

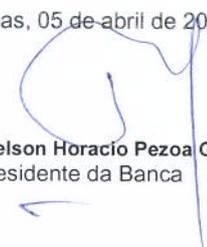
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**“ESTUDO DO MELHORAMENTO DO SABOR DE CACAU
(*Theobroma cacao* L.) ATRAVÉS DE AÇÃO ENZIMÁTICA
DURANTE A FERMENTAÇÃO”**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Marinalda da Silva Soares, aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de abril de 2001.

Campinas, 05 de abril de 2001


Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa Garcia
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

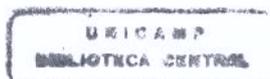
MARINALDA DA SILVA SOARES
Engenheira Química

Prof. Dr. NELSON HORACIO PEZOA GARCÍA
Orientador

CAMPINAS

2001

i



UNIDADE	CB
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	50 112
V.	Ex.
TOMBO BC/	45249
PROC.	16.39210.1
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	11/07/01
N.º CPD	

CM00158107-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Soares, Marinalda da Silva
Solle Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através de ação enzimática durante a fermentação / Marinalda da Silva Soares. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Nelson Horacio Pezoa García
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Cacau. 2.Theobroma cacao L. 3.Fermentação. 4.Enzimas.
5.Sabor. I.Pezoa Garcia, Nelson Horacio. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

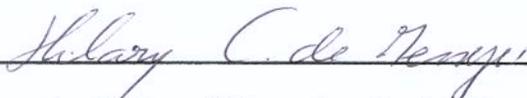
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nelson Horácio Pezoa García
Universidade Estadual de Campinas
Orientador



Prof^a. Dra. Gláucia Maria Pastore
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Prof^a. Dra. Hilary Castle de Menezes
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Prof^a. Dra. Helena Maria André Bolini Cardello
Universidade Estadual de Campinas
Membro

DEDICO

***Aos meus pais Agenor Soares e
Maria José, pelo imenso amor e
incentivo ao longo da minha vida.***

OFEREÇO

***Ao Jeovani Leal pelo apoio e carinho
sempre.***

***“Se as coisas são inatingíveis, ora não é
motivo para não querê-las. Até porque
desejar menos é condenar-se a obter
menos”.***

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García , pela sua excelente orientação em todas as etapas deste trabalho e ainda por sua confiança, atenção e amizade;

À Prof^ª. Dra. Glaucia Maria Pastore pela amizade e colaboração na realização deste;

À Prof^ª. Dra. Hilary Castle de menezes, pela amizade e valiosas sugestões;

À Prof^ª. Dra. Helena Maria André Bolini Cardello por sua estimável atenção, amizade e carinho;

À Prof^ª. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix, pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À Prof^ª. Adilma Regina Pippa Scamparini, por ter autorizado o laboratório para realização da análise de ácidos orgânicos;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado;

Ao Núcleo Experimental de Agronomia do Vale do Ribeira, do Instituto Agronômico (IAC), de onde foram provenientes os frutos estudados;

À PROZYN pela doação da enzima proteolítica e em especial à Daniella por ter sido sempre atenciosa;

À minha amiga Maria Luiza Tucci, pela imensa colaboração durante as correções deste trabalho e por seu constante apoio e carinho;

À toda a minha família pelo carinho e incentivo;

Às amigas Ana Koon e Priscilla Ferraz, por todo carinho, amizade e assistência durante a realização deste trabalho;

Ao Severino, pela ajuda na realização das análises de ácidos orgânicos;

Às minhas amigas e companheiras da República Girassol, Su, Rafa e Leilinha, pela amizade e por todas as brincadeiras e apoio sempre;

Aos amigos Carlinha, Alex, Vanina, Alê, Marcus, Kellynha, Niê, Dani, Cris, Laura, Allan, Valéria, Amanda, Gabi, Vitor, Lilian, Rodrigo, Edwin, Leonel, Marília

Evelyn, Elizângela, Edy, Ricardo, Eduardo, Mei e Leopoldo, por todo apoio, amizade e incentivo;

Ao Edivaldo, pelo carinho e apoio dedicado sempre;

Aos técnicos, Aduino da Planta Piloto, dos diversos laboratório da FEA, Carol, Camila, Alice, Beth, Judite, Carla, Ana Maria, Adriana e Zé Roberto; e aos funcionários, Cosme, Marcelo, Marlene, Jaime, Edinho, César, Maurício e Artur;

A todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	páginas
ÍNDICE.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xix

ÍNDICE

1. - INTRODUÇÃO.....	1
2. - OBJETIVOS.....	5
3. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 - CACAUEIRO.....	7
3.2 - PRODUÇÃO.....	8
3.3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	11
3.3.1 - Composição química da polpa de cacau.....	11
3.3.2 - Composição química dos <i>nibs</i> e testa de cacau.....	12
3.4 - PRÉ-PROCESSAMENTO DE CACAU.....	14
3.4.1 - Colheita e quebra do fruto.....	14
3.4.2 - Fermentação.....	15
3.4.3 - Fatores que afetam a fermentação.....	16
3.4.4 - Transformações específicas durante a fermentação.....	20
3.4.5 - Reações bioquímicas durante a fermentação.....	22
3.5 - ENZIMAS DAS SEMENTES DE CACAU.....	27
3.5.1 - Glicosidase.....	28
3.5.2 - Proteases.....	29
3.5.3 - Polifenoloxidase.....	30
3.5.3.1 - A polifenoloxidase e o cacau.....	30

3.5.3.2	- A polifenoloxidase e a pinha.....	31
3.6	- SECAGEM	34
3.7	- TORRAÇÃO	36
3.8	MELHORAMENTO DO SABOR DE CACAU DURANTE A FERMENTAÇÃO	37
4.	- MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	- MATERIAL	41
4.1.1	- Frutos de cacau	41
4.1.2	- Enzimas	41
4.1.3	- Equipamentos e aparelhos	42
4.1.4	- Reagentes	43
4.2	- MÉTODOS	43
4.2.1	- Caracterização física dos frutos e sementes	43
4.2.2	- Tratamento enzimático	43
4.2.3	- Fermentação	45
4.2.3.1	- Determinação de sólidos solúveis (°Brix)	48
4.2.3.2	- Controle da temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação	48
4.2.3.3	Determinação do pH nas sementes de cacau durante a fermentação	48
4.2.4	- Secagem	48
4.2.5	- Características físicas das amêndoas fermentadas e secas	49
4.2.5.1	- Massa de 100 amêndoas	49
4.2.5.2	Número de amêndoas em 100 gramas	49
4.2.5.3	Densidade aparente	49
4.2.5.4	Composição em frações das amêndoas	50
4.2.5.5	- Prova de corte ("cut test")	50
4.2.6	- Preparo dos nibs	50
4.2.7	- Características físico-químicas dos nibs	50

4.2.7.1	- Teor de umidade.....	50
4.2.7.2	- pH.....	51
4.2.7.3	- Acidez titulável total.....	51
4.2.7.4	- Ácidos orgânicos.....	51
4.2.7.5	- Teor de proteína.....	51
4.2.7.6	- Teor de gordura.....	51
4.2.7.7	- Teor de cinzas.....	52
4.2.7.8	- Teor de fibras.....	52
4.2.7.9	- Determinação do grupo amino-terminal.....	52
4.2.7.10	- Determinação de aminoácidos livres.....	52
4.2.7.11	- Determinação de fenóis totais.....	53
4.2.7.12	- Determinação de taninos.....	53
4.2.7.13	- Determinação de flavo-3-óis.....	53
4.2.7.14	- Determinação de antocianidinas.....	53
4.2.7.15	- Teor de teobromina e cafeína.....	54
4.2.8	- Torrção	54
4.2.9	- Análise sensorial do liquor obtido nos diferentes experimentos	54
4.2.9.1	- Testes de ordenação-preferência.....	55
4.2.9.2	- Análise de aceitação.....	56
4.2.10	- Análises estatísticas	57
5.	- RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	- CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS FRUTOS E SEMENTES	61
5.2	- PARÂMETROS DETERMINADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO	62
5.2.1	- Determinação de sólidos solúveis (°Brix)	62
5.2.2	- Controle da temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação.....	63
5.2.3	- Determinação do pH nas sementes de cacau durante a fermentação.....	66

5.3 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS AMÊNDOAS FERMENTADAS E SECAS	67
5.3.1 - Teor de umidade	67
5.3.2 - Densidade aparente	67
5.3.3 - Massa de 100 amêndoas e número de amêndoas em 100 grama	68
5.3.4 - Frações das amêndoas	69
5.4 - CLASSIFICAÇÃO DAS AMÊNDOAS FERMENTADAS	69
5.5 - Características físico-químicas dos nibs	71
5.5.1 - Valores médios de pH, acidez titulável e ácidos orgânicos dos <i>nibs</i> e da semente liofilizada de cacau	71
5.5.2 - Composição centesimal dos <i>nibs</i> dos diferentes tratamentos de fermentação e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar)	74
5.5.3 - Valores médios do grupo amino terminal e de aminoácidos dos <i>nibs</i> fermentados com tratamentos diferentes e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar)	76
5.5.4 - Valores médios dos compostos fenólicos dos <i>nibs</i> fermentados com tratamentos diferentes e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar)	78
5.6 – TORRAÇÃO DOS NIBS	82
5.6.1 – Variação da temperatura durante a torração dos <i>nibs</i>	82
5.7 - ANÁLISE SENSORIAL DO LIQUOR	83
6. - CONCLUSÕES	89
7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO I – Controle da temperatura de fermentação nas caixas de fermentação	103
ANEXO II – Correlação entre pH, acidez e ácido acético dos <i>nibs</i> e da semente liofilizada	104

ANEXO III - Cromatogramas da análise de ácidos orgânicos para os diferentes experimentos.....	105
ANEXO IV – Cromatogramas típicos de aminoácidos livres em pó de cacau desengordurado: (a) semente liofilizada; (b) E7.....	106
ANEXO V - Cromatogramas típicos de aminoácidos livres em pó de cacau desengordurado: (a) E3; (b) E4.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 01 – Fruto do cacaveiro ainda na planta e aberto com a polpa mucilaginosa à mostra.....	7
FIGURA 02 – <i>Annona squamosa</i> L.: pinha, ata ou fruta-do-conde.....	32
FIGURA 03 – Fluxograma de processamento industrial dos produtos de cacau e terminologia nas diferentes etapas do processo	47
FIGURA 04 – Ficha do teste sensorial ordenação-preferência	58
FIGURA 05 - Ficha do teste sensorial de aceitação.....	59
FIGURA 06 – Variação da temperatura na massa de sementes de cacau durante a fermentação.....	65
FIGURA 07 – Evolução da temperatura durante a torração dos <i>nibs</i>	83
FIGURA 08 – Histograma referente aos resultados do teste de aceitação em relação ao aroma para as amostras do produto obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.....	85
FIGURA 09 – Histograma referente aos resultados do teste de aceitação em relação ao sabor para as amostras do produto obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.....	86
FIGURA 10 – Histograma referente aos resultados do teste de aceitação em relação a impressão global para as amostras do produto obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.....	87

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 01 – Produção de cacau dos principais países produtores com respectivos anos.....	9
TABELA 02 – Composição química da polpa mucilaginosa de frutos produzidos na Costa do Marfim, Nigéria e Malásia (g/100 g massa de polpa fresca).....	11
TABELA 03. Concentração de carboidratos, proteínas e compostos nitrogenados da polpa mucilaginosa de frutos produzidos na Costa do Marfim, Nigéria e Malásia, (g/100 g massa de polpa fresca).....	12
TABELA 04. Valores médios dos açúcares componentes do mel de cacau (% em relação de matéria seca).....	12
TABELA 05. Composição química dos <i>nibs</i> e testa de cacau.....	13
TABELA 06. Caracterização das principais enzimas ativas durante a fermentação da semente do cacau.....	27
TABELA 07. Propriedades e composição química da polpa de pinha (<i>Annona squamosa</i> L.).....	33
TABELA 08. Tratamentos fermentativos de sementes do cacau utilizando a enzima polifenoloxidase contida na pinha e a enzima comercial protease.....	44
TABELA 09. Valores biométricos dos frutos <i>in natura</i> de cacau.*.....	61
TABELA 10. Valores biométricos das sementes de cacau.....	62
TABELA 11. Valores de sólidos solúveis (°Brix) da polpa durante a fermentação.....	63
TABELA 12. Valores do pH no interior das caixas durante a fermentação.....	66
TABELA 13. Características físicas das amêndoas (valores médios de 100 amêndoas).....	68
TABELA 14. Valores médios de <i>nibs</i> , testa e gérmen da amêndoa expressos em porcentagem.....	69

TABELA 15. Valores do teste da prova de corte (porcentagem de amêndoas marrons e violetas)	71
TABELA 16. Valores médios do pH e acidez titulável total dos <i>nibs</i> e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar).....	72
TABELA 17. Valores de ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação das amêndoas fermentadas e secas.....	73
TABELA 18. Estimativa de correlação (ρ) entre pH, acidez, e ácido acético dos <i>nibs</i> * e da semente liofilizada.	74
TABELA 19. Composição Química* dos <i>nibs</i> fermentados com tratamentos diferentes e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar).....	76
TABELA 20. Valores médios do grupo amino-terminal e de aminoácidos livres nos <i>nibs</i> fermentados com tratamentos diferentes e na semente liofilizada de cacau (sem fermentar).....	77
TABELA 21. Concentração (mg g^{-1}) de fenóis totais, taninos e flavan-3-óis em pó de cacau desengordurado.....	80
TABELA 22. Quantificação de antocianidinas em pó de cacau desengordurado..	81
TABELA 23. Resultados do teste de ordenação para o melhor tempo de torração.....	82
TABELA 24. Valores médios dos atributos sensoriais estudados dos produtos obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.....	88

RESUMO

A fermentação das sementes de cacau é uma atividade indispensável para o desenvolvimento dos precursores do aroma de chocolate. Durante essa etapa a polpa que envolve as sementes é metabolizada por microrganismos, produzindo, principalmente, etanol e ácido acético, que são absorvidos pelos cotilédones causando a morte da semente e promovendo alterações físico-químicas importantes na constituição do sabor. Entre essas, pode-se ressaltar a formação de aminoácidos e açúcares redutores livres, oxidação de antocianinas, e complexação de aminoácidos com compostos fenólicos formando quinonas, contribuindo assim para a redução do amargor e adstringência das amêndoas. Diante da necessidade do melhoramento do sabor do cacau, este trabalho visa a utilização da enzima polifenoloxidase (PPO) provinda da polpa de pinha (*Annona squamosa* L.), que atua na fase primária da fermentação e da enzima protease, na forma comercial, denominada "Protezyn Flavour", a fim de reduzir a concentração de compostos responsáveis pelo amargor e adstringência e aumentando a disponibilidade de aminoácidos livres para as reações de desenvolvimento de sabor. As enzimas foram adicionadas após 48 horas e 96 horas do processo fermentativo, tempos em que as condições de pH e temperatura se tornaram mais favoráveis. A enzima protease foi adicionada nas concentrações de 0,5% e 0,75% em relação ao teor de proteína presente na semente,. A polpa de pinha madura rica em PPO foi adicionada nas concentrações de 5,0% e 7,5% em relação à massa total de sementes de cacau com polpa mucilagínosa. Foram realizadas oito fermentações de sementes de cacau em duplicata: três com adição de polpa de pinha madura, três com adição da enzima protease e duas sem aplicação de enzima, sendo que em uma destas adicionou-se água na mesma proporção das soluções com enzima protease. As fermentações foram realizadas todas simultaneamente em caixas de isopor com capacidade aproximadamente de 6 litros e com orifícios, no fundo, de 0,5cm de diâmetro, espaçados a cada 2,5cm

para o escoamento do mel e em uma sala climatizada com temperatura média de 33°C e umidade relativa ao redor de 65%, condições similares às daquelas das regiões onde se cultiva e fermenta o cacau. Os *nibs* foram secados e moídos para depois serem desengordurados. Foram realizadas análises no pó de cacau desengordurado para a quantificação de fenóis totais, taninos, antocianidinas, flavan-3-óis e aminoácidos livres. Os experimentos tratados com PPO tiveram redução de 18,64 e 20,07% de fenóis totais. Houve aumento na concentração de aminoácidos livres na faixa de 43,8-79,74%. A torração foi efetuada sobre os *nibs* com granulometria entre 3-6 mm, em lotes de 250 g, em forno elétrico rotativo à temperatura de 150°C na camisa do aparelho. Foram utilizados três tempos de torração para cada experimento: 36, 38 e 40 minutos. Os *nibs* torrados foram refinados (*liquor*) para a formulação da mistura para realização dos testes sensoriais. Os tratamentos com adição de 0,5% da enzima comercial “Protezyn flavour” e adição de 5,0% de polpa de pinha, após 96 horas de fermentação, foram considerados os melhores, de acordo com os resultados analíticos.

SUMMARY

The fermentation of cocoa beans is an indispensable activity for the development of the precursors of chocolate flavor. During this stage the pulp that surrounds the beans is metabolized by microorganisms, producing, mainly, ethanol and acetic acid which are absorbed by the cotyledons resulting in the death of the seed, with several physical-chemical changes that will have important an influence on the flavor. Among these the synthesis of amino acids and free reducing sugars, anthocyanin oxidation and of amino acid complexation with fenolics compounds, giving rise to quinones. All of these contribute to the reduction of the bitterness and astringency of the beans. In order to improve of the cocoa flavor, this work deals with the use of the enzyme polyphenoloxidase (PPO) extracted from ripe custard apple (*Annona squamosa* L.) pulp, which acts in the primary phase of fermentation, and of the commercial enzyme protease, known as " Protezyn Flavour ", with the aim of reducing the concentration of compounds responsible for the bitterness and astringency, and of increasing the availability of free amino acids for the reactions of flavor development. The enzymes were added after 48 hours and 96 hours of the fermentation process. The enzyme protease was added in the concentrations of 0.5% and 0.75% of the bean protein content. The ripe custrad apple pulp, rich in the enzyme PPO, was added in the concentrations of 5.0% and 7.5% of the total weight of wet beans. Eight fermentations were carried out: three with the addition of ripe custard apple pulp, three with the addition of the enzyme protease and two with no enzyme application, and in one of these fermentations water was added in the same proportion as the solutions with the enzyme protease. The fermentations were carried out simultaneously in fiberglass boxes with a capacity for 6 liters, with holes in the botton, spaced at 2.5cm for the drainage of exsudates. The boxes were placed in an acclimatized room with a meam temperature of 33°C and relative humidity of 65%, conditions similar in those of the areas where cocoa is cultivated and fermented. The *nibs* were dried and ground and then defatted. Analyses were

carried out on the defatted cocoa powder for the quantification of total phenols, tannins, anthocyanidins, flavan-3-ols and free amino acids. The experiments with PPO showed a reduction of from 18.64 and 20.07% in total phenols. There was no increase in the concentration of free amino acids in the range from 43.80 –79.74%. Roasting was effected on *nibs* in the range of size from 3 to 6 mm, in portions of 250 g, in a rotative electric oven at a temperature of 150°C. For each experiment three different times of roasting were applied: 36, 38 and 40 minutes. The roasted cocoa *nibs* were ground and refined for the formulation of the mixture used in the sensory tests. According to the analyses the best results were obtained with the treatments with the addition of 0.5% of the enzyme protease and 5.0% of the ripe custard apple pulp, allowing for 96 hours of fermentation.

1 - INTRODUÇÃO

O cacauieiro é uma árvore silvestre originária da América Tropical, pertencente ao gênero *Theobroma*, que produz sementes, que são a matéria prima principal na fabricação do chocolate (HANCOCK, 1988).

A fermentação das sementes realizada ainda na propriedade agrícola é uma operação indispensável ao desenvolvimento dos precursores do aroma chocolate. Durante essa etapa, a polpa que envolve as sementes é metabolizada por microrganismos, produzindo inúmeros compostos, destacando-se numa primeira etapa, o etanol e ácidos acético e láctico, os quais ao serem absorvidos pelos cotilédones, promoverão várias mudanças físico-químicas, que terão influência importante no sabor. Entre essas, pode-se ressaltar a formação de aminoácidos e açúcares redutores livres, oxidação de antocianinas, e complexação de aminoácidos com compostos fenólicos formando quinonas, contribuindo assim para a redução do amargor e adstringência das amêndoas (PEZOA, 1989).

No decorrer da etapa de secagem, continua a oxidação dos compostos polifenólicos na presença de oxigênio, resultando também na formação de quinonas que sofrem polimerização para formação de produtos de cor marrom. Contudo, tendo em vista o pH ideal da polifenoloxidase (6,0), em sementes ácidas (pH 4,0 – 5,0), o escurecimento é lento durante o processo de secagem. Por outro lado, em reações modelos com pH > 7 os polifenóis são oxidados quimicamente e não enzimicamente (JEANJEAN, 1995).

O término da fermentação deve acontecer no momento preciso. Um cacau sobrefermentado certamente se tornará marrom, dando a falsa aparência de uma amêndoa perfeitamente fermentada, contudo esse excesso de tratamento poderá provocar a inutilização do cacau, tornando-o insípido. Uma consequência da oxidação polifenólica e da polimerização da quinona é a redução da adstringência e do amargor (JEANJEAN, 1995), porém com os cuidados necessários para não atingir a sobrefermentação.

