade do CIC, Adriana Reis, bióloga, com mestrado em genética e biologia molecular, doutora em biotecnologia na área de bioprospecção de microrganismos da fermentação de cacau e atuante na qualificação do cacau do Brasil auxiliando os produtores a alcançarem melhores resultados. A análise foi conduzida seguindo a metodologia do Guia para Avaliação Sensorial de Amêndoas de Cacau e Chocolate da *Cocoa of Excellence* (edição 2021) com um

painel de 5 degustadores especializados.

4.6 Extração de compostos fenólicos e alcaloides

Para obtenção dos compostos de interesse da matriz utilizou-se como referência o estudo de Hammerstone e colaboradores (1999).⁶⁶

Uma amostra de cada um dos dois lotes de chocolate temperados (01721 e 01921) foram moídas em liquidificador ARNO e posteriormente congeladas até a extração da gordura.

Os lipídios foram retirados de 45g de chocolate, extraídos três vezes em 450 mL de hexano. Ao final da extração obteve-se aproximadamente 36g e 27g de material desengordurado referente aos lotes 01721 e 01921, respectivamente.

Os polifenóis e alcaloides do chocolate foram obtidos a partir de uma amostra de 10g de material desengordurado extraídos em 50mL de acetona, água e ácido acético nas proporções 70%, 29,5%, 0,5%, respectivamente. Após um intervalo de 1 hora, o material foi centrifugado (Centrífuga Evlab modelo EV 025) por 10 minutos a uma rotação de 1500 giros. O sobrenadante foi coletado e concentrado, com remoção dos solventes por evaporação rotativa a 40°C por 2 horas. Em seguida o material foi congelado para posterior liofilização a -85°C (liofilizador Labconco freezezone 4.5) resultando em 3,7g e 3,5g de material referente aos lotes 01721 e 01921 respectivamente.

Posteriormente foi conduzida extração em fase sólida nas duas amostras liofilizadas para separação dos analitos de interesse. Para isso foi usado cartucho de coluna C18 de 6mL pré-condicionadas com metanol e água ultrapura. O procedimento foi desenvolvido utilizando 1g do extrato seco liofilizado suspenso em 100mL de água ultrapura com auxílio de sonicação. Alíquotas do extrato suspenso foram eluídas primeiramente com água para remoção dos carboidratos, seguida de eluição dos fenólicos e alcaloides por uma mistura de acetona, água e ácido acético nas proporções em volume 70:29,5:0,5, respectivamente. Os eluatos contendo os açúcares foram descartados e as frações contendo os fenólicos e alcaloides foram combinadas, concentradas por meio de evaporação rotativa, congeladas e posteriormente liofilizadas a -85°C.

4.7 Análise CLAE-DAD de Teobromina, cafeína, epicatequina e catequina

A análise qualitativa foi realizada nas amostras usando um sistema UFLC modular (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), composto por uma bomba quaternária (modelo LC-20AD), desgaseificador, amostrador automático (SIL-20AHT), detector de arranjo de diodos (DAD, SPD-M20A) e comunicador (CBM-20A), controlado por sistema de computador operado pelo software LC LabSolutions versão 1.25 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). Os compostos foram separados em coluna analítica C18 (Waters 250 x 4,6mm, 5 μ m) a 25 \pm 2°C. As fases móveis utilizadas no gradiente foram (A) solução de ácido trifluoroacético - TFA (0,1%) e (B) metanol, com vazão de 1,0 mL/min. O gradiente das fases móveis usado para análise HPLC-DAD iniciou em 20% da fase B. O programa de gradiente usado foi: 0–0,5 min, 20% B; 1–2 min, 30% B; 3–5 min, 32% B; 7,0 min, 35% B, 8,0 min, 40% B; 10,0 min, 100% B; 11,0 min, 20% B; 13,0 min, 20% B. O volume de injeção usado para cada execução foi de 5 μ L. A determinação foi realizada a 254 e 350 nm. As amostras foram diluídas em fase móvel, homogeneizadas em banho ultrassônico e filtradas em filtro de seringa de 0,45 μ m antes de serem injetadas.

4.8 Doseamento de fenólicos totais e taninos totais

A dosagem de compostos fenólicos totais foi realizada, em triplicata para cada amostra, pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu⁶⁷, com algumas adaptações. Esse método utiliza uma mistura dos ácidos fosfotungstístico e fosfomolibídico em meio básico. O ácido gálico foi o padrão utilizado (Sigma Aldrich – 0,2 mg/mL) para construir a curva analítica (5, 10, 20, 30, 40 μ g/mL) diluído em etanol 55%. Em tubos de ensaio, contendo 250 μ L da amostra (0,1 mg/mL), foram adicionados 2.250 μ L de uma mistura reativa (Folin Ciocalteu), previamente, diluída em água destilada (1:4 v/v), e 250 μ L de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 17%. Após 30 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS em 750nm. Os teores de compostos fenólicos foram expressos em mg equivalentes ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG/g).

Os taninos totais foram determinados por método indireto adaptado de Makkar e colaboradores⁶⁸. Este método consiste na diferença entre os fenólicos totais e os fenólicos não tânico. Os fenólicos não tânico das amostras de

chocolate desengordurado e extratos fenólicos de chocolate foram obtidos a partir da adição do agente precipitante polivinilpolipirrolidona (PVPP) em tubo cônico na quantidade de 150mg em cada tubo e posterior adição de 1500µL da amostra. Os tubos foram levados à centrífuga por 10 minutos a 1600rpm. O sobrenadante foi recolhido e realizado a leitura da absorvância em espectrofotômetro, conforme realizado anteriormente para fenólicos totais.

4.9 Análise da capacidade antioxidante

As capacidades de eliminação de radicais das amostras dos dois lotes de chocolate foram analisadas com base na reação com DPPH. A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH foi baseada no experimento de Mano-Sousa e colaboradores (2022)⁶⁹ com algumas adaptações. Uma solução de DPPH (0,002% p:v) em etanol foi preparada. Em seguida, 750µL das amostras (5, 50 e 500 µg/mL) foram adicionados aos tubos contendo 1500µL de solução de DPPH. O tubo foi então coberto e deixado no escuro à temperatura ambiente (25°C). As amostras foram analisadas em triplicatas sendo utilizada como amostra de controle, uma preparação de 750µL de amostra adicionado de 1500µL de etanol. Após 30 minutos, a absorvância em 517nm foi medida com um espectrofotômetro (Biotek Power Wave XS2, EUA) e o etanol foi usado para correção da linha de base. A absorvância foi expressa como a porcentagem de inibição e foi calculada usando a equação:

$$\text{Capacidade antioxidante (\%)} = [1 - (\text{abs controle} - \text{abs amostra}) \div \text{abs controle}] \times 100$$

Onde, abs controle = absorção da amostra em etanol e abs controle = absorção das amostras de chocolate em etanol e DPPH. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) com teste de Tukey estabelecendo nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.10 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas foram realizadas pelos laboratórios de química de alimentos e setor de floricultura da Universidade Federal de Viçosa – Campus Florestal conforme descrito a seguir.