Tem sido realizadas algumas pesquisas com o objetivo de reduzir os compostos polifenólicos do cacau. PURR (1972) desenvolveu estudos a partir do princípio de infiltração à vácuo de enzimas ou de substâncias que influenciam a ação dessas enzimas (cofatores) em sementes de cacau durante a fermentação. Foram testados sais de cobre, uma vez que o cobre é um cofator da polifenoloxidase, proteínas, misturas de aminoácidos, entre outros. Essas substâncias tiveram um efeito desejável considerando que se poderia obter um bom chocolate. A redução, em torno de 25%, no teor de polifenóis em *nibs* (pequenos pedaços de amêndoas desintegradas) de cacau, através de tratamento enzimático, foi obtida por YOSHIYAMA & ITO (1996) e FERNÁNDEZ BARBERY (1999). Esses autores concluíram que houve uma grande redução de polifenóis quando *nibs* foram autoclavados, facilitando a penetração e ação da enzima polifenoloxidase nos tecidos, diminuindo o sabor amargo e a adstringência nos produtos de cacau.

A presença da enzima polifenoloxidase durante o processo fermentativo, é um fator significativo da qualidade do sabor, devido a esta catalisar a oxidação de monohidroxi e o-dihidroxi fenóis para formar o-quinonas (WONG *et al.*, 1990). Ao oxidar compostos fenólicos, há diminuição da adstringência e do sabor amargo, permitindo uma melhor apreciação dos sabores presentes (HOLDEN, 1959).

Diante da necessidade do melhoramento do sabor do cacau, este trabalho visou a utilização de duas enzimas na fase de fermentação: a) polifenoloxidase presente na polpa de pinha (*Annona squamosa* L.), esperando-se que esta atue primeiro na fase primária da fermentação e posteriormente, de uma forma menos intensa, no final desta etapa e durante a secagem das amêndoas, reduzindo a adstringência e o sabor amargo; b)enzima proteolítica na forma comercial, denominada "Protezyn Flavour", cuja atividade será importante para incremento da produção de precursores do sabor, aumentando a disponibilidade de aminoácidos livres necessários para as reações posteriores de desenvolvimento do sabor.

No Brasil, a produção de cacau está mais concentrada nas regiões Norte e Nordeste. Como a pinha é uma fruta tipicamente de clima tropical e subtropical e abundante na região cacauzeira, poderia ser economicamente viável ao pequeno produtor de cacau dessas regiões utilizá-la como fonte de polifenoloxidase durante a fermentação de cacau, visando melhoramento do sabor. Essa prática não apresentaria maiores dificuldades no procedimento tradicional de fermentação, promovendo probabilidade de redução da adstringência e do sabor amargo do cacau, melhorando a qualidade do produto final.

2 - OBJETIVOS

GERAIS

- Melhorar o sabor do cacau através da adição de enzimas durante o processo de fermentação

ESPECÍFICOS

- Reduzir a concentração de compostos fenólicos através da adição da enzima polifenoloxidase, a fim de diminuir a adstringência e o amargor,
- Hidrolisar proteínas utilizando uma protease comercial, aumentando assim a disponibilidade de aminoácidos livres, para as reações de desenvolvimento de sabor, juntamente com açúcares redutores livres.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - CACAUEIRO

O cacaueteiro é planta pertencente à família *Sterculiaceae*, que possui diversos gêneros, sendo a espécie *Theobroma cacao*, utilizada para a produção de chocolate. Essa planta é uma árvore silvestre originária da América Tropical, cultivada em todas as regiões de floresta tropical úmida principalmente dentro dos 17° N e 20° S de latitude (HANCOCK, 1988, MINIFIE, 1989).

O fruto é alongado, apresentando sulcos longitudinais, e casca dura (FIGURA 1); as sementes, de cor violeta, e em número de 20-40, dispõem-se em 5 fileiras e são envolvidas pela testa, que se apresenta recoberta por uma polpa mucilaginosa branca ou rósea e adocicada. A semente encerra o embrião, localizado na base dos cotilédones (CAVALCANTE, 1991).



FIGURA 01. Fruto do cacaueteiro ainda na planta e aberto, com a polpa mucilaginosa à mostra. FONTE: <http://www.ceplac.gov.br>

Existe uma grande variabilidade nos frutos de cacau, quanto às dimensões, cor, forma e número de sementes. Do ponto de vista comercial, três grupos são fundamentais no reconhecimento do cacau. Eles são o criollo, o forastero e o trinitário (BECKETT, 1994).

Cacau criollo: é caracterizado pela forma alongada, com uma ponta proeminente. Sua superfície externa é enrugada, possuindo cinco sulcos longitudinais profundos e pronunciados. Apresenta sementes ovais que se encontram relativamente soltas na polpa. Os cotilédones não apresentam células pigmentadas, caracterizando-se pela cor branca. Possui aroma suave e agradável.

Cacau forastero: os frutos de forma arredondada, possuem casca dura de superfície quase lisa. As sementes estão firmemente alojadas na polpa e são achatadas, de forma quase triangular. Apresentam cotilédones de cor violeta e sabor mais ácido e mais adstringente que as outras variedades.

Cacau trinitário: tem origem atribuída geralmente, ao resultado da hibridação entre cacau tipo criollo e forastero. Porém, evidências bioquímicas, recentemente descobertas, sugerem que o cacau trinitário seja mais próximo do cacau criollo. Árvores tanto desta variedade como do cacau criollo dão origem a um produto considerado por muitos como de alta qualidade.

3.2 - PRODUÇÃO

No Brasil, o cacau foi cultivado inicialmente no Pará e em seguida, em 1746, na Bahia. A região de Ilhéus é a zona mais favorável ao cultivo do cacau devido ao clima, solo e topografia. Atualmente a Bahia responde por cerca de 80% da produção nacional. A região cacaeira da Bahia espera produzir 1,6 milhão de

sacas de 60Kg na safra 1999/2000, a menor dos últimos 30 anos (REVISTA COMÉRCIO EXTERIOR, s.d.).

O mercado internacional de cacau tem se caracterizado, nos últimos anos, por um persistente excesso de produção, o que tem gerado uma elevada acumulação de estoques e uma queda generalizada dos preços internacionais. A diferença entre a taxa de crescimento da produção e do consumo resultou em um aumento sem precedentes nos estoques mundiais de cacau, tanto em termos absolutos quanto em proporção ao consumo mundial. Como consequência desse contínuo desequilíbrio entre a oferta e a demanda, tem havido uma queda contínua nos preços do cacau no mercado internacional (SANT'ANA, 1994).

É importante mencionar, além disso, que o mercado de cacau caracteriza-se por uma elevada concentração na produção e consumo, o que facilitaria um acordo internacional, devido ao número reduzido de participantes no mercado (SANT'ANA, 1994). A Tabela 01 apresenta os principais produtores de cacau.

TABELA 01. Produção* de cacau dos principais países produtores com respectivos anos.

ANO AGRÍCOLA	Brasil	Gana	Costa do Marfim	Malásia	Indonésia
1976/77	234	n.d	230	21	3
1984/85	403	175	571	99	33
1988/89	336	300	840	222	74
1992/93	305	312	690	219	181
1994/95	229	309	877	120	238
1996/97	156	325	1.100	110	274

*valores em mil toneladas. FONTE: FIEB (1998) citado por FERREIRA *et al.* (1998)

Atualmente, a Costa do Marfim (África) é o maior produtor mundial.

O Brasil já ocupou esse posto na economia mundial de cacau, porém nos últimos 15 anos houve uma decadência da produção cacaueteira no sul da Bahia.

Segundo referências do IBGE (1999), a produção brasileira no ano de 1998 foi de 280 mil toneladas e a estimativa para 1999 segundo a International Cocoa Organization (ICCO, 1999) seria de 150 mil toneladas, indicando assim uma nova queda na produção, e esse decréscimo pode ser explicado não somente pela incidência do fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, conhecido pelo nome de “vassoura-de-bruxa” que continua a atacar as plantações baianas, mas também à falta de investimentos em técnicas modernas de plantio e ao baixo preço do cacau brasileiro no mercado mundial.

No Brasil, cultiva-se comercialmente o cacau forastero, sendo que, ultimamente vêm sendo introduzidos diferentes híbridos, mais resistentes e produtivos (SEAGRI, 1999).

Os cinco principais importadores (Estados Unidos, Alemanha, Rússia, Reino Unido e França) são responsáveis por 63% das importações. Os Estados Unidos são de longe o importador dominante, com uma participação de 27% no mercado (SANT'ANA, 1994).

3.3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.3.1 – Composição química da polpa de cacau

A polpa é composta por 80 a 90% de água e 10 a 13% de açúcares, além de pequenas quantidades de ácido cítrico, proteínas e outros componentes com porcentagens menores (MINIFIE, 1989).

A composição da polpa é importante porque é a partir dos açúcares nela contidos, que se inicia o processo fermentativo (LOPEZ, 1979).

As Tabelas 02 e 03 apresentam a composição química e a concentração de carboidratos, proteínas e compostos nitrogenados da polpa mucilagínosa e na Tabela 04 estão os valores médios dos açúcares.

TABELA 02. Composição química da polpa mucilagínosa de frutos produzidos na Costa do Marfim, Nigéria e Malásia (g/100 g massa de polpa fresca)

	Costa do Marfim	Nigéria	Malásia
Água	82,60	82,50	85,90
Mono e dissacarídeos	11,15	13,05	11,60
Polímeros da parede celular	02,81	n.d	1,48
Citrato	01,31	0,79	0,29
Proteína, peptídeos e aminoácidos	0,74	0,64	0,65
Gordura	0,45	0,75	0,35
Metais		0,22	n.d
Vitaminas (compostos simples)	0,24	n.d	n.d
Etanol		0,10	0,20

FONTE: PETTIPHER (1986)

n.d.: Não determinado

TABELA 03. Concentração de carboidratos, proteínas e compostos nitrogenados da polpa mucilagínosa de frutos produzidos na Costa do Marfim, Nigéria e Malásia, (g/100 g massa de polpa fresca)

	Costa do Marfim	Nigéria	Malásia
Sacarose	4,35	1,92	1,35
Glicose	3,00	5,06	4,90
Frutose	3,80	6,07	5,35
Nitrogênio total	0,11	0,11	n.d
Aminoácidos livres	0,15	0,51	0,21
Proteínas/peptídeos	0,57		0,43
Amônia	0,02	0,02	0,01

FONTE: PETTIPHER (1986)

n.d.: Não determinado

TABELA 04. Valores médios dos açúcares componentes do mel de cacau (% em relação de matéria seca)

Açúcar	Intervalo entre a colheita e a quebra do fruto	
	0 dia	6 dias
Sacarose	8,50	6,56
Glicose	2,67	4,50
Frutose	2,94	3,62
Sorbose	0,08	0,10
Inositol	0,05	Traços
Pentitol	0,01	traços

FONTE: BERBERT (1979) citado em ZAMALLOA (1994).

3.3.2 - Composição química dos *nibs* e testa de cacau

A composição química das amêndoas de cacau (TABELA 05) pode variar dependendo de muitos fatores, entre os quais a variedade, origem, grau de maturação dos frutos e práticas agrícolas.

TABELA 05. Composição química dos *nibs* e testa de cacau.

Componetes	<i>Nibs</i>	Testa
Água*	2,1	3,8
Gordura	54,7	3,4
Cinzas	2,7	8,1
Nitrogênio		
Nitroênio total	2,2	2,8
Nitrogênio protéico	1,3	2,1
Teobromina	1,4	1,3
Cafeína	0,07	0,1
Carboidratos		
Glicose	0,1	0,1
Amido	6,1	--
Pectina	4,1	8,0
Fibra crua	2,1	18,6
Celulose	1,9	13,7
Pentoses	1,2	7,1
Gomas e mucilagem	1,8	9,0
Taninos		
Ácido tânico	2,0	1,3
Púrpura e vermelho	4,2	2,0
Ácidos (orgânicos)*		
Acético livre	0,1	0,1
Cítrico	---	0,7
Oxálico	3	0,3

* A água e os ácidos orgânicos podem variar de acordo com o grau de secagem ou torração.

FONTE: MINIFIE (1989).

3.4 – PRÉ-PROCESSAMENTO DE CACAU

Segundo ZAMALLOA (1994), embora os critérios físicos e químicos como teor de gordura, proteína, carboidratos, cor e pH sejam frequentemente usados como base para avaliar a qualidade das amêndoas secas, o critério final é o sabor após a torração e operações subsequentes. Além de estar intimamente relacionado às características genéticas, o sabor é também bastante influenciado pelas técnicas de pré-processamento, sendo que o desenvolvimento potencial do sabor depende principalmente das etapas de fermentação e secagem.

3.4.1 – Colheita e quebra do fruto

O desenvolvimento do fruto, desde a fecundação até a maturação, demora cerca de seis meses. Na prática, a maturidade do fruto é reconhecida geralmente pela mudança de cor do mesmo. Por ocasião da colheita, é muito importante observar o estágio de maturação, a fim de assegurar uma fermentação adequada (LAJUS, 1982).

O pré-processamento se inicia com a abertura dos frutos permitindo dessa forma a separação das sementes que são compostas de um embrião e de dois cotilédones que são cobertos pela testa. As sementes, junto com a polpa mucilaginosa, são submetidas às operações de fermentação, secagem e armazenamento, dependendo principalmente dessa sequência a qualidade final dos produtos a serem obtidos (ROHAN, 1964; SCHWAN *et al.*, 1990).

3.4.2 - Fermentação

Após a colheita dos frutos, continuam os mecanismos bioquímicos que contribuem para a formação dos precursores do sabor e aroma. Além da fermentação propiciar a degradação da polpa mucilaginosa, impede a germinação das sementes e tem como principal objetivo o desenvolvimento dos precursores necessários para o sabor chocolate (HOSKIN & DIMICK, 1981).

Dois principais fenômenos ocorrem durante esse processo: a) atividade microbiana na polpa mucilaginosa, com produção de álcool e ácidos, liberando calor; b) complexas reações bioquímicas no interior dos cotilédones, iniciadas pela difusão de produtos do metabolismo da polpa, produzidos por microrganismos. Dessa forma ocorre a morte do embrião, causada pelas condições adversas do meio e posteriormente uma degradação celular, proporcionada pelo ataque de ácidos e da elevação da temperatura no tecido da semente. Essas transformações facilitarão a secagem das amêndoas (MINIFIE, 1989; LOPEZ & DIMICK 1991; SCHAWN, 1996).

A fermentação do cacau pode ser realizada de quatro maneiras: em montes, cestas, bandejas ou caixas. A fermentação em montes é usada principalmente em Gana, Nigéria e Costa do Marfim. As sementes são amontoadas no chão sobre folhas de bananeira e recobertas com o mesmo material. Para facilitar a drenagem do líquido exsudado (mel), formam-se montes sobre estrados de fibras vegetais, bambu ou madeira. O revolvimento da massa, neste caso, geralmente é feito no segundo e no quarto dia (ROHAN, 1964).

A fermentação em cestos é comum na Nigéria. Os cestos são cobertos e forrados internamente com folhas de bananeira e a drenagem do mel é feita

através dos interstícios. O revolvimento é feito pela transferência da massa de um cesto para outro (FORSYTH & QUESNEL, 1957).

ROHAN (1964) também desenvolveu um estudo de fermentação em bandejas de madeira. No total de 12 bandejas empilhadas, a superior é coberta por folhas de bananeira, sendo cada bandeja dividida ao meio por uma tábua removível. Após 24 horas de fermentação, a pilha é coberta com sacos bem ajustados. Não há necessidade de manipulação ao longo da fermentação.

De acordo com LOPEZ & DIMICK (1991), pesquisas realizadas por FORSYTH & QUESNEL (1956) revelaram que a maioria do cacau mundial é processada em cestas, montes ou caixas. A fermentação em montes e cestas é realizada em propriedades que possuem pequena produção de cacau, porém a maioria dos grandes produtores utiliza caixas de madeira. De uma maneira geral, no Brasil, a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da lavoura Cacaueira), órgão responsável pelo desenvolvimento das regiões cacaueiras do Brasil, recomenda esse tipo de técnica (CEPLAC, 1980), segundo a qual, a massa de sementes deve sofrer revolvimentos ao longo do processo e o primeiro deve ser realizado obrigatoriamente após 24 horas do início da fermentação. O momento em que devem ser realizados os revolvimentos seguintes dependerá da magnitude do lote (FORSYTH & QUESNEL, 1957).

3.4.3 – Fatores que afetam a fermentação

Os vários métodos de fermentação são bastante distintos entre si nos detalhes e isso reflete o grande número de fatores influenciando o processo:

- Maturação dos frutos - Somente os frutos maduros possuem quantidades de açúcar e outras substâncias necessárias para uma boa fermentação das

sementes, já que os frutos não maduros além de ser muito ácidos, apresentam sementes menores e menor quantidade de açúcar, motivo pelo qual fermentam mal e têm menor rendimento no peso final (MARAVALHAS, 1971 citado em FERNÁNDEZ BARBERY, 1999).

- Doenças dos frutos - A maioria das doenças dos frutos leva à completa perda das sementes. Mesmo quando as sementes não estão destruídas é indesejável usá-las na fermentação. No caso da podridão parda causada pelo fungo *Phytophthora palmivora*, os frutos são atacados em qualquer fase de seu desenvolvimento. Na superfície de frutos atacados aparecem manchas de coloração escura, que posteriormente se espalham por todo o fruto, ocasionando seu apodrecimento dentro de uma semana (LAJUS, 1982).

- Tipo de cacau - A concentração de pigmentos nos cotilédones é a principal diferença entre as variedades Criollo e Forastero. As antocianinas constituem cerca de 0,5% da massa seca do Forastero, mas são ausentes nas sementes do Criollo. Essas diferenças na composição química do cotilédone determinam a duração da fermentação. As sementes do cacau Criollo precisam ser fermentadas por um período relativamente curto (2 a 3 dias), enquanto aquelas do cacau Forastero devem ser fermentadas durante 5 a 7 dias (SHWAN *et al.*, 1995).

- Variações na relação polpa/semente - Sementes frescas podem variar consideravelmente na relação polpa/semente e no teor de açúcares por semente. Esses fatores variam com o tipo de material vegetal e também com as condições de cultivo (CLAPPERTON, 1994).

- Diferenças climáticas e estacionais – Há diferenças estacionais no teor de polpa aderida às sementes. Na África Ocidental a safra principal começa no final da estação úmida e conforme a colheita prossegue, o teor de polpa decresce. Além

das variações estacionais há países como Uganda em que a temperatura ambiente mostra considerável variação diurna. Isso pode levar a baixas temperaturas na fermentação, sendo assim as caixas de fermentação deverão ser protegidas de ventos (FOWLER, 1994).

- Repouso dos frutos - Os frutos colhidos podem ficar no campo por um período de três a quatro dias (ROHAN, 1964; CEPLAC, 1980). Esse intervalo é aconselhável para que o fruto passe pelo período pós-colheita, que tem por finalidade homogeneizá-los (SOBRAL, 1982 citado por ARAGÃO, 1992).

Períodos de espera muito superiores tendem a secar excessivamente a polpa e reduzir o seu teor de açúcar, além do perigo de germinação dentro do fruto. Sementes colhidas até quatro dias antes da quebra podem ser fermentadas conjuntamente, sem afetar a qualidade do produto (CEPLAC, 1980).

O período entre a quebra do fruto e início da fermentação propriamente dita, também é de extrema importância, pois não deve ultrapassar 24 horas. Também recomenda-se não fermentar conjuntamente sementes provenientes de quebras de dias diferentes, pois isso poderia conduzir a uma fermentação desigual. Quando o prazo de 24 horas for excedido, os dias entre a quebra e o início da fermentação contarão como dias de fermentação (CEPLAC, 1980).

- Quantidade de cacau – O calor gerado pela fermentação é retido por isolamento, mas isso torna-se difícil de ser conseguido com pequenas quantidades de sementes, uma vez que sua área superficial é grande em relação à sua massa. Há uma quantidade mínima de sementes que fermentarão satisfatoriamente. Várias opiniões têm sido dadas com respeito ao mínimo (CLAPPERTON, *et al*, 1994).

- Duração – Um levantamento conduzido sobre o método de fermentação através de países produtores de cacau revelou uma ampla faixa de duração de 1,5 dias a 10 dias. A mais importante diferença é determinada pelo material genético. Cacau Criollo é fermentado por 2-3 dias e Forastero por 6-8 dias. A duração é também influenciada pelo método adotado. Para cacau forastero, caixas requerem normalmente 6 dias ou 144 horas, mas a duração pode ser estendido para 8 dias em alguns países. Fermentação em montes deve durar 6 dias, mas a maioria dos produtores em Gana fermentam por um período mais curto de 3-5 dias (CLAPPERTON, *et al.*, 1994).

Subfermentação produzirá amêndoas com mais pigmento púrpura e mais amargor e adstringência (CLAPPERTON, *et al.*, 1994).

Sobrefermentação produzirá amêndoas com *nibs* de coloração escura e pouco sabor chocolate (CLAPPERTON, *et al.*, 1994).

- Revolvimentos - Os revolvimentos são muito importantes no decorrer da fermentação, pois a aeração controla o nível de acidez e os acréscimos de temperatura, influenciando a atividade enzimática necessária ao desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate (SCHWAN *et al.*, 1990).

A frequência de revolvimentos varia segundo pesquisadores. De acordo com DIAS (1987) *apud* ARAGÃO (1992) os tempos seriam 48, 72, 96, 120 e 144 horas após o início do processo. Entretanto, segundo CEPLAC (1980) e LAJUS (1982) os períodos seriam 24, 48, 96, 120 horas após o início.

Em pesquisa visando o estudo da influência da frequência de intervalos de revolvimentos na fermentação de cacau, SCHWAN *et al.* (1990) concluíram que revolvimentos frequentes tornam a fermentação mais rápida e resultam em um

produto para chocolate com boas características organolépticas. Os períodos de revolvimentos de 24, 48, 96 e 144 horas após o início do processo fermentativo seriam ideais.

3.4.4 - Transformações específicas durante a fermentação

Para melhor compreensão do que se passa no interior das sementes de cacau durante a fermentação, é interessante conhecer um pouco de sua constituição e histologia.

Os cotilédones representam a parte útil da semente na fabricação de chocolate e de manteiga de cacau. Segundo ROESH *et al.* (1958) e BOCA (1977) citado em LAJUS (1982), na estrutura histológica dos cotilédones, distinguem-se três tipos de células:

- Células de epidérmicas : possuem forma alongada e cor marrom, dispostas em camada monocelular;
- Células de pigmentos ou células de depósito de polifenóis: células grandes que constituem cerca de 10% das células dos cotilédones. Contém os pigmentos antociânicos, os polifenóis (catequinas e leucocianidinas) e as purinas (teobromina e cafeína). Esses componentes participam das reações químicas e enzimáticas que ocorrem no interior das sementes durante a fermentação, as quais serão responsáveis pelo desenvolvimento das características de cor e aroma;
- Células parenquimatosas ou células de reserva: células menores, incolores, que constituem cerca de 90% das células dos cotilédones. Contém proteína sob a forma de grãos de aleurona, amido, açúcares e muitas gotículas pequenas de gordura.

Sabe-se que em cacau a principal reserva é lipídica (mais de 50% da matéria seca). As proteínas representam cerca de 12% e há entre 4,5 a 7% de amido, sendo que a amilose corresponde a cerca de 30% do total (URBANSKI, 1992 citado em BRITO *et al.*, 1998).

Quando as sementes são retiradas do fruto, tornam-se sujeitas ao ataque de microrganismos do meio ambiente. O alto conteúdo de açúcares da polpa fresca que recobre as sementes, o baixo valor de pH (cerca de 3,6) e seu baixo teor de oxigênio constituem-se em excelente meio para o desenvolvimento de leveduras (SCHWAN, 1996).

No primeiro dia de fermentação, as leveduras na ausência de oxigênio, iniciam a conversão dos açúcares da polpa em etanol. Isso caracteriza a primeira maior atividade microbiológica da fermentação do cacau, a fermentação alcoólica. Como resultado da ação dos microrganismos, a temperatura da massa de sementes aumenta para 30-35⁰C e as células da polpa começam a se romper nas primeiras 24 a 36 horas, causando o aparecimento de uma exudação aquosa (também conhecida como “mel”) que se dirige aos orifícios do fundo da caixa de fermentação (LOPEZ & QUESNEL, 1973; MINIFIE, 1989).

As leveduras também têm condições para metabolizar o ácido cítrico presente. Assim, com uma acidez mais baixa, temperatura mais alta, outro grupo de microrganismos - as bactérias lácticas - vão ter seu desenvolvimento favorecido (ROELOFSEN, 1958 citado em DRUMMOND, 1998).

A maior parte das bactérias lácticas pode fermentar vários tipos de açúcares, inclusive as pentoses e pode atacar os ácidos málico e cítrico, produzindo ácido láctico, acético e dióxido de carbono. A interrupção do crescimento e da atividade dessas bactérias na fermentação de cacau se dá principalmente devido ao término do substrato açúcar (SCHWAN, 1996).

E assim, com o meio em temperatura elevada (35 a 40°C) , os açúcares reduzidos a cerca de 2%, presença de álcool, ácido láctico e com aeração da massa, entram em ação as bactérias acéticas (SCHWAN, 1996).

A partir do terceiro dia de fermentação, ocorre uma redução do número de bactérias formadoras de esporos, que se desenvolvem em temperaturas próximas a 50°C, o que pode variar com o número e frequência de revolvimentos, realizados no decorrer do processo fermentativo, provocando o aparecimento de metabólitos que, se difundidos para o interior do cotilédone, podem influenciar a qualidade do produto final (SCHAWN *et al.*, 1990).

O ácido acético e seus ésteres, quando absorvidos em grandes quantidades pelos cotilédones, durante o beneficiamento primário das sementes do cacau, transmitem ao produto um sabor desagradável que o deprecia (LOPEZ & McDONALD, 1983). Esse é o ácido mais importante relacionado com a acidez elevada do cacau produzido no Brasil, e que faz o produto brasileiro sofrer restrições em alguns mercados importadores (LOPEZ, 1983).

3.4.5 - Reações bioquímicas durante a fermentação do cacau

A testa das sementes é permeável a muitas substâncias de baixo peso molecular. Por isso, álcool, ácido acético, como também outros metabólitos, são absorvidos juntamente com água. A semente incha, e mudanças físicas e químicas similares àquelas ocorridas durante a germinação ocorrem em nível celular e subcelular. O aumento da temperatura entre 45 e 50°C, e a difusão do álcool e ácido acético ao interior da amêndoa, inibindo a germinação, é um pré-requisito para o início das mudanças bioquímicas. Após a morte da semente, têm início as reações enzimáticas, controladas principalmente pelas mudanças de

temperatura e pH durante a fermentação da polpa (MINIFIE, 1989; LOPEZ & DIMICK, 1991).

Em nível subcelular, dependendo do tratamento aplicado às sementes, diferenças de aeração, temperatura, bem como variação na concentração de ácido acético, observadas durante a fermentação em escala comercial, podem influenciar o tipo e o grau de mudanças observadas na estrutura subcelular e, conseqüentemente alterar o desenvolvimento das reações químicas e enzimáticas dos componentes celulares (BIEHL *et al.*, 1977).

A morte das sementes, em nível microscópico, é reconhecida por dois critérios: a perda da capacidade de germinação e a difusão dos pigmentos antocianicos para fora das células de depósito, colorindo o líquido intersticial. Além disso, ocorre um entumescimento das sementes, provavelmente devido a diferenças na pressão osmótica existente dentro e fora da testa (FORSYTH, 1957 citado por LAJUS, 1982). A água é necessária para a dissolução e difusão dos compostos polifenólicos .

Os compostos polifenólicos do cacau foram divididos em três grupos segundo FORSYTH (1955), citado por LAJUS (1982): catequinas (37%), antocianinas (4%) e leucocianidinas (58%).

FORSYTH & QUESNEL (1957) descreveram a importância da reação de hidrólise enzimática das antocianinas do cacau. Os cotilédones perdem sua cor violeta, adquirindo uma coloração mais clara, pois a cianidina liberada adquire a forma de pseudobase, incolor nas condições existentes. Mais adiante, durante a etapa de secagem do cacau, essas cianidinas serão oxidadas sob ação da polifenoloxidase, desenvolvendo-se a coloração marrom típica do cacau. As

antocianinas em si, não possuem sabor pronunciado, visto que variedades de cacau não pigmentado, possuem sabor de excelente qualidade.

Nas sementes de cacau, os compostos polifenólicos estão armazenados nas células de pigmentos dos cotilédones. Durante a fermentação das amêndoas, esses compostos se difundem através do líquido celular, são oxidados e em seguida condensados em moléculas de elevado peso molecular, em grande parte taninos (HANSEN *et al.*, 1998; WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

Na obtenção do chocolate, a composição dos compostos polifenólicos é alterada principalmente durante as etapas de torração, refino e conchagem, nas quais temperaturas elevadas são atingidas na presença de oxigênio, aumentando a atividade oxidativa dos polifenóis. Entretanto, o conhecimento dessas mudanças é limitado (WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

Após a morte do gérmen, ocorrem duas importantes reações; a que conduz à formação dos precursores de aroma, em particular aminoácidos livres e monossacarídeos, e as que provocam a diminuição do amargor e da adstringência.

BAREL *et al.* (1983) citado por DRUMMOND (1998) observaram que a quantidade de proteínas das amêndoas de cacau, durante a fermentação, decresce regularmente entre o segundo e o quinto dia.

Analisando a formação de aminoácidos livres durante a fermentação, através do conteúdo de nitrogênio solúvel das amêndoas do cacau de Ghana e da Nigéria, ROHAN & STEWART(1967a) citados por DRUMMOND (1998), verificaram um aumento dessa concentração no decorrer do processo fermentativo, sugerindo um máximo na concentração de aminoácidos nas

amêndoas, ao quarto dia de fermentação. Em um outro estudo, os mesmos autores demonstraram também nas mesmas amêndoas, que durante a fermentação ocorre um aumento no teor de açúcares redutores, os quais atingiram concentração máxima ao quarto ou quinto dia da fermentação, dependendo da origem das sementes.

Alguns aminoácidos originados da hidrólise proteolítica, durante a fermentação, complexam-se com substituintes fenólicos (quinonas). Essa combinação é que diminui o amargor e a adstringência (YOSHIYAMA & ITO, 1996).

De acordo com FORSYTH & QUESNEL (1957), no interior do cotilédone há duas fases definidas e distintas de reações durante a fermentação, que são classificadas em fase I, hidrólise anaeróbica e fase II, condensação oxidativa.

Fase I - Hidrólise anaeróbica: conforme já mencionado, a morte do gérmen é causada por um conjunto de fatores tais como, o aumento da temperatura (45 a 50°C) e a formação de álcool etílico, o que tem como consequência a perda da capacidade de germinação. Nessa fase ocorre difusão do conteúdo celular, iniciando-se assim uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor da semente, ocorrendo hidrólise das proteínas, originando aminoácidos livres. A difusão do suco celular depende das propriedades físico-químicas das substâncias, tamanho das moléculas, solubilidade, temperatura e permeabilidade seletiva das membranas celulares. A difusão dos ácidos para o interior do cotilédone contribui para que ocorram as reações enzimáticas e propicia uma proteção contra as bactérias putrefativas, evitando prejuízos ao sabor devido à produção de ácidos graxos livres.

Fase II - Condensação oxidativa: é a fase seguinte à anaeróbica hidrolítica e frequentemente se segue a ela. A oxidação continua na fase de secagem, até que o teor de umidade atinja um ponto mínimo, quando cessa a atividade da polifenoloxidase, que é máxima em torno de pH 6 e a uma temperatura de 35,5°C. Essa fase tem como característica fundamental a redução da adstringência e amargor devido à oxidação de polifenóis que formam complexos com proteínas e peptídeos. Segundo os autores, evidenciou-se que as proteínas se tornaram insolúveis pela formação de complexos proteínas-polifenóis, imediatamente após a morte da semente.

A presença e concentração de muitos precursores do sabor que são sintetizados durante a fermentação, dependem de mecanismos enzimáticos. Na Tabela 06 se resumem as reações catalisadas enzimaticamente e seus produtos. Não se produzem somente os precursores saborizantes, mas também se produzem mudanças na coloração. A hidrólise de compostos fenólicos pelas glicosidases trazem consigo o clareamento dos cotilédones e ao mesmo tempo influenciam o sabor (BECKETT, 1994).

TABELA 06. Caracterização das principais enzimas ativas durante a fermentação da semente do cacau.

Enzima	localização	Substrato	Produtos	pH	Temperatura
Invertase	semente, testa	sacarose	glucose,	4	52,
			frutose	5,25	37
Glicosidase (β -galactosidase)	semente cotilédone	glicosídeos (3- β -D-galactosidil cianidina, 3- α -L-arabinosidil cianidina)	cianidina,	3,8-	45
			açúcares	4,5	
Proteases	semente cotilédone fragmentos	proteínas	péptidos, aminoácidos	4,7	55
Polifenoloxidase	semente cotilédone	polifenóis (epicatequina)	o-quinonas,	6	31,5
			o--diquinonas		34,5

FONTE: BECKETT (1994).

3.5 - ENZIMAS DAS SEMENTES DE CACAU

Ainda que as reações bioquímicas que ocorrem no pré-processamento do cacau, consideradas importantes ao desenvolvimento dos precursores do sabor, tenham sido amplamente estudadas, de um modo geral, poucos estudos existem a respeito das enzimas presentes nas sementes. LOPEZ & DIMICK (1991) trabalhando com enzimas de cacau tiveram como objetivo principal o entendimento do mecanismo da fermentação, a fim de transformar um método rudimentar, em um processo realizado com base científica. Na opinião dos autores algumas enzimas têm recebido atenção superficial, referente apenas à sua identificação, à determinação da temperatura e pH ótimos. Dentre essas têm recebido maior atenção a β -glicosidase, a protease e a polifenoloxidase.

Essas enzimas existem naturalmente nas sementes de cacau, mas devido ao fato de as condições do meio, durante o pré-processamento, tornarem-se adversas, pelo aumento da temperatura e elevação da acidez, há uma perda considerável em suas atividades (LOPEZ & DIMICK, 1991).

3.5.1 – Glicosidase

A glicosidase é responsável pela mudança mais óbvia que se observa nas sementes do cacau Forastero, pois hidrolisa as antocianidinas. Os cotilédones perdem sua cor violeta, adquirindo uma coloração mais clara, pois a cianidina liberada adquire a forma de pseudo-base incolor nas condições existentes. O clareamento, porém, é resultante da hidrólise enzimática de pigmentos. FORSYTH & QUESNEL (1957) identificaram pigmentos como cianidinas 3- α -L-arabinosidyl e 3- β -D-galactosidyl, de coloração violeta com propriedades indicadoras, e MARAVALHAS (1972), declarou que a mudança inicial durante a fermentação para tons azulados era devida à produção de amônia derivada de aminoácidos pela aminoxidase. A absorção pelos cotilédones, de ácido acético produzido na fermentação da polpa, causa uma mudança para vermelho/púrpura, devido ao abaixamento do pH.

A temperatura e pH ótimos para a glicosidase foram determinados em 44°C e 4,0-4,5, respectivamente. A presença de um inibidor de glicosidase foi notada na fração constituída de complexos polifenóis etil-acetato-insolúvel. A destruição de pigmentos ocorreu por conta da hidrólise de açúcares e uma descoloração pseudo-base formada de cianidinas (LOPEZ & DIMICK, 1991).

3.5.2 – Proteases

Várias proteases estão presentes nos cotilédones das sementes de cacau maduro, as quais tornam-se ativas após a ruptura celular e acidificação nos nibs durante a fermentação. Duas delas, têm sido identificadas como sendo responsáveis pela ruptura adequada da 7S-globulina para dar origem aos precursores específicos do aroma do cacau, e alto potencial de aroma (VOIT *et al.*, 1994):

- endopeptidase aspartica (pH ótimo: 3,4; peso molecular: 45kDa, subunidades: 33,9 e 15,7 kDa, inibidor: pepstatin A). Aminoácidos hidrofóbicos são os locais específicos de ruptura. Em sementes de cacau maduro, são únicas no sentido de que elas mostram atividade 20 a 50 vezes mais alta de endopeptidase aspártica comparadas com as sementes ortodoxas até agora investigadas.

- serina endopeptidase (arboxypeptidase): pH ótimo: 5,8, inibidor: PMSF (phenylmenthidulfonyl fluoride). Esta enzima não ataca proteína nativa mas rompe quase especificamente, aminoácidos hidrofóbicos no terminal carboxil dos oligopeptídeos hidrofóbicos uma vez que eles são produzidos a partir da 7S-globulina pela endopeptidase aspártica do cacau. Como resultado, oligopeptídeos hidrofílicos mais aminoácidos livres hidrofóbicos são produzidos (BYTOF *et al.*, 1995).

A proteólise ocorre sob a influência de endopeptidases e uma exopeptidase. As endopeptidases atacam preferencialmente as proteínas vacuolares de reserva e a exopeptidase, ataca os peptídeos formados pela atividade da endopeptidase, e as proteínas citoplásmicas e nucléicas. Acredita-se que essas enzimas sejam ativas nas sementes mas não sejam efetivas, porque elas estão separadas dos seus substratos (LOPEZ & DIMICK, 1991). BIEHL *et al.*

(1982), sugerem que as endopeptidases estejam localizadas na matriz citoplasmática em volta, mas externamente aos vacúolos e que elas sejam canalizadas para dentro durante a absorção de água pelas proteínas vacuolares. Sabe-se que têm pH ótimo entre 3 e 5,5, e a exopeptidase um pH ótimo de 4,5. A partir dos resultados dos resultados dos autores a respeito da análise de aminoácidos e peptídeos em relação à fermentação, eles concluíram que as proteínas vacuolares são hidrolizadas principalmente a peptídeos pela endopeptidase e, na presença de água suficiente, peptídeos são degradados a aminoácidos pela exopeptidase. Contudo, a atividade proteolítica nas sementes de cacau não foi governada simplesmente pela temperatura e pH, mas por uma complexa interação entre esses e a organização estrutural subcelular.

3.5.3 - Polifenoloxidase (PPO)

A polifenoloxidase (1,2-benzenediol:oxigenio oxirredutase; EC 1.10.3.1) é geralmente chamada de tirosinase, polifenolase, catecol oxidase, cresolase ou catecolase. O nome tirosinase origina-se da tirosina se constituir no primeiro substrato. As enzimas de plantas superiores e fungos oxidam uma grande variedade de compostos monofenólicos e o-difenólicos (WHITAKER, 1994).

3.5.3.1 - A polifenoloxidase e o cacau

As oxidases das amêndoas de cacau têm sido bastante estudadas. Na produção de chocolate, a PPO é um fator responsável pelo desenvolvimento de precursores do sabor iniciando-se na fase oxidativa da fermentação e continuando até a etapa de secagem (FORSYTH & QUESNEL, 1963). YOSHIMA & ITO (1996) concluíram que a enzima PPO age sobre os compostos fenólicos, responsáveis

pelo amargor e adstringência indesejáveis no cacau, solubilizando-os, devido ao aumento do peso molecular ou devido à complexação com as proteínas. A redução da adstringência e do sabor amargo estão entre as mudanças que são afetadas pela proteína-polifenol polimerizada. Um aumento na penetração de oxigênio na massa de amêndoas durante a etapa de secagem, promove uma oxidação máxima de (-)-epicatequina e procianidinas. Com isso, são produzidas melaninas e melanoproteínas as quais são responsáveis pelo escurecimento da cor característica do chocolate (QUESNEL, 1966 citado por WONG *et al.*, 1990). Essas reações estendem-se à medida que aumentam os revolvimentos das amêndoas. Ocasionalmente a oxidação enzimática é inibida pela falta de aeração da massa, mas as reações não-enzimáticas podem continuar (WONG *et al.*, 1990).

Ainda que as pesquisas dos mecanismos bioquímicos nas amêndoas venham ocorrendo de forma intensiva, há uma grande limitação quanto aos estudos da ação da PPO nas mesmas (WONG, 1990).

A PPO do cacau é inibida por dietilditiocarbonato (DIETC) e cianida, mas não pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou azimutato de sódio. Entretanto, a atividade foi dependente do pH (LOPEZ & DIMICK, 1991).

3.5.3.2 - A polifenoloxidase e a pinha (*Annona squamosa* L.)

A pinha (*Annona squamosa* L.) pertencente à família *Annonaceae*, é uma planta de origem americana, provavelmente das Antilhas, de onde se espalhou, de forma cultivada, por todas as três Américas e países asiáticos. No Brasil, encontrou, nos Estados do nordeste, as melhores condições climáticas para o seu desenvolvimento sendo até hoje largamente cultivada. O fruto é um sincarpo carnoso, globoso ou codiforme, de cerca de 12 cm de diâmetro, formado pelos carpelos que cresceram juntos sem entretanto se soldarem; a casca é constituída

de tubérculos carnosos correspondentes, cada um, a um carpelo (FIGURA 02) (COUCEIRO, 1973; CAVALCANTE, 1991). É também conhecida como ata ou fruta-do-conde. Apresenta polpa branca ou amarela, com aroma agradável, muito doce, o que a torna importante para o consumo *in natura* e para a industrialização. Os plantios mais organizados da pinha estão localizados atualmente, no oeste do Estado de São Paulo e interior da Bahia, Pernambuco e Alagoas (ALBUQUERQUE, 1999).



FIGURA 02. *Annona squamosa* L. : pinha, ata ou fruta-do-conde
FONTE: ALBUQUERQUE (1999).

Embora haja crescente demanda pelos frutos de pinha, tanto para consumo “in natura” quanto para a indústria, existe escassez de conhecimentos sobre sua composição química, caracterização bioquímica e fisiologia de pós-colheita (ALBUQUERQUE, 1999).

De acordo com ALBUQUERQUE (1999) há um grande mercado potencial para exportação da pinha "in natura", porém um dos obstáculos a serem vencidos é a facilidade de escurecimento enzimático que a fruta apresenta, catalisado pela enzima polifenoloxidase (PPO). A PPO catalisa a reação oxidativa por sua habilidade em utilizar o oxigênio molecular durante a oxidação de substratos fenólicos produzindo cor escura (MAYER, 1987).

Os dados sobre as propriedades e a composição química da polpa de pinha estão apresentados na Tabela 07.

TABELA 07. Propriedades e composição química da polpa de pinha (*Annona squamosa* L.)

Propriedades	
pH	5,2-6,1
Acidez (% expresso em ác.cítrico)	0,29-0,14
°Brix (%)	29,0-33,0
Composição química	
	(%)
Umidade	70,0
Proteínas	2,2
Açúcares redutores	14,5
Açúcares não-redutores	4,9
Extrato etéreo	0,2
Cinzas	0,9

FONTE: GUZMAN *et al.* (1985) citado por ALBUQUERQUE (1999).

3.6 - SECAGEM

Ao término da fermentação, as sementes livres da polpa são submetidas à secagem. Durante esta etapa faz-se constantes revolvimentos para facilitar a entrada de oxigênio, sendo a umidade reduzida até 6-7%, propiciando uma melhor conservação durante o armazenamento. A profunda modificação da composição bioquímica das sementes durante o processo de fermentação e secagem conduz à formação dos precursores do sabor (ROHAN, 1964; LOPEZ & QUESNEL, 1973).

O retardamento ou má condução da secagem acarretará risco de desenvolvimento de fungos. A contaminação com esses microrganismos conduz a um sabor desagradável no produto final (ZAMALLOA, 1994).