4.10.1 Determinação de perda por dessecação (umidade)

O procedimento ocorreu em duplicatas segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz⁷⁰ com adaptações. Cerca de 4g de amostra de cada lote de chocolate foram colocados em um recipiente previamente tarado, pesadas em balança analítica e direcionadas para estufa a 105°C durante 3 dias, sendo pesadas em intervalos de cerca de 3 horas durante o dia até obtenção de peso constante. Posteriormente o material foi resfriado em um dessecador até a temperatura ambiente e pesado para cálculo do percentual de umidade conforme a equação:

$$\% \text{ umidade} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde, N = n° de gramas de umidade (perda de massa em gramas) e P = n° de gramas da amostra.

4.10.2 Determinação de cinzas (resíduo por incineração)

O procedimento ocorreu em duplicatas segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz⁷⁰. Cerca de 2g de amostra de cada lote de chocolate pesadas em balança analítica foram colocadas em um cadinho previamente aquecido em mufla a 550°C, resfriado em um dessecador até temperatura ambiente e tarado. O material foi seco em chapa elétrica, carbonizado em temperatura baixa e incinerado em mufla a 550°C até a eliminação completa do carvão. O resíduo foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até a obtenção de peso constante para cálculo do grau de pureza do material conforme a equação:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde, N = n° de gramas de cinzas e P = n° de gramas da amostra.

4.10.3 Extração direta de lipídeos em Soxhlet

O procedimento ocorreu em duplicatas segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz.⁷⁰ Foram pesadas em balança analítica cerca de 4g das amostras de cada lote de chocolate em cartucho soxhlet e amarrado com fio de lã previamente

desengordurado. Em seguida, o cartucho foi transferido para o aparelho extrator tipo soxhlet sendo este acoplado ao balão de fundo chato previamente tarado. Foi adicionado o solvente hexano em quantidade suficiente para um soxhlet e meio. O equipamento foi mantido sob aquecimento em chapa elétrica à extração contínua por 8 horas (4 a 5 gotas por segundo). Posteriormente o cartucho foi retirado e o solvente destilado. O balão com o resíduo foi transferido para a estufa a 105°C e mantido por cerca de 1 hora. Após retirada da estufa, foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente. A operação de aquecimento foi repetida mantendo à temperatura por 30 minutos seguida de posterior resfriamento em dessecador. O cálculo foi realizado seguindo a equação:

$$\% \text{ lipídeos} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde, N = n° de gramas de lipídeos e P = n° de gramas da amostra.

4.10.4 Determinação de proteínas – método Kjeldahl

O procedimento ocorreu em duplicatas segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz⁷⁰ com adaptações. Foram pesadas cerca de 0,2g de amostras dos dois lotes de chocolate colocando-as em tubo de bloco digestor. Adicionou-se em seguida 5mL da solução de H₂SO₄ concentrado e 1g de mistura digestora (Na₂SO₄, CuSO₄, água e selênio metálico). A digestão em bloco foi conduzida à temperatura entre 360°C e 410°C. A digestão foi concluída quando praticamente cessou a evolução da fumaça e o material estava descolorido, deixando esfriar em seguida. O procedimento foi repetido com uma prova em branco (Considerando todos os reagentes menos a amostra de chocolate). O produto foi direcionado para destilação da solução indicadora em ácido bórico. Foi adicionado ao material digerido de 20mL de NaOH 40% e liberado a entrada de vapor no tubo de digestão. A liberação de NH₃ é iniciada e arrastada através do destilador pelo vapor d'água sendo condensado e coletado pela solução indicadora em ácido bórico, assumindo coloração azul e indicando o final da transferência de NH₃. Em seguida, a solução é titulada em HCl padrão (0,05 mol/L) até que assumir coloração vermelha. O mesmo procedimento de destilação e titulação foi realizado com a prova em branco. Após a titulação da prova em

branco foram feitos os cálculos para obtenção do percentual de proteína conforme as etapas abaixo.

1ª) Cálculo do volume líquido de HCl gasto na titulação da amostra:

$$V_L = V_A - V_B$$

Onde, V_L = volume líquido de HCl gasto na titulação da amostra, V_A = volume da titulação da amostra e V_B = volume de HCl da titulação da prova em branco.

2ª) Cálculo da quantidade de acidez (H^+) gasta na recomposição do ácido bórico:

$$H^+ = V_L \times \text{concentração HCl} \times f$$

Onde f = fator de correção = 1,0316

3ª) Cálculo da quantidade de massa de N a partir da acidez gasta para recompor $H_2BO_3^-$ sendo esta equivalente à quantidade de NH_3 em termos de matéria proveniente do destilado e captura pelo ácido bórico.

$$\text{Massa molar N} = 14 \text{ mmol/mg}$$

$$\text{Massa N} = \text{Quantidade } H^+ \times \text{massa molar N}$$

4ª) Cálculo da quantidade de N total da amostra:

$$\text{Teor N total} = \frac{\text{massa N}}{\text{peso amostra}}$$

5ª) Calcular o teor de proteína da amostra a partir do teor de N total:

$$\text{Teor de proteína} = \text{teor de N} \times f$$

Sendo f = fator de conversão para cacau = 3,57.

6ª) Calcular percentual de proteína contido na amostra:

$$\% \text{ proteína} = \frac{\text{teor de proteína da amostra}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

4.11 Extração de compostos voláteis

A extração dos voláteis das amostras dos dois lotes de chocolate de cacau seguiu conforme procedimento realizado por Martins e colaboradores (2017)⁷¹ com algumas adaptações. As amostras (20 g) foram maceradas e colocadas em câmaras vidro bitubuladas (15 x 10 cm), sob temperatura, umidade e iluminação ambiente. As amostras de *headspace* foram coletadas em coluna de vidro contendo 20 mg de Hayesep D (80-100 mesh, Supelco) sob fluxo de 1,5 L.min⁻¹ de ar filtrado em carvão ativado, durante 120 minutos. A dessorção foi realizada com 0,5 mL de acetato de etila grau HPLC, bidestilado.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou desenvolver um processo biotecnológico de baixo custo para melhoria do *flavor* de amêndoas de cacau. O processo de fermentação com uma levedura belga da espécie *Saccharomyces cerevisiae* amplamente utilizada na fabricação de bebidas demonstrou ser uma excelente alternativa para correção de alguns problemas decorridos da primeira fermentação de grãos de cacau nas fazendas, por exemplo sobrefermentação, sem prejuízo dos compostos fenólicos. Além de ser uma alternativa para a melhoria dos atributos sensoriais de chocolates com alto teor de cacau que desagradam grande parte da população. A fermentação desenvolvida foi conduzida em temperatura ambiente e demonstrou excelentes resultados com a levedura utilizada, mesmo em condições adversas. Também deve-se ressaltar que o resíduo gerado possibilita novos estudos sobre o desenvolvimento de uma bebida alcoólica à base de cana de açúcar e cacau que não foi o objeto desta pesquisa.

Através das metodologias aplicadas para determinação do teor de compostos fenólicos e taninos, dos perfis cromatográficos e análises físico-químicas das amostras foi possível sugerir que mesmo havendo pouca diferença no teor de compostos fenólicos dos chocolates produzidos houve uma mudança significativa nas características sensoriais da amostra possivelmente relacionadas aos compostos voláteis presentes e modificado pela ação das leveduras durante o processo de fermentação. Além disso, a capacidade antioxidante se manteve igual sendo este um dos principais atributos desejáveis pelos consumidores pelas

suas funções benéficas relacionadas à saúde, o que o torna um alimento amplamente comercial.

Foi possível também compreender melhor as reações químicas que ocorrem durante o beneficiamento do cacau e fabricação do chocolate, a importância do conhecimento das etapas e fatores que podem interferir para obtenção de bons resultados, como forma de otimizar e potencializar os processos de fabricação de chocolates de qualidade superior. Além disso, a possibilidade de modular o aroma e sabor do cacau utilizando leveduras específicas que possibilitam a manutenção de características químicas do produto importantes para a saúde do consumidor final.

Mesmo não sendo possível analisar o perfil dos compostos voláteis nesse estudo, a metodologia de extração abriu caminho para futuros estudos relacionados a esses compostos de interesse.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afoakwa EO. Chocolate and cocoa, flavor and quality. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 2012: 1-19.
2. Beckett ST. The science of chocolate: Royal Society of Chemistry, 2008.
3. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. Critical reviews in food science nutrition 2008; 48: 840-57.
4. Aime M, Phillips-Mora WJM. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage of Marasmiaceae. 2005; 97: 1012-22.
5. Ferreira ACR. Beneficiamento de cacau de qualidade superior. 2017.
6. Silva AF, Fachinello AL, Boteon M, Castro NR, Gilio L. ESTRUTURA E RENDA DA CADEIA PRODUTIVA DO CACAU E CHOCOLATE NO BRASIL. Brazilian Review of Economics Agribusiness/Revista de Economia e Agronegócio 2017; 15.
7. Estival KGS, Teixeira LR, Teotonio ANA, Correa SRS. Da Política dos Coronéis do Cacau aos Espaços de Participação Política: Estudo de Caso da Câmara Setorial do Cacau no Brasil. Revista de Ciências Gerenciais 2014; 18.

8. Gonçalves MF, Carneiro WMA, Sena JVC. A cadeia produtiva do cacau na bahia: uma análise à luz da nova economia institucional. *Revista Fortaleza* 2010; 2: 55-68.
9. Leiter J, Harding S. Trinidad, Brazil, and Ghana: three melting moments in the history of cocoa. *Journal of rural Studies* 2004; 20: 113-30.
10. Organization IC. (2022) [www document] https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-XLVIII-No.-3.pdf [accessed on 27/10/2022 2022]
11. BRAINER MSCP. Produção de cacau. 2021.
12. Henz I, Balbino SB. Consumo do cacau (theobroma cacao) e seus efeitos na saúde. 2021.
13. Duarte AAM, Mostarda C, Irigoyen MC, Rigatto K. A single dose of dark chocolate increases parasympathetic modulation and heart rate variability in healthy subjects. *Revista de Nutrição* 2016; 29: 765-73.
14. Santos GBM, Santos PBM, Santos AM. (2022) Tendências e Especificações do Mercado de Chocolate. [www document] <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/chocolates-finos-e-de-aroma/tendencias-e-especificacoes-mercado-chocolate/view> [accessed on 14/10/2022 2022]
15. Junior GCAC, Ferreira NR, Gloria MBA, da Silva Martins LH, Lopes AS. Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Annals of Microbiology* 2021; 338: 127834.
16. Visintin S, Ramos L, Batista N, Dolci P, Schwan F, Cocolin L. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 2017; 257: 31-40.
17. Gutierrez JM, Pereira LB, Ferrocino I, Cocolin L. Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients* 2019; 11: 884.
18. Efraim P, Pezoa-García NH, Jardim DCP, Nishikawa A, Haddad R, Eberlin MN. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Food Science Technology* 2010; 30: 142-50.

19. Berger RG. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability: Springer Science & Business Media, 2007.
20. Voigt J, Biehl B, Wazir SKS. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry* 1993; 47: 145-51.
21. Rohan TA, Stewart T. The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. *Journal of food Science* 1967; 32: 395-98.
22. Beckett ST. *Industrial chocolate manufacture and use*: Blackwell Publishing Ltda, 2009.
23. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008; 48: 840-57.
24. Racine KC, Lee AH, Wiersema BD, Huang H, Lambert JD, Stewart AC, Neilson AP. Development and characterization of a pilot-scale model cocoa fermentation system suitable for studying the impact of fermentation on putative bioactive compounds and bioactivity of cocoa. *Foods* 2019; 8: 102.
25. Chagas Junior GCA, Ferreira NR, Lopes AS. The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: An overview. *International Journal of Food Science Technology* 2021; 56: 544-52.
26. Araújo JA, Ferreira NR, Silva SHM, Oliveira G, Monteiro RC, Alves YFM, Lopes AS. Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. *Annals of Microbiology* 2019; 9: 975-87.
27. De Vuyst L, Weckx S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J Appl Microbiol* 2016; 121: 5-17.
28. Nazaruddin R, Seng L, Hassan O, Said MJIC. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops Products* 2006; 24: 87-94.
29. Camu N, De Winter T, Addo SK, Takrama JS, Bernaert H, De Vuyst L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol

concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008; 88: 2288-97.

30. Hansen CE, Mañez A, Burri C, Bousbaine A. Comparison of enzyme activities involved in flavour precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. *Journal of the Science of Food Agriculture* 2000; 80: 1193-98.

31. Batista NN, Ramos CL, Ribeiro DD, Pinheiro ACM, Schwan RF. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology* 2015; 63: 221-27.

32. Soumahoro S, Ouattara HG, Droux M, Nasser W, Niamke SL, Reverchon S. Acetic acid bacteria (AAB) involved in cocoa fermentation from Ivory Coast: species diversity and performance in acetic acid production. *Journal of food science technology* 2020; 57: 1904-16.

33. Ozturk G, Young GM. Food evolution: the impact of society and science on the fermentation of cocoa beans. *Comprehensive reviews in food science food safety* 2017; 16: 431-55.

34. Gutierrez JM, Botta C, Ferrocino I, Giordano M, Bertolino M, Dolci P, Cannoni M, Cocolin L. Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. *Applied environmental microbiology* 2018; 84: e01164-18.

35. Pereira GVM, Miguel MGCP, Ramos CL, Schwan RF. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied environmental microbiology* 2012; 78: 5395-405.

36. Schwan RF, Wheals AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44: 205-21.

37. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 1998; 56: 317-33.

38. Kim H, Keeney PG. Method of analysis for (-)-epicatechin in cocoa beans by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* 1983; 48: 548-51.