CRESPO (1985), citado por ZAMALLOA (1994), afirmou que com 3% de amêndoas contaminadas por fungos, a pasta de cacau apresentará gosto desagradável, impossível de ser eliminado nos processos subsequentes.

É no decorrer da secagem que continua a se desenvolver a cor castanha característica do chocolate, devido às reações de oxidação dos polifenóis, catalisadas pela enzima polifenoloxidase, que é ativa somente quando o oxigênio tem acesso aos cotilédones nestes estudos (FORSYTH & QUESNEL, 1957).

Para a secagem do cacau utilizam-se duas técnicas básicas: a secagem natural e a secagem artificial, distinguindo-se pela fonte de calor e pelo tipo de equipamento utilizado.

A secagem natural ou secagem ao sol é uma operação simples e ainda muito utilizada. Em uma plataforma de secagem, as sementes são espalhadas em

finas camadas, revolvidas frequentemente com a finalidade de proporcionar a remoção uniforme da umidade (GARCIA, 1985).

Quando as condições climáticas são desfavoráveis, como em dias de chuva, ou quando o espaço disponível nas barcaças não é suficiente para comportar o volume da produção, tem-se como alternativa a secagem artificial. No Brasil, em lugares onde a colheita coincide com a época chuvosa, a secagem artificial é extremamente importante (LAJUS, 1982).

Considera-se como fator essencial, durante a secagem, a velocidade de remoção de água. Uma secagem rápida acarreta perda de umidade na periferia, deixando o interior úmido, o que deprecia o produto, e proporciona condições ao aparecimento de mofo interno, durante o período de armazenamento. Além disso, ocorre o endurecimento com eventual ruptura da testa. No caso da secagem excessiva, ocorre perda de peso, tornando as sementes quebradiças, enquanto o excesso de umidade ou secagem lenta propicia o desenvolvimento de mofos, produzindo manchas brancas (ROHAN, 1964).

Ao se concluir a operação de secagem, as amêndoas de cacau apresentam as características físicas, químicas e sensoriais decisivas para sua classificação e comercialização (VASCONCELOS, 1999).

A correta fermentação e secagem do cacau são de vital importância e essas etapas devem ser realizadas consecutivamente para que se obtenha um resultado satisfatório. Um sabor final agradável do cacau ou chocolate está relacionado com a realização de uma fermentação adequada, mas se a secagem em seguida for retardada, poderá haver aparecimento de bolores que também originam sabores indesejáveis. Essa situação negativa poderá ser evitada se as

operações de fermentação e secagem forem conduzidas corretamente (MINIFIE, 1989).

3.7 - TORRAÇÃO

A etapa de torração é mais que um simples processo de desidratação, sendo considerada um tratamento térmico bem definido, que deve ocorrer sob condições de tempo, temperatura e umidade muito bem controladas e otimizadas para permitir o desenvolvimento das características de qualidade do chocolate, as quais já devem existir na forma de precursores gerados na fermentação e secagem das amêndoas (MINIFIE, 1989; MINSON, 1992).

No processo de torração, os métodos mais comuns são aqueles realizados nas amêndoas inteiras ou nos *nibs*, havendo ainda a possibilidade de se torrar o liquor do cacau (massa de cacau integral) (KEME, 1994 citado por FADINE, 1998).

Por mais que as operações anteriores sejam importantes para o desenvolvimento do sabor, é durante a torração que ocorre a interação entre os precursores do sabor e o sabor final de chocolate, permitindo sua completa expressão. Antes da torração, as amêndoas podem apresentar adstringência, sabor amargo, ácido, mofado, sujo, de avelã ou inclusive de chocolate, dependendo do lote examinado. Após torração, as amêndoas apresentam o aroma intenso de cacau, ainda que sejam desagradáveis ao paladar. Compreende-se que essa operação deva merecer atenção extra (BECKETT, 1994).

Na torração, parte dos aminoácidos, peptídeos e açúcares redutores reagem na reação de Maillard, produzindo gosto e aroma chocolate (MOHR *et al.*, 1971 citado por LOPEZ & DIMICK, 1991).

3.8 - MELHORAMENTO DO SABOR DE CACAU DURANTE A FERMENTAÇÃO

Um fabricante de chocolate necessita de amêndoas de cacau que possam ser processadas de forma a se obter um chocolate que deverá ter sabor agradável ao consumidor. Embora seja um conceito difícil de ser definido e avaliado, esta é a mais importante propriedade da amêndoa de cacau, sendo que a única possibilidade de avaliá-la é através da manufatura do chocolate, seguida de provas de degustação.

Desde a metade dos anos 70, a produção global de cacau quase que dobrou atingindo atualmente cerca de 2,4 milhões de toneladas por ano. Quase todo o incremento da produção foi proveniente da Costa do Marfim, Indonésia e Malásia. Menos de 5% desse aumento foi proveniente de Gana que representa o padrão de sabor para cacau comercial (CLAPPERTON, 1994).

O resultado foi a entrada no mercado, de grande quantidade de cacau divergindo totalmente do padrão Gana de qualidade (CLAPPERTON, 1994).

Motivados por essa situação, fabricantes do Reino Unido iniciaram pesquisas em Gana, Malásia e Costa do Marfim para descobrir porque os sabores diferiam e como torná-los mais próximos do padrão Gana. Então um projeto foi elaborado com autoridades dos países, na Costa do Marfim para o período de 1982/86 (CLAPPERTON, 1994).

Isso marcou uma importante alteração na direção da pesquisa, desde análises detalhadas da composição dos produtos, a estudos sobre práticas de campo que os produtores seriam capazes de testar e aplicar, e conduziu a uma melhor compreensão das origens das características do sabor cacau tanto em

termos do material vegetal como em termos do processamento primário (CLAPPERTON, 1994).

Dentre os principais fatores que influem na qualidade do produto final estão: fatores genéticos, condições climáticas, estado sanitário das plantações, colheita, fermentação e secagem. O sabor desenvolvido de amêndoas de cacau varia bastante, sendo grandemente influenciado pelo material genético e o método de preparação (FOWLER, 1994).

Baseado na intensa atividade bioquímica e intensa formação de compostos nos cotilédones durante a etapa de fermentação, vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar as características sensoriais, a fim de se obter um produto final com sabor mais agradável.

JIMÉNEZ & LUNA (1969) tentaram melhorar a fermentação do cacau utilizando leveduras puras. Utilizaram *Trichosporon cutaneum* (isolada das paredes de madeira de um fermentador típico) e *Candida tropicalis* (isolada de cascas de maçã). Essas leveduras foram inoculadas no campo no momento da quebra dos frutos e ainda no fermentador. Os resultados mostraram que não houve diferenças de temperatura e aparência interna do cacau seco quando comparado ao tratamento testemunha (fermentação natural). A amostra de cacau fermentada com *Candida tropicalis* originou um chocolate com características sensoriais superiores, sendo que aquela inoculada com *Trichosporon cutaneum* e o tratamento testemunha apresentaram boas características sensoriais.

LOPEZ (1979) estudou o efeito da remoção parcial da polpa das sementes de cacau no processo de fermentação, analisando o sabor do chocolate. As sementes prensadas apresentaram uma fermentação acelerada. A taxa de velocidade e elevação da temperatura aumentou, e a produção de ácido acético

foi tão rápida que houve aumento na acidez final dos cotilédones. Os resultados dos testes sensoriais mostraram uma preferência pelo chocolate preparado a partir de amostras não-prensadas, sendo isso atribuído à variação no processo de fermentação resultante da remoção da polpa.

Em estudos realizados por SANCHEZ *et al.* (1983), utilizando uma cultura pura de *Sacharomyces chevalieri*, isolada da flora de fermentação tradicional, adicionada às sementes de cacau, os resultados obtidos demonstraram uma rápida e regular fermentação com boa atividade pectinolítica. Sendo assim o cacau produzido demonstrou ser de alta qualidade comparado ao tratamento controle.

Utilizando três microrganismos na fermentação do cacau: *Brettanomyces claussenii* C - Y - 31 - 2 - 2 (cultura pura) e *Candida famata* - 30 mais *Acetobacter sp. B - 46* (em cultura associada), VASQUEZ (1989) realizou dois tratamentos. No primeiro inoculou *Candida famata* no início da fermentação e *Acetobacter sp. B - 46* 24hs depois. No segundo tratamento foi inoculado *Brettanomyces claussenii* C - Y - 31 - 2 - 2 no início da fermentação. Fez-se também um tratamento testemunha para efeito comparativo. Os resultados obtidos demonstraram que o primeiro tratamento e tratamento testemunha apresentaram comportamento similar durante a fermentação. No entanto, o chocolate obtido no primeiro era mais ácido, mais adstringente e menos agradável. O segundo alcançou a temperatura máxima de fermentação 24hs mais tarde. Sua concentração de voláteis também apresentou evolução diferente e as amêndoas apresentaram uma qualidade ligeiramente superior. Embora o chocolate obtido tenha sido diferente da testemunha, essa diferença não pode ser detectada. De um modo geral, seu sabor foi agradável.

RIBEIRO (1990), analisou 16 espécies de fungos isolados durante a fermentação do cacau. Os resultados demonstraram que cada fungo isolado

apresentava sua provisão de enzimas e capacidade peculiar para degradar algumas das diversas substâncias existentes na polpa e testa da semente. Alguns fungos apresentaram melhor atividade proteolítica, outros melhor atividade celulolítica, outros tiveram ainda, boa capacidade de hidrolisar pectina. O autor observou portanto, que possivelmente os fungos pudessem ser utilizados, segundo sua atividade enzimática, objetivando melhorar alguns aspectos da fermentação. O entendimento da atividade enzimática e hidrolítica de diferentes fungos, leveduras e bactérias, pode ser um meio de se controlar a formação de sabores ácidos e estranhos, algumas vezes presentes no cacau fermentado.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório e Planta Piloto de Frutas, Hortaliças e Produtos Açucarados do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, Campinas (SP)

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Frutos de cacau

Foram utilizados frutos de cacau de polimerização aberta colhidos de matrizes clonais, com representantes dos grupos: Forastero e Trinitário. As sementes representaram uma mistura aleatória de vários materiais genéticos. As matrizes pertencem à coleção de germoplasma de cacau do Núcleo Experimental de Agronomia do Vale do Ribeira, do Instituto Agrônômico (IAC), localizado em Pariquera-Açu (SP).

4.1.2 - Enzimas

Foi utilizada a enzima polifenoloxidase provinda da polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) e a enzima protease oriunda de um complexo fúngico proteases/peptidases, desenvolvido para hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas. O complexo denominado “Protezyn Flavor”, fornecido pela Prozyn Indústria e Comércio Ltda, é produzido pela fermentação de uma cepa selecionada de *Aspergillus orizae*.

4.1.3 - Equipamentos e aparelhos

- Torrador rotativo elétrico de laboratório, Probat-Werke, munido de sensor de temperatura de alta precisão.
- Moinho Ika-Universal Mülhe, modelo M20
- pH-metro Micronal, modelo B-374
- Mufla Engro, modelo 355 - L
- Balança semi-analítica Mettler – Toledo, modelo AB 204
- Espectrofotômetro Beckman, modelo DU - 70
- Balança Analítica Mettler, modelo AB 204
- Agitador de tubos com rotação vertical de 360° - Phoenix, modelo. MS22
- Destilador de nitrogênio Tecnal, modelo TE-036
- Bloco digestor de proteínas Technicon, modelo BD-40
- Estufa com circulação forçada de ar Fanem, modelo 320/sc300
- Estufa à vácuo Fanem, modelo 414
- Extrator de gordura Tipo Soxhlet Fanem, modelo 170-1
- Mufla Forlabo, modelo 2133
- Potenciômetro Metrohn Herisau, modelo 516
- Refratômetro ABBE PZ0, modelo RL 1
- Congelador de placas Frigostrella do Brasil, modelo P.M-5
- Liofilizador Edwards, modelo RV12
- Espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70
- Outros aparelhos e materiais comuns de laboratório e planta piloto.

4.1.4 - Reagentes

Os reagentes utilizados nas análises químicas foram de qualidade especial para análise (P.A), de diversas procedências.

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Caracterização física dos frutos e sementes

Em uma amostra de 50 frutos representando um lote total de 700 frutos foram realizadas as seguintes determinações individualmente: massa total do fruto, da casca, das sementes com polpa, das sementes sem polpa, da placenta, número de sementes/fruto, tamanho: comprimento, largura e espessura das sementes.

4.2.2 - Tratamento enzimático

As enzimas em estudo foram adicionadas após 48 horas e 96 horas do processo fermentativo, tempos em que as condições se tornaram mais favoráveis (Tabela 08).

A enzima comercial "Protezyn Flavour" foi adicionada nas concentrações de 0,5% e 0,75% em relação ao teor de proteína presente na semente, sendo que a faixa recomendada pelo fabricante varia de 0,5-1,0% para remover o amargor produzido por alguns peptídeos. A polpa de pinha madura que apresenta uma elevada atividade da enzima polifenoloxidase (ALBUQUERQUE, 1999) foi

adicionada nas concentrações de 5,0% e 7,5% em relação à massa total de sementes de cacau com polpa mucilagínosa, com base nos trabalhos de FERNÁNDEZ BARBERY (1999) realizados com essa enzima em nibs de cacau nas condições mais propícias de pH e temperatura, atingidos ao longo da fermentação.

Foram realizadas oito fermentações de sementes de cacau em duplicata: três com adição de polpa de pinha madura, três com adição da enzima protease e dois sem aplicação de enzima, sendo que em um destes adicionou-se água na mesma proporção das soluções com enzima protease. Os experimentos estão relacionados na Tabela 08, a qual mostra o tratamento realizado, o tempo e a concentração de adição em cada fermentação.

TABELA 08. Tratamentos fermentativos de sementes do cacau utilizando a enzima polifenoloxidase contida na pinha e a enzima comercial protease.

Experimento	Tratamento	Tempo de adição
E1	Adição de 7,5%* de polpa de pinha madura*	Após 48 horas
E2	Adição de 0,75%** da enzima protease	Após 48 horas
E3	Adição de 5,0%* de polpa de pinha madura	Após 96 horas
E4	Adição de 0,5%** da enzima protease	Após 96 horas
E5	Adição de 7,5%* de polpa de pinha madura	Após 96 horas
E6	Adição de 0,75%** da enzima protease	Após 96 horas
E7	Sem adição de enzima, mas com adição de água	Após 48 horas
E8	Sem adição de enzima	-

* Em relação à massa total

** Em relação ao teor de proteína da semente

4.2.3 – Fermentação

A massa total de sementes com polpa mucilaginosa extraída dos frutos foi cuidadosamente homogeneizada separando-se uma amostra dessas sementes para fim de análises. Essas sementes tiveram sua polpa removida e em seguida foram congeladas em congelador de placas e liofilizadas. No fim do processo de liofilização, no momento da quebra do vácuo, substituiu-se o oxigênio pelo gás nitrogênio com o objetivo de minimizar a oxidação das mesmas.

A fermentação foi realizada em caixas de isopor com capacidade aproximadamente de 6 litros e com orifícios, no fundo, de 0,5cm de diâmetro, espaçados a cada 2,5cm para o escoamento do mel. Essas definições para drenagem foram baseadas nos experimentos realizados por ZAMALLOA (1994).

Todos os experimentos de fermentação foram realizados simultaneamente em uma sala climatizada com aquecedores e ventilador elétricos, recipientes contendo água, a fim de obter uma temperatura média de 33°C e uma umidade relativa ao redor de 65%, condições similares às das regiões onde se cultiva e fermenta o cacau. Para determinação da umidade relativa do ar foram instalados termômetros de bulbo seco e bulbo úmido.

Cada caixa comportou 4000g de sementes com polpa mucilaginosa fresca, as quais foram previamente misturadas com 0,2% de folhas picadas de bananeira e também recobertas por essas folhas, seguindo a prática tradicional dos produtores de cacau fermentado e de acordo aos estudos realizados por ZAMALLOA (1994). Em todas as fermentações realizadas foram feitos revolvimentos, a partir das 48 horas e subsequentes a cada 24 horas, transferindo-se o material da caixa a um outro recipiente para facilitar esta operação. O processo teve uma duração de sete dias.

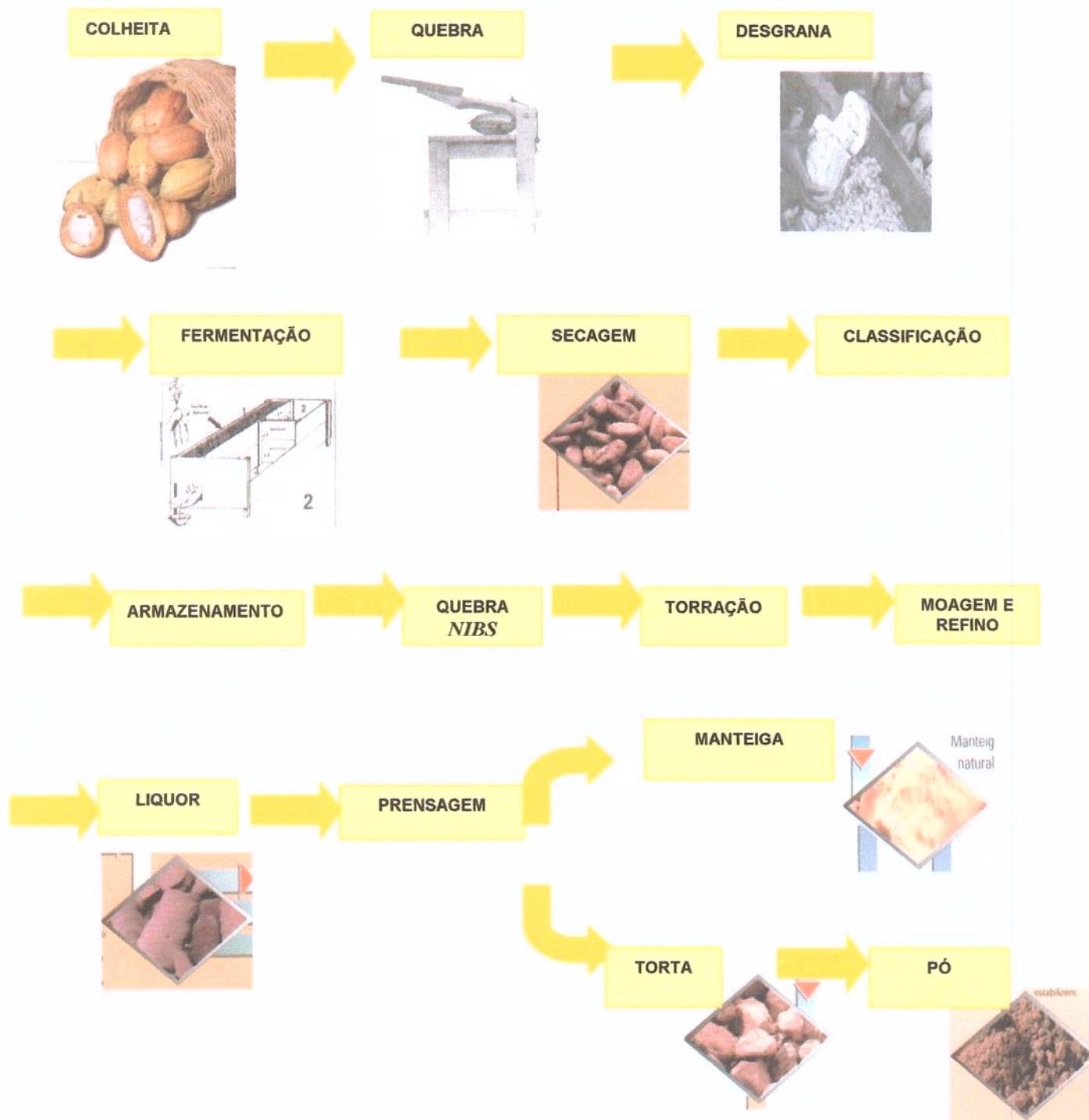


FIGURA 03. Fluxograma de processamento industrial dos produtos de cacau e terminologia utilizada nas diferentes etapas do processo.

Durante o período de fermentação, houve um controle através das análises que se seguem:

4.2.3.1 - Determinação de sólidos solúveis (°Brix)

O Brix da polpa mucilagínosa foi determinado, utilizando-se refratômetro - ABBE - marca PZO - mod. RL 1.

4.2.3.2 - Controle da temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação

As leituras de temperatura foram realizadas a cada doze horas em três níveis diferentes: superfície, meio e fundo da caixa. A temperatura foi considerada a média entre as três leituras.

4.2.3.3 - Determinação do pH da massa das sementes de cacau durante a fermentação

Através do método 13.010, da AOAC - OICC (1984)

4.2.4 – **Secagem**

A secagem do material foi realizada naturalmente, ao sol, em bandejas metálica (35X28X15cm) recobertas com tela de nylon, realizando-se revolvimentos a cada oito horas durante o dia e cobertos durante à noite. O processo de

secagem foi interrompido quando as amêndoas atingiram um máximo de 6,5% de umidade.

4.2.5 - Características físicas das amêndoas fermentadas e secas

Após a secagem natural das amêndoas, estas foram colocadas em esturfa com circulação de ar a 35°C para homogeneização da umidade, submetidas às seguintes análises:

4.2.5.1 - Massa de 100 amêndoas. Colhidas ao acaso

4.2.5.2 - Número de amêndoas em 100 gramas. Colhidas ao acaso

4.2.5.3 - Densidade aparente.

Foi realizada segundo o método de BRUNO (1989), que utiliza o deslocamento volumétrico de sementes de painço, por uma determinada massa de amêndoas (de 100 amêndoas neste caso). Foi utilizado um funil apoiado em um tripé, para que o painço caísse no recipiente com velocidade constante. As medidas foram efetuadas em triplicata. A densidade aparente foi calculada através da razão entre a massa das amêndoas e o seu volume.

4.2.5.4 - Composição em frações das amêndoas.

Uma amostra de 100 amêndoas foi pesada e descascada manualmente, separando-se a testa, o gérmen e os cotilédones. Cada uma das frações foi pesada e expressa em porcentagem.

4.2.5.5- Prova de corte ("cut test)

Visando relacionar a qualidade em função do grau de fermentação, as amêndoas secas foram classificadas pela prova de corte, conforme o método recomendado na Resolução número 42 do Conselho Nacional do Comércio Exterior (CONCEX, 1968).

4.2.6 - Preparo dos nibs

As amêndoas fermentadas e secas dos diferentes experimentos foram quebradas em pequenos fragmentos (nibs) em moinho de facas tipo Rietz. Posteriormente foram separadas testa, gérmen e cotilédones, por diferença de densidade, com auxílio de uma coluna de ar e por peneiragem.

4.2.7 - Características físico-químicas dos nibs

As características físico-químicas dos nibs foram determinadas utilizando-se os métodos a seguir:

4.2.7.1 - Teor de umidade - método 31.1.02 da AOAC (1997)

4.2.7.2 - pH - método 31.1.07 da AOAC (1997)

4.2.7.3 - Acidez titulável total - método 13.010, da AOAC - OICC (1984)

4.2.7.4 - Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos das amostras de cacau foram extraídos com água nanopure (10g/100mL), segundo o método descrito por VASCONCELOS (1999) e modificado por MATTIETTO (no prelo). As determinações foram feitas através do método descrito por DRUZIAN (1997), utilizando-se coluna SHIMADZU LC Column, Shim-pack SCR-101 H e uma fase móvel de solução de ácido perclórico a pH 2,1 com um fluxo de 1,0 mL/min a 50°C.

4.2.7.5 - Teor de proteína

Segundo o método micro Kjeldahl, baseado na hidrólise e posterior destilação da amostra, de acordo com o método 31.1.08 da AOAC (1997).

4.2.7.6 - Teor de gordura

Obtido por extração Soxhlet diretamente na amostra, segundo o método 31.4.02 da AOAC. (1997).

4.2.7.7 - Teor de cinzas

Determinado por carbonização das amostras até cesar a liberação de fumaça de calcinação em mufla a 540°C até peso constante, através do método 31.1.04 da AOAC (1997).

4.2.7.8 - Teor de fibras

Determinado utilizando-se o método *Acid Detergent Fibre* (ADF), segundo GOERING & VAN SOEST (1970).

4.2.7.9 - Determinação do grupo amino-terminal

O grupo amino-terminal das amostras de cacau foi extraído com uma mistura de ácido tricloroacético/acetato de sódio/ácido acético (0,11M:0,22M:0,33M) (MURTHY, 1997) e determinados em Espectrofotômetro, após reação com o-ftaldialdeído (CHURCH, 1985).

4.2.7.10 - Determinação de aminoácidos livres

Os aminoácidos livres foram obtidos através do método proposto por BECKAM (1977). As determinações foram feitas segundo o método descrito por VASCONCELOS (1999).

4.2.7.11 - Determinação de fenóis totais

Os fenóis foram extraídos de alíquotas de pó de cacau desengordurado e seco com uma solução de acetona/água (70:30) (PRICE & BUTLER 1977) e quantificadas segundo método descrito por AMERINE & OUGH (s.d.).

4.2.7.12 - Determinação de taninos

A extração de taninos foi realizada em alíquotas de pó de cacau desengordurado com MeOH 50% (FERNÁNDEZ BARBERY, 1999) e a quantificação foi realizada seguindo a método descrito por HAGERMAN & BUTLER (1978).

4.2.7.13 - Determinação de flavan-3-óis

Através do método modificado, descrito por MAILLARD *et al* (1996), fez-se a quantificação de flavan-3-óis em alíquotas de pó desengordurado e seco, extraídos com MeOH.

4.2.7.14 - Determinação de antocianidinas

A determinação foi realizada seguindo o método, descrito por OSZMIANSKI & SAPIS (1988) e modificado por WILSKA-JESZKA & KOREN (1996). A extração foi realizada em alíquotas de pó de cacau desengordurado e seco com uma solução de HCl 1,5 N e etanol absoluto (85:15).

4.2.7.15 - Teor de teobromina e cafeína

Foi realizada uma determinação individual de teobromina e cafeína utilizando-se espectrofotometria UV, a partir do pó de cacau desengordurado, mediante uma extração líquida-líquida, segundo SHUFEM *et al.* (1990).

4.2.8 - Torração

A torração foi efetuada sobre os nibs entre 3-6 mm, em lotes de 250 g, em forno elétrico rotativo a uma temperatura de 150°C na camisa do aparelho. Baseado nos estudos realizados por FADINI (1998) os quais determinam que 38 minutos é o melhor tempo de permanência no torrador a 150°C, foram utilizados três tempos de torração para cada experimento: 36, 38 e 40 minutos.

4.2.9 - Análise sensorial do *liquor* obtido nos diferentes experimentos

Os *nibs* de cacau torrados foram refinados em moinho com três cilindros resfriados, com o mínimo de espaçamento, até obtenção de granulometria inferior a 40 μm (*liquor*) para a formulação da mistura para realização dos testes sensoriais realizados no Laboratório de Frutas, Hortaliças e Produtos Açucarados e no Laboratório de Análise Sensorial, ambos pertencentes ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

As amostras para análise sensorial foram formuladas a partir do método descrito por MEURSING (1983) e modificado por LOPES (2000), no qual utilizou-se 16 g de *liquor* de cacau, 12 g de leite em pó desnatado e 12 g de açúcar refinado, adicionados de 100 ml de água quente, misturando-se em

homogeneizador durante 2 minutos. As amostras foram servidas em copos plásticos descartáveis de 30 ml, codificados com três dígitos, utilizando-se banho-maria para se manter a temperatura à 50°C antes de serem servidas aos provadores.

Foram realizados dois tipos de testes sensoriais, sendo um de ordenação-preferência e o outro de aceitação das amostras, em diferentes condições.

4.2.9.1 - Testes de ordenação-preferência

Em uma primeira etapa, foram realizados oito testes de ordenação-preferência, para se determinar o tempo de torração dos *nibs* mais adequado.

Cada uma das oito amostras de *nibs* foi submetida à torração por 36, 38 e 40 minutos, e após terem sido refinadas e formuladas, foram apresentadas aos provadores, os quais eram instruídos a ordená-las de acordo com a preferência utilizando a ficha apropriada (FIGURA 04).

Em função dos resultados da primeira etapa, foi realizada uma segunda etapa com três testes de ordenação-preferência: As amostras tratadas com a enzima proteolítica foram submetidas a um novo teste de ordenação-preferência, bem como as amostras tratadas com a polifenoloxidase. O terceiro teste foi realizado entre as amostras tratadas e não tratadas enzimaticamente. Em todos os casos com o objetivo de verificar qual o melhor tratamento a se realizar durante a fermentação, para cada enzima.

4.2.9.2 - Análise de aceitação

Através dos testes de ordenação-preferência, foram selecionadas duas amostras com adição de cada enzima na menor concentração, 5,0% de polpa de pinha e 0,5% de protease, E3 e E4, respectivamente, as quais foram selecionadas em virtude do fator econômico, já que não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto à preferência com relação às demais amostras. Entre as amostras sem tratamento enzimático não houve diferença estatística ($p \leq 0,05$), portanto selecionou-se a amostra sem adição de água (E8) como padrão, por se tratar de uma fermentação com processamento tradicional.

Foi realizada a análise de aceitação de três amostras, duas tratadas enzimaticamente (conforme descrito acima) e a amostra padrão (sem adição de enzima) para efeito de comparação.

As amostras foram apresentadas de forma monádica, em cabines individuais.

As avaliações foram realizadas através de fichas com escala hedônica não estruturada de 9 cm, em relação ao aroma, sabor e impressão global (FIGURA 05).

Em todos os testes realizados utilizou-se um número mínimo de 35 provadores.

4.2.10 - Análise estatística

Os valores obtidos de medidas físicas das amêndoas, composição química, grau de fermentação (prova de corte), acidez total, pH, ácidos orgânicos, grupo amino-terminal, aminoácidos livres, fenóis totais, taninos, flavan-3-óis, antocianidina e os dados do teste sensorial de aceitação foram analisados estatisticamente, por Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para determinação de diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias das amostras, utilizando-se o pacote SAS (Statistical Analysis System).

Os testes de ordenação-preferência foram analisados através do método de Friedman (Tabela de Newell e Mac Farlane).

Determinaram-se coeficientes correlação de Pearson entre as variáveis pH, acidez total e ácidos orgânicos dos *nibs* e da semente liofilizada.

Nome: _____ Data: __/__/__

Por favor prove as amostras da esquerda para a direita e avalie o **SABOR**, ordenando-as em ordem crescente de preferência.

_____ _____ _____
- preferida + preferida

Comentários _____

FIGURA 04. Ficha do teste sensorial ordenação-preferência.

Nome: _____ Data: __/__/__

AMOSTRA _____

Você está recebendo uma amostra codificada de cacau fluido. Por favor, prove a amostra e avalie na escala apropriada, o aroma, o sabor e a impressão global.

- Em relação ao aroma

Desgostei muitíssimo Gostei muitíssimo

|-----|

- Em relação ao sabor

Desgostei muitíssimo Gostei muitíssimo

|-----|

- Em relação à impressão global

Desgostei muitíssimo Gostei muitíssimo

|-----|

O que você mais gostou nesta amostra:

O que você menos gostou nesta amostra:

—

Muito obrigada!

FIGURA 05. Ficha do teste sensorial de aceitação

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS FRUTOS E SEMENTES

As características físicas de 50 frutos de cacau *in natura* estão representadas na Tabela 09.

TABELA 09. Valores biométricos dos frutos *in natura* de cacau.*

	Fruto total g	Casca g	Semente com polpa g	Semente sem polpa g	Placenta g	Semente/ fruto Nº	g semente/ 100g fruto
Máximo	1263,38	1008,04	221,88	105,84	33,46	57	8,37
Mínimo	229,16	188,38	23,87	12,98	2,35	8	5,66
Média**	525,46	425,21	80,38	46,10	8,54	27,83	8,01
Média***	695,40	540,90	144,14	90,13	15,31	39,8	13,39

* Os frutos foram colhidos no mês de maio de 2000.

** Média representativa de frutos.

*** Média obtida por ZAMALLOA (1994) para frutos colhidos em maio de 1992.

Ao se comparar os valores biométricos deste estudo com os obtidos por ZAMALLOA (1994), para dez clones de frutos com a mesma origem e variedades, mas colhidos em maio de 1992, foi observado que a média dos parâmetros obtidas por este autor foi maior que àquela obtida para os frutos do presente trabalho. Acredita-se que isso possa ter sido ocasionado pelas condições climáticas diferentes vigentes no período de desenvolvimento dos frutos.

Os valores biométricos das sementes são uma característica da variedade e da origem do cacau. Os valores de comprimento, largura e espessura, bem como da massa média de sementes estão representados na Tabela 10.

TABELA 10. Valores biométricos das sementes de cacau.

	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Massa por sementes (g)
Máximo	25,9	14,8	12,7	2,05
Mínimo	18,45	11,10	7,45	0,81
Média*	21,10	12,33	9,26	1,21
Média**	25,7	12,66	9,56	-

* Os frutos foram colhidos no mês de maio de 2000.

** Média representativa de frutos.

*** Média obtida por ZAMALLOA (1994) para frutos colhidos em 1992

5.2 - PARÂMETROS DETERMINADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO

5.2.1 - Determinação de sólidos solúveis (°Brix)

Os valores de sólidos solúveis corrigidos de acordo com a temperatura da polpa mucilaginosa durante a fermentação dos experimentos estão apresentados na Tabela 11, na qual pode-se observar que não houve grandes diferenças no °Brix entre as fermentações realizadas. As concentrações variaram na faixa de 22,1 a 24,4 °Brix para os valores lidos após 24 horas e de 18,8 a 23,0 °Brix para os valores lidos após 48 horas.

Devido principalmente à transformação de açúcar em álcool durante os primeiros dias de fermentação, foi observada uma diminuição de sólidos solúveis da polpa.

As leituras de sólidos solúveis só foram possíveis até 48 horas de fermentação, visto que após esse tempo não havia mais presença de líquido da polpa (mel).

TABELA 11. Valores de sólidos solúveis (°Brix) da polpa durante a fermentação.

Experimento	Horas de processamento	
	24	48
	°Brix	°Brix
E1	24,4	23,0
E2	23,4	20,5
E3	22,9	19,5
E4	22,1	18,8
E5	22,1	19,0
E6	23,4	20,0
E7	24,1	22,8
E8	23,2	21,5

5.2.2 - Controle da temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação

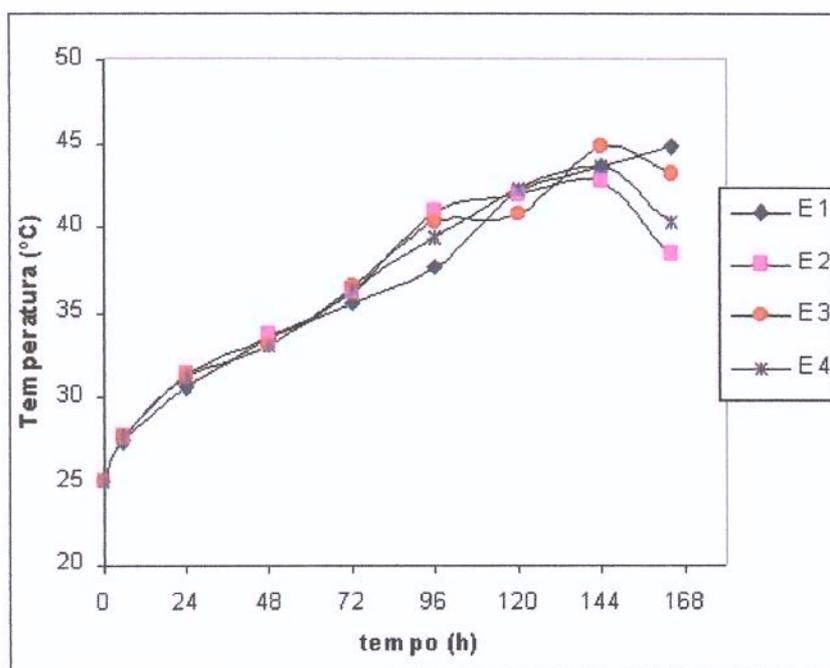
As curvas representativas das variações da temperatura, na massa de sementes de cacau durante a fermentação, estão ilustradas nas figuras 6a e 6b.

Os experimentos tratados com a polifenoloxidase (E1, E3 e E5) apresentaram variações de temperatura semelhantes, havendo um declínio nos tempos em torno de 120 e 144 horas. O comportamento da temperatura para os experimentos tratados com protease foi bem próximo ao comportamento obtido no experimento padrão (E7).

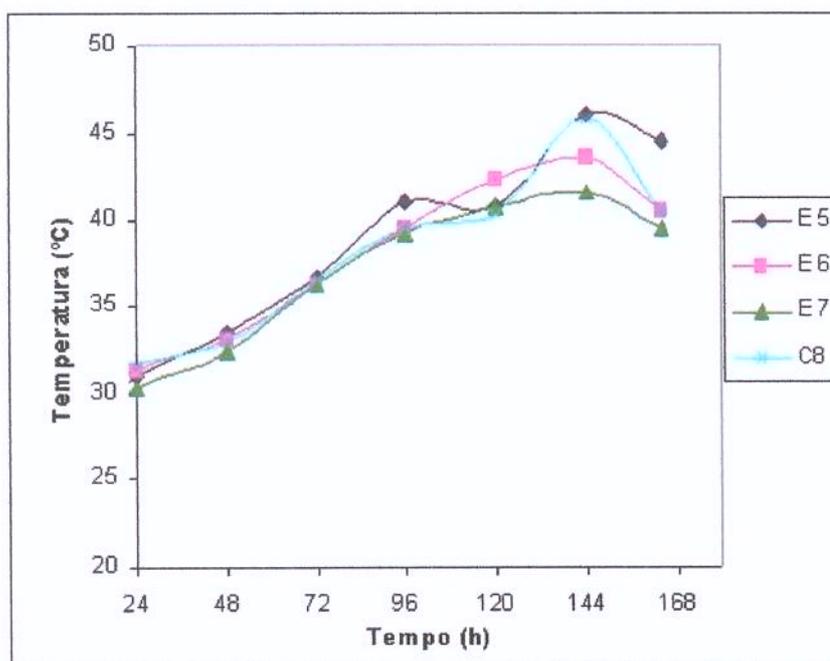
De um modo geral, a temperatura no decorrer da fermentação sobe devido às reações exotérmicas de oxidação do etanol com produção de CO₂, H₂O e ácido acético, atingindo valores de 45 a 48°C, em aproximadamente 120 horas, sendo que o controle da aeração é muito importante (LOPEZ, 1979). A partir desse

momento ocorre um decréscimo até 38-40°C, correspondendo ao final da fermentação (144 horas) (DIAS, 1987).

Segundo ZAMALLOA (1994) em boas fermentações comerciais, a temperatura da massa de sementes deve atingir 45 a 48°C em aproximadamente 72 horas. Essa diferença de tempo para atingir a temperatura adequada pode ser devida ao volume do produto em fermentação, flora microbiana presente e inclusive às condições climáticas.



(a)



(b)

FIGURA 06. Variação da temperatura na massa de sementes, de cacau durante a fermentação.

(a) E1(7,5% de polpa de pinha - 48hs), E2(0,75% de protease - 48hs), E3(5,0% de polpa de pinha - 96hs) e E4(0,5% de protease - 96hs)

(b) Experimentos: E5(7,5% de polpa de pinha - 96hs), E6(0,75% de protease - 96hs), E7(sem adição de enzima, mas com adição de água) e E8(sem adição de enzima)

5.2.3 - Determinação do pH da massa de sementes de cacau durante a fermentação

O acompanhamento do pH no interior das caixas foi realizado com o objetivo de se avaliar o progresso da fermentação. Como apresenta a Tabela 12, houve um aumento do pH do meio em todos os experimentos realizados. Essa variação está relacionada com as mudanças ocorridas na polpa durante o processo.

O valor baixo para o pH da polpa na fase inicial deve-se principalmente ao ácido cítrico que está presente de forma natural na polpa de semente de cacau. Em consequência da atividade dos microrganismos na polpa, o ácido cítrico vai sendo substituído pelos ácidos menos dissociados: láctico (numa extensão muito limitada) e ácido acético (ROELOFSEN, 1958).

TABELA 12. Valores do pH no interior das caixas durante a fermentação

Experimento	pH						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
E1	2,96	3,30	3,42	3,45	4,02	4,63	n.d
E2	2,92	3,25	3,45	3,53	4,64	6,15	n.d
E3	2,95	3,29	3,31	3,90	4,20	4,51	n.d
E4	2,97	3,22	3,25	3,45	4,16	5,30	n.d
E5	2,97	3,10	3,22	3,53	3,70	3,62	n.d
E6	2,99	3,28	3,40	3,92	4,45	5,76	n.d
E7	2,98	3,28	3,45	4,00	4,63	5,56	n.d
E8	2,97	3,29	3,35	4,00	4,61	5,53	n.d

n.d.: Não determinada

Cumpridas as 168 horas não foi possível determinar o pH por falta de substrato.

5.3 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS AMÊNDOAS FERMENTADAS E SECAS

Terminada a etapa de fermentação, iniciou-se a secagem natural das amêndoas ao ar livre, isento de odores estranhos, e ao abrigo de chuva. Essa etapa teve duração de nove dias, dos quais, no último dia, as amêndoas foram colocadas em estufa com circulação de ar à 35°C, a fim de melhorar o equilíbrio da umidade entre as diferentes amostras.

Na Tabela 13 estão representados os resultados das análises de umidade, densidade aparente, massa de 100 amêndoas e o número de amêndoas em 100 gramas.

5.3.1 - Umidade

Os valores de umidade estão compreendidos entre 4,18 e 4,27%, encontrando-se abaixo do limite de 8,0% estabelecido pelas especificações de padronização recomendadas pelo Conselho Nacional do Comércio Exterior (CONCEX, 1968).

5.3.2 - Densidade aparente

Os valores médios da densidade aparente das amêndoas (Tabela 13), compreendidos entre 0,84 e 0,85 g/cc, não apresentam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os experimentos e estão na faixa dos valores 0,76 e 0,96 g/cc reportados por ZAMALLOA (1994).

5.3.3 - Massa média por amêndoa e número de amêndoas em 100 gramas

Os resultados obtidos de massa média por amêndoa apresentados na Tabela 10, estão compreendidos entre 1,04 e 1,19g. Esses valores estão de acordo com a faixa de valores 0,85 e 2,21g reportados por ZAMALLOA (1994)

A Tabela 13 mostra também os números de amêndoas em 100 g, os quais variaram entre 75 e 92 amêndoas e se encontra na média dos valores obtidos por ZAMALLOA (1994) tiveram uma faixa de 49 e 122 amêndoas. Por se tratar de mistura de materiais clonais, de origens, as sementes apresentaram grande variabilidade de tamanho e forma (Tabela 10), havendo diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto em relação à massa média por amêndoa, quanto ao número de amêndoas em 100g.

TABELA 13. Características físicas das amêndoas (valores médios de 100 amêndoas).