39. Kim H, Keeney P. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science* 1984; 49: 1090-92.
40. Carnésecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, Coehlo D, Gossé F, Raul F. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer letters* 2002; 175: 147-55.
41. Osman H, Nasarudin R, Lee SL. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food chemistry* 2004; 86: 41-46.
42. 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* 2000; 33: 423-47.
43. Misnawi, Jinap S, Jamilah B, Nazamid S. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *International journal of food science technology* 2003; 38: 285-95.
44. Aprotosoiaie AC, Luca SV, Miron A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2016; 15: 73-91.
45. Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R. Identification of main fine flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany Food Quality* 2013; 86.
46. Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients* 2013; 5: 4159-73.
47. Jinap S, Jamilah B, Nazamid S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food Agriculture* 2005; 85: 917-24.
48. Ryan CM, Khoo W, Ye L, Lambert JD, O'Keefe SF, Neilson AP. Loss of native flavanols during fermentation and roasting does not necessarily reduce digestive enzyme-inhibiting bioactivities of cocoa. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2016; 64: 3616-25.
49. Aikpokpodion P, Dongo L. Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. *Int J Sustain Crop Prod* 2010; 5: 66-70.
50. Gutiérrez TJCRiFS, Safety F. State-of-the-art chocolate manufacture: A review. 2017; 16: 1313-44.

51. Barišić V, Kopjar M, Jozinović A, Flanjak I, Ačkar Đ, Miličević B, Šubarić D, Jokić S, Babić JJM. The chemistry behind chocolate production. 2019; 24: 3163.
52. Adeyeye E, Akinyeye R, Ogunlade I, Olaofe O, Boluwade JJFc. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. 2010; 118: 357-63.
53. Voigt J, Janek K, Textoris-Taube K, Niewianda A, Wöstemeyer JJFC. Partial purification and characterisation of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components. 2016; 192: 706-13.
54. Counet C, Callemien D, Ouwerx C, Collin SJJoa, Chemistry F. Use of gas chromatography– olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. 2002; 50: 2385-91.
55. Hamdouche Y, Meile JC, Lebrun M, Guehi T, Boulanger R, Teyssier C, Montet DJFRI. Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. 2019; 119: 477-91.
56. Theodorovski DC, Machado AR, Bertolo F, Carolina M, Ribeiro O, Prestes RA, Almeida DM. Caracterização de caldo de cana liofilização. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande 2014; 16: 369-76.
57. Hernández-Hernández C, López-Andrade PA, Ramírez-Guillermo MA, Guerra Ramirez D, Caballero Perez JF. Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. Food science nutrition 2016; 4: 690-95.
58. 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 Products 2006; 24: 87-94.
59. Lima LJ, Almeida MH, Nout MR, Zwietering MH. *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 nutrition 2011; 51: 731-61.
60. Al-Dabbagh B, Elhaty IA, Elhaw M, Murali C, Al Mansoori A, Awad B, Amin AJBrn. Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). 2019; 12: 1-8.
61. BRASIL Lea. Resolução número 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Diário Oficial 1978; 24: 11499-527.

62. Marques JHJRDA. Determinação da composição centesimal de chocolate meio amargo. 2018; 10.
63. Efraim P, Alves AB, Jardim DCP. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian Journal of Food Technology* 2011; 14: 181-201.
64. Koné MK, Guéhi ST, Durand N, Ban-Koffi L, Berthiot L, Tachon AF, Brou K, Boulanger R, Montet D. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International* 2016; 89: 910-17.
65. Meersman E, Steensels J, Struyf N, Paulus T, Saels V, Mathawan M, Allegaert L, Vrancken G, Verstrepen KJ. Tuning Chocolate Flavor through Development of Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Starter Cultures with Increased Acetate Ester Production. *Appl Environ Microbiol* 2016; 82: 732-46.
66. Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 490-6.
67. Aparecido-Gouveia EJ, Mano-Sousa BJ, Chequer FMD, Duarte-Almeida JM. Avaliação da qualidade de produtos magistrais e fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba*, *Passiflora incarnata* e *Matricaria recutita* comercializados no mercado brasileiro e argentino. *Scientia Plena* 2022; 18.
68. Makkar H, Blümmel M, Becker K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition* 1995; 73: 897-913.
69. Brayan Jonas Mano-Sousa, Thaís Paula Rodrigues Gonçalves, Bruna Cristina Alves, Perla Fonseca Amorim de Araújo, Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima, Almeida JMD. Evaluation of the Antioxidant and Larvicidal Potential of Phenolic and Flavonoid Compounds from Different Extracts of the Flowers of *Matricaria recutita* L. *Nova Science Publishers, Inc* 2022: 145-68.
70. Lutz IA. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: IAL, 2008.

71. Martins CB, Vidal DM, Gomes S, Zarbin PHJ, JotBCS. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by *Ilex paraguariensis* plants are affected by the herbivory of the lepidopteran *Thelosia camina* and the coleopteran *Hedypathes betulinus*. 2017; 28: 1204-11.

7 ANEXOS

Relatório de Ensaio Sensorial Nº: 417.2022.B- V.0			
01. Dados Contratação:			
Solicitante:			
Razão Social:	Gabriela Cristina Elias		
CNPJ/CPF:	105.755.936-95		
Contato:	Gabriela Cristina Elias E-mail: gabriela_elias7@hotmail.com		
Proposta Comercial:	118.2022.V0		
02. Dados da Amostragem:			
Descrição da Amostra:	AMENDOAS DE CACAU PROCESSADA - CHOCOLATE		
Endereço Amostragem:	RUA SÃO GONÇALVES CDELOHO,400, CHANADOUR Cidade: DIVINOPOLIS/MG CEP: 35501296		
Responsável pela Amostragem:	renata.rocha		
Matriz e Origem Amostra:	Amêndoas de Cacau Processada - Chocolate alto teor de cacau (>40%)		
Data de Amostragem:	18/03/2022 10:30:00	Característica da Amostra:	Simplex
Informações Adicionais:	CHOCOLATE DE ALTO TEOR ACIMA DE 40%		
Data Recebimento:	18/03/2022 10:43:00	Data Conferência:	22/03/2022 10:50:59
Data Conclusão Amostra:	21/03/2022 15:27:31	Responsável pela Conferência:	Adriana_Reis
Nº Lote:	L 01721 - FAB 080721		

03. Resultados:			
Parâmetros	Resultados	Metodologia	Início Ensaio
Avaliação Sensorial - Qualidade Global	7,10	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Acidez	4,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Adstringência	3,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Amadeirado	2,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Amargor	3,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Amendoado	3,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Doce	4,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Especiarias	2,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Floral	1,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Frutas Frescas	3,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Frutas Marrons	4,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Outros	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Sabor cacau	5,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Torrado	5,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Animal/couro	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Fumaça	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Mofado	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Sobrefermentado/Pútrido	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Sujo	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022

Opiniões e Interpretações: Aroma: acidez cítrica (frutado) e amanteigado; Ótima nota para sabor cacau; Atributos principais equilibrados com acidez cítrica moderada; Atributos auxiliares em destaque: adocicado, fruta marrom (demasiadamente madura), fruta fresca e amendoado moderado; Notas suaves de especiarias (umami) e amadeiradas; Traços para notas florais (green); Sem off flavor presente.

Referência(s) Normativa(s): CAOBISCO/ECA/FCC Cocoa Beans: Chocolate and cocoa Industry Quality Requirements. September 2015 (End, M.J. and Dand, R., Editors).

Relatório de Ensaio tipo B

04. Qualidade Global:
0-3 <i>Off-flavours</i> claramente caracterizado na amostra como defeito; atributos básicos e complementares mascarados pelos <i>off-flavours</i> ; dependendo do tipo, número e intensidade dos <i>off-flavours</i> , nota 0 é a pior e 3 a menos ruim.
4 <i>Off-flavours</i> com intensidade baixa; atributos básicos seriamente desbalanceados; atributos complementares mascarados pelos <i>off-flavours</i> e pelos atributos básicos desbalanceados.

- 5** *Off-flavours* com intensidade baixa; atributos básicos desbalanceados; atributos complementares parcialmente mascarados pelos atributos básicos desbalanceados.
- 6** *Off-flavours* com intensidade baixa; atributos básicos desbalanceados; atributos complementares em baixa intensidade, nada excepcional, nem balanceado aos atributos básicos; sabor geral simples, principalmente caracterizado pelos atributos básicos e menos pelos complementares.
- 7** Ausência de *off-flavours*; um ou mais atributos complementares são excelentes mas não estão balanceados aos atributos básicos; sabor geral simples, principalmente caracterizado pelos atributos básicos e menos pelos atributos complementares.
- 8** Ausência de *off-flavours*; Atributos básicos bem equilibrados com sabor de cacau moderado; um ou mais atributos complementares são excelentes, em equilíbrio com os atributos básicos e entre si; o sabor geral apresenta alguma complexidade.
- 9** Ausência de *off-flavours*; atributos básicos bem balanceados, boa base de sabor de cacau; muitos atributos complementares excelentes e em equilíbrio com os atributos básicos e entre si; o sabor geral apresenta uma combinação de complexidade, singularidade, harmonia, brilho, gosto residual limpo.
- 10** Ausência de *off-flavours*; atributos básicos bem equilibrados, em intensidade baixa a moderada, bom sabor de cacau; atributos complementares claramente reconhecíveis, muitos excelentes, em equilíbrio com os atributos básicos e entre si; o sabor geral apresenta uma combinação de complexidade, singularidade, harmonia, brilho, gosto residual limpo; a amostra é de qualidade extraordinária, raramente vista.

05. Termos e Definições:

Intensidade de Atributos

- 0** Ausente
- 1** Somente traços e que podem não ser encontrado se provado novamente
- 2** Presente na amostra
- 3-5** Claramente caracterizável na amostra
- 6-8** Dominante
- 9-10** Máximo do que você já experimentou

Cacau: descritor que compreende o típico sabor de amêndoas de cacau que foram bem fermentadas, torradas e livre de defeitos (barras de chocolate, cacau fermentado/torrado)

Acidez: descritor que agrupa os sabores provenientes do ácido cítrico (frutas cítricas), ácido acético (vinagre), ácido láctico (semelhante a cheiro de vômito ou leite azedo) e ácido mineral (sabor metálico)

Amargor: descritor percebido no fundo da língua/garganta associado ao sabor de cafeína, cerveja, pomelo, carqueja e que usualmente é devido à falta de fermentação adequada nas amêndoas de cacau

Adstringência: descritor referente a sensação de boca seca e/ou de aspereza na língua na qual incrementa a produção de saliva; percebido entre a língua e palato ou atrás dos dentes frontais (casca de nozes cruas, casca de banana, alguns vinhos). Usualmente devido à falta de fermentação

Doce: descritor referente a líquidos ou chocolate com o sabor característico de caldo de cana caramelizado - caramelo ou açúcar mascavo, a açúcar refinado

Frutas frescas: descritor que agrupa ampla gama de frutas frescas como bagas (groselha, framboesas não totalmente madura), frutas cítricas (essência de citrus) e frutas tropicais (banana, maracujá, laranja, quase sempre apresenta uma nota cítrica)

Frutas Marrons: descritor que agrupa ampla gama de frutas escuras (ameixa, cereja escura), frutas secas (damasco seco, banana passas, uva passas, etc. que sofreram caramelização do açúcar da fruta, com notas sulfurosas e também de nozes), fruta demasiadamente madura (detectado em amêndoas no início da sobrefermentação) e frutas marrons (ameixas e tâmaras)

Amendoado: descritor relacionado ao sabor de nozes, castanhas, cascas de nozes e casca de amêndoa e amendoim associado com alguma sensação de adstringência

Floral: descritor que agrupa ampla gama desde gramínea verde até flores e notas típicas de perfumes. Floral Grama/Vegetal verde/Herbal. Floral Terroso/Cogumelo/Musgo/Madeira em decomposição. Floral Flor de laranjeira. Floral Perfume de flores.

Amadeirado: descritor que agrupa o amadeirado de madeira clara (cinza, praia, bordo, pinho branco, cacauero cortado), madeira escura (carvalho, nogueira, teca) e resina (breu, balsamo de resinas de árvores escuras e claras)

Especiarias: Especiarias (noz-moscada, canela, cravo, cardamomo, páprica, fava-tonka, baunilha, pimenta); Tabaco (cachimbo); Umami (glutamato monossódico)

Torrado: medida de extensão da torra da amêndoa

Off-Flavours Sujo/Poerento: característica desagradável, estrada poerenta

Off-Flavours Animal/ de carne / Couro: carne curada, presunto, gordura processada, gordura animal rançosa, lojas de artigos de couro, sela de cavalo com notas de animal sujo semelhante a suor ou urina

Off-Flavours Sobrefermentado/ fruta podre: fruta em decomposição, associado a sobrefermentação da amêndoa ou fermentação não uniforme

Off-Flavours Pútrido/estrupe: vegetais em decomposição, compostagem, pátio de fazenda, estrume

Off-Flavours Fumaça: ocorre quando se queima material vegetal (madeira, grama, cascas de cacau, etc.) Outros off-flavours - cacau contaminado com fumaça da queima de diesel.

Off-Flavours Mofado: característico de crescimento de mofo, blue cheese (gorgonzola, brie)

Off-Flavours Outros Off-flavours: inseticida, petróleo, tinta, borracha de pneu, químicos

Código de Verificação: 0007400165352013594520202200000



Adriana Cristina Reis Ferreira
CRBio-BA 85939/05-D
Gestor Técnico

Relatório de Ensaio Sensorial Nº: 418.2022.B- V.0			
01. Dados Contratação:			
Solicitante:			
Razão Social:	Gabriela Cristina Elias		
CNPJ/CPF:	105.755.936-95		
Contato:	Gabriela Cristina Elias E-mail: gabriela_elias7@hotmail.com		
Proposta Comercial:	118.2022.V0		
02. Dados da Amostragem:			
Descrição da Amostra:	AMENDOAS DE CACAU PROCESSADA - CHOCOLATE		
Endereço Amostragem:	RUA SÃO GONÇALVES CDEELHO,400, CHANADOUR Cidade: DIVINOPOLIS/MG CEP: 35501296		
Responsável pela Amostragem:	renata.rocha		
Matriz e Origem Amostra:	Amêndoa de Cacau Processada - Chocolate alto teor de cacau (>40%)		
Data de Amostragem:	18/03/2022 10:30:00	Característica da Amostra:	Simple
Informações Adicionais:	CHOCOLATE DE ALTO TEOR ACIMA DE 40%		
Data Recebimento:	18/03/2022 10:43:00	Data Conferência:	22/03/2022 11:13:40
Data Conclusão Amostra:	21/03/2022 15:31:37	Responsável pela Conferência:	Adriana_Reis
Nº Lote:	L 01921 - FAB 17/07/21		

03. Resultados:			
Parâmetros	Resultados	Metodologia	Início Ensaio
Avaliação Sensorial - Qualidade Global	6,40	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Acidez	3,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Adstringência	3,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Amadeirado	2,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Amargor	4,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Amendoado	2,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Doce	3,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Especiarias	2,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Floral	2,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Frutas Frescas	3,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Frutas Marrons	4,00	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Outros	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Sabor cacau	4,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Atributo Torrado	4,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Animal/Couro	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Fumaça	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Mofado	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Sobrefermentado/Pútrido	1,50	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022
Avaliação Sensorial - Off Flavor Sujo	0,0	Análise Sensorial Consensual	21/03/2022

Opiniões e Interpretações: Aroma: amanteigado e floral (green); Boa nota para sabor cacau; Atributos principais equilibrados com amargor moderado; Atributos auxiliares em destaque: fruta marrom (demasiadamente madura), adocicado, fruta fresca moderado; Notas suaves florais (green e herbal), amendoadas, de especiarias (umami) e amadeiradas; Off flavor presente: sobrefermentado (traços); Amargor fenólico residual (suave);

Referência(s) Normativa(s): CAOBISCO/ECA/FCC Cocoa Beans: Chocolate and cocoa Industry Quality Requirements. September 2015 (End, M.J. and Dand, R., Editors),

Relatório de Ensaio tipo B

04. Qualidade Global:
0-3 <i>Off-flavours</i> claramente caracterizado na amostra como defeito; atributos básicos e complementares mascarados pelos <i>off-flavours</i> ; dependendo do tipo, número e intensidade dos <i>off-flavours</i> , nota 0 é a pior e 3 a menos ruim.
4 <i>Off-flavours</i> com intensidade baixa; atributos básicos seriamente desbalanceados; atributos complementares mascarados pelos <i>off-flavours</i> e

pelos atributos básicos desbalanceados.

5 *Off-flavours* com intensidade baixa; atributos básicos desbalanceados; atributos complementares parcialmente mascarados pelos atributos básicos desbalanceados.

6 *Off-flavours* com intensidade baixa; atributos básicos desbalanceados; atributos complementares em baixa intensidade, nada excepcional, nem balanceado aos atributos básicos; sabor geral simples, principalmente caracterizado pelos atributos básicos e menos pelos complementares.

7 Ausência de *off-flavours*; um ou mais atributos complementares são excelentes mas não estão balanceados aos atributos básicos; sabor geral simples, principalmente caracterizado pelos atributos básicos e menos pelos atributos complementares.

8 Ausência de *off-flavours*; Atributos básicos bem equilibrados com sabor de cacau moderado; um ou mais atributos complementares são excelentes, em equilíbrio com os atributos básicos e entre si; o sabor geral apresenta alguma complexidade.

9 Ausência de *off-flavours*; atributos básicos bem balanceados, boa base de sabor de cacau; muitos atributos complementares excelentes e em equilíbrio com os atributos básicos e entre si; o sabor geral apresenta uma combinação de complexidade, singularidade, harmonia, brilho, gosto residual limpo.

10 Ausência de *off-flavours*; atributos básicos bem equilibrados, em intensidade baixa a moderada, bom sabor de cacau; atributos complementares claramente reconhecíveis, muitos excelentes, em equilíbrio com os atributos básicos e entre si; o sabor geral apresenta uma combinação de complexidade, singularidade, harmonia, brilho, gosto residual limpo; a amostra é de qualidade extraordinária, raramente vista.

05. Termos e Definições:

Intensidade de Atributos

0 Ausente

1 Somente traços e que podem não ser encontrado se provado novamente

2 Presente na amostra

3-5 Claramente caracterizável na amostra

6-8 Dominante

9-10 Máximo do que você já experimentou

Cacau: descritor que compreende o típico sabor de amêndoas de cacau que foram bem fermentadas, torradas e livre de defeitos (barras de chocolate, cacau fermentado/torrado)

Acidez: descritor que agrupa os sabores provenientes do ácido cítrico (frutas cítricas), ácido acético (vinagre), ácido láctico (semelhante a cheiro de vômito ou leite azedo) e ácido mineral (sabor metálico)

Amargor: descritor percebido no fundo da língua/garganta associado ao sabor de cafeína, cerveja, pomelo, carqueja e que usualmente é devido à falta de fermentação adequada nas amêndoas de cacau

Adstringência: descritor referente a sensação de boca seca e/ou de aspereza na língua na qual incrementa a produção de saliva; percebido entre a língua e palato ou atrás dos dentes frontais (cascas de nozes cruas, casca de banana, alguns vinhos). Usualmente devido à falta de fermentação

Doce: descritor referente a liquors ou chocolate com o sabor característico de caldo de cana caramelizado – caramelo ou açúcar mascavo, a açúcar refinado

Frutas frescas: descritor que agrupa ampla gama de frutas frescas como bagas (groselha, framboesas não totalmente madura), frutas cítricas (essência de citrus) e frutas tropicais (banana, maracujá, laranja, quase sempre apresenta uma nota cítrica)

Frutas Marrons: descritor que agrupa ampla gama de frutas escuras (ameixa, cereja escura), frutas secas (damasco seco, banana passas, uva passas, etc. que sofreram caramelização do açúcar da fruta, com notas sulfurosas e também de nozes), fruta demasiadamente madura (detectado em amêndoas no início da sobrefermentação) e frutas marrons (ameixas e tâmaras)

Amendoado: descritor relacionado ao sabor de nozes, castanhas, cascas de nozes e casca de amêndoa e amendoim associado com alguma sensação de adstringência

Floral: descritor que agrupa ampla gama desde gramínea verde até flores e notas típicas de perfumes. Floral Grama/Vegetal verde/Herbal. Floral Terroso/Cogumelo/Musgo/Madeira em decomposição. Floral Flor de laranjeira. Floral Perfume de flores.

Amadeirado: descritor que agrupa o amadeirado de madeira clara (cinza, praia, bordo, pinho branco, cacaueteiro cortado), madeira escura (carvalho, noqueira, teca) e resina (breu, balsamo de resinas de árvores escuras e claras)

Especiarias: Especiarias (noz-moscada, canela, cravo, cardamomo, páprica, fava-tonka, baunilha, pimenta); Tabaco (cachimbo); Umami (glutamato monossódico)

Torrado: medida de extensão da torra da amêndoa

Off-Flavours Sujo/Poerento: característica desagradável, estrada poerenta

Off-Flavours Animal/ de carne / Couro: carne curada, presunto, gordura processada, gordura animal rançosa, lojas de artigos de couro, sela de cavalo com notas de animal sujo semelhante a suor ou urina

Off-Flavours Sobrefermentado/ fruta podre: fruta em decomposição, associado a sobrefermentação da amêndoa ou fermentação não uniforme

Off-Flavours Pútrido/estrupe: vegetais em decomposição, compostagem, pátio de fazenda, estrupe

Off-Flavours Fumaça: ocorre quando se queima material vegetal (madeira, grama, cascas de cacau, etc.) Outros off-flavours - cacau contaminado com fumaça da queima de diesel.

Off-Flavours Mofado: característico de crescimento de mofo, blue cheese (gorgonzola, brie)

Off-Flavours Outros Off-flavours: inseticida, petróleo, tinta, borracha de pneu, químicos

Código de Verificação: 0007400165352013594530202200000



Adriana Cristina Reis Ferreira
CRBio-BA 85939/05-D
Gestor Técnico

Figura 15 – Espectro UV-vis do padrão de teobromina

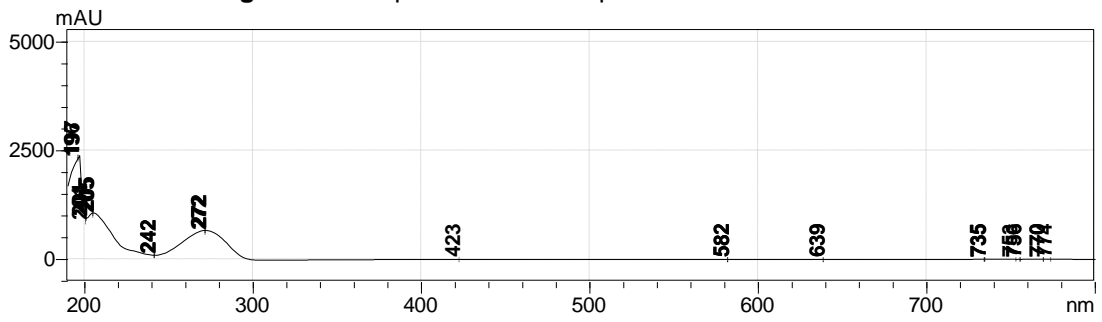


Figura 16 - Espectro UV-vis do padrão de catequina

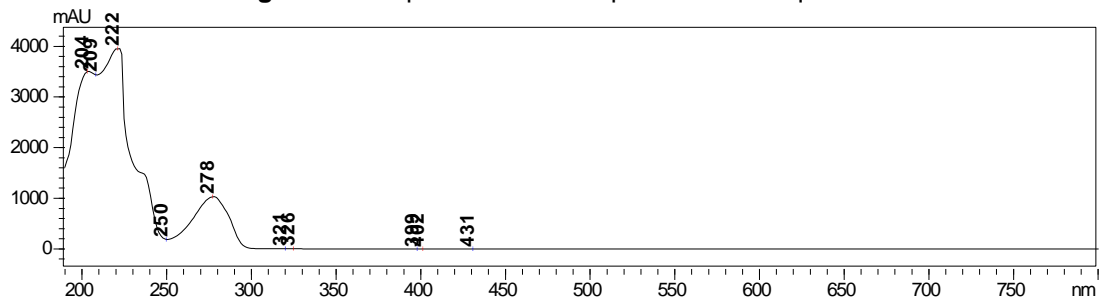


Figura 17 - Espectro UV-vis padrão de epicatequina

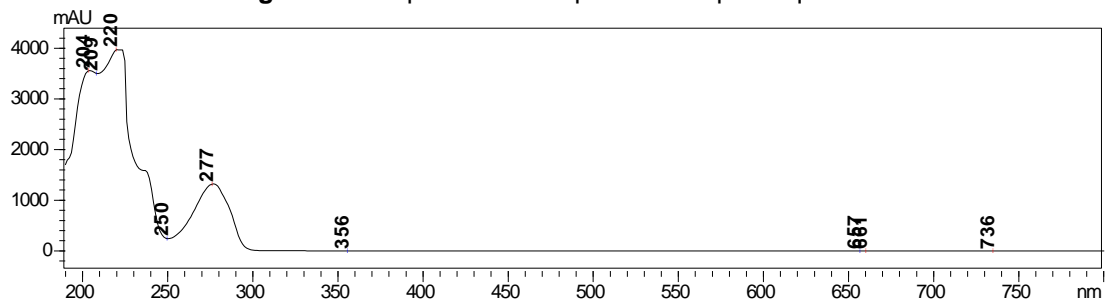


Figura 18 - Espectro UV-vis padrão de cafeína

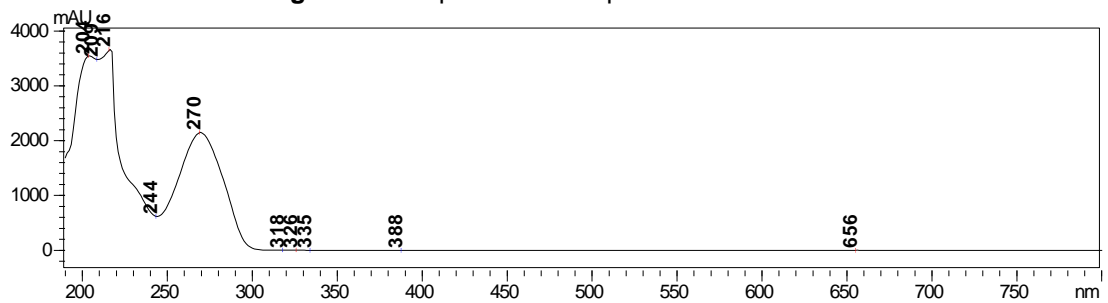


Figura 19 - Espectro UV-vis do pico 1 da amostra de chocolate do lote 01721 (refermentado), característico de teobromina.

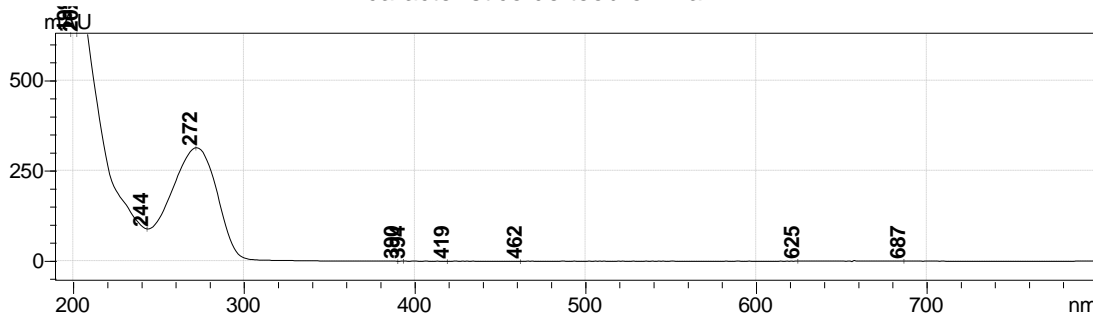


Figura 20 - Espectro de UV-vis do pico 2 da amostra de chocolate do lote 01721, característico de catequina.

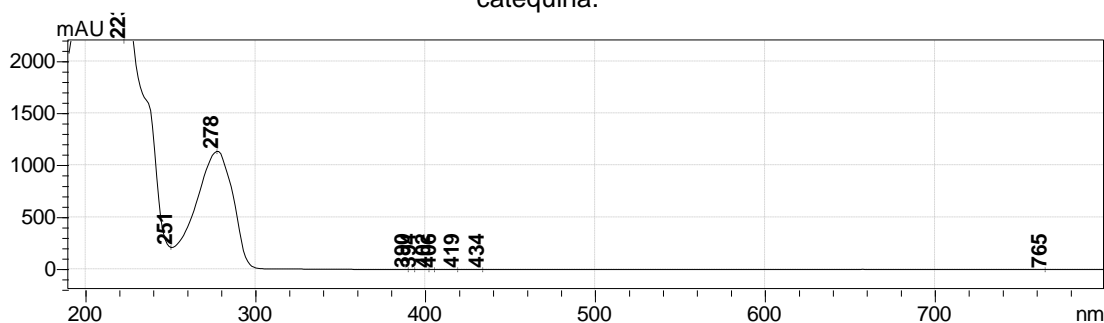


Figura 21 - Espectro UV-vis do pico 3 da amostra de chocolate do lote 01721, característico de cafeína

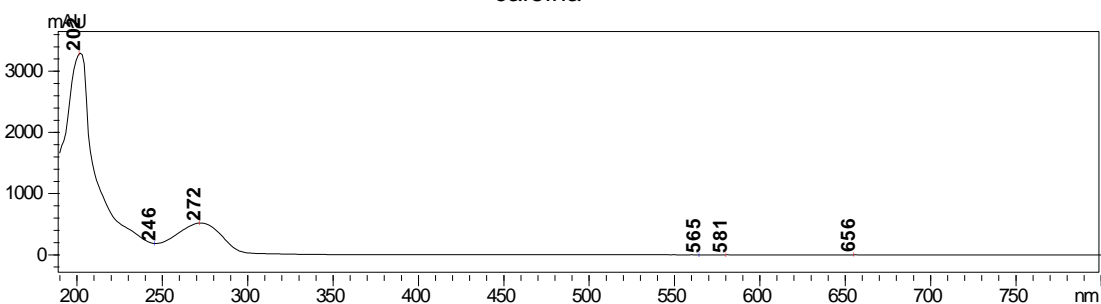


Figura 22 - Espectro UV-vis do pico 4 da amostra de chocolate do lote 01721, característico de epicatequina

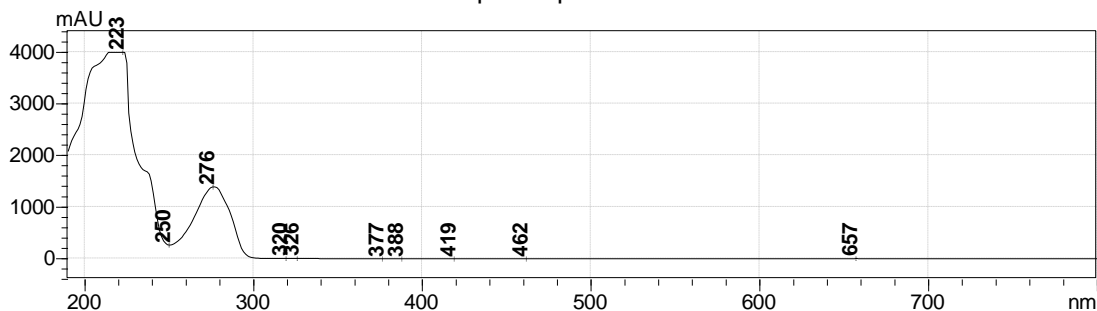


Figura 23 - Espectro UV-vis do pico 1 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de teobromina

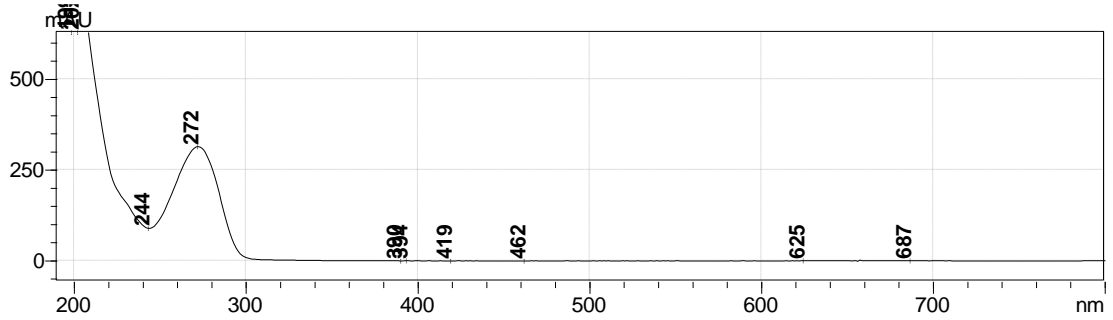


Figura 24 - Espectro UV-vis do pico 2 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de catequina

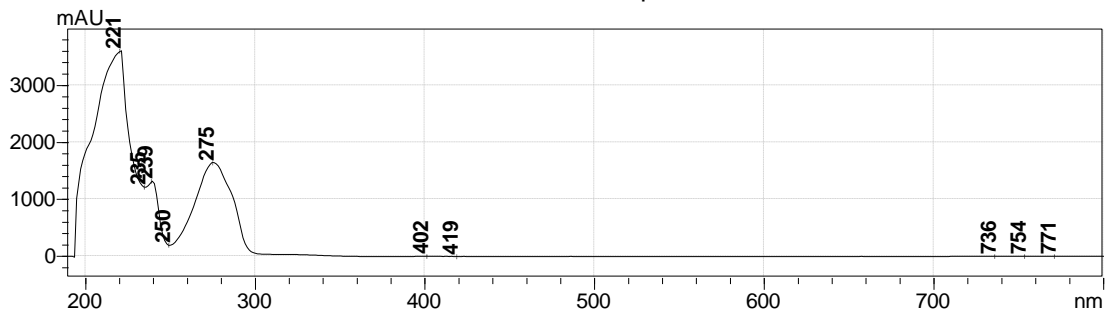


Figura 25 - Espectro UV-vis do pico 3 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de cafeína

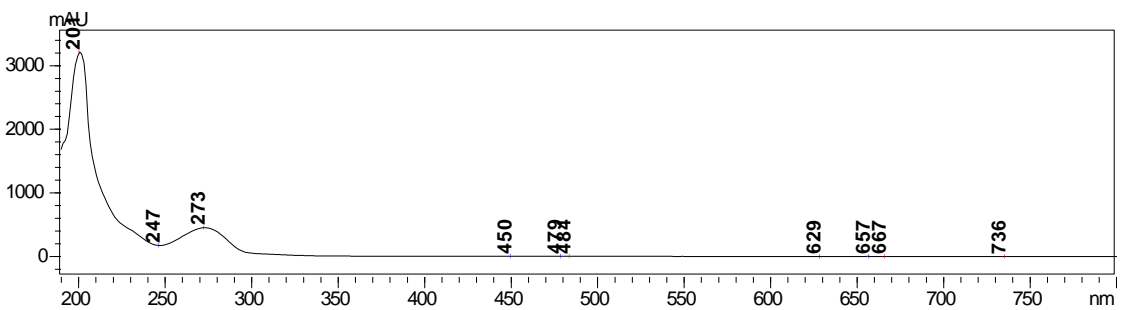


Figura 26 - Espectro UV-vis do pico 4 da amostra de chocolate do lote 01921 (tradicional), característico de epicatequina