Experimento	Umidade %	Densidade g/cc	Massa Média por amêndoa (g)	Número de amêndoas em 100 g
E1	4,18a	0,86a	1,19a	75f
E2	4,21a	0,83a	1,04g	92a
E3	4,27a	0,83a	1,19a	87c
E4	4,23a	0,84a	1,12d	86d
E5	4,21a	0,85a	1,07f	92a
E6	4,20a	0,85a	1,08e	89b
E7	4,19a	0,83a	1,14c	86d
E8	4,21a	0,82a	1,13c	84e
C.V	1,12	1,54	0,12	0,11

C.V. : Coeficiente de variação

Observação: Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

5.3.4 - Frações das amêndoas

Na Tabela 14 encontram-se os valores médios percentuais de massa de cotilédones, testa e gérmen, partes que compõem a amêndoa. Apesar de serem estatisticamente diferentes entre si, observa-se que para a maioria das frações dos experimentos os valores percentuais não há diferença significativa ($p \leq 0,05$).

TABELA 14. Valores médios de nibs, testa e gérmen da amêndoa expressos em porcentagem.

Experimento	Cotilédone%	Testa %	Gérmen %
E1	82,66d	16,51a	0,83a
E2	85,86a	13,46e	0,68b
E3	83,80d	15,38b	0,82a
E4	84,50b	14,80cd	0,70b
E5	85,36b	13,95e	0,69b
E6	85,55ab	14,76d	0,69b
E7	84,05c	15,23bc	0,72b
E8	84,25bc	15,06c	0,69b
C.V.	0,12	0,19	2,33

C.V. : Coeficiente de variação

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

5.4 - CLASSIFICAÇÃO DAS AMÊNDOAS FERMENTADAS

Os valores médios, em porcentagem do teste da prova de corte, estão representados na Tabela 15, em função da qualidade da fermentação (amêndoas marrons, amêndoas violetas, mofadas, danificadas por insetos, ardósias, germinadas e achatadas e/ou com outros defeitos).

A porcentagem de amêndoas marrons variou entre 71,5 a 80%, tendo havido diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Os tratamentos E3, E4, E6, E7 e E8 correspondentes aos tratamentos com adição de 5,0% de polpa de pinha madura (após 96 horas), adição de 0,5% (após 96 horas) de protease, adição de 0,75% (após 96 horas) de protease, sem adição de enzima e adição de água, sem enzima, respectivamente, apresentaram os maiores teores de amêndoas marrons. Observa-se que o tratamento E1 (adição de 7,5% de polpa de pinha madura após 48 horas) apresentou a menor porcentagem de amêndoas com coloração marrom.

Todos os tratamentos apresentaram aroma característico de um produto de cacau fermentado, porém suave, pouco odor de ácido acético, ausência de odores estranhos, como de mofo, amêndoas ardósias e germinadas. Entretanto, houve constatação de diferenças nos graus de fermentação em todos os tratamentos.

Nos aspectos considerados para a avaliação (amêndoas ardósias, germinadas, mofadas e achatadas), todas as amostras analisadas encontraram-se dentro das especificações do CONCEX (1968), sendo classificadas, segundo a qualidade, como tipo superior (Tipo I).

Embora a presença de algumas amêndoas violetas não seja considerada determinante na classificação da amêndoa, essa ocorrência pode indicar, em alguns tratamentos, que o grau de fermentação foi insuficiente. Microscopicamente, suas estruturas se assemelham às das amêndoas marrons, bem fermentadas ainda que tenha ocorrido ruptura das membranas celulares, as antocianinas não foram suficientemente hidrolisadas e oxidadas (ZAMALLOA, 1994).

TABELA 15. Valores do teste da prova de corte (porcentagem de amêndoas marrons e violetas)

Experimento	Amêndoas				
	Marrons %	Violetas %	Mofadas e danificadas por insetos %	Ardósias e germinadas %	Achatadas e/ou com outros defeitos %
E1	71,5c	28,5a	ausência	ausência	<2
E2	75,0b	25,0b	ausência	ausência	<2
E3	78,5a	21,5c	ausência	ausência	<2
E4	79,5a	20,5c	ausência	ausência	<2
E5	75,0b	25,0b	ausência	ausência	<2
E6	80,0a	20,0c	ausência	ausência	<2
E7	77,0a	23,0c	ausência	ausência	<2
E8	78,0a	22,0c	ausência	ausência	<2
C.V.	0,73	2,38	-	-	-

C.V. : Coeficiente de variação

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

5.5 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS NIBS

Após terem sido fermentadas e secas naturalmente ao sol as amêndoas e as sementes liofilizadas de cacau foram fragmentadas (*nibs*) e preparadas para a caracterização físico-química e sensorial.

5.5.1 - Valores médios de pH, acidez titulável total e ácidos orgânicos dos *nibs* e da semente liofilizada de cacau.

A Tabela 16 apresenta os valores médios de pH e acidez titulável total das amêndoas fermentadas e secas e da semente liofilizada de cacau.

TABELA 16. Valores médios do pH e acidez titulável total dos *nibs* e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar).

Experimento	pH	Acidez Titulável total meq.NaOH/100g
E1	4,81g	27,30a
E2	5,95b	11,59f
E3	5,14e	19,35c
E4	5,46d	17,44d
E5	4,97f	25,34b
E6	5,59c	13,51e
E7	5,94b	12,62ef
E8	5,89b	12,92ef
Semente liofilizada	6,58a	8,30g
C.V.	0,53	1,74

C.V. : Coeficiente de variação

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

Observa-se que os resultados dos testes estatísticos apresentam diferenças ($p \leq 0,05$) tanto entre os valores de pH quanto para os valores de acidez.

A acidez do cacau não é própria das sementes, mas sim adquirida durante a fermentação quando os tecidos dos cotilédones absorvem ácidos e outras substâncias produzidas pelos microorganismos envolvidos no processo (LOPES & PASSOS (1995) citado em DIAS (1998)).

De acordo com JINAP & DIMIK (1990), as amêndoas com valores de pH acima de 5,49 são classificadas como pH elevado, encontrando-se nessa faixa os tratamentos E2, E5, E7e E8. As amêndoas com pH entre 5,20 e 5,49 são classificadas na faixa de pH médio, equivalente apenas ao tratamento E4, e as amêndoas com pH compreendidos entre 4,75 e 5,19 são consideradas na faixa de pH baixo, correspondendo aos tratamentos E1, E3 e E6.

As diferenças de acidez existentes entre os tratamentos podem ter sido ocasionadas por vários fatores, tais como: variação no estágio de maturação e na condução do processo de fermentação, principalmente devido aos diferentes tratamentos realizados.

Na Tabela 17 estão apresentados os teores de ácidos orgânicos determinados nos *nibs* e na semente liofilizada de cacau. Pode-se observar que os tratamentos com menor valor de pH e maior valor de acidez titulável (Tabela 10), apresentaram maior teor de ácido acético e láctico, principalmente os tratamentos E1 e E6, os quais apresentaram com a maior presença de ácido acético em seus *nibs*.

TABELA 17. Valores de ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação das amêndoas fermentadas e secas.

Experimento	Ácido cítrico(%)	Ácido acético(%)	Ácido láctico(%)
E1	n.d	0,98a	0,03
E2	n.d	0,33f	0,05
E3	n.d	0,57c	0,05
E4	n.d	0,46d	0,05
E5	n.d	0,81b	0,06a
E6	n.d	0,38e	0,05
E7	n.d	0,46d	traços
E8	n.d	0,56d	traços
Semente liofilizada	0,34	0,10g	traços
C.V.	-	2,08	-

C.V. : Coeficiente de variação

n.d.: Não determinado

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

Os dados da Tabela 18, que apresenta uma estimativa de correlação entre pH, acidez e ácido acético, indicam que a melhor correlação apresentada, em ordem de importância, foi entre a acidez total e o teor de ácido acético ($\rho=0,971$), devido este ácido ser absorvido pelos cotilédones durante a fermentação. Observou-se um elevado grau de correlação negativo entre o pH e acidez total ($\rho=-0,950$). O pH apresentou uma boa correlação com o teor de ácido acético ($\rho= -0,861$), mas com valor negativo.

TABELA 18. Estimativa de correlação (ρ) entre pH, acidez, e ácido acético dos *nibs** e da semente liofilizada.

	Ác. acético	Acidez total
pH	-0,928 (0,001)	-0,950 (0,000)
Acidez total	0,971 (0,000)	

* Das amêndoas fermentadas dos diferentes tratamentos

Sendo assim, os resultados evidenciaram que os valores de acidez dos cotilédones e semente de cacau liofilizada estão correlacionados de maneira expressiva com os teores de ácido acético, de acordo com os coeficientes de correlação.

5.5.2 - Composição centesimal dos *nibs* dos diferentes tratamentos de fermentação e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar)

Os valores médios das análises químicas dos *nibs* fermentados e da semente liofilizada de cacau sem fermentar realizadas neste trabalho estão apresentados na Tabela 19.

Entre os principais componentes, é importante destacar o teor de gordura e de proteína. Quando os resultados obtidos são comparados com os reportados por MINIFIE (1989) (Tabela 05), observa-se diferença principalmente entre os

valores de lipídios, fibra e cafeína. Esta diferença pode estar relacionada com os diversos fatores que influenciam a fermentação do cacau, como cultivo, pré-tratamentos realizados, entre outros.

TIMBIE *et al* (1978) verificaram que o teor de teobromina e cafeína varia em função do grau de maturação dos frutos na colheita, do grau de fermentação e da variedade de cacau. O teor total de alcalóides em base seca e desengordurada variou de 23,7 mg/g em amêndoas de cacau Criollo, até 49,7mg/g em amêndoas de cacau Trinitário, obtendo-se uma média nos tratamentos deste autor de 37,0 mg/g para os dez clones analisados. A porcentagem de teobromina com relação ao teor total de alcalóides, variou de 52,3% em um clone de cacau Criollo, até 99,1% em um clone de cacau Forastero Amazonense, obtendo-se a média de 87% entre os dez clones analisados.

Há diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as composições químicas dos *nibs* dos diferentes experimentos realizados. Essas diferenças podem estar relacionadas com os diferentes tratamentos realizados durante a fermentação.

TABELA 19. Composição Química* dos *nibs* fermentados com tratamentos diferentes e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar).

Experimento	Proteína	Fibras	Lipídios	Cinzas	Teobromina	Cafeína
E1	13,65e	5,59abc	50,46b	2,52e	1,145d	0,179ab
E2	13,98d	5,31bc	49,57c	2,89c	1,320b	0,175ab
E3	14,84a	5,43abc	48,54d	3,06b	1,240c	0,188ab
E4	14,11cd	5,22c	49,38c	2,67d	1,305bc	0,185ab
E5	13,59e	5,29bc	50,12bc	2,94c	1,330b	0,187ab
E6	14,21bc	5,20c	51,53a	2,84c	1,345b	0,171b
E7	14,88a	5,79a	49,70bc	2,89c	1,440a	0,191ab
E8	14,75a	5,64ab	49,55bc	2,76cd	1,425ab	0,188ab
Semente liofilizada	14,95a	5,52abc	48,5d	3,31a	1,495a	0,201a
C.V.	0,39	1,92	0,41	0,93	1,41	3,62

C.V. : Coeficiente de variação

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

* Valores em base à matéria seca

5.5.3 - Valores médios do grupo amino-terminal e de aminoácidos dos *nibs* fermentados com tratamentos diferentes e da semente liofilizada de cacau (sem fermentar).

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados do grupo amino-terminal e de aminoácidos determinados nos *nibs* de cada tratamento e da semente liofilizada de cacau. A análise de aminoácido foi realizada apenas nos tratamentos selecionados sensorialmente, como sendo os de melhor qualidade.

TABELA 20. Valores médios do grupo amino-terminal e de aminoácidos livres nos *nibs* fermentados com tratamentos diferentes e na semente liofilizada de cacau (sem fermentar).

Experimento	Grupo amino-terminal (mg/g amostra)	Aminoácidos Livres (mgAA/100mg amostra)
E1	26,98b	-
E2	25,04cd	-
E3	28,29a	2,75
E4	23,68d	2,20
E5	26,02bc	-
E6	23,78d	-
E7	21,07e	1,53
E8	22,12e	-
Semente liofilizada	14,61f	0,59
C.V.	1,61	-

C.V. : Coeficiente de variação

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

*Os resultados foram analisados apenas para os experimentos selecionados sensorialmente (E3 e E4 com PPO e protease, respectivamente, e E7 sem adição de enzima)

Pode-se observar que há diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores determinados para o grupo amino-terminal na maioria dos tratamentos. Os tratamentos com adição de protease (E2, E4 e E6) não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre si, mas apresentaram-se diferentes estatisticamente com os outros tratamentos. Essas diferenças podem ser devido ao pH e a temperatura estabelecidos nas sementes durante a fermentação, sendo que esses fatores são dependentes da aeração realizadas nas caixas de fermentação. Consideráveis diferenças têm sido relatadas, segundo BIEHL & PASSER (1982), quanto ao grau de proteólise e a composição de aminoácidos livres em sementes fermentadas.

Os valores do grupo amino-terminal obtidos para os *nibs* fermentados com tratamentos diferentes estão de acordo com o valor de 24,14 mg/g encontrado por FERNÁNDEZ BARBERY (1999) em *nibs* fermentados

Quanto aos valores de aminoácidos livres determinados, observou-se um aumento na concentração de aminoácidos livres da ordem de 43,8%, para o experimento tratado com protease (E4) e de 79,74% para o experimento com adição de polifenoloxidase (E3), destacando-se o aumento dos aminoácidos leucina, alanina e fenilalanina, com incrementos de 50%, 41,7% e 53,3%, respectivamente para E4 e de 58,33%, 81,82% e 53,3%, respectivamente para E3, como se pode observar no Anexo V (a,b), obtido após efetuada a integração das áreas.

5.5.5 - Valores médios dos compostos fenólicos determinados em pó desengordurado de cacau obtidos a partir das amêndoas fermentadas com diferentes tratamentos e da semente sem fermentar

Os fenóis totais em cacau são reduzidos em torno de 30% do valor inicial durante a fermentação, devido a oxidação através da polifenoloxidase, reações com as proteínas, ou devido a polimerizações (FORSYTH *et al*, 1958; CROS *et al*, 1982; VILLENEUVE *et al*, 1989).

Os valores quantificados de fenóis totais, taninos e flavan-3-óis para pó de cacau desengordurado a partir das amêndoas fermentadas com diferentes tratamentos e da semente sem fermentar estão apresentados na Tabela 21.

Os experimentos tratados com a polifenoloxidase e com adição após 96 horas E3 e E5, tiveram uma redução de 18,64 e 20,07%, respectivamente, com

relação à semente sem fermentar e de 5,29 e 6,95%, respectivamente, com relação ao tratamento padrão E8, não apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre si. Entretanto, o experimento E1 praticamente não variou, talvez pelo fato de a adição da polifenoloxidase, nesse experimento, ter sido realizada no primeiro revolvimento (após 48 horas de fermentação), ou seja, no início da fase aeróbica.

Em estudos realizados por YOSHIAMA & ITO (1996) e FERNÁNDEZ BARBERY (1999), os autores conseguiram uma redução em torno de 25% em *nibs* de cacau autoclavados e tratados termicamente, utilizando diretamente a enzima polifenoloxidase (25U/mL).

Entre os experimentos tratados com a protease, apenas E6 (com adição após 96 horas) teve redução na concentração de fenóis totais.

Quanto aos resultados estatísticos de fenóis totais, pode-se observar que os experimentos praticamente não diferiram entre si ($p \leq 0,05$).

TABELA 21. Concentração (mg g^{-1}) de fenóis totais, taninos e flavan-3-óis em pó de cacau desengordurado.

Tratamentos	Fenóis totais	taninos	Flavan-3-óis
E1	275,55bcd	48,96abc	139,27c
E2	282,94b	49,84e	187,38b
E3	268,55cd	46,64bcd	67,84de
E4	280,79bc	41,79d	68,93de
E5	263,84d	50,65abc	59,955e
E6	269,51cd	44,26cd	78,13d
E7	284,48bc	54,65a	144,25c
E8	283,56bc	55,27a	143,91c
Semente liofilizada	330,08a	33,30e	216,14a
C.V.	1,69	3,75	2,94

C.V. : Coeficiente de variação

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

Todos os experimentos tratados enzimaticamente durante a fermentação apresentaram redução na concentração de taninos, variando na faixa de 8,36 a 29,38% em relação ao padrão E8. Estatisticamente, os valores de taninos apresentaram poucas diferenças entre si ($p \leq 0,05$).

BRACCO (1969) citado por YOSHIYAMA & ITO (1996) concluiu que à medida que progride a fermentação das amêndoas do cacau, a concentração de flavan-3-óis diminui em relação à concentração de fenóis totais e que essa proporção seria um indicador importante para mostrar o grau de fermentação.

Os experimentos com adição das enzimas polifenoloxidase e protease, no quarto dia de fermentação (E3, E4, E5 e E6), apresentaram uma redução de flavan-3-óis na faixa de 45,71 a 52,86% com relação ao padrão E8. Esses experimentos não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

A determinação de antocianidinas em pó de cacau desengordurado a partir dos *nibs* e da semente estão apresentados na Tabela 22.

Durante a fermentação, as antocianidinas são hidrolisadas pelas glicosidases, e mais tarde esses pigmentos são oxidados pela polifenoloxidase (FORSYTH & QUESNEL, 1957; HANSEN *et al*, 1998).

TABELA 22. Quantificação de antocianidinas em pó de cacau desengordurado

Tratamento	Antocianidina ¹
E1	1,07c
E2	1,21bc
E3	1,10bc
E4	1,22b
E5	1,13bc
E6	1,15bc
E7	1,15bc
E8	1,15bc
Semente liofilizada	2,11a
C.V.	2,96

¹ valores obtidos na leitura de absorbâncias, (535nm/462nm), $\lambda A/\lambda B$.

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância)

Os resultados obtidos na determinação de antocianidina para os experimentos E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8 não diferiram entre si significativamente a $p \leq 0,05$, sendo que todos eles diferiram da semente liofilizada.

5.6 - TORRAÇÃO DOS NIBS

5.6.1 - Variação da temperatura durante a torração dos nibs

A temperatura na camisa de aquecimento do forno elétrico para a torração dos nibs foi fixada para todos os experimentos em 150°C, permanecendo constante a temperatura da camisa durante todo o processo. Por outro lado, foi controlado o perfil de temperatura interna da cavidade do forno, temperatura dos gases do produto ao longo da torração, com auxílio de um termopar. Todas as torrações correspondentes aos diferentes experimentos tiveram um comportamento semelhante ao apresentado na Figura 07.

A temperatura máxima atingida no interior do forno foi de 150°C. Os nibs foram colocados quando a temperatura na cavidade interna marcava 148°C, sendo que após a introdução destes, houve um declínio para 66°C, continuando a subir logo em seguida até o ponto máximo (150°C).

O tempo de torração mais adequado obtido por análise sensorial de três tempos variou em função de cada experimento, sendo que houve uma preferência entre os provadores para os tempos de 36 e 38 minutos de torração recebeu a preferência entre os provadores. A Tabela 23 apresenta os tempos de torração selecionados em cada experimento.

TABELA 23. Resultados do teste de ordenação para o melhor tempo de torração.

Experimento	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Tempo(min)	36	36	36	36	38	38	38	38

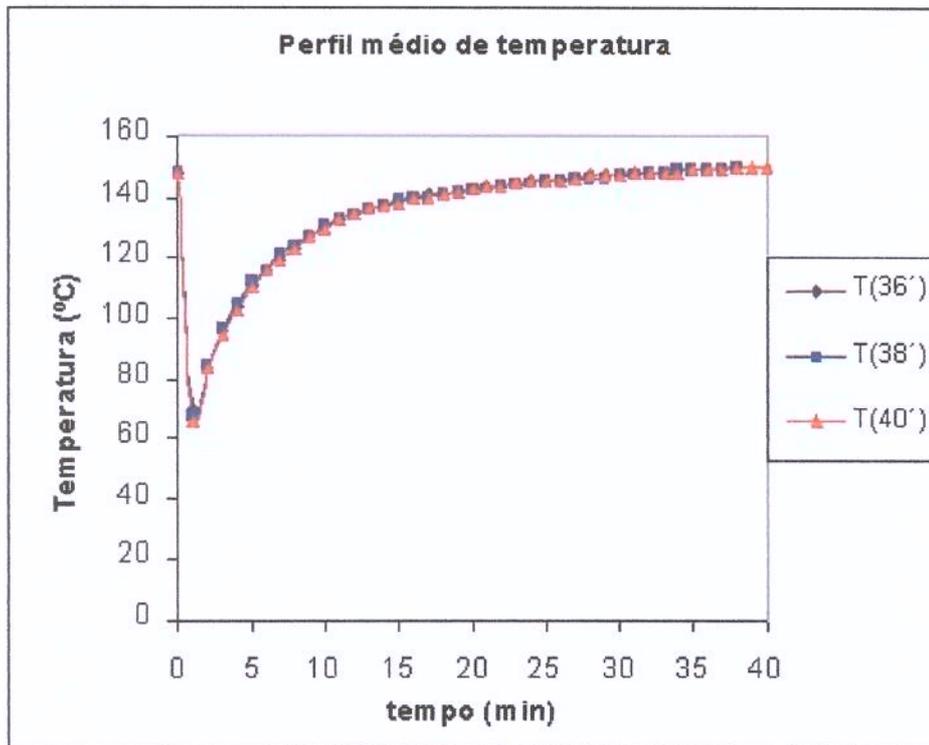


FIGURA 07. Evolução da temperatura durante a torração dos nibs.

Observando a Figura 07, pode-se verificar que o perfil de temperatura no interior da cavidade do forno elétrico foi bastante semelhante para as três torrações realizadas nos diferentes tempos usados, o que garantiu uma boa reprodutibilidade dos tratamentos técnicos.

5.7 - ANÁLISE SENSORIAL DO LIQUOR

Os melhores tempos de torração em cada experimento foram determinados através do teste de ordenação. As amostras analisadas para os tempos de torração de cada tratamento, diferiram significativamente entre si a $p \leq 0,05$.

Os testes de ordenação realizados para se determinar a concentração de cada enzima adicionada com maior eficiência, demonstraram que não houve diferença significativa entre as amostras a $p \leq 0,05$. Portanto, fez-se a escolha das amostras que apresentavam menor adição de enzima por uma questão de custo, sendo de 0,5% para a amostra com enzima proteolítica e 5% para a amostra com adição de polpa de pinha.

Comparando-se as amostras adicionadas de enzimas entre si e com a amostra padrão através do teste de aceitação em escala não estruturada ou em linha (9 cm) para os atributos: aroma, sabor e aceitação global, pode-se observar pelas Figuras 08, 09 e 10, a amostra que mais se destacou.

Em relação ao aroma, a amostra sem adição de enzima (E7) teve uma melhor aceitação, enquanto as outras amostras não diferiram significativamente entre si a $p \leq 0,05$.

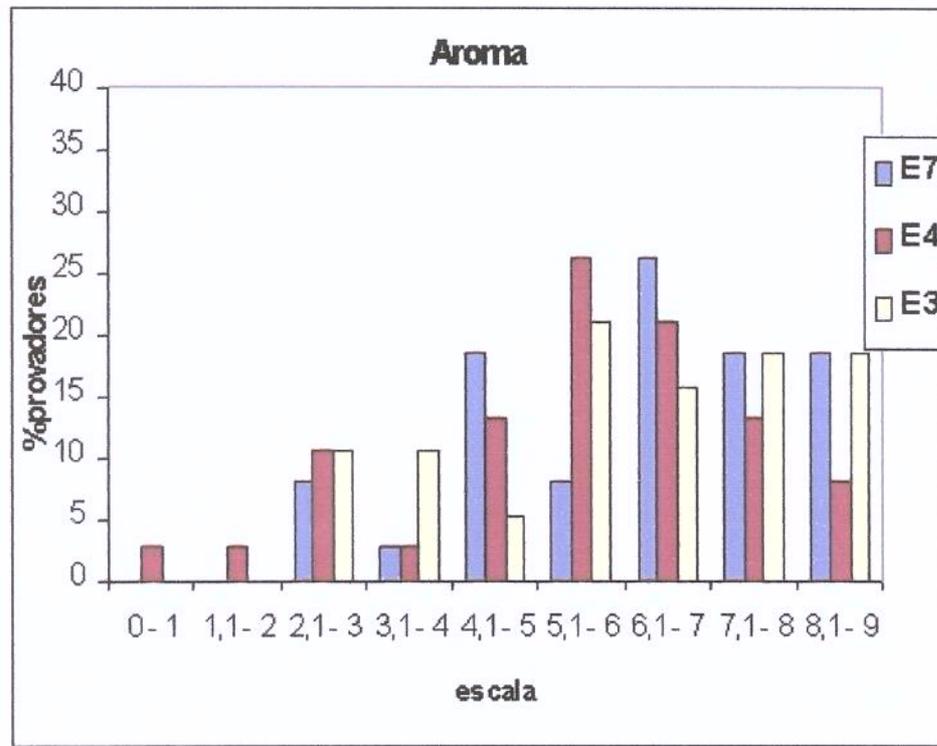


FIGURA 08. Histograma referente aos resultados do teste de aceitação em relação ao aroma para as amostras do produto obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.

De acordo com a Figura 08 observa-se que a amostra sem adição de enzima (E7) apresentou melhores características quanto ao aroma, entretanto não diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) da amostra com adição de polifenoxidase (E3), de acordo com a Tabela de Médias (Tabela 24).

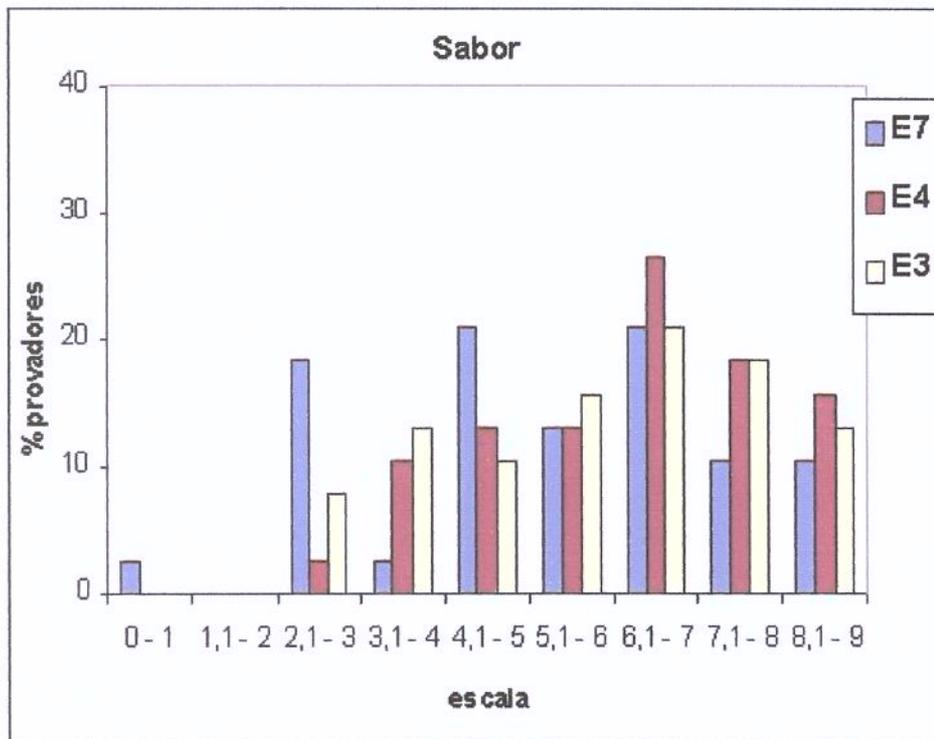


FIGURA 09. Histograma referente aos resultados do teste de aceitação em relação ao sabor para as amostras do produto obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.

Quanto ao sabor, a amostra com adição de polifenoloxidase (E3) apresentou melhores características, entretanto não diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) da amostra com adição de protease (E4), conforme a Tabela de Médias (Tabela 24).

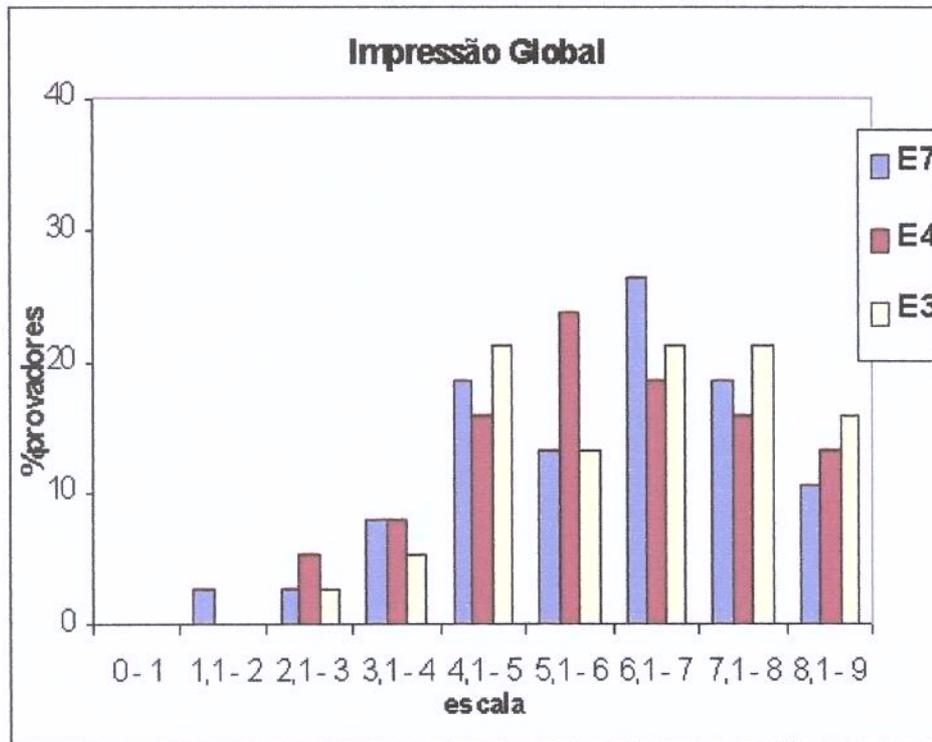


FIGURA 10. Histograma referente aos resultados do teste de aceitação em relação a impressão global para as amostras do produto obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.

As amostras não diferiram entre si ($p \leq 0,05$) quanto à impressão global (Tabela 24). Todas apresentaram a porcentagem de provadores indicando faixas semelhantes, como ilustrado na Figura 10

TABELA 24. Valores médios dos atributos sensoriais estudados dos produtos obtido de cacau tratado e não tratado enzimaticamente durante a fermentação.

Amostra	Aroma	Sabor	Impressão Global
E3	5,979ab	5,884a	6,134a
E4	5,539b	6,116a	5,955a
E7	6,387a	5,266b	6,061a
DMS	0,758	0,843	0,698

DMS = Diferença Mínima Significativa pelo Teste de Tukey.

Os valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de tukey a 5% de significância).

6 – CONCLUSÕES

- O sistema montado para o processo fermentativo das sementes de cacau em estudo, para o qual foram utilizadas caixas de isopor com capacidade de seis litros, mantidas em ambiente de temperatura e umidade relativa controlada, permitiu uma adequada fermentação, observando-se nitidamente no transcurso desta, a fase aeróbica e anaeróbica desse processo.
- Considerando a caracterização físico-química das amêndoas fermentadas e dos *nibs* de cacau, pode-se afirmar que a matéria-prima utilizada para este estudo dos grupos Forastero e Trinitário, provindas do Núcleo Experimental de Agronomia do Vale do Ribeira, do Instituto Agronômico (IAC), Pariquera-Açu, S.P., correspondia a um material próprio para o processamento industrial.
- A classificação das amêndoas fermentadas segundo a Resolução No 42 do CONCEX (1968), mostrou que todos os experimentos de fermentação realizados neste estudo, incluindo aqueles com adição de enzimas, originaram produtos considerados de Grau Superior.
- A adição de 0,5% da enzima comercial “Protezyn flavour” após 96 horas de fermentação, permitiu um aumento significativo de aminoácidos livres da ordem de 43,8%, em relação à amostra sem adição de enzima.
- A adição de 5,0% de polpa de pinha madura após 96 horas de fermentação, reduziu em 18,64% o teor de fenóis totais, 15,61% de taninos e 52,86% de flavan-3-óis, não diferindo estatisticamente do tratamento com a concentração de 7,5% de polpa de pinha.

- A análise sensorial dos produtos obtidos a partir dos tratamentos enzimáticos e não enzimáticos estudados, mostrou que a faixa de 36 a 38 minutos é a mais adequada para a torração dos *nibs* a 150°C.
- Tanto a adição do complexo de enzimas proteolíticas durante a fermentação “Protezyn Flavour” quanto a adição da polpa de pinha madura contendo a polifenoxidase, promoveram uma significativa melhoria do sabor global das amostras, propiciando ainda uma redução importante da adstringência e do sabor amargo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L.E.D. **Purificação e caracterização bioquímica da polifenoloxidase (PPO) em fruto da família anonácea-pinha (*Annona squamosa* L.)**. Campinas, 1999. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de campinas.

AMERINE, M.A. & OUGH, C.S. **Methods for Analysis of Musts and Wines**. 2^a ed. New York. Jy Wiley E Sons, Inc. s.d, 337p.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**: edited Ig W. Horwitz 13^a ed. Washington, 850p. 1984.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**: edited Ig W. Horwitz 16^a ed. Washington, 850p. 1997. v.2.

BECKETT, S.T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Trad. De Mariano Gonzáles Alonso. 1 ed. Zagarozza: Acribia, 432p, 1994.

BECKMAN INSTRUMENTS, INC Beckman 118/119 CL Amino acid analyser. Instruction Manual. Spinco Division, Palo Alto, 1977.

BIEHL, B. & PASSERN, D. Proteolysis during Fermentation-like Incubation of Cocoa Seeds. **J. Sci. Food Agric**.v.33. p. 1280-1290, 1982.

BIEHL, B.; PASSERN, U. & PASSERN, D. Subcelular structures in fermenting cocoa beans. **J. Sci. Food Agric**. London, 28. p. 41-52, 1977.

- BIEHL, B.; WEWETZER, C.; PASSERN, D. Vacuolar (Storage) Proteins of Cocoa Seeds and their Degradation during Germination and fermentation. **J. Sci. Food Agric.** v. 33, p.1291-1304,1982.
- BIEHL, B. & VOIGT, J. **Biochemistry of Chocolate Flavour Precursors**. Int. Cocoa Conference Salvador, Bahia. 25p. November., 1996.
- BRITO, E.S.; PEZOA, N.H.; GALLÃO, M.I.; CORTELAZZO, A.L. Avaliação da estrutura celular de cacau (*Theobroma cacao* L.) por microscopia eletrônica de varredura durante a fermentação, secagem e torração. In: **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro, julho, 1998.
- BRUNO, M.E. **Utilização de proteases de origem bacteriana e fúngica na produção de biscoitos semi-duros**. Campinas, 1989. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de campinas.
- BYTOF, G.; BIEHL, B.; HEINRICHS, H. & VOIGT, J. Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**. v. 54, p. 15-21, 1995.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém, 5ª ed., Museu Paraense Emílio Goeldi, Edições CEJUP: CNPQ. p.90-96, 1991.
- CHURCH, F.C.; POSTER, D.H.; CATIGNANI, G.L. & SWAISGOOD, H.E. Na o-phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. **Analytical Biochemistry**. 146. p. 343-348. 1985.

- CLAPPERTON, J.F. A review of reserch to identy the origins of coca flavour characteristics. **Cocoa Growers' bulletin**. 48. p. 7-23. 1994.
- CLAPPERTON, J.F.; LOCKWOOD, G.; YOW, S.T.K. & LIM, D.H.K. Effects of planting materials on flavour. **Cocoa Growers' bulletin**. 48. p. 47-57. 1994.
- COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DE LAVOURA CACAUEIRA (CEPLAC). Normas técnicas para o cultivo de cacau no Recôncavo Baiano. Ilhéus, Centro de pesquisas do Cacau, 1980. 43 p.
- CONSELHO NACIONAL DO COMÉRCIO EXTERIOR (BRASIL). Resolução nº 42. Rio de Janeiro. 1968. 9p.
- COUCEIRO, E.M. Pinha, fruto do conde ou ata, sua cultura e origem. **Publicação da CEASA**, Recife, v.1 (8), 1973.
- CROSS, E.; VILLENEUVE, F. & VICENT, J.C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. **Café Cacao Thé**. 16 (2). p. 109-113. 1982
- DIAS, J.C. **Permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético: evolução na fermentação e efeito da adição de celulases antes da secagem, na acidez do produto final**. Lavras, 1987. 86p. Tese (Mestrado). Escola Superior de agricultura de Lavras.
- DIAS, J.C. **Influência do tamanho do fermentador e da época no tempo de fermentação e acidez do cacau**. Belém; CEPLAC/SUPOR, 1998. 18p. (CEPLAC/SUPOR. Boletim Técnico, 16).

- DRUMMOND, M. M. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Theobroma cacao* L.), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**. Campinas, 1998. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- DRUZIAN, J.I.; SCAMPARINI, A. **Determinação de açúcares e ácidos orgânicos de polissacarídeos produzidos por diferentes espécies de Rhizobios**. II Simpósio Latino Americano de Ciências de alimentos – Processo e Ação para o Ano 2000, p.32, out. 1997.
- FADINI, A. L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração do cacau frente ao processo por microondas**. Campinas, 1998. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FERNÁNDEZ BARBERY, S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) utilizando polifenoloxidase extraída da pinha (*Annona squamosa* L.) e tratamento térmico não convencional**. Campinas, 1999. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FERREIRA, H.I.S.; FREIRE, L.B.; MASCARENHAS, G.; LANDIM, A.D.; DIAS, L.H.H. **Custos Efetivos de Produção de Cacau**. 1998. <http://www.jacaranda.vescba.com.br/hilmar/1relatorio.htm>, 25.10.1999.
- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. Cocoa Glicosidase and colour changes during fermentation. **J.Sci. Food Agric.** (8), 505-509, 1957.

- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. The mechanism of cacao curing. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**. New York, 25:457-459, 1963.
- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. & ROBERTS, J.B. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. **J. Sci Food Agric**. London. 9. p. 181-184. 1958.
- FOWLER, M.S. Fine or flavour cocoas: current position and prospects. **Cocoa Growers' bulletin**. 48. p. 17-23. 1994.
- GARCIA, J. J. S. Beneficiamento, armazenamento e padronização do cacau. **Sistema de produção do cacau na Amazônia Brasileira**. Belém, CEPLAC/DEPEA, cap.9, 86-104, 1985.
- GOERING, H.K. & VAN SOEST, P.J. Forage fibre analysis. *Agri-handbook: Agriculture Research Service, U. S. Dept. Agriculture*, p.375, 1970.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **J. Agric. Food Chem.** 26 (4): 809-813, 1978.
- HANCOCK, B.L. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Producción y transporte del haba de cacao. 1 ed. Zaragoza: Editorial Acribia,. p. 9-32, 1988.
- HANSEN, C. E.; DELOLMO, M. & BURRI, C. Enzyme activities in Cocoa beans During Fermentation. **J. Sci. Food Agric.** 77. p. 273-281. 1998.
- HOLDEN, M. Processing of raw cocoa. III – Enzymic aspects of coca fermentation. **J. Sci. Food Agric.** (10): 691-700, 1959.

- HOSKIN, J.M. & DIMICK, P.S. Chemico-Physical Aspects of Chocolate Processing -A review. **Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology**. v 14 (4): 269-282, 1981.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: DPE-DEAGRO**. Disponível na internet: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>, 25.10.1999.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO). **Estimativa da produção mundial para o período de 1998/99**. Disponível na internet: <http://www.icco.org/>, 15/06/1999.
- JEANJEAN, C.E. Qualité du cacao, influence de la fermentation et du séchage. **Plantations, recherche, developpment**. Maio-Junho. 1995.
- JIMENEZ, S. & LUNA, A.F. Fermentação de cacau com cultivos puros de levedura. **Informe Técnico - CEPEC, Bahia**, p.63, 1969.
- JINAP, S. & DIMICK, P. Acid Characteristcs of fermented and dried cocoa from diferent of origem Pensylvania Agricultural Experiment Station. **J. Food Sci.** 55(2). p. 547-550. 1990.
- LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. São Paulo, 1982. Tese (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- LOPES, A.S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.) em função**

do processamento. Campinas, 2000. 112p. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

LOPEZ, A.S. Fermentation and organoleptic quality of cacao as affected by partial removal of pulps juices from the beans prior to curing. **Theobroma**. v.9, n.1, 25-37, 1979.

LOPEZ, A.S.F. Factors Associated with Cacao Bean Acidity and Possibility of its Reduction by Improved Fermentation. **Revista Theobroma**, Brasil, v.13, n.3, p. 48-49, 1983.

LOPEZ, A.S. & DIMICK, P.S. Enzymes involved in cocoa curing. *In:* edited by FOX, P.F. Food Enzymology. Ireland: Elsevier applied science, v. 2, cap. 25, p. 211-236, 1991.

LOPEZ, A.S. & McDONALD, C.R. Preliminary Test of a Simple and Inexpensive System for the Mechanical Aeration of box-Type Cacao Fermentation. **Revista Theobroma** (Brasil). v.13, n.3, p.233-248, 1983.

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

MAILLARD, M. N.; SOUM, M. H.; BOIVIN, P.; BERSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. **Lebensm. Wiss. - U. Technol.** (29): 238-244, 1996.

MARAVALHAS, N. Aminoacids in fermented and unfermented cocoa beans. **Rev. Int. Choc.**, v. 27, p. 22-23, 1972.

- MATTIETTO, R.A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).** Dissertação no prelo.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. **Phytochemistry**. v.26 (1), p.11-20, 1987.
- MEURSING, E.H. **cocoa products for industrial processing**. 3 ed. Ver. Koogaam de zaam, Ccaofabriek de Zaan B. V. 126p. 1983.
- MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa, and confectionery science and technology**. 3 ed. New York: Na VI Book published by Van Nostrand Reinhood, 104p, 1989.
- MINSON, E. Chocolate manufacture –beans through liquor production. **The Manufacturing confectioner**. p. 61-67. 1992
- MUITA luta do cacau ao chocolate. **Sorveteria Brasileira**, São Paulo, v.15, n.93, p.48-49, 1993.
- MURTHY, M. V. R.; PADMANABHAN, S.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B. K. Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method. **Food Biotechnology**. 11, 1-23, 1997.
- OSZMIANSKI, J.; SAPIS, J.C. Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry). **Journal of Food Science**. 53 (4): 1988.

- PASSOS, F. M. L.; LOPEZ, A S. F.; SILVA, D. O. Aeration and its influence on the microbial sequence in cocoa fermentation in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**. 49 (6): 14070-4, 1984.
- PETTIPHER, G.L. Analysis of cocoa pulp and formulation of a Standardized artificial cocoa pulp medium. **J. Sci. Food Agr.** 37. p.297-309, 1986.
- PEZOA, G.N.H. **Contribution a l'étude d'un capter por controlar en continu procedé de torrefaction**. France, 170p,1989. Tese de doutorado. Université de Technologie de Compiègne.
- PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.**; 25 (6), 1268-1273, 1977
- PURR, A. Enzymatische vorgange in kakao-bohnen während der fermentation bei anwendung der vakuuminfiltration. **Ann. Technol. Agric.** 21(3). p. 457-472. 1972.
- REVISTA COMÉRCIO EXTERIOR. Informe Banco do Brasil. 27: 5-11, s.d.
- RIBEIRO, N.C.A. Hidrólise enzimática produzida por fungos isolados do cacau em fermentação. *In*: Centro de Pesquisas do Ccau (Itabuna, Bahia, Brasil). **Agrotópica**. v.2, n.2, 75-80, 1990.
- ROELOFSEN, P.A. Fermentation drying and storage of cocoa beans. **Advances in Food Research**, p.226-229, 1958.

- ROHAN, T.H. El beneficio del cacao bruto destinado al mercado. FAO: Estudio Agropecuários. 223p, 1964.
- SANCHEZ, J.; GALZY, P; GUIRAUD, J.P. *et al.* The use of pure yeast culture seeding during traditional cocoa fermentation. Proceedings-of-the-6th-International-Congress-of-Food-Science-and-Technology. 1, 91. 1983.
- SANT'ANA, J.A. **O Quinto acordo Internacional do Cacao.** Estudos de política Agrícola. 23,1994.
- SCHWAN, R.F. **Microbiology of cocoa fermentation: A study to improve quality.** *In:* 12ª CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CACAU. Salvador - BA, 1996.
- SCHAWN, R.F.; LOPEZ, A.; SILVA, D.O. & VANETTI, M.C.D. Influência da frequência e intervalos de revolvimentos sobre a fermentação do cacau e qualidade do chocolate. *In:* Centro de pesquisas do cacau. (Itabuna, Bahia, Brasil). **Informe Técnico.** P.22-31, 1990.
- SCHAWN, R.F.; ROSE, A.H. & BOARD, R.G. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. **The Society for Applied Bacteriology.** V.79. p. 96-107. 1995.
- SECRETARIA DE AGRICULTURA, IRRIGAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA (SEAGRI). **Aspectos Gerais: Cacaueiro.** Governo Estado da Bahia: Bahia, sd. Disponível na Internet: <http://www.bahia.ba.gov.br/seagri/cacau1.htm>, 25.10.1999.

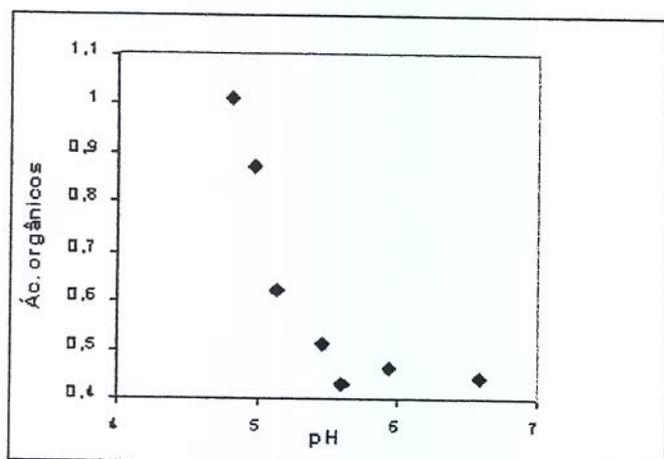
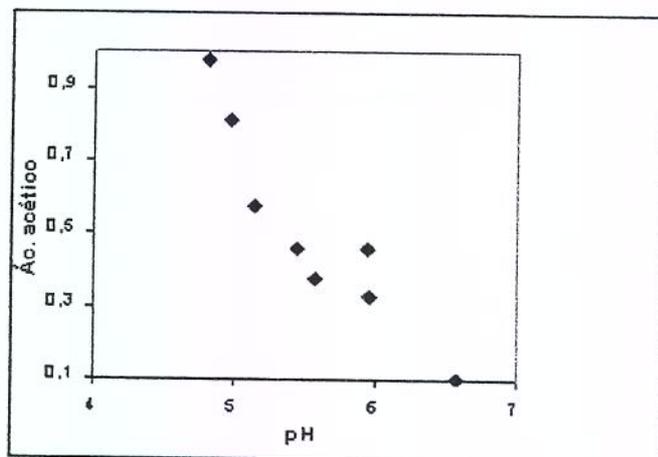
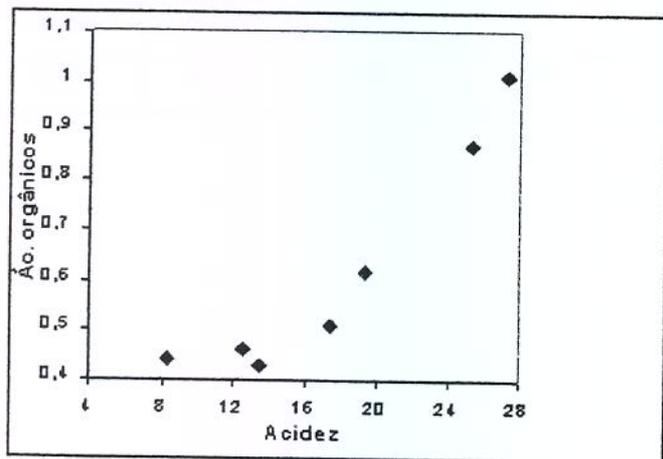
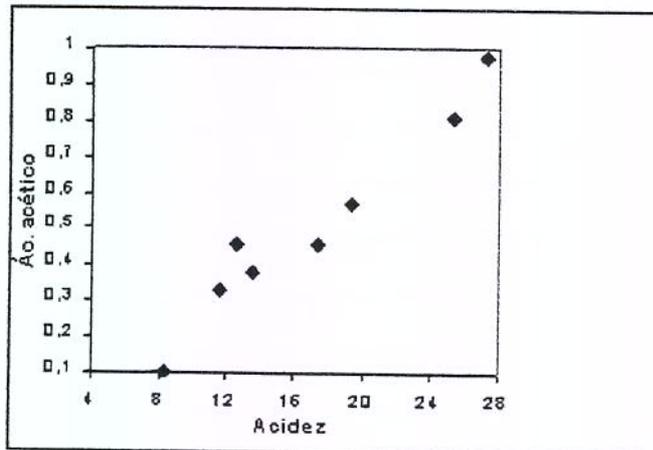
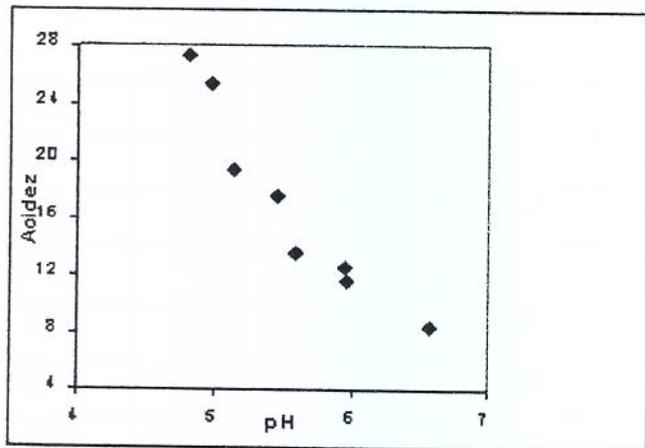
- SHUFEN, L.; BERGER, J. E.; HARTLAND, S. UV Spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa beans. **Anal Chimi. Acta.** 232: 409-412, 1990.
- TIMBIE, D.J.; SECHIST, L. & KEENEY, P.G. Application of high pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. **J. Food Sci.** Chicago. 43: 560-565. 1978.
- VASQUEZ, J.E.S. Tentative pratique d'amélioration de la fermentation du cacao par inoculation directe de micro-organismes. **Café, Cacao, Thé.** v.33, n.3, 157-167, 1989.
- VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físico-químicas durante a fermentação de amêndoas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.) em pesquisa para utilização em produto alternativo ao chocolate.** Campinas, 1999. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- VILLENEUVE, F.; CROS, E.; VINCENT, J.C. & MACHEIX, J.J. Recherche d'un indice fermentation du cacao. III Evolution des flavan-3-ols de la fève. **Café, Cacao, Thé.** 33. p. 165-170. 1989.
- VOIGT, J.; BIEHL, B.; HEINRICH, H.; KAMARUDDIN, S.; GAIM MARSONER, G. & HUGL, A. In-vitro formation of cocoa specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. **Food Chem.** 49, p.173-180. 1994.
- WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences.** Series: Food science and technology, v.61. 2 ed. New York, 1994.

- WILSKA-JESZKA, J & KORZUCHOWSKA, A. Anthocyanins and chlorogenic acid chokeberry juices. *Zeitschrift. Lebensmittel Untersuchung Forschungh.* V.203. p.38-42. 1996.
- WOLLGAST, J. & ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao* L.: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International.** v.33, p.423-447, 1995.
- WONG, M. K.; DIMICK, P. S.; HAMMERSTEDT, R. H. Extraction and high performance liquid chromatographic enrichment of polyphenol oxidase from *Theobroma cacao* seeds. **Journal of Food Science**, 55 (4): 1108-1111, 1990.
- YOSHIYAMA, M & ITO, Y. Decrease of adstringency of cacao beans by an enzymatic treatment. **Nippon Shokuchin Kagaku Kogaku Kaishi** V. 43.p. 124-129 (1996).
- ZAMALLOA, C.W.A. **Caracterizações físico-químicas e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no estado de São Paulo.** Campinas, 121p, 1994.. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ANEXO I – Controle da temperatura de fermentação nas caixas de fermentação.

Tempo (h)	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7
0	25	25	25	25	25	25	25
6	27,4	27,5	27,6	27,5	27,4	27,5	27,4
24	30,5	31,3	31,1	31,2	31	31,2	30,3
48	33,4	33,5	33	33	33,5	33	32,4
72	35,6	36,1	36,4	36,3	36,7	36,3	36,3
96	37,6	40,9	40,3	39,5	41	39,5	39,2
120	42,2	42	40,8	42,3	40,8	42,3	40,7
144	43,6	42,8	44,8	43,6	46,1	43,6	41,6
164	44,8	38,4	43,2	40,4	44,6	40,4	39,5

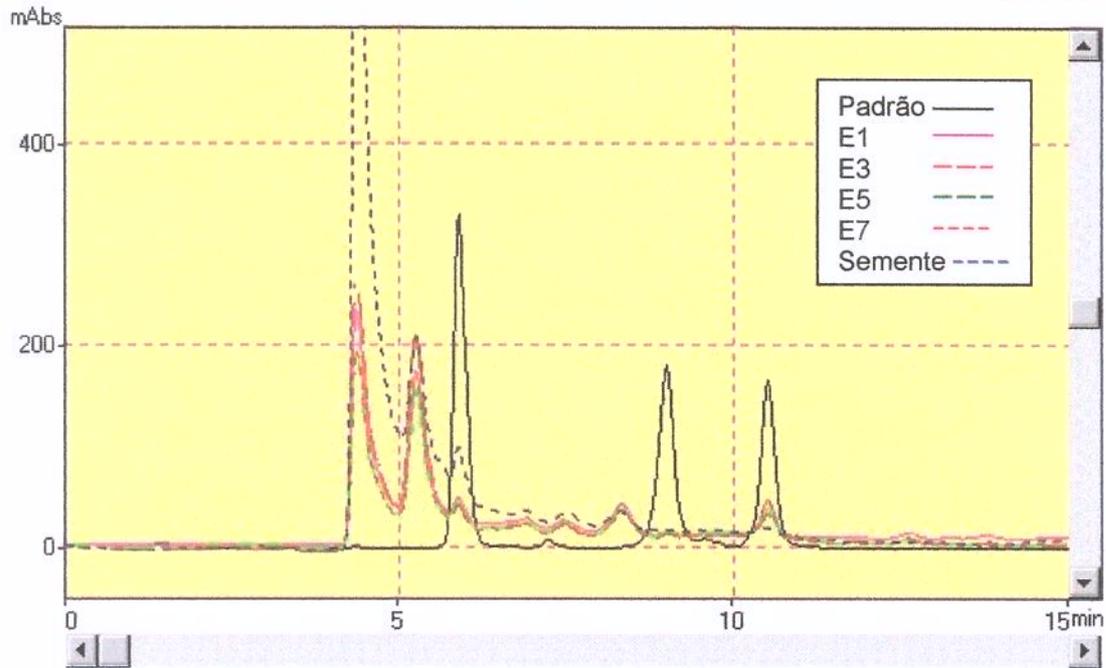
ANEXO II – Correlação entre pH, acidez, e ácido acético dos *nibs* e da semente liofilizada



ANEXOIII – Cromatogramas da análise de ácidos orgânicos para os diferentes experimentos

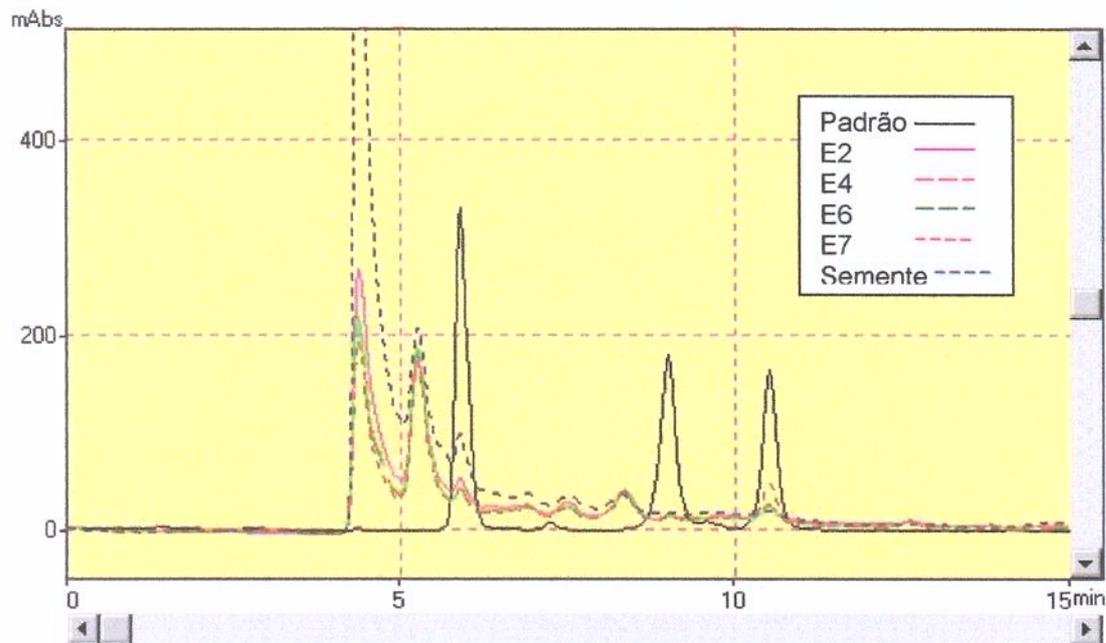
RT:3.84 Level:506233

Atten:9

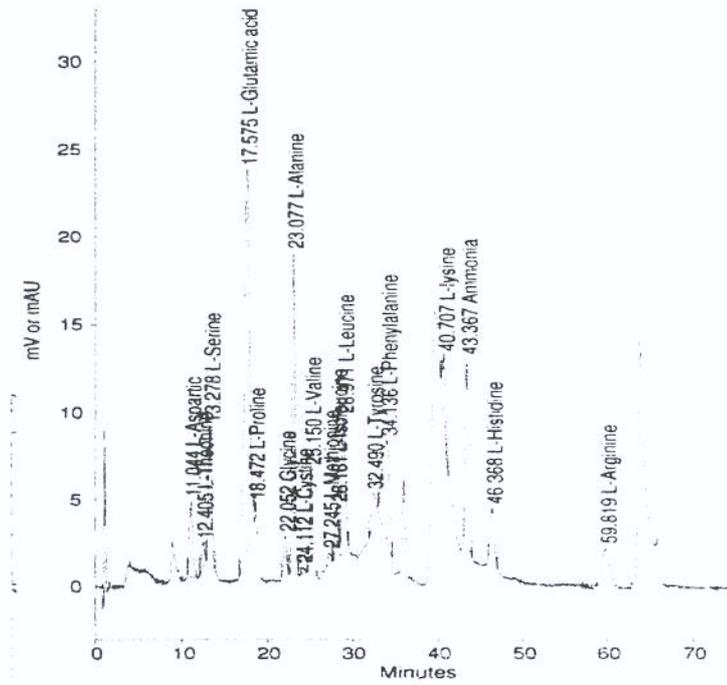


RT:5.56 Level:512000

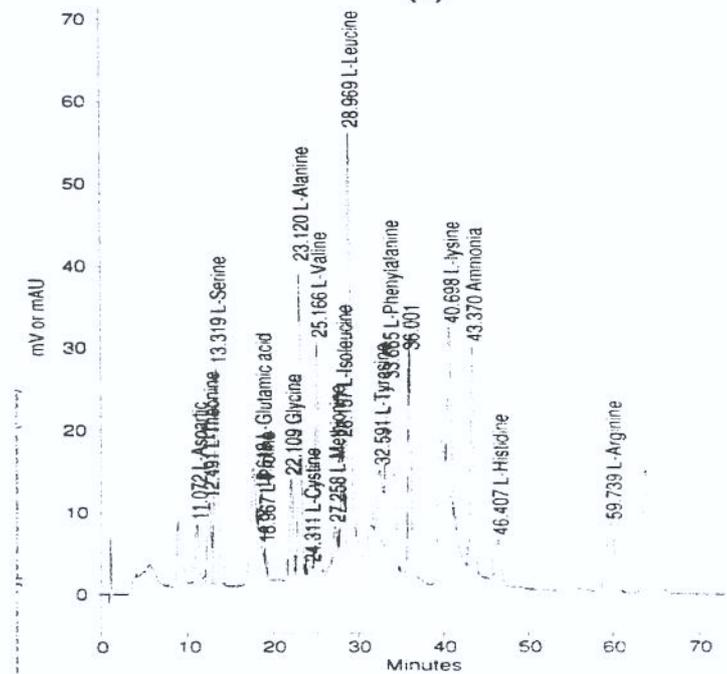
Atten:9



ANEXO IV – Cromatogramas típicos de aminoácidos livres em pó de cacau desengordurado: (a) semente liofilizada; (b) E7

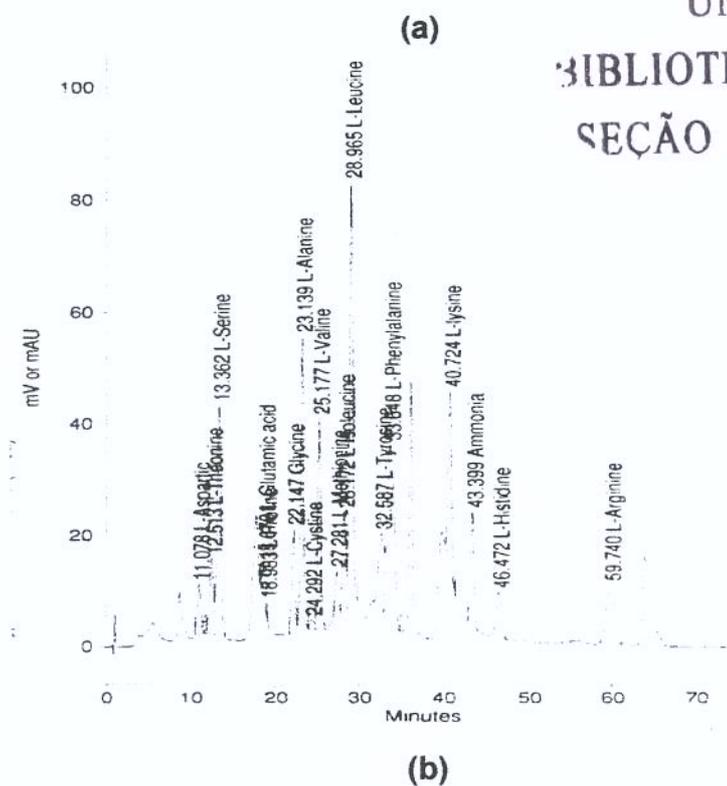
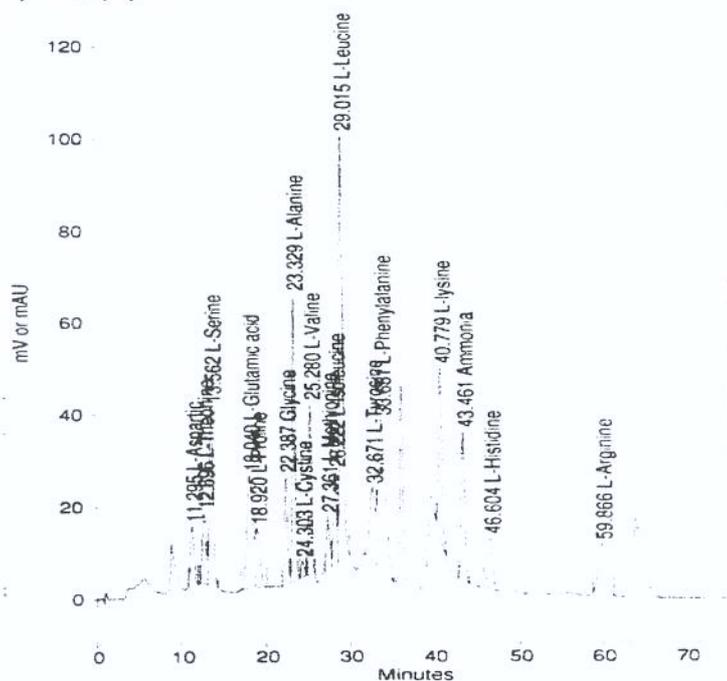


(a)



(b)

ANEXO V – Cromatogramas típicos de aminoácidos livres em pó de cacau desengordurado: (A) E3; (B) E4



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE