

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

**ESTUDO DO MELHORAMENTO DO SABOR DE  
CACAU (*Theobroma cacao* L.) UTILIZANDO POLIFENOLOXIDASE  
EXTRAIDA DA PINHA (*Annona squamosa* L.) E TRATAMENTO TÉRMICO  
NÃO CONVENCIONAL**

**Dissertação apresentada à Faculdade  
de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Tecnologia de Alimentos**

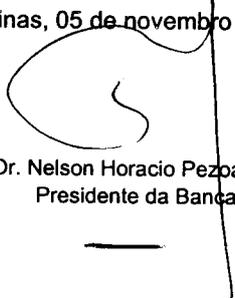
**PARECER**

**Sandra Drina Fernández Barbery  
Aluna**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Sandra Drina Fernández Barbery, aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de novembro de 1999.

**Dr. Nelson Horacio Pezoa García  
Orientador**

Campinas, 05 de novembro de 1999

  
Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García  
Presidente da Banca

**Campinas, Outubro de 1999**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
COMBO BC/39571	
PROD 229.199	
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 02-12-99	
V.º CPD	

CM-00137462-1

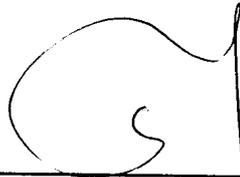
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F391e Fernández Barbery, Sandra Drina  
Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) utilizando polifenoloxidase extraída da pinha (*Annona squamosa* L.) e tratamento térmico não convencional / Sandra Drina Fernández Barbery. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

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

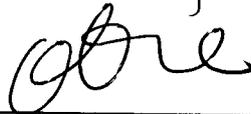
1.Cacau. 2.Calor. 3.Sabor. 4.Fenóis. I.Pezoa Garcia,  
Nelson Horacio. II.Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa Garcia**  
(orientador)

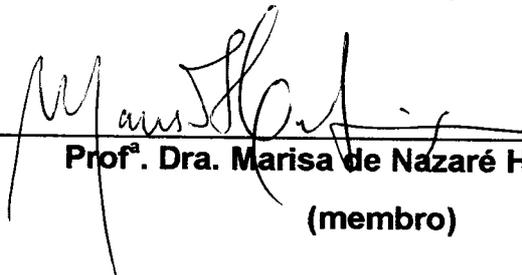


---

**Profª. Dra. Glaucia Maria Pastore**  
(membro)

---

**Profª. Dra. Hilary Castle de Menezes**  
(membro)



---

**Profª. Dra. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix**  
(membro)

**Campinas, Outubro de 1999**

## ERRATA

Na página 38 no item 4.2.3. Tratamento enzimático, no primeiro parágrafo: Foi estudada a redução de substâncias polifenólicas, utilizando polifenoloxidase E.C. 1.1.0.3.1.; obtida por ALBUQUERQUE, 1999.

Na página 70 no item 8. REFERENCIAS 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.

**Aos meus pais, Oscar e Drina pelo amor, carinho, incentivo e principalmente por terem oferecido o apoio para que eu chegasse até aqui**

**Ao Luis pelo amor, dedicação, ajuda, e compreensão em todos os momentos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa, pela orientação, confiança e incentivo durante o trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix, Prof<sup>a</sup>. Dra Glauca Maria Pastore, Prof<sup>a</sup>. Dra Hilary Castle de Menezes, pela colaboração e pelas sugestões dadas na fase de correção da tese.

À Elisa Albuquerque Lima e à Prof<sup>a</sup>. Dra Glauca Maria Pastore por ceder a enzima para a realização de parte deste estudo.

Ao Edy, pela colaboração, amizade e pelas importantes sugestões dadas na fase de execução e correção da tese.

À Miriam pela ajuda, apoio e amizade, muito obrigada

Ao Randolpho e Carla, pelo apoio, amizade

À Marise pela amizade e companheirismo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos, em especial à Aninha, Priscila, pela paciência, ajuda, amizade e carinho, Amanda, Luciane, Gabriela, Ana Lúcia, Allan, pela amizade e apoio.

Ao Waldeci, pela prontidão, amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Cereais: Kelly, Carol, Sr. Nilo e Sr. José.

Ao pessoal de apoio da faculdade, pela infinita ajuda: D. Marlene, Cosme, Marçal e Enrique.

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra e Jamila, pela amizade, apoio e receptividade no início.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sandra Fernández Barbery

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
RESUMO .....	IV
SUMMARY .....	VI
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1. Generalidades do cacau .....	5
3.2. Pré-processamento do cacau.....	6
3.2.1. Colheita e quebra do fruto .....	6
3.2.2. Fermentação .....	7
3.2.3. Secagem .....	10
3.2.4. Torração.....	12
3.3. Mudanças químicas que influem no sabor de cacau .....	13
3.3.1. Compostos polifenólicos .....	13
3.3.1.1. Ação da enzima polifenoloxidase (PPO) no cacau.....	17
3.3.2. Formação de pirazinas e reação de Maillard.....	20
3.3.3. Ácido Acético .....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1. Material.....	27
4.1.1. Matéria-prima .....	27
4.1.2. Equipamentos e aparelhos .....	27
4.1.3. Reagentes.....	28
4.2. Métodos.....	29
4.2.1. Preparo da matéria-prima e análises físico-químicas .....	30
4.2.1.1. Caracterização da Matéria-prima .....	30
4.2.1.2. Preparo dos <i>nibs</i> .....	30
4.2.1.3. Características físicas e químicas da massa de cacau .....	31
4.2.1.4. Torração dos <i>nibs</i> de cacau .....	31

4.2.2. Tratamento térmico após a torração .....	32
4.2.2.1. Planejamento experimental .....	32
4.2.2.2. Determinação de ácido acético .....	33
4.2.2.3. Determinação de açúcares redutores.....	34
4.2.2.4. Determinação de grupo amino-terminal.....	34
4.2.2.5. Análise cromatográfica dos componentes voláteis.....	35
4.2.2.5.1. Extração dos voláteis .....	35
4.2.2.5.2. Separação, identificação e dosagem de alquilpirazinas por cromatografia gasosa.....	36
4.2.3. Tratamento enzimático.....	38
4.2.3.1. Determinação de fenois totais .....	39
4.2.3.2. Determinação de taninos.....	39
4.2.3.3. Determinação de flavan-3-óis.....	40
4.2.3.4. Determinação de antocianidinas .....	40
4.2.3.5. Análise sensorial .....	41
4.2.4. Análises estatísticas.....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
5.1. Caracterização da matéria-prima .....	44
5.1.1. Prova de corte.....	44
5.1.2. Análises físico-químicas.....	45
5.2. Torração.....	46
5.3. Tratamento térmico após torração .....	47
5.4. Tratamento enzimático com PPO.....	60
5.4.1. Análise sensorial.....	64
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

1. Composição química da amêndoa de cacau.....	6
2. Composição das células onde são armazenados os polifenóis .....	14
3. Caracterização das principais enzimas ativas durante a fermentação .....	18
4. Atividade residual da polifenoloxidase (expressa como % atividade inicial) durante a fermentação.....	20
5. Componentes voláteis presentes no aroma de cacau.....	22
6. pH e acidez titulável de amêndoas de cacau classificadas segundo o país de origem.....	26
7. Variáveis e níveis de variação utilizados no tratamento térmico após torração .....	33
8. Planejamento experimental para 2 variáveis independentes .....	33
9. Resultados da prova de corte.....	44
10. Composição química dos “nibs” de cacau.....	45
11. Composição física da amêndoa integral de cacau.....	46
12. Valores médios de ácido acético, açúcares redutores e grupo amino-terminal em “nibs” torrados e tratados termicamente.....	50
13. Estimativa dos efeitos e coeficientes das regressões do conteúdo de ácido acético, açúcares redutores e grupo amino-terminal, em função do tempo e temperatura de tratamento térmico após torração .....	51
14. Modelos ajustados para as respostas .....	52
15. Valores médios das concentrações de pirazinas para as amostras de cacau torrado e tratado termicamente .....	58
16. Concentração de fenóis totais em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase .....	61
17. Concentração de taninos em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase.....	61
18. Concentração de flavan-3-óis em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase .....	62

<b>19. Quantificação de antocianidinas em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase .....</b>	<b>64</b>
<b>20. Média das notas da avaliação hedônica, quanto ao sabor das amostras tratada e não tratada .....</b>	<b>66</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

1. Fluxograma geral do processamento das amêndoas de cacau .....	29
2. Micro extrator-destilador do tipo Likens & Nickerson, acoplado a um destilador por arraste de vapor .....	35
3. Ficha utilizada na análise sensorial .....	42
4. Ficha utilizada na análise sensorial .....	43
5. Valores médios de temperatura na camisa de aquecimento e dentro da cavidade do forno elétrico rotativo, durante o processo de torração de “nibs” de cacau.....	47
6. Perfil médio de temperaturas na camisa de aquecimento e na cavidade interna do torrador nos ensaios do tratamento térmico após torração.....	48
7. Superfície de resposta e gráfico de contorno para o ácido acético .....	53
8. Superfície de resposta e gráfico de contorno para os açúcares reductores .....	55
9. Superfície de resposta e gráfico de contorno para o grupo amino-terminal.....	56
10. Cromatograma dos padrões de pirazinas e padrão interno .....	57
11. Cromatograma típico da fração aromática do cacau torrado a 150 °C por 38 minutos.....	58
12. Histograma referente aos resultados do teste “diferença do controle” .....	65
13. Histograma da avaliação quanto ao sabor do produto obtido de “nibs” tratados e não tratados enzimaticamente .....	66

## RESUMO

Existem grandes diferenças no sabor de cacau dependendo de sua origem de produção, certas regiões produzem amêndoas com excessivo sabor ácido e amargo e forte adstringência. Em geral as amêndoas de cacau produzidas no Brasil e na Malásia, têm apresentado teores excessivos de acidez comparados com amêndoas provenientes do leste africano, por este motivo estas amêndoas são utilizadas em quantidades limitadas nas formulações. A presença do ácido acético e láctico seja de forma individual ou em combinação tem sido relacionada como a mais importante causa da elevada acidez. Por outro lado, na atualidade, uma importante porcentagem da produção nacional de amêndoas de cacau se encontra, segundo os próprios comercializadores, insuficientemente fermentada (cor violeta). Estas amêndoas apresentam um conteúdo de substâncias polifenólicas maior em relação às amêndoas de cacau bem fermentadas (cor marrom), o que ocasiona, principalmente, um aumento da adstringência e do amargor. Este aumento pode inibir a percepção de outros sabores desejáveis. Assumindo as deficiências na qualidade organoléptica do cacau brasileiro em relação a outros países produtores, os objetivos do presente trabalho visaram desenvolver alguns recursos tecnológicos para melhorar as características do sabor do cacau brasileiro. Um dos recursos utilizados foi o tratamento térmico após a torração na tentativa de reduzir o teor de ácido acético e ao mesmo tempo acompanhar o comportamento dos compostos aromáticos do cacau e de seus principais precursores. Para a redução de substâncias polifenólicas, utilizou-se a polifenoloxidase (PPO) parcialmente purificada, extraída da polpa de pinha (*Annona squamosa* L). Na primeira parte do trabalho, os "nibs" de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L, variedade Forasteiro, cultivados no estado da Bahia, Brasil) foram torrados a 150 °C por 38 min, após a torração os "nibs" de cacau foram submetidos a um tratamento térmico seguindo um fatorial completo (2<sup>2</sup>) de acordo planejamento central composto rotacional (DCCR). As variáveis independentes foram temperatura e tempo, temperatura na faixa de 50-75 °C e tempos entre 20 e 90 minutos. As variáveis dependentes (respostas) para avaliar os ensaios realizados com "nibs" foram: quantidade de ácido acético, açúcares redutores, grupo amino-terminal e comportamento do perfil aromático. Na segunda parte do trabalho, "nibs" autoclavados (121 °C por 15 min) e não autoclavados de amêndoas cruas insuficientemente fermentadas e secas, da mesma origem, foram embebidos em uma solução contendo 200 U/min/ml da enzima, durante 30, 60, 90, 150, 210 e 360 minutos, a 23° C e pH 6. 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 e flavan-3-óis. Após o tratamento térmico, observou-se uma diminuição significativa do teor de ácido acético presente nos "nibs" de cacau na faixa de 62 a 85 minutos de tratamento com temperaturas na faixa de 70 a 80 °C. Uma diminuição significativa do teor de açúcares redutores acontece durante o tratamento térmico acima de 75 °C para tempos curtos (10-15 min) e em volta de 50 °C para tempo maiores de tratamento (acima de 85 min). A concentração do

grupo amino-terminal tem uma diminuição significativa durante o tratamento térmico após torração a temperaturas acima dos 45 °C e tempos em volta de 80 minutos, no entanto é possível observar que a temperatura tem pouca influência sobre a redução do grupo amino-terminal comparada com a influência exercida pelo tempo. O comportamento dos compostos aromáticos (pirazinas) foi analisado através de superfície de resposta não se obtendo equações preditivas significativas, a falta de ajuste do experimento foi muito grande e o  $R^2$  muito baixo, esta falta de ajuste pode ter ocorrido devido a outros fatores desconhecidos. Analisando os resultados para a diminuição de compostos polifenólicos, é possível observar que não existe uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de tratamento de 210 e 360 min, desta forma o material utilizado na análise sensorial foi o obtido após 210 min de tratamento. A concentração de fenóis totais em "nibs" de cacau não autoclavados e tratados enzimaticamente (210 min) teve uma queda de 15%. A perda destes fenóis em "nibs" autoclavados e também tratados enzimaticamente foi de 24%. No caso dos taninos a perda em "nibs" tratados com PPO não autoclavados foi de 15%, e nos autoclavados de 26%. A perda de antocianidinas em "nibs" tratados não autoclavados foi de 18%, e de 51% nos "nibs" autoclavados. A concentração de flavan-3-óis teve uma queda de 10% em "nibs" não autoclavados e de 23% nos autoclavados. O tratamento enzimático em "nibs" autoclavados, resultou na alteração do sabor do cacau insuficientemente fermentado, diminuindo a adstringência e o amargor. Essa alteração sensorial foi percebida na análise sensorial (teste de aceitação) de modo significativo pelos provadores, existindo diferença a nível de 5% na avaliação hedônica para o sabor entre o produto formulado com a amostra tratada e o formulado com a amostra não tratada.

## SUMMARY

Considerable variations in the taste of cocoa occur according to the region of production, some regions producing excessively acid, bitter and astringent cocoa beans. In general, cocoa beans produced in Brazil and Malaysia are characterized by excessive acidity as compared with those from East Africa, limiting the amounts of these beans that can be used in formulations. The presence of acetic and lactic acids, separately or combined, has been shown to be the principal cause of this excessive acidity. On the other hand, according to those who commercialize brazilian cocoa beans, an important percentage of national beans are currently insufficiently fermented (violet color). Compared to well fermented beans (brown color), such beans present an increase in astringency and bitterness. This increase can prevent the perception of other, favourable flavours. Assuming such deficiencies in the organoleptic qualities of brazilian cocoa as compared to that of other producer countries, this research aimed at developing some technological resources to improve the taste characteristics of brazilian coca. One of the resources used was the heat treatment of the beans after roasting, aimed at reducing the acetic acid content, at the same time following the behaviour of the aromatic compounds and their principle precursors. Partially purified polyphenoloxidase (PPO), extracted from *Annona squamosa* L pulp, was used to reduce the content of phenolic substances. In the first part of this research, the cocoa nibs (*Theobroma cacao* L, Forasteiro variety, cultivated in Bahia state, Brazil) were roasted at 150°C for 38 minutes. The roasted nibs were then submitted to a heat treatment according to a complete factorial ( $2^2$ ) central compound rotational design (CCRD). The independant variables were temperature (from 50 to 75°C) and time (from 20 to 90 minutes). The dependant variables (responses) used to evaluate the assays were: amount of acetic acid, reducing sugars, terminal amino groups and behaviour of the aromatic profile. In the second part, autoclaved nibs (121°C/15 min.) and non-autoclaved, raw, insufficiently fermented dried nibs, of the same origin, were imbibed in a solution containing 200U/min/ml of enzyme for 30, 60, 90, 150, 210 and 360 minutes at 23°C and pH 6. The nibs were dried and ground and subsequently deffated. The defatted cocoa powder was quantitatively analyzed for total phenols, tannins, anthocyanidins and flavan-3-ols. After heat treatment, a significant decrease in the acetic acid content was observed in nibs heated for more than 70 minutes at initial temperatures in the heating jacket in the range from 75 to 85°C. A significant decrease in reducing sugar content occurred with heat treatments above 75°C for short times (10-15 min) and of about 50°C for longer time periods (more than 85 min). The concentration of terminal amino groups decreased significantly during post-roasting heat treatment at temperatures above 45°C and times of about 80 minutes, although it was apparent that the effect of temperature was insignificant in comparison with the effect of time. The behaviour of the aromatic compounds (pyrazines) was analysed using response surface methodology, but significant predictive equations were not obtained, the lack of fit of the experiment being very great and  $R^2$  very low. This lack of fit probably occurred due to other factors. An

analysis of the results obtained in the assays aimed at reducing the polyphenolic content, showed that there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between treatment times of 210 and 360 minutes, so the material used in the sensorial test was that obtained with 210 minutes of treatment. The phenolic content of non-autoclaved, enzymatically treated (210 min) nibs, decreased by 15% as compared to the untreated samples. The decrease in phenolic content of autoclaved enzymatically treated nibs was 24%. With respect to the tannin content, the decrease in PPO treated non-autoclaved nibs was 15% and in autoclaved treated nibs, 26%. The loss of anthocyanidins in treated non-autoclaved nibs was 18% and in autoclaved nibs, 51%. The concentration of flavan-3-ols fell by 10% in non-autoclaved nibs and 23% in autoclaved nibs. The enzyme treatment resulted in an alteration in the taste of autoclaved insufficiently fermented nibs, decreasing the astringency and bitterness. This sensory alteration was perceived in the acceptance test, there being a significant difference at the 5% level in the hedonic evaluation between the product formulated with the treated sample and that formulated with the non-treated sample.

## 1. INTRODUÇÃO

O atributo mais notável do chocolate, responsável pela grande aceitação universal, é seu sabor peculiar. Como na maioria dos alimentos naturais, a mistura e equilíbrio dos inúmeros componentes que contribuem ao sabor definitivo do chocolate, é dependente de vários fatores como genéticos, condições ambientais, colheita e processos de transformação, com maior intensidade no caso do chocolate do que em muitos outros tipos de produtos, pela complexidade química do desenvolvimento do seu sabor.

Desta forma um dos aspectos fundamentais no processamento do cacau é o desenvolvimento dos precursores do sabor, que são influenciados, além dos fatores citados acima, também pelas técnicas de pré-processamento, fundamentalmente pelos processos de fermentação e secagem. Esse conjunto de variações durante estas etapas irá propiciar um sabor suave ou forte, após a torração e outras etapas posteriores.

No processo da fermentação, ocorrem mudanças nos carboidratos, proteínas, e compostos fenólicos da semente do cacau. Em adição, produtos do metabolismo dos microorganismos fermentadores da polpa, difundem-se através do cotilédone reagindo com diversos componentes da semente, associando-se assim ao conjunto de precursores do sabor. O processo de secagem influencia também o sabor, visto que nesta etapa continuam as reações bioquímicas como a oxidação e polimerização dos polifenóis (MARTIN, 1987).

A presença e a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), durante a fermentação e a secagem das amêndoas de cacau, é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento dos precursores do sabor, começando na fase oxidativa da fermentação e continuando na secagem; é também um dos fatores menos compreendidos até agora, mas potencialmente um dos mais

significativos no que se refere à qualidade do sabor das mesmas (ROELOFSEN, 1958; FORSYTH & QUESNEL, 1963; MAYER, 1987; VAMOS-VEGYAZO, 1981; citados por WONG, M. K. *et. al.*, 1990).

O papel da PPO e a importância da mesma na produção do sabor característico de chocolate, não estão bem compreendidos, contudo uma baixa atividade da enzima ou condições que podem levar a uma redução da atividade têm sido apontados como os fatores responsáveis por uma queda na produção de precursores de sabor de chocolate. A importância desta enzima é freqüentemente mencionada de forma implícita na redução do sabor adstringente do cacau (HOLDEN, 1959; citado por REEVES, *et. al.*, 1988).

O grau de acidez no cacau é um fator importante que, dependendo da quantidade de ácidos presente nas amêndoas, pode comprometer o sabor final do chocolate. Os principais ácidos que contribuem para o aumento da acidez são o acético e o láctico, os teores destes ácidos, nas amêndoas, são variáveis de acordo com a origem e pré-processamento das mesmas (WOOD, 1989). Segundo LOPEZ, (1979) a quantidade de ácido acético produzida durante a fermentação é a mais representativa e importante em comparação com outros ácidos.

JINAP & DIMICK, 1990 citados por BECKET, 1994, afirmam que o cacau brasileiro apresenta um pH de 4,75-5,19 sendo considerado assim um cacau bastante ácido juntamente com o cacau da Malásia e das ilhas Salomon. A quantidade de ácido acético que contém o cacau brasileiro segundo estes autores é de 0,52-0,82 g/100g e de ácido láctico 0,27-0,50 g/100g Comparativamente o cacau de Gana, Gabão, Costa do Marfim, Camarões, Nigéria e República Dominicana com pH de 5,20- 5,49, apresenta quantidades de ácido acético de 0,42-0,56 g/100g, e ácido láctico de 0,22-0,29 g/100g Finalmente o cacau do Equador, Venezuela, Guatemala com pH maior que os anteriores contém,

quantidades de ácido acético e lático, menores 0,44-0,55 g/100 e 0,21-0,30 g/100g, respectivamente.

Após as etapas de fermentação e secagem, o cacau é submetido à torração, durante este processo uma série de compostos aromáticos são desenvolvidos através da reação de Maillard, principalmente ésteres hidrocarbonetos, ácidos, cetonas, aldeídos, furanos e em maior número as pirazinas. Todos esses componentes participam do sabor do cacau, em concentrações que variam em função do tempo e da temperatura da torração (BAUERMEISTER, 1981; PEZOA, 1989).

Em geral o cacau brasileiro apresenta um sabor aceitável, inclusive as suas características de amargor e adstringência são normais quando a fermentação é adequada. De acordo com o mercado internacional a característica que mais compromete a qualidade do cacau brasileiro além da alta acidez que apresentam as amêndoas, é o insuficiente desenvolvimento do sabor. Por estas razões são necessárias alternativas de tratamentos que visem a redução dos ácidos voláteis indesejáveis produzidos durante a fermentação e que permitam o desenvolvimento suficiente de componentes do sabor.

## **2. OBJETIVOS**

Considerando as deficiências na qualidade organoléptica do cacau brasileiro em relação a outros países produtores e a necessidade de estudar alguns recursos tecnológicos para melhorar as características do sabor do cacau fermentado e seco, este trabalho têm por objetivos:

- 1) Reduzir o teor de ácido acético
- 2) Desenvolver compostos aromáticos desejáveis mediante tratamentos adicionais aos usuais na formação do sabor, como são a torração e conchagem.
- 3) Reduzir o teor de compostos fenólicos a fim de diminuir adstringência e amargor

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Generalidades do cacau**

A planta cacauera que pertence ao gênero *Theobroma cacao L.*, produz as amêndoas do cacau, matéria-prima principal na fabricação do chocolate. Esta planta é uma árvore silvestre da América, cultivada em todas as regiões de floresta tropical úmida principalmente dentro dos 17 e 20° de latitude do Equador (HANCOCK, 1988).

Dentro do fruto encontram-se aproximadamente 35 a 50 sementes, que representam cerca de 13,5 a 29% da massa total do fruto. O comprimento das sementes varia entre 21 e 29 mm, a largura entre 10 a 17 mm, e sua espessura entre 8 e 12 mm, pesando 1,4 a 2g cada uma. Ditas sementes estão constituídas por um gérmen e dois cotilédones recobertos por uma membrana que quando seca se denomina testa, e são envolvidas por uma polpa mucilagínosa doce, acidulada e de sabor agradável (ZAMALLOA, 1994).

Existe uma grande variabilidade nos frutos de cacau, quanto as dimensões, cor, forma do fruto e o número de sementes. ZAMALLOA (1994), estudando 10 clones produzidos no estado de São Paulo determinou que as médias do número de sementes por fruto foram de 39,8; em relação ao comprimento e largura dos clones foi de 25,7 mm de comprimento e 12,66 mm de largura. Os resultados da espessura da semente do cacau cultivado no estado de São Paulo apresentou-se 29% maior que o da Bahia.

A Tabela 1 apresenta a composição química de amêndoas de cacau, esta composição pode variar dependendo de muitos fatores, entre os quais variedade, país de origem, grau de maturação dos frutos e práticas agrícolas.

O pré-processamento do cacau inicia-se com a abertura dos frutos para a remoção das sementes envolvidas pela polpa mucilaginosa, conjunto que será submetido as operações de fermentação, secagem e armazenagem (ROHAM, 1990, citado por ZAMALLOA, 1994).

**Tabela 1.** Composição química da amêndoa de cacau.

<b>COMPOSTOS</b>	<b>Porcentagem em relação a matéria seca<sup>a</sup></b>
Manteiga de cacau	56,00
Cinzas	2,80
Teobromina	1,40
Cafeína	0,20
Polifenóis	6,50
Proteína bruta	12,00
Açúcares	1,22
Amido	6,30
Pentosanas	1,60
Celulose	9,50
Ácidos carboxílicos	1,70
Diversos	0,80

<sup>a</sup> FONTE: MINIFIE, 1970.

### **3.2. Pré-processamento do cacau**

#### **3.2.1. Colheita e quebra do fruto**

Somente os frutos maduros possuem quantidades de açúcar e outras substâncias necessárias para lograr uma boa fermentação das sementes, já os frutos não maduros além de serem muito ácidos, apresentam grãos menores e menor quantidade de açúcar, motivo pelo qual fermentam mal e tem menor rendimento no peso final. Não se deve esperar muito tempo para se colher um fruto maduro, devido aos riscos de germinação das sementes e apodrecimento das mesmas, o que constitui grave defeito na classificação (BRAUDEAU, 1970 MARAVALHAS, 1971).

Durante a quebra dos frutos que deve ser realizada quatro a seis dias após a colheita, deve-se ter muito cuidado na remoção da polpa e sementes, evitando que os fragmentos de placenta e casca se misturem com as sementes.

Estas sementes junto com a polpa deverão ser transferidas imediatamente para os cochos de fermentação, ou transferidas no mesmo dia no caso em que a quebra foi realizada longe deste lugar. Admite-se em casos eventuais um intervalo de um dia entre a quebra e o transporte para o cocho; nunca deve-se misturar sementes provenientes de quebras realizadas em dias diferentes num mesmo cocho de fermentação (MARAVALHAS, 1971).

### **3.2.2. Fermentação**

Uma vez colhidos os frutos, continuam os mecanismos bioquímicos que contribuem para a formação de precursores do sabor. Além da fermentação facilitar a separação da polpa mucilaginosa, esta impede a germinação das sementes e tem como principal objetivo o desenvolvimento dos precursores necessários para o sabor de chocolate (HOSKIN & DIMICK, 1988). O tempo de duração deste processo deve ser de cinco a seis dias. Não sendo recomendáveis menos de cinco e mais de sete dias (ROHAN, 1958; MARAVALHAS, 1971). A duração deste processo de fermentação vai depender das condições de processo, clima, e outros fatores relacionados a esta etapa. A cor interna das amêndoas de cacau, ao final da fermentação, deve ser marrom e não violeta, já que a cor violeta é característica de um produto mal fermentado e está relacionado com um fraco sabor de chocolate. (ROHAN, 1958; LOPEZ & Mc DONALD, 1981).

As sementes que não foram fermentadas são incapazes de produzir o sabor característico de chocolate inclusive após o aquecimento. BRADEAU (1970), mostrou que nem as células com pigmentos, nem as células de reserva

dos cotilédones frescos contém alguma das substâncias que originarão sabor de chocolate; confirmando assim que as substâncias aromáticas se originam durante o processo de fermentação.

A polpa fresca de cor branca que envolve as sementes de cacau apresenta um alto conteúdo de açúcares, baixo pH (cerca de 3,6), baixo teor de oxigênio, sendo um excelente meio para o desenvolvimento de leveduras. A polpa está fortemente aderida as sementes e ela é composta de aproximadamente 85% de água e 11% de açúcares, além de pequenas quantidades de ácido cítrico, pentosanas e proteínas (CARR, 1980; MINIFIE, 1989; SHAUGHNESSY, 1992)

Os sistemas mais comuns para fermentação são: em montes, caixas, cestos, sacos de lona, gavetas de madeira, etc. De maneira geral, o tipo de fermentação predominante no Brasil é o que utiliza caixas de madeira com orifícios em sua base (cochos).

Na fase inicial da fermentação, as leveduras que se desenvolvem na mucilagem da semente de cacau iniciam a conversão anaeróbia dos açúcares da polpa em etanol e CO<sub>2</sub>, caracterizando a primeira maior atividade microbiológica da fermentação do cacau, a fermentação alcoólica. Como resultado da ação dos microorganismos, a temperatura da massa de sementes aumenta nas primeiras 24 a 36 horas para 30-35 °C e as células da polpa começam a se romper, causando o aparecimento de uma exsudação aquosa (mel), a qual migra através dos orifícios situados no fundo das caixas de fermentação (CARR, 1980; MINIFIE, 1989; SHAUGHNESSY, 1992).

ROELOFSEN (1958), descreve alguns experimentos nos quais foi mostrado que leveduras podiam metabolizar ácido cítrico e causar degradação da polpa das sementes, demonstrando que atividades como o metabolismo de ácidos orgânicos, podem ocorrer quando elas estão fermentando. Com o consumo do

ácido cítrico, o pH se eleva gradualmente de 3,6 até 4, favorecendo o desenvolvimento das bactérias lácticas. As temperaturas superiores a 30 °C são menos favoráveis para as leveduras já que o número destas começam a diminuir da massa de cacau antes das primeiras 24 horas de fermentação, ou seja quando se atinge essa temperatura, que é propícia para as bactérias lácticas. Outro fator que contribui para a redução drástica do número de leveduras do meio, é a presença de ácido acético produzido durante o metabolismo das bactérias lácticas heterofermentativas.

Dentro da classificação das bactérias lácticas, presentes na etapa de fermentação do cacau, estão as homofermentativas que produzem apenas ácido láctico a partir do metabolismo da glicose, e as heterofermentativas que produzem não somente ácido láctico a partir do metabolismo da glicose, mas também ácido acético, dióxido de carbono e etanol, do mesmo substrato. A maior parte das bactérias lácticas pode fermentar uma extensa gama de açúcares, inclusive as pentoses e pode atacar os ácidos málico e cítrico, produzindo ácido láctico, ácido acético e dióxido de carbono, acarretando uma queda global na acidez e elevação do pH (WHIING & COGGINS, 1964; CARR, 1980; citados por CARR, 1980).

O processo de revolvimento da massa de sementes tem o efeito imediato de aumentar a aeração e por conseguinte a atividade bacteriana, principalmente para os microorganismo aeróbios, como as bactérias acéticas. Um dos objetivos do revolvimento é assegurar o grau de fermentação mais uniforme e eficiente (HANCOCK, 1988).

Seguindo-se a fermentação alcoólica, rapidamente é iniciada a fermentação acética, onde as bactérias acéticas transformam o etanol em ácido acético e água, na presença de oxigênio. Por esta reação ser exotérmica, uma quantidade considerável de energia é produzida, causando a elevação da temperatura a cerca de 50 °C (CARR, 1980).

O aumento de temperatura e a formação de álcool etílico, seguidos da formação de ácido acético e a presença de outros ácidos são responsáveis pela morte do germen e conseqüente perda da capacidade de germinação. Nessa fase existe uma 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 (FORSYTH & QUESNEL, 1957).

A proteólise na semente de cacau é iniciada após a absorção de ácido acético, completando-se dentro de poucas horas, reação importante que ocorre na ausência de oxigênio. Considerando que os oligopeptídeos e os aminoácidos são precursores do sabor de chocolate, o acúmulo predominante de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina entre os aminoácidos liberados durante a fermentação de cacau e a significativa degradação dos aminoácidos, são considerados importantes na formação do sabor de chocolate (KIRCHHOFF *et al.* 1989). Segundo MARAVALHAS (1971), existe um aumento do conteúdo de aminoácidos livres na semente de cacau durante o processo de fermentação, tendo um suave aumento nos teores de arginina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, e valina durante a fermentação. Estes aminoácidos e açúcares redutores livres, produzidos durante esta etapa, são os principais precursores para a formação de componentes do sabor, que principalmente na fase de torração, participam na síntese das pirazinas, componentes de grande importância no sabor de chocolate (REINECCIUS *et al.*, 1972).

### **3.2.3. Secagem**

Após o processo de fermentação inicia-se o processo de secagem. Este processo estabiliza a atividade microbiológica e previne o crescimento de mofo

nas amêndoas. Durante esta etapa importantes reações enzimáticas e químicas, iniciadas durante a fermentação das amêndoas, são completadas.

Como indicadores de um processo bem conduzido de secagem, a qualidade é referenciada com uma boa cor marrom, uma baixa adstringência e amargor. Também são indicadores de uma secagem correta, a ausência de sabor excessivamente ácido e sabor de fumaça (HOSKIN & DIMICK, 1988).

No início do processo de secagem as amêndoas de cacau apresentam uma umidade na faixa de 40-50%, faixa esta que deve ser reduzida para 6-8% para conseguir melhor conservação durante o armazenamento (LOPEZ & QUESNEL, 1973). Esta operação deve ser conduzida de tal maneira a se obter um teor de umidade em torno de 7%, visto que uma secagem excessiva torna a casca quebradiça e o excesso de umidade facilita o desenvolvimento de fungos (MARAVALHAS, 1971; HOSKIN & DIMICK, 1988). CRESPO (1985), citado por PEZOA (1989), afirma que com aproximadamente 3% das amêndoas contaminadas por fungos, a pasta de cacau apresenta um gosto desagradável, impossível de se eliminar nos processos subsequentes.

Durante a operação de secagem do cacau quando se desenvolve a cor marrom característica do chocolate, ocorrem reações importantes de oxidação dos polifenóis catalisadas pela enzima polifenoloxidase, que é ativada somente quando o oxigênio tem acesso aos cotilédones (FORSYTH & QUESNEL, 1957; HOSKIN & DIMICK, 1988). Dentro destas reações encontram-se a oxidação e a polimerização das catequinas e das proantocianidinas livres ou combinadas com peptídeos. As antocianidinas são destruídas por hidrólise ou por oxidação, ou mesmo ambas, dependendo da velocidade de penetração de oxigênio nas amêndoas, ocorrendo então o desenvolvimento da cor marrom típica do cacau (LAJUS, 1982; citado por VASCONCELOS, 1999).

### **3.2.4. Torração**

A torração é um processo térmico onde são usadas nos equipamentos temperaturas aproximadamente entre 110-220 °C dependendo do tipo e características do cacau (HOSKIN & DIMICK, 1988). Outros fatores que influenciam nas condições da torração são: período de colheita, tratamentos anteriores a torração, umidade, tamanho das amêndoas ou “nibs” e características de sabor desejadas (LEE & JACKSON, 1975; BAUERMEISTER, 1981; citados por PEZOA, 1989).

De uma maneira geral, o processo de torração que pode ser aplicado nas amêndoas inteiras, “nibs” ou massa de cacau chamada também de liquor de cacau, tem por objetivo provocar a formação da fração aromática típica do cacau, principalmente via reação de Maillard, a partir dos precursores de sabor formados durante a etapa de fermentação, como os açúcares redutores e os aminoácidos livres (BERTINI, 1989).

Outros fenômenos que ocorrem paralelamente ao desenvolvimento do sabor de chocolate durante a torração são:

- Redução do teor de água das amêndoas de aproximadamente 8% para cerca de 2%.
- Inativação das enzimas capazes de degradar a manteiga de cacau.
- Desenvolvimento da cor típica do chocolate.
- Diminuição dos ácidos voláteis indesejáveis, como o ácido acético, propiônico, butírico, etc.

O tamanho das amêndoas é um fator importante para determinar o grau de torração que elas devem receber. Se é otimizado o tempo de torração para as amêndoas de cacau de tamanho médio, as pequenas serão inevitavelmente muito

torradas e no caso das amêndoas de tamanho maior a torração será insuficiente, ocasionando uma má qualidade no produto obtido (HOSKIN & DIMICK, 1988). É importante que neste processo o produto apresente uma temperatura uniforme, pois uma diferença de 5°C abaixo da temperatura ideal de processamento acarreta alterações importantes em relação ao sabor e ao contrário, qualquer aumento acima dessa temperatura, além de sobretorrar o produto provoca migração e perdas de manteiga de cacau (BAUERMEISTER, 1981).

Quando são utilizados “nibs” ao invés de amêndoas inteiras, como no processo convencional, a diferença de intensidade de torração, devido à diferença de temperatura nas diversas partes da amêndoa, é diminuída, obtendo-se melhor transferência de calor e conseqüentemente redução no consumo de energia (BERTINI, 1989).

### **3.3. Mudanças químicas que influem no sabor de cacau**

#### **3.3.1. Compostos polifenólicos**

Segundo BRAUDEAU (1970), o tecido dos cotilédones, das sementes de cacau, é composto por dois tipos de células: o primeiro tipo de células apresenta pigmentos compostos de polifenóis (taninos, catequinas, antocianinas, proantocianidinas) e purinas (teobromina e cafeína); já o segundo tipo, são células de reserva, incolores, que contém gorduras, amido, proteínas e enzimas.

A porcentagem de células armazenadoras de compostos polifenólicos na amêndoa de cacau constituem de 11-13% e aproximadamente 90% das células são armazenadoras de lipídios e proteínas, o maior volume porém, é composto de células armazenadoras de gordura (BELITZ & GROSCH, 1988). As células armazenadoras de compostos polifenólicos, dependendo do conteúdo de antocianinas adquirem cor entre branca e violeta intenso. A Tabela 2 apresenta a

composição das células, onde são armazenados os polifenóis, comparada com o tecido total.

**Tabela 2.** Composição das células onde são armazenados os polifenóis

Composto	(%) <sup>a</sup> de compostos na célula armazenadora	(%) <sup>a</sup> de compostos nos cotilédones
<b>Catequina</b>	25,0	3,0
<b>Proantocianidina</b>	21,0	2,5
<b>Polímeros de proantocianidina</b>	17,5	2,1
<b>Antocianinas</b>	3,0	0,4
<b>Fenóis totais</b>	66,5	8,0
<b>Teobromina</b>	14,0	1,7
<b>Caféina</b>	0,5	0,1
<b>Açúcares livres</b>	1,6	
<b>Polissacarídeos</b>	3,0	
<b>Outros</b>	14,4	

<sup>a</sup> Base seca

Fonte: BELITZ & GROSCH, 1988

Existem três grupos diferentes de fenóis no cacau: proantocianidias (58%), catequinas (37%) e antocianinas (4%). A catequina principal é (-)-epicatequina; também foram identificadas a (+)-catequina, a (+)-galocatequina e a (-)-epigalocatequina. A fração de antocianinas está formada principalmente por 3-β-D-galactosidil-cianidina e por 3-α-L-arabinosidil-cianidina. As proantocianidinas são compostos que se transformam em antocianinas e catequinas quando são aquecidas em solução ácida (BELITZ & GROSCH, 1988).

As alterações químicas no interior da semente de cacau, dependem da morte das células do cotilédone, então as membranas celulares degradam-se e permitem que entrem em contato os diferentes constituintes que estavam separados no tecido vivo. A morte, ocorre durante o segundo dia, é produzida principalmente pelo ácido acético que está sendo produzido na polpa. A alta temperatura é também uma causa que contribui para a morte das células. As antocianinas e outras substâncias polifenólicas das células pigmentadas, podem então se difundir em direção as células adjacentes de armazenamento, onde

encontram-se com diversas enzimas que provocam diferentes reações hidrolíticas nas condições anaeróbias da amêndoa. Entre estas reações se encontram a degradação das antocianinas, de tal maneira que se produz a descoloração dos cotilédones nesta etapa. Quando o ar começa a atingir o interior das amêndoas, iniciam-se as reações oxidativas ou de escurecimento as quais predominam e então o tecido adquire uma cor escura, isto acontece na última etapa da fermentação normal em caixas, de 6 a 7 dias, e pode continuar durante a secagem sempre que esta não seja realizada com demasiada rapidez (HANCOOK, citado por BECKETT, 1994).

Como já foi argumentado por outros autores, durante o processo de fermentação das sementes de cacau, os polifenóis sofrem intensas modificações, que se iniciam depois da morte das sementes, quando as substâncias fenólicas e as enzimas são liberadas de seus respectivos locais de armazenamento na célula (QUESNEL, 1965). Observa-se geralmente um decréscimo da totalidade de seus componentes (fenóis totais, taninos, antocianinas) (MENDES-FERRAO, 1963, CROS *et al*, 1982, citados por VILLENEUVE & MACHEIX, 1985), interpretado por muitos autores como resultado de uma oxidação enzimática (KNAPP, 1937, SWAIN, 1962, citados por VILLENEUVE & MACHEIX, 1985).

Segundo CROS *et al* (1982), no estudo da evolução dos taninos e dos fenóis totais em sementes de cacau durante a fermentação, existe uma diminuição, que fica em volta de 70%, no teor de compostos polifenólicos presentes em amêndoas fermentadas durante 8 dias em caixas, em relação com o teor destes compostos em sementes não fermentadas. Os taninos tiveram uma evolução muito similar aos compostos fenólicos, começado a diminuição a partir do 3<sup>o</sup> dia de fermentação, ponto no qual atingem sua concentração máxima.

As sementes frescas de cacau contêm concentrações elevadas de pigmentos violeta chamados antocianidinas. Durante a fermentação estes

pigmentos são hidrolizados devido à ação de enzimas glucosidases resultando na perda desta coloração violeta nos cotilédones. As glucosidases não têm sido caracterizadas por completo, mas sabe-se que o ponto máximo de destruição destes pigmentos violetas (antocianidinas) encontra-se em volta dos 45 °C e pH entre 3,8 e 4,5 (FORYSTH & QUESNEL, 1957). Ao longo da fermentação as antocianidinas livres são oxidadas pela ação da polifenoloxidase até quinonas, estas quinonas podem complexar com aminoácidos e proteínas e depois polimerizar com outros flavonoides até formar taninos. Taninos com altos pesos moleculares complexam com proteínas através de pontes de hidrogênio e o resultado desta reação são pigmentos, insolúveis em água, de cor marrom característica e necessária para a produção de chocolate (HANSEL *et al.* 1988).

Na etapa da fermentação aeróbica do cacau, pigmentos de cor marrom são formados a partir de compostos polifenólicos, o processo de formação destes pigmentos acontece a partir da oxidação da catequina e da epicatequina até quinonas, e a condensação de proteínas e polifenóis resulta na redução da adstringência e do sabor amargo no cacau, contudo a exata participação da polifenoloxidase (PPO) no desenvolvimento do sabor de chocolate precisa de maiores estudos, já que, o mecanismo de reação desta enzima é bastante complexo (FORYSTH, 1952).

Durante a secagem, as reações envolvendo compostos polifenólicos, são uma continuação oxidativa da fermentação. Os polifenóis são oxidados na presença de oxigênio resultando na formação de quinonas que sofrem polimerização para a obtenção de produtos de cor marrom, Entretanto, tendo em vista seu pH ideal (6,0), em sementes ácidas (pH 4,0 - 5,0) o escurecimento é lento durante o processo de secagem. Num pH > 7 os polifenóis são oxidados de maneira não enzimática. Então, um cacau sobre fermentado facilmente se torna marrom, dando a falsa aparência de uma semente perfeitamente fermentada. Uma

conseqüência da oxidação polifenólica e a polimerização da quinona é a redução da adstringência (JEANJEAN, 1995).

A mudança no teor de compostos polifenólicos, durante o aquecimento, foi estudada por YOSHIYAMA & ITO (1996), os resultados relatados por estes pesquisadores indicam que, após um aquecimento, de amêndoas de cacau pouco fermentadas, por autoclavagem (10 min, 120 °C) e posterior torração em forno seco (20 min, 120 °C), os teores de polifenóis totais, flavan-3-óis e proantocianidinas, mantinham-se presentes em 84%, 82% e 79% respectivamente. A partir deste fato, pode-se sugerir que os polifenóis presentes em amêndoas de cacau insuficientemente fermentadas, são conservados mesmo tendo passado pelo processo de aquecimento, e que a adstringência também acaba permanecendo.

#### **3.3.1.1. Ação da enzima polifenoloxidase (PPO) no cacau**

A alteração não microbiana mais evidente nas frutas e outros vegetais é o escurecimento causado pela oxidação enzimática. O escurecimento enzimático é o resultado da transformação em etapas de um monofenol primeiro a um difenol e depois a uma quinona. O grupo carbonílico reage então de forma não enzimática com outros constituintes dos alimentos, e de forma particular com compostos com grupos amino, para darem finalmente produtos de cor escura.

Este escurecimento enzimático é evidente na maioria das frutas descascadas ou cortadas e acontece rapidamente depois da ruptura das células. Embora um escurecimento excessivo dê lugar a produtos pouco atrativos, esta reação pode ser desejável, por exemplo, para obter um produto ligeiramente amarelo quando elabora-se o purê de maçã pasteurizado. O escurecimento enzimático é também responsável pela formação da cor procurada no cacau, café, chá e frutas secas (ROBINSON, 1991).

No cacau são encontrados vários tipos de enzimas endógenas, estas têm uma função muito importante para a produção dos precursores do sabor e para a degradação dos pigmentos durante a fermentação do cacau. A Tabela 3 resume as reações que são catalisadas enzimaticamente e que ocorrem durante a fermentação de amêndoas de cacau.

**Tabela 3.** Caracterização das principais enzimas ativas durante a fermentação

Enzima	Localização	Substrato	Produto	pH	Temperatura (°C)
Invertase	amêndoa testa	Sacarose	Glucose frutose	4,0-5,25	37
Glicosidases (β-galactosidase)	amêndoa cotilédone	Glicósidos (3-β-D-galactosidilcianidina, 3-α-L-arabinosidilcianidina)	Cianidina açúcares	3,8-4,5	45
Proteinases	amêndoa "nibs"	Proteínas	Peptídios aminoácidos	4,7	55
Polifenol oxidases	amêndoa cotilédone	Polifenóis, (epicatequina)	O-quinonas O-diquinonas	6	31,5-34,5

Fonte: LOPEZ, 1986 citado por Beckett, 1994.

Segundo (LOPEZ & DIMICK 1991, citados por HANSEN *et al*, 1988), embora uma grande variedade de enzimas como as proteases, glucosidases e polifenoloxidase terem sido detectadas nas amêndoas de cacau, poucas são as ligações diretas que têm sido estabelecidas entre estas enzimas endógenas e a produção de sabor.

Durante a fermentação a enzima polifenoloxidase participa de uma série de reações, entre elas a formação de o-quinonas, as quais interagem com aminoácidos para a formação de aldeídos, que participa da formação do aroma do cacau, esta afirmação sugere que esta enzima poderia ser utilizada, por exemplo, no processo de desenvolvimento de sabor de chocolate associado às reações de escurecimento durante o processamento do cacau (MOTODA, 1979).

Esta reação de formação de aldeídos a partir de aminoácidos com a participação da PPO foi estudada por SAIJO, 1970; SANDERSON, 1970; citados

por MOTODA, 1979, em extratos a partir de cacau a qual, segundo estes pesquisadores, envolve duas etapas: a reação enzimática e a não enzimática, a primeira etapa compreende a formação de quinonas a partir de polifenóis com a participação da polifenoloxidase e a segunda etapa a degradação de Strecker catalisada por quinonas. Ainda BALLEY *et al.*, 1962; ROHAN, 1964; PINTO & CHICHESTER, 1966; todos eles citados pelo mesmo autor, indicam que os aldeídos são formados a partir de aminoácidos livres através da degradação de Strecker durante os processo de fermentação, secagem e torração.

A atividade enzimática das peroxidases e das polifenoloxidases apresenta um acentuado decréscimo após os dois primeiros dias de fermentação, nesse período, suas atividades passam a ser praticamente nulas (VILLENEUVE 1982, citado por BAREL *et al.* 1983). Esta inativação enzimática no processo de fermentação acontece devido à geração de calor durante a mesma e também pelo aumento nas concentrações de ácido acético, etanol e polifenóis. Este processo de fermentação e a consequente morte das sementes facilitam a ação da enzima, mas a inativação desta ocorre rapidamente sem conseguir que grandes quantidades de compostos polifenólicos sejam liberados (HOLDEN, 1959). Porém, segundo REEVES *et al.*, 1987, a atividade enzimática da polifenoloxidase só tem uma diminuição significativa após o terceiro dia de fermentação, os dados apresentados na Tabela 4 demonstram que os resultados encontrados por estes pesquisadores estão distantes dos resultados de outros autores que reportam que a perda significativa da atividade enzimática acontece já a partir do segundo dia.

A atividade das enzimas pode ser comprometida durante o processo de secagem, se esta etapa é realizada de forma artificial e conduzida de maneira muito rápida, com o emprego de temperaturas elevadas, as enzimas do interior da amêndoa são inativadas por falta de umidade, antes de que tenham sido completadas diversas alterações necessárias para a formação correta dos

precursores do sabor de chocolate, as quais ocorrem na parte inicial deste processo (HANCOCK, 1988; HARDY, 1961, citado por ZAMALLOA, 1994).

**Tabela 4.** Atividade residual da polifenoloxidase (expressa como % atividade inicial) durante a fermentação

Dias	% atividade inicial		
	Reeves <sup>a</sup>	Villeneuve (1985) <sup>b</sup>	Holden (1959) <sup>c</sup>
1	100	66	36
2	94	28	20
3	93	13,5	8
4	22	8	5
5	13	5,6	0

Reagentes usados para a solubilização:

<sup>a</sup> 0,002M citrato, 0,04 M fosfato, pH 5,5; contendo 0,5 M NaCl e 1% de Triton X-100.

<sup>b</sup> 0,1 M citrato/fosfato, pH 5,2, contendo 4% de PVPP, 1,2% polietilenoglicol 600 e 0,02% mercaptoetanol.

<sup>c</sup> 0,01 M acetato de sódio

**Fonte:** REEVES *et al*, 1987

### 3.3.2. Formação de pirazinas e reação de Maillard

Uma das mais importantes e complexas reações relacionadas com o sabor no processo de torração, é o escurecimento não enzimático ou reação de Maillard. Os produtos de isomerização formados durante a fase inicial são fundamentalmente substâncias formadas por adição entre aminoácidos e açúcares. Durante a etapa intermediária, são desidratados, fragmentados e transaminados, formando substâncias complexas, que dependem da temperatura e pH. Em condições ácidas, geralmente formam-se hidroximetilfurfural e outros derivados do furfural. Se o pH for neutro, o resultado da reação é principalmente de reductonas. Todos os intermediários são produtos muito complexos e conhece-se pouco sobre sua estrutura e a natureza exata da sua formação nos sistemas de alimentos. No final, são polimerizadas várias substâncias, dependendo dos substratos e do pH os quais contribuirão ao sabor definitivo do chocolate. Algumas das substâncias mais importantes são: pirazinas, pirrois, imidazois, tiazois e oxazois (HOSKIN & DIMICK, 1988).

Segundo REINECCIUS *et al* (1972), a reação de Maillard se desenvolve numa faixa de pH de 3 a 10, onde o pH alcalino e um teor de umidade na faixa de 7 a 15% favorece a intensidade desta reação.

As pirazinas representam cerca de 25% do total dos produtos identificados na fração aromática do chocolate (BAREL *et al*, 1985). Estes compostos não apresentam qualquer sabor característico de chocolate, apesar da significância delas dentro da fração aromática do chocolate, sendo que o sabor de chocolate é resultado da complexa mistura de um grande número de compostos presentes no cacau. Porém as pirazinas se encontram entre os mais importantes compostos formados na reação de escurecimento de alimentos em geral, já que elas aparecem em grande número em alimentos cozidos ou torrados e em sistemas modelo de escurecimento (SHIBAMOTO, 1980; MAGA *et al*, 1973; HODGE, 1967, citados por SHIBAMOTO, 1982).

Aproximadamente 500 compostos voláteis do cacau torrado já foram identificados, sendo que dentre estes compostos as pirazinas representam o grupo com maior quantidade de componentes identificados (Tabela 5).

No decorrer da torração, as pirazinas, que são componentes aromáticos heterocíclicos, aumentam de concentração de forma gradual. Uma diminuição do teor de algumas pirazinas na amêndoa é sinal do início de uma sobre-torrção. Isto possivelmente acontece devido à volatilização destas, dado o aumento de temperatura (PEZOA, 1989; MERMET *et al*, 1992). Contudo REINECCIUS *et al*. (1972) relatam que a formação de pirazinas durante a etapa de torração está em direta relação com a origem do cacau, sendo ainda que maiores concentrações de pirazinas serão encontradas nas amêndoas que foram bem fermentadas, quando comparadas àquelas levemente fermentadas ou então subfermentadas. O autor ainda reforça que as mesmas pirazinas estão presentes em todos os casos

acima, mas em diferentes proporções. Essas diferenças quantitativas envolvem principalmente os picos da 2-metil, 2,3,5-trimetil e 2,3,5,6-tetrametilpirazinas.

**Tabela 5.** Componentes voláteis presentes no aroma de cacau

<b>COMPONENTES</b>	<b>n</b>	<b>COMPONENTES</b>	<b>n</b>
<b>1. ALIFÁTICOS</b>	<b>(194)</b>	<b>4. HETEROCÍCLICOS</b>	<b>(201)</b>
Hidrocarbonetos	10	<b>Compostos oxigenados</b>	<b>(37)</b>
Álcoois	18	Furanos	22
Aldeídos	16	Sulfetos	01
Cetonas, dicetonas, hidroxicetonas	18	Lactonas	06
Ácidos	35	Outros	08
Ésteres	44	<b>Compostos nitrogenados</b>	<b>(140)</b>
Éteres, acetaldeídos	06	Pirróis	14
Aminas	33	Piróis (halogenados)	02
Nitrilos	01	Piridinas	13
Compostos de enxofre	10	Pirazinas	79
<b>2. ALICÍCLICOS</b>	<b>(20)</b>	Ciclopentapirazinas	13
Hidrocarbonetos	07	Quinoxaleinas	10
Álcoois	05	Outros	09
Cetonas, dicetonas	04	<b>Thiazóis</b>	<b>09</b>
Ésteres	01	<b>Oxazóis</b>	<b>15</b>
Outros	03		
<b>3. AROMÁTICOS</b>	<b>(93)</b>		
Hidrocarbonetos	32		
Fenóis	08		
Álcoois	05		
Aldeídos	05		
Cetonas	05		
Ácidos	17		
Ésteres	13		
Éteres, acetaldeídos	02		
Compostos de nitrogênio	04		
Compostos de enxofre	02		

(n=número de componentes)

**Fonte:** SILWAR, 1988

Segundo BAUERMEISTER (1981) a 2,3,5,6-tetrametilpirazina e a 2,5-dimetilpirazina têm sido consideradas como bons indicadores do grau de torração, em função de que a formação das metilpirazinas a partir de seus precursores está diretamente relacionada como o tempo e temperatura de torração.

### **3.3.3. Ácido Acético**

A fermentação das sementes de cacau é uma condição indispensável para o desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma do chocolate (LOPEZ, 1983). Durante esta etapa do beneficiamento na fazenda acontece que a polpa aderente à semente é metabolizada pelos microorganismos, resultando na produção de calor, ácido acético e etanol, fatores que ao serem absorvidos pelos cotilédones causam a morte da semente (QUESNEL, 1965).

Os ácidos no cacau são produzidos através do metabolismo microbiano da polpa, estes ácidos são depois absorvidos pelo cotilédone. A difusão dos ácidos para o cotilédone fornece um ambiente ácido próprio para as reações enzimáticas as quais irão desenvolver os precursores do sabor de chocolate. Outra função destes ácidos é a de proteger as amêndoas de uma possível putrefação causada por bactérias, o que ocasionaria a produção de sabores não desejáveis. O ácido acético em particular é responsável pela morte das sementes, evitando a germinação, e pela solubilização dos compostos polifenólicos (JINAP, 1994).

Durante a etapa da fermentação, ao final das primeiras 24-36 horas (dependendo da região produtora de cacau), a primeira aeração da massa de sementes é realizada, através do seu revolvimento. Continuamente são feitas novas aerações de 24 em 24 horas, até o final da fermentação. Este procedimento tem como objetivo promover uma fermentação mais uniforme e eficiente, facilitando a penetração do oxigênio entre as sementes, a fim de tornar a sua polpa um ambiente propício para o desenvolvimento dos microorganismos, aeróbios, como as bactérias acéticas *Acetomonas* e *Acetobacter* (SHAUGHNESSY, 1992, DOELLE, 1969, citado por PEZOA, 1989).

Sem dúvida alguma, o aroma predominante em qualquer fermentação de cacau é do ácido acético, cuja produção segue rapidamente à fermentação

alcoólica. O substrato dessa reação é o álcool etílico que se encontra disponível nessa etapa da fermentação. Dita reação produz uma considerável quantidade de energia e é essa atividade a principal responsável pela elevação da temperatura que algumas vezes pode ultrapassar os 50 °C. É muito provável que a presença do ácido acético combinada com essa elevação de temperatura sejam os responsáveis pela morte das leveduras já que estas só podem ser encontradas nos primeiros estágios da fermentação. As concentrações de ácido láctico durante esta fermentação raramente excedem 0,5%, porém as quantidades de ácido acético chegam a atingir às vezes mais de 2% de concentração (CARR, 1980).

No que diz respeito ao teor de acidez das amêndoas de cacau, existem diferenças que variam de acordo com o país produtor. As amêndoas de cacau produzidas no Brasil e na Malásia, por exemplo, têm apresentado teores excessivos de acidez comparados com amêndoas provenientes do leste africano, por este motivo estas amêndoas são utilizadas em quantidades limitadas nas formulações. A presença do ácido acético e láctico seja de forma individual ou em combinação um com o outro tem sido relacionada como a mais importante causa desta elevada acidez (BIEHL, 1935; LOPEZ, 1983; ROHAN & STEWARD, 1964, citados por JINAP & DIMICK, 1990). Quando o ácido acético e seus esteres, durante a primeira etapa da fermentação das sementes de cacau, são absorvidos em grandes quantidades pelos cotilédones, transmitem ao produto um sabor ácido e desagradável, este ácido é o mais importante relacionado com o cacau produzido no Brasil, conseqüentemente o produto sofre restrições de alguns mercados importadores (LOPEZ & McDONALD, 1982; PASSOS *et al*, 1984)

A presença de ácido acético nas amêndoas de cacau fermentadas e secas é evidente devido ao odor característico que este ácido apresenta, normalmente durante o processo de fabricação de chocolate, como conseqüência da volatilização deste ácido nos tratamentos térmicos que são aplicados no cacau, a maior parte deste é eliminada, é bom lembrar que isto acontece com níveis

normais de ácido acético, porém não é o caso do ácido láctico, por ser este um ácido não volátil. A presença destes ácidos faz com que o pH das amêndoas secas diminua e como estas amêndoas ácidas normalmente apresentam pouco sabor de chocolate, é possível que um pH abaixo de 5,0 interfira nas reações que produzem os precursores do sabor (WOOD, 1989)

Uma solução possível para o problema da acidez elevada do cacau brasileiro é a remoção de parte da polpa, antes da fermentação, para ser utilizada em outros produtos (geleias, polpa congelada, suco, vinagre e licor de cacau). Segundo SCHAWN (1996), citado por VASCONCELOS (1999) uma fermentação normal acontece quando existe uma remoção de polpa de até 25% do peso das sementes frescas.

No Brasil parte da polpa é removida para ser usada em outros produtos. Tem sido demonstrado que a fermentação nestas condições, além de sofrer uma aceleração, ocorre de forma normal sempre que a porcentagem de polpa removida não ultrapasse os 23% do peso total. Uma remoção superior a esta porcentagem afetará seriamente o desenvolvimento do processo fermentativo (LOPEZ, 1985), citado por WOOD, (1989).

A Tabela 6 apresenta os valores de pH e acidez titulável encontrados por JINAP & DIMICK (1990) de amostras de amêndoas de cacau provenientes de diferentes países. As amêndoas de acidez elevada são caracterizadas por altas concentrações de ácido acético e láctico, contudo, só o ácido acético tem uma alta correlação entre o pH e a acidez titulável o que indicaria que este ácido é o responsável pela alta acidez em amêndoas de cacau produzidas por alguns países. Pode-se observar que os valores de acidez titulável para as amêndoas de cacau provenientes do Brasil e da Malásia são muito parecidos e chegam a ser considerados excessivamente altos se comparados com os valores de acidez apresentados por amêndoas de cacau da Costa de Marfim e Ghana. Segundo

estes autores a elevada acidez encontrada nas amêndoas de cacau do Brasil e da Malásia pode ser atribuída ao grau de fermentação e aos métodos de fermentação utilizados nestes países.

**Tabela 6.** pH e acidez titulável de amêndoas de cacau classificadas segundo o país de origem<sup>a</sup>

Pais	pH	Acidez titulável <sup>b</sup>
Brasil	4,70±0,13	0,198±0,006
Equador	5,59±0,01	0,109±0,001
Venezuela	5,49±0,07	0,128±0,040
Guatemala	5,74±0,00	0,083±0,000
República Dominicana	5,46±0,65	0,136±0,055
Gabon	5,48±0,00	0,128±0,008
Nigeria	5,45±0,01	0,134±0,001
Camarões	5,22±0,20	0,148±0,093
Ghana	5,26±0,13	0,125±0,014
Costa de Marfim	5,32±0,15	0,135±0,020
Malásia	4,89±0,36	0,198±0,052
Indonésia	5,36±0,69	0,130±0,064
Ilhas Salomon	4,99±0,01	0,165±0,001

<sup>a</sup> Cada lote foi analisado em duplicata; media de concentração ± std. dev.

<sup>b</sup> meq NaOH/g de amostra.

Fonte: JINAP & DIMICK, 1990.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Matéria-prima**

Foram utilizadas amêndoas de cacau fermentadas e secas da variedade “Forastero”, fornecidas pela indústria processadora de cacau INDECA S. A., localizada na cidade de Embú, São Paulo.

#### **4.1.2. Equipamentos e aparelhos**

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Frutas, Hortaliças e Produtos Açúcarados do Departamento de Tecnologia de Alimentos, no Laboratório de Fontes Protéicas do Departamento de Nutrição e no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência de Alimentos, todos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, Campinas, SP.

Os equipamentos usados para o desenvolvimento da pesquisa foram os seguintes:

- Desintegrador de facas ICMA Tipo Rietz.
- Separador de testa, gérmenes e cotilédones de amêndoas por fluxo de ar, fabricado no DTA/FEA/UNICAMP.
- Moinho de cilindros - SUPREMA, com motor de 3hp.
- Moinho de rolos resfriados MAR-GIRIUS CONTINENTAL
- Torrador rotativo elétrico de laboratório, PROBAT-WERKE.
- Espectrofotômetro UV/V BECKMAN, modelo DU-70.
- Micro extrator-destilador do tipo LIKENS & NICKERSON, adaptado à um destilador de nitrogênio.

- Cromatógrafo a Gás VARIAN, modelo 3400 e Integrador Varian, modelo 4400.
- Equipamento de Eletroforese Capilar HEWLETT PACKARD 3D.
- Extrator de gorduras tipo SOXHLET FANEM, modelo 170-1.
- Destilador de Nitrogênio TECNAL, modelo TE-036.
- Bloco digestor de proteínas - TECHNICON - mod. BD-40.
- pH-metro MICRONAL, modelo B-374.
- Mufla ENGRO, modelo 355-L.
- Estufa FANEM, modelo 315-SE.
- Centrífuga FANEM, modelo 204-N
- Balança semi-analítica METTLER, modelo P 1210.
- Balança analítica digital OERTLING, modelo LA 164.
- Moinho IKA-UNIVERSAL MUHLE M20 Janke &Kunkel
- Determinador de umidade Karl Fisher 701 KFT Titrino METROHM.
- Outros aparelhos e materiais comuns de laboratório e planta piloto.

#### **4.1.3. Reagentes**

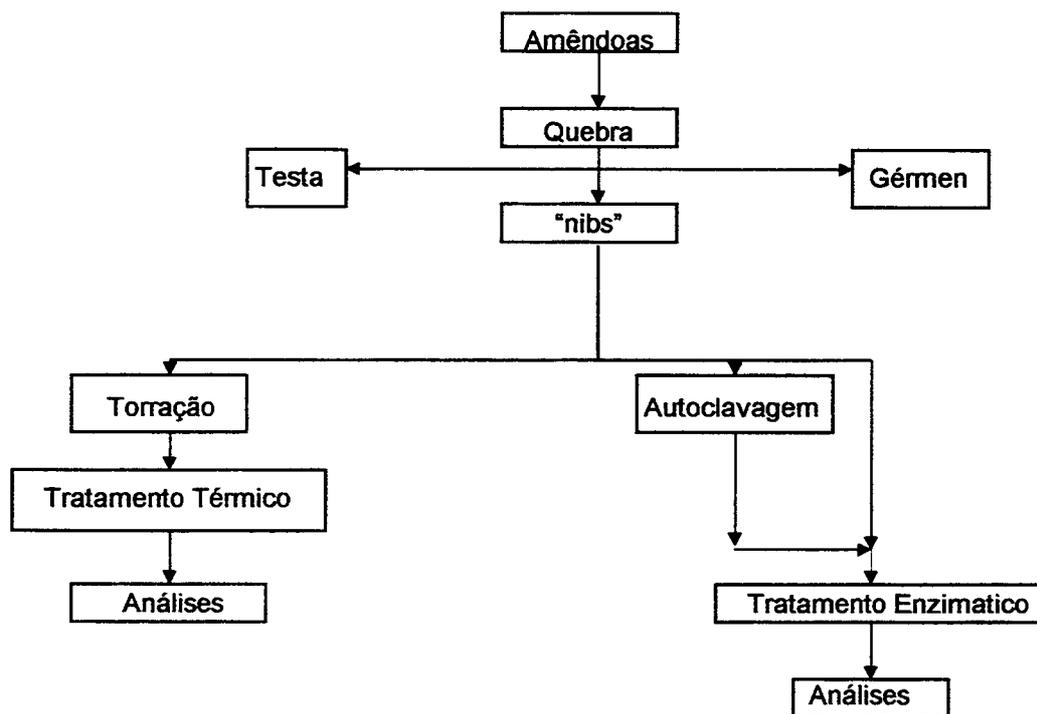
Os reagentes utilizados nas análises químicas foram do grau p.a, de diferentes procedências: Merck, Cinética Química Ltda., Grupo Química, etc.

Os padrões dos principais compostos aromáticos estudados: 2,3,5,6-tetrametilpirazina; 2,3,5-trimetilpirazina; 2,5-dimetilpirazina; 2,6-dimetilpirazina; 2,3-dimetilpirazina; 2-metilpirazina; etilpirazina e o padrão interno para a quantificação: 4-etil piridina, foram da marca Aldrich Chemical Company.

## 4.2. Métodos

Foram realizados dois tipos de tratamentos com o objetivo de melhorar o sabor do cacau. O primeiro destes através do uso da enzima polifenoloxidase E.C 1.1.0.3.1.1, visando uma redução dos compostos polifenólicos, e o segundo com ajuda de um forno elétrico rotativo, sendo que neste equipamento foi realizado o tratamento térmico após a torração com o objetivo de diminuir o teor de ácido acético ainda presente em concentrações consideráveis e promover um maior desenvolvimento de componentes aromáticos. Nestes dois procedimentos a matéria prima foi processada em forma de “nibs”.

As amêndoas de cacau fermentadas e secas seguiram o processamento descrito no fluxograma da Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma geral do processamento das amêndoas de cacau

#### **4.2.1. Preparo da matéria-prima e análises físico-químicas**

##### **4.2.1.1. Caracterização da Matéria-prima**

Foram avaliadas as amêndoas de cacau fermentadas e secas através da prova de corte, procedimento que se baseia na estimativa visual da qualidade a respeito do grau de fermentação, da presença de amêndoas mofadas, danificadas por insetos, germinadas e achatadas. Este procedimento foi realizado da seguinte forma: foram cortadas longitudinalmente, com ajuda de um faca, 100 amêndoas de cacau escolhidas de forma aleatoria, conservando-se apenas uma das metades de cada uma delas. Foram examinadas individualmente cada uma das cem metades e foram determinadas as porcentagens de amêndoas de distintas categorias de acordo com o método proposto na Resolução número 42 do Conselho Nacional do Comércio Exterior (CONCEX, 1968), a qual admite a tolerância dos seguintes defeitos:

- a) amêndoas mofadas e danificadas por insetos, total máximo de 4% (contadas e não pesadas) e não mais de 2% de cada defeito isoladamente, sem que a soma ultrapasse a tolerância máxima de 4%;
- b) amêndoas ardósias, máximo de 2% contadas; e
- c) amêndoas germinadas, achatadas e/ou outros defeitos, não ultrapassem a tolerância máxima de 2% contadas.

##### **4.2.1.2. Preparo dos “nibs”**

As amêndoas fermentadas e secas foram quebradas num desintegrador de facas em pedaços menores. Posteriormente os cotilédones fragmentados foram separados da testa e do gérmen com o auxílio de uma coluna de ar. Os “nibs” assim separados, foram selecionados por tamanho, através de peneiragem obtendo-se as frações entre 2 e 6 mm. Os fragmentos menores de 2mm de

diâmetro foram eliminados e os maiores de 6 mm foram novamente submetidos a desintegração e separação.

#### **4.2.1.3. Características físicas e químicas da massa de cacau**

Foi realizada uma moagem dos “nibs” para obter o liquor ou massa de cacau mediante o uso de um moinho de cilindros resfriado. As características físicas e químicas determinadas foram as seguintes:

- Teor de umidade - método 14.004 da AOAC (1984)
- pH - método 13.010 da AOAC - OICC (1984)
- Acidez total titulável - normas analíticas do instituto Adolfo Lutz (1976)
- Teor de proteína - método 13.011 da AOAC (1984)
- Teor de gordura - método 13.012 da AOAC - OICC (1984)
- Teor de cinzas - método 13.013 da AOAC - OICC (1984)
- Teor de cafeína e teobromina - método 980.14 da AOAC (1984)
- Porcentagem de cascas, germen e cotilédone das amêndoas: foi quantificado o teor médio de cotilédones, testa e gérmen das amêndoas de cacau através da pesagem de 100 gramas de amêndoas e a separação manual das frações as quais foram pesadas. Esta quantificação foi realizada em triplicata.

#### **4.2.1.4. Torração dos “nibs” de cacau**

A torração foi realizada num forno elétrico rotativo munido de um controlador de temperatura digital de alta precisão. Esta operação foi conduzida em lotes de 250 g Após a torração os “nibs” foram imediatamente resfriados através de passagem de ar forçado, em bandeja perfurada, no próprio torrador. As condições desta operação foram ajustadas a temperatura de 150 °C na camisa de aquecimento deste torrador, e o tempo de permanência de 38 minutos. Segundo FADINI, (1998) os atributos de sabor obtidos durante a torração de

“nibs” em forno elétrico rotativo nestas condições, apresentam melhores resultados permitindo um maior desenvolvimento do potencial aromático do cacau.

#### **4.2.2. Tratamento térmico após a torração**

Para a realização do tratamento térmico após torração através do uso do forno elétrico rotativo, a matéria prima utilizada foram “nibs” de cacau torrados.

##### **4.2.2.1. Planejamento experimental**

O experimento utilizado foi o fatorial completo ( $2^2$ ) de acordo planejamento central composto rotacional (DCCR) com 2 fatores ou variáveis independentes (BARROS NETO *et al*, 1995). O planejamento para dois fatores contém um mínimo de  $2^n + 2n + 2$  pontos ou experimentos, onde n é correspondente ao número de variáveis. Os experimentos definidos por estes pontos compreendem  $2^n$  pontos para um modelo fatorial completo (combinando níveis de +1 e -1), dois pontos axiais ou estrela em cada eixo, com distância igual do centro a cada vértice (um com nível em  $-\alpha$  e o outro em  $+\alpha$  valores mínimo e máximo), e um ou mais centrais (nível zero). O valor de alfa depende do número de pontos do modelo fatorial (F) e do número de fatores (n), sendo calculada a equação:  $\alpha = (F)^{1/4} = (2^n)^{1/4}$ ; neste caso, com 2 variáveis ( $2^2$ )  $^{1/4} = \sqrt[4]{4} = 1,41$ .

Neste trabalho, o número de ensaios do experimento foi igual a 11 sendo 4 fatoriais, 4 axiais e 3 repetições do ponto central. As variáveis independentes foram temperatura e tempo. Os níveis das variáveis tem seus valores apresentado na Tabela 7. A temperatura usada compreende a faixa de 50-75 °C, temperaturas intermediarias entre a temperatura de secagem e temperatura de torração. A respeito da variável tempo, o intervalo entre 20 e 90 minutos foi utilizado para a realização dos ensaios. As variáveis dependentes (respostas) para avaliar os

ensaios realizados com “nibs” foram: quantidade de ácido acético, açúcares redutores, grupo amino-terminal e comportamento do perfil aromático.

**Tabela 7..** Variáveis e níveis de variação utilizados no tratamento térmico após torração.

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$X_1$ =TEMPO	5,5	20	55	90	104,5
$X_2$ =TEMPERATURA	44,8	50	62,5	75	80,2

Os valores codificados e reais das duas variáveis utilizadas no planejamento estatístico dos experimentos são mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Planejamento experimental para 2 variáveis independentes.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais	
	$(x_1)$	$(x_2)$	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	20	50,0
2	+1	-1	90	50,0
3	-1	+1	20	75,0
4	+1	+1	90	75,0
5	-1,41	0	5,5	62,5
6	+1,41	0	104,5	62,5
7	0	-1,41	55	44,8
8	0	+1,41	55	80,8
9	0	0	55	62,5
10	0	0	55	62,5
11	0	0	55	62,5

#### 4.2.2.2. Determinação de ácido acético

O preparo das amostras para a quantificação de ácido acético, no cacau torrado e tratado térmicamente, foi realizado da seguinte forma: os “nibs”, após o tratamento, foram finamente moídos até a obtenção de liquor de cacau. Uma amostra de 25 g deste liquor foi levada a destilação com 30 g de cloreto de sódio e 100 ml de água. Coletaram-se 50 ml do destilado e alíquotas deste foram filtradas através de membrana Millipore (tamanho de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ). A quantificação foi realizada num equipamento de Eletroforese Capilar HP 3D, provido de capilar de sílica fundida de 64,5 cm de comprimento e 50  $\mu\text{m}$  de

diâmetro interno. A análise foi conduzida com tampão para ácidos orgânicos da HP, e a injeção, de amostra, foi realizada sob pressão de 50 mBar, durante 4 s. Foi construída uma curva com concentrações distintas de ácido acético que variaram na faixa de 3 a 7 µl/ml.

#### **4.2.2.3. Determinação de açúcares redutores**

A determinação de açúcares redutores nas amostras de cacau tratadas termicamente foi realizada pela reação com o ácido dinitro salicílico (DNSA) segundo a metodologia, descrita por CHAPLIN & KENNEDY (1986).

A extração dos açúcares redutores foi realizada com 10 ml de água a partir de 0,1 g de cacau integral. Para a quantificação dos açúcares redutores foram retiradas alíquotas de 0,5 ml do extrato e depois misturados com 5 ml de reagente (DNSA). Esta mistura foi aquecida a 100 °C durante 10 min e após este tempo a mistura foi resfriada até temperatura ambiente com ajuda de um banho de gelo. Finalmente a absorbância da mistura foi lida a 570 nm. Para a quantificação foi construída uma curva com concentrações diferentes de glucose (5; 10; 15; 20 mg/ml).

#### **4.2.2.4. Determinação de grupo amino-terminal**

A extração de grupos amino-terminal nas amostras de cacau tratadas termicamente foi realizada seguindo a metodologia, descrita por MURTHY (1997).

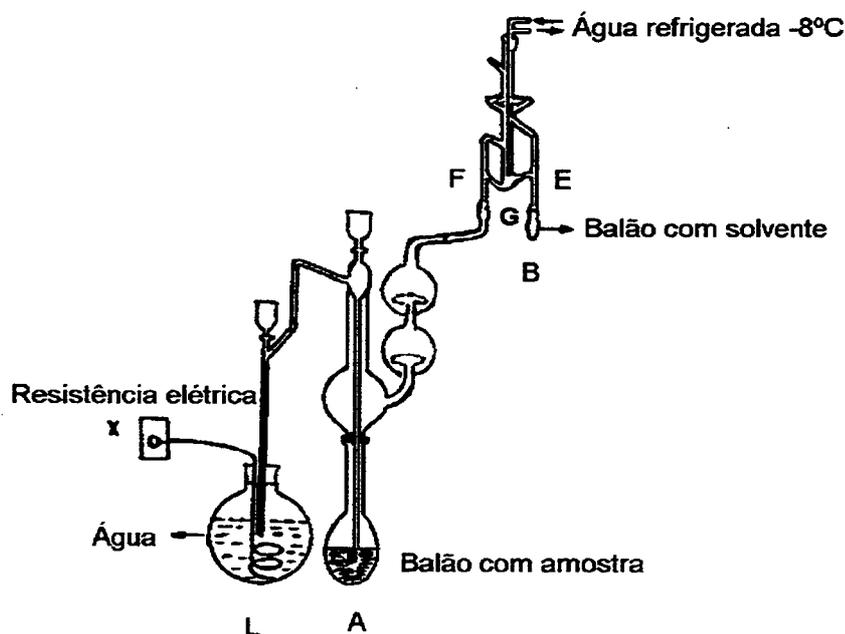
Uma amostra de 0,1 g de cacau integral foi extraída com 10 ml de uma mistura de ácido acético 0,1 M; acetato de sódio 0,1 M e ácido tricloroacético 0,1 M, após 16 horas de permanência a 20°C. O extrato foi centrifugado a 3397 g durante 15 min, finalmente o extrato foi filtrado. A quantificação adaptada de CHURCH *et al*, (1985) foi realizada a partir de uma alíquota de 0,1 ml do extrato

filtrado que foi misturada com 0,9 ml de uma mistura de ácido acético 0,1 M; acetato de sódio 0,1 M e ácido tricloroacético 0,1 M junto com 4ml de reagente PDA (tetraborato 0,1 M; duodecil sulfato de sódio 20%; o-ftaldialdeido). Após tempo de permanência de 10 min realizou-se a leitura de absorvância a 340 nm. A curva padrão utilizada para a quantificação de grupos amino-terminal, foi construída com concentrações diferentes de ácido amino acético (1,5; 3,0; 6,0; 9,0; 12,5; 15 $\mu$ g/ml).

#### 4.2.2.5. Análise cromatográfica dos componentes voláteis

##### 4.2.2.5.1. Extração dos voláteis

A extração dos componentes voláteis foi realizada através de um microdestilador do tipo LIKENS & NICKERSON (Figura 2) acoplado a um destilador por arrastre de vapor, descrito por ZAMALLOA (1994).



**Figura 2.** Micro extrator-destilador do tipo Likens & Nickerson, acoplado a um destilador por arrastre de vapor

No balão tipo Kjeldhal do destilador por arrastre de vapor (A) foram colocados 30 g de amostra, 10 g de NaCl e 20 ml de água destilada. O vapor, produzido pelo aquecimento de água destilada através de uma resistência elétrica (L), que passava pelo balão tipo Kjeldhal tinha por objetivo arrastar os compostos voláteis da amostra para o micro-extrator.

Na câmara do micro-extrator (G) foi colocado 1,5 ml de água destilada e depois solvente de extração (mistura de n-pentano e éter-etílico 2:1 v/v) até alcançar o nível de refluxo (F), a coluna de condensação do micro-extrator foi continuamente resfriada por uma solução álcool/água (1:2), ajustada à temperatura de -6 °C, permitindo assim a condensação dos vapores de água que continham os componentes voláteis. Em seguida a fase aquosa foi separada do solvente por diferença de densidade na câmara do micro-extrator e o excesso de solvente contendo os componentes voláteis foi recolhido, através do ramal (E), num balão com solvente (B) acoplado ao extrator que era aquecido separadamente até atingir uma ebulição moderada (40-45 °C), concentrando assim o extrato final que continha os componentes voláteis (1ml). As alíquotas do extrato obtido foram injetadas diretamente no cromatógrafo gasoso, após sua desidratação com sulfato de potássio.

Foram realizadas duas extrações para cada amostra de cacau estudada, sendo que para cada extrato de componentes voláteis foram realizadas duas injeções no cromatógrafo.

#### **4.2.2.5.2. Separação, identificação e dosagem de alquilpirazinas por cromatografia gasosa**

Os componentes voláteis de 12 amostras de cacau torradas e tratadas termicamente foram analisados por cromatografia gasosa.

Para a separação e posterior quantificação dos derivados pirazínicos estudados em cada amostra de cacau tratado, utilizou-se um cromatógrafo da marca VARIAN, modelo 3400, equipado com um detetor de ionização de chama, acoplado a um integrador da marca VARIAN, modelo 4400.

As condições de análises em coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento e 0,248 mm de diâmetro interno, com fase líquida D.B. WAX, foram as seguintes:

- Gás de arraste: hidrogênio, com fluxo de 1 ml/min e pressão de 8 psi.
- "Make up" - nitrogênio: 29 ml/min
- Fluxo de hidrogênio no detetor: 30ml/min
- Ar sintético no detetor: 300 ml/min
- Temperatura do detetor: 250 ° C
- Temperatura do injetor: 230 °C
- Volume injetado da amostra: 5 µl
- Tipo de injeção: "Splitless" de Grobs
- Período do "Splitless": 0,40 min
- Solvente n-Pentano e Éter Etílico (2:1 v/v)
- Programação de temperatura:

inicial: 50 °C	final: 100 °C	gradiente de temperatura: 2 °C
inicial: 100 °C	final: 210 °C	gradiente de temperatura: 10 °C

Para cada amostra injetada foram quantificados, individualmente, 7 compostos voláteis, os quais foram: 2-metilpirazina; 2,5-dimetilpirazina; 2,6-dimetilpirazina; etilpirazina; 2,3-dimetilpirazina; 2,3,5-trimetilpirazina e 2,3,5,6-tetrametilpirazina. A identificação das metilpirazinas foi através do uso de seus respectivos padrões e os cálculos de suas concentrações foram realizados com o uso da adição da 4 etilpiridina como padrão interno ao extrato aromático concentrado até 1ml.

A equação utilizada na determinação da concentração de cada pirazina foi a seguinte:

$$\mu\text{g de pirazina} = A_p \times Cr \times M_{pi} / A_{pi}$$

Sendo:

$A_p$  = área do pico da alquilpirazina na amostra

$A_{pi}$  = área do pico do padrão interno na amostra

$Cr$  = coeficiente de resposta da alquilpirazina relativa ao padrão interno

$M_{pi}$  = massa do padrão interno em  $\mu\text{g}$

#### **4.2.3. Tratamento enzimático**

Foi estudada a redução de substâncias polifenólicas, utilizando a polifenoloxidase E.C 1.1.0.3.1.1.; parcialmente purificada através da precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e diálise, extraída da polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) com pH e temperatura ótima de 6,5 e 20 °C respectivamente. O tratamento com polifenoloxidase foi realizado em “nibs”, autoclavados (121 °C, 15 min.) e em “nibs” não autoclavados. Para o tratamento enzimático, 50 g de “nibs” para cada replicata, foram embebidos em 25 ml de uma solução da enzima contendo 200U/ml/min, durante 30, 60, 90, 150, 210 e 360 minutos, a 23 °C e pH 6. Foi feita uma homogenização dos “nibs” com a solução de enzima cada 15 min. Os “nibs” foram secos e moídos para depois serem desengordurados. Foram realizadas as seguintes análises, no pó de cacau desengordurado: fenóis totais, taninos, flavan-3-óis e antocianidinas. O tratamento enzimático para cada tempo definido foi feito em replicata e as análises em triplicata para cada replicata.

#### 4.2.3.1. Determinação de fenóis totais

A extração dos fenóis foi realizada segundo a metodologia, modificada, descrita por BARTOLOMÉ *et al*, 1995. “nibs” finamente moídos foram desengordurados com Hexano. Alíquotas de pó desengordurado e seco (1 g) foram pesadas e extraídas com 15 ml de uma solução de acetona/água (70:30) refrigerada a 4 °C com agitação durante 20 min e finalmente centrifugadas 10 min a 2942 g Alíquotas de 0,5 ml do sobrenadante foram completadas com 0,5 ml de água e submetidas à determinação. A quantificação de fenóis totais foi realizada de acordo com metodologia, descrita por PRICE & BUTLER, 1977, para tanto, foram adicionados 3 ml de uma solução de  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$  0,10 M em HCl 0,10 M à alíquota do extrato (1 ml) e submetidos a agitação, 20 min. Logo depois foram adicionados 3 ml de uma solução de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,008 M, finalmente 20 minutos depois da adição do último reagente foi lida a absorbância a 720 nm (VIS). Para a quantificação dos fenóis foi construída uma curva com diferentes concentrações de ácido tânico (0,03; 0,05; 0,07; 0,09 mg/ml)

#### 4.2.3.2. Determinação de taninos

Para a extração de taninos alíquotas de 0,05 g de pó de cacau desengordurado foram pesadas e extraídas em 4 etapas com MeOH 50%, a primeira etapa da extração foi conduzida com 2 ml de MeOH 50% com agitação durante 8 min, a segunda etapa foi realizada num banho de água a 80-85 °C também com 2 ml de MeOH 50% sem agitação com tempo de permanência de 8 min, a terceira etapa foi idêntica à segunda e a quarta etapa foi realizada com adição de 4 ml de MeOH 50% nas mesmas condições das anteriores. Ao final do processo de extração foram obtidos 10 ml de extrato. A quantificação foi realizada seguindo a metodologia descrita por HAGERMAN & BUTLER, 1978, para tanto foram adicionados 2ml de uma solução de albumina bovina sérica em uma concentração de 1mg/ml, preparada com buffer (ácido acético 0, 2 M; Na Cl 0,17

M, com pH ajustado a 4,9) a um 1ml do extrato alcoólico, após um tempo de permanência de 24 h a 4 °C a mistura foi centrifugada durante 15 min a 3397 g, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi redissolvido em 4 ml de SDS/TEA. Finalmente foi adicionado 1 ml de FeCl<sub>3</sub> ( FeCl<sub>3</sub> 0,01 M em HCl 0,01 M) e após 15 min foi lida a absorbância a 510 nm. Para a quantificação utilizou-se uma curva construída com diferentes concentrações de ácido tânico (0,15; 0,225; 0,375; 0,525 e 0,675 mg/ml).

#### **4.2.3.3. Determinação de flavan-3-óis**

Esta determinação foi conduzida seguindo a metodologia, modificada, descrita por MAILLARD *et al*, 1996. Para a quantificação de flavan-3-óis alíquotas de pó desengordurado e seco de 0,025 g foram extraídas 4 vezes, durante 10 min com 10 ml de MeOH em cada extração. Todos os extratos reunidos foram filtrados através de papel filtro e o filtrado evaporado até *secura*. O resíduo foi dissolvido em 5 ml de água e 5 ml de sulfato de amônia (400g/L). Esta mistura foi acidificada até pH 3 com ácido metafosfórico (200g/ml) e com a ajuda de um funil de separação realizou-se 3 extrações com 10 ml de acetato de etila em cada extração. Os 30 ml recuperados da extração foram evaporados até *secura* e posteriormente o resíduo foi dissolvido em 15 ml de MeOH. Finalmente foi lida a absorbância a 280 nm (UV). Para a quantificação utilizou-se uma curva construída com diferentes concentrações de (+)catequina (0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 mg/ml)

#### **4.2.3.4. Determinação de antocianidinas**

A determinação foi realizada seguindo a metodologia, modificada, descrita por Oszmianski & Sapis, (1988); em Wilska-Jeszka & Koren, (1996). Para a extração e quantificação de antocianidina 0,05 g de pó desengordurado e seco foram extraídos 4 vezes com 2,5 ml de uma solução de HCl 1,5 N e etanol

absoluto (85:15) com agitação durante 3 min em cada extração e finalmente centrifugação durante 5 min a 3397 g O total dos sobrenadantes (10 ml) foram recolhidos num bequer e evaporados até secura, sendo que o resíduo foi dissolvido em 5 ml de etanol e lido a 535 e 460 nm (VIS). Os resultados são expressos em unidades de Abs.

#### **4.2.3.5. Análise sensorial**

Para a avaliação sensorial da amostra tratada enzimaticamente que apresentou melhores resultados nas quantificações analíticas, foi preparada uma formulação contendo 65 % de liquor e 38% de sacarose. O liquor de cacau foi obtido a partir dos “nibs” tratados, secos e torrados.

O refino foi realizado em um moinho de três cilindros, resfriados, com o mínimo espaçamento possível entre estes. A amostra foi cilindrada várias vezes até a obtenção de uma massa refinada.

A amostra foi colocada em um becker e com ajuda de um banho maria manteve-se a temperatura a 60 °C com um agitador ligado durante aproximadamente 8 horas. Após este tratamento que utilizou temperatura da operação de conchagem foi realizada a etapa de temperagem até uma temperatura de 30 °C, posteriormente as amostras foram moldadas e finalmente após o resfriamento desmoldadas.

Foram realizadas duas análises sensoriais, a primeira, com o uso de uma ficha de diferença do controle (Figura 3), conduzida com objetivo de analisar a existência de uma diferença entre a amostra tratada enzimaticamente e a amostra não tratada. Esta última amostra foi utilizada como padrão no teste. Na segunda análise sensorial, foram utilizadas as mesmas amostras (tratada e não tratada), avaliadas através de uma ficha com escala hedônica de 9 pontos (Figura 4).

NOME: _____ DATA: _____	
<p>Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 2 amostras codificadas de chocolate "meio amargo", por favor, prove a amostra padrão e em seguida prove cada uma das amostras codificadas e avalie na escala abaixo o quanto cada amostra codificada difere em termos globais de <b>sabor</b>, da amostra padrão.</p>	
0 Nenhuma diferença	
1	
2 Ligeiramente diferente	
3	
4 Regularmente diferente	
5	
6 Muito diferente	
7	
8 Extremamente diferente	
AMOSTRA	GRAU DE DIFERENÇA
_____	_____
_____	_____

**Figura 3.** Ficha utilizada na análise sensorial

NOME: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_

1 – Você está recebendo 2 amostras codificadas de chocolate “meio amargo”, por favor, prove cada uma das amostras e utilize a escala abaixo para expressar o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra em termos globais de **sabor**.

9 Gostei muitíssimo  
 8 Gostei muito  
 7 Gostei moderadamente  
 6 Gostei ligeiramente  
 5 Nem gostei nem desgostei  
 4 Desgostei ligeiramente  
 3 Desgostei moderadamente  
 2 Desgostei muito  
 1 Desgostei muitíssimo

AMOSTRA	VALOR
_____	_____
_____	_____

2 – Agora, por favor, comente o que você mais gostou e menos gostou em relação ao **sabor** de cada uma das amostras.

AMOSTRA	MAIS GOSTEI	MENOS GOSTEI
_____	_____	_____
_____	_____	_____

**Figura 4.** Ficha utilizada na análise sensorial

#### 4.2.4. Análises estatísticas

Os dados dos testes sensoriais e da composição química, foram analisados estatisticamente, por Análise de variância (ANOVA), utilizando-se o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização da matéria-prima

#### 5.1.1. Prova de corte

A Tabela 9 apresenta os resultados da prova de corte realizada para a caracterização da matéria-prima. Esta prova foi conduzida em triplicata considerando 100 amêndoas em cada prova. Nos aspectos considerados para a avaliação (ardósias, germinadas, mofadas e achatadas), as amêndoas analisadas, para serem utilizadas no trabalho, encontraram-se dentro das especificações do CONCEX, 1968.

**Tabela 9.** Resultados da prova de corte\*

<b>Defeitos</b>	<b>Nº de amêndoas</b>
Ardósias	1
Germinadas	0
Mofadas	0
Danificadas por insetos	3
Achatadas	0
Pouco fermentadas	25

\* 98,5 g, peso médio de 100 amêndoas

A quantidade elevada de amêndoas pouco fermentadas (violetas), está presente em uma grande porcentagem do cacau que atualmente está sendo comercializado no Brasil, segundo os próprios comercializadores do produto. A falta de controle do processo de fermentação, que é realizado nas fazendas, é apontado como responsável por este número elevado de amêndoas de cor violeta.

Segundo HANCOCK (1988), na prática nenhuma fermentação é uniforme e como uma fermentação excessiva traz consigo a perda tanto da intensidade como da qualidade do sabor, o grau ideal de fermentação que deve ser o resultado da

prova de corte é de 70 a 80% de amêndoas totalmente fermentadas e de 20 a 30% de amêndoas de cor parcialmente marrom e parcialmente violeta. As amêndoas de cor totalmente violeta contêm concentrações elevadas de antocianinas, compostos que foram liberados das células pigmentadas devido à fermentação acética, mas que posteriormente têm sofrido poucas transformações químicas. A presença delas compromete o sabor do cacau acentuando a adstringência.

### 5.1.2. Análises físico-químicas

A Tabela 10 apresenta os resultados da caracterização química dos “nibs” de cacau utilizados neste trabalho.

**Tabela 10.** Composição química dos “nibs” de cacau

COMPOSTOS	PORCENTAGEM
Proteína	13,60
Fibras	5,54
Lipídios	53,65
Umidade	7,20
Cinzas	2,82
Teobromina	1,06
Caféina	0,17
Outros componentes <sup>1</sup>	15,96

<sup>1</sup> “outros componentes” representa o teor calculado por diferença, que inclui compostos tais como carboidratos, ácidos, taninos, etc.

Pode-se observar que o cacau tem como principais componentes a gordura e as proteínas, quando os resultados obtidos são comparados com os citados na literatura por MINIFIE (1970), é possível observar diferenças entre os teores de lipídios e proteínas encontrados no estudo e os teores relatados na literatura, diferenças que podem estar relacionadas com inúmeras variáveis, como região de cultivo, pré-tratamentos realizados e variedade do fruto entre outros, no entanto o teor de cinzas é praticamente igual nos dois casos.

A Tabela 11 apresenta a composição física das amêndoas de cacau utilizadas no estudo, os resultados desta determinação encontram-se dentro dos valores médios relatados por ZAMALLOA (1994). Após a separação da testa e do gérmen o rendimento em “nibs”, adequados para a torração, ficou em torno de 75% do peso inicial das amêndoas.

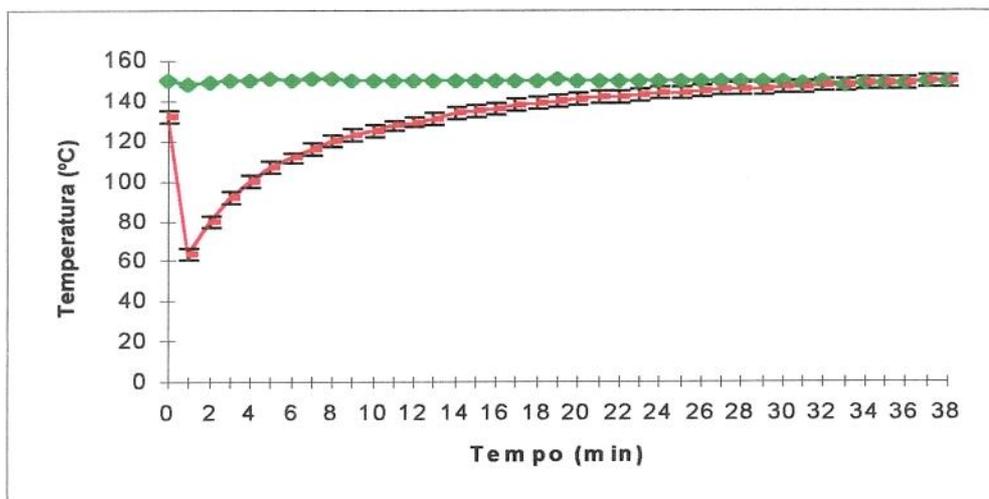
**Tabela 11.** Composição física da amêndoa integral de cacau

<b>Componentes</b>	<b>%</b>
Cotilédone	84,50
Gérmen	0,91
Testa	14,59

## **5.2. Torração**

A temperatura da camisa de aquecimento do forno elétrico utilizado para a torração dos “nibs” foi de 150 °C, permanecendo constante durante todo o processo. Paralelamente, o perfil de temperatura interna da cavidade do forno foi medida com ajuda de um termopar, ao longo do processo de torração. O perfil médio de temperatura, do interior da cavidade do forno está apresentado na Figura 5. Pode-se observar uma boa reprodutibilidade do equipamento durante a torração, o que garantiu uma homogeneidade entre os lotes torrados.

A máxima temperatura atingida na cavidade de torração, após 38 minutos de tratamento foi de 150 °C. Pode-se observar que a temperatura dentro da cavidade antes da introdução dos “nibs” foi de 136 °C e uma vez estes colocados, a temperatura caiu rapidamente até 61 °C no primeiro minuto de torração, subindo novamente até atingir o máximo já mencionado.



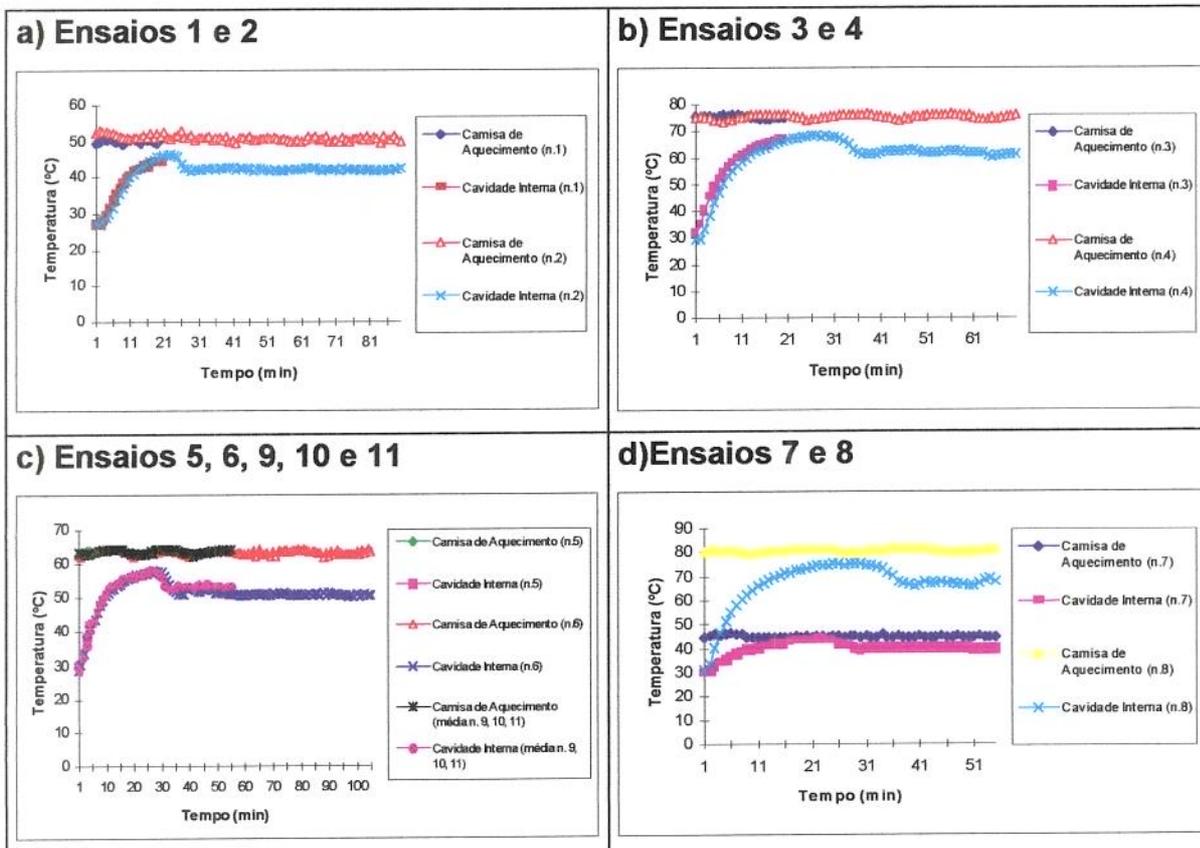
**Figura 5.** Valores médios de temperatura na camisa de aquecimento e dentro da cavidade do forno elétrico rotativo, durante o processo de torração de “nibs” de cacau. ◆ temperatura da camisa, — temperatura da cavidade.

### 5.3. Tratamento térmico após torração

Seguindo as condições de tempo e temperatura determinadas pelo planejamento experimental (Tabela 8), foram realizados 11 ensaios do tratamento térmico após a torração dos “nibs”. Acompanhando os tratamentos foi obtido o perfil médio de temperatura na cavidade interna do torrador elétrico rotativo. Foram feitas quatro torrações de 250 g para cada ensaio. Para garantir a reprodutibilidade destes ensaios foram controladas a temperatura da camisa de aquecimento e da cavidade interna do forno elétrico rotativo.

As figuras apresentando os perfis de temperatura da cavidade de torração, registradas no torrador elétrico rotativo, foram divididas segundo as temperaturas utilizadas durante o tratamento (Tabela 8), excetuando os tratamentos 7 e 8 que foram colocados em uma mesma figura por terem o mesmo tempo de tratamento (55 min). Todos estes dados estão apresentados na Figura 6.

A Figura 6a apresenta o perfil de temperaturas utilizadas para os ensaios 1 e 2 com temperatura fixada em 50 °C (camisa de aquecimento).

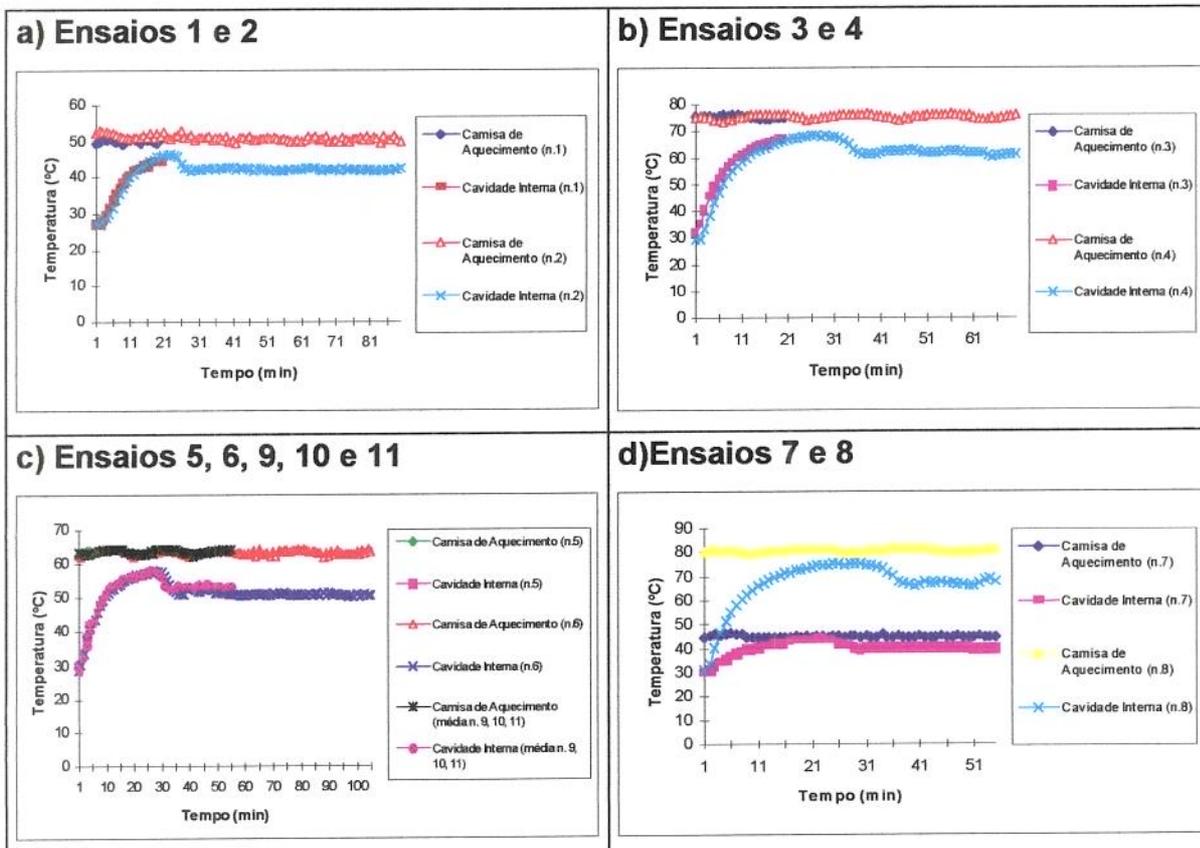


**Figura 6.** Perfil médio de temperaturas na camisa de aquecimento e na cavidade interna do torrador nos ensaios do tratamento térmico após torração

Observa-se que nos ensaios 1 e 2 existe uma uniformidade nas temperaturas, tanto interna (cavidade) como na externa (camisa), utilizadas durante estes tratamentos térmicos, no entanto, no caso do tratamento 2, a partir do minuto 25, após um aumento de temperatura constante, esta tende à estabilização, continuando assim até o final do ensaio.

Na Figura 6b estão apresentados os perfis médios de temperaturas dos ensaios 3 e 4, estes foram realizados com temperatura fixada na camisa de aquecimento em 75 °C.

A Figura 6a apresenta o perfil de temperaturas utilizadas para os ensaios 1 e 2 com temperatura fixada em 50 °C (camisa de aquecimento).



**Figura 6.** Perfil médio de temperaturas na camisa de aquecimento e na cavidade interna do torrador nos ensaios do tratamento térmico após torração

Observa-se que nos ensaios 1 e 2 existe uma uniformidade nas temperaturas, tanto interna (cavidade) como na externa (camisa), utilizadas durante estes tratamentos térmicos, no entanto, no caso do tratamento 2, a partir do minuto 25, após um aumento de temperatura constante, esta tende à estabilização, continuando assim até o final do ensaio.

Na Figura 6b estão apresentados os perfis médios de temperaturas dos ensaios 3 e 4, estes foram realizados com temperatura fixada na camisa de aquecimento em 75 °C.

Como aconteceu nos ensaios anteriores (Figura 6a) o comportamento das temperaturas (camisa e cavidade) nos ensaios 3 e 4 foi uniforme e constante, no caso do ensaio 4, após um aumento constante de temperatura até os 33 primeiros minutos de tratamento, existe uma tendência à estabilização, permanecendo assim até o final do experimento.

A Figura 6c apresenta os perfis médios de temperatura dos ensaios 5, 6, 9, 10 e 11, sendo que os três últimos fazem parte dos pontos centrais do planejamento experimental.

Para complementar os dados, perfis médios de temperaturas (camisa e cavidade) utilizadas nos tratamentos térmicos, são apresentados na Figura 6d que contem os dados dos ensaios 7 e 8.

Acompanhando os perfis de temperatura (interna e externa) dos ensaios anteriores, a evolução das temperaturas nos ensaios 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 tem um comportamento similar não apresentando alterações bruscas no decorrer do experimento, é interessante observar que para os casos em que os ensaios ultrapassaram 30 minutos de tratamento existe uma tendência à estabilização da temperatura.

Após os ensaios realizados com os “nibs” de cacau, foram realizadas as análises para a quantificação das variáveis dependentes: ácido acético, açúcares redutores, grupo amino-terminal e sete compostos aromáticos (pirazinas).

Na Tabela 12 são apresentados os resultados das análises de ácido acético, açúcares redutores e grupo amino-terminal presentes nos “nibs” de cacau cru, torrado e também dos “nibs” tratados termicamente seguindo o planejamento experimental.

**Tabela 12.** Valores médios de ácido acético, açúcares redutores e grupo amino-terminal em “nibs” torrados e tratados termicamente.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ácido acético (g/100g)	Açúcares redutores (mg/g)	Grupo amino-terminal (mg/g)
1	20	50	0,86	2,14	20,65
2	90	50	0,77	1,81	18,06
3	20	75	0,84	2,00	19,34
4	90	75	0,73	1,96	18,39
5	5,5	62,5	0,88	1,90	19,86
6	104,5	62,5	0,74	1,88	17,60
7	55	44,8	0,88	1,86	17,68
8	55	80,8	0,75	1,77	18,07
9	55	62,5	0,79	2,05	19,42
10	55	62,5	0,81	2,06	19,58
11	55	62,5	0,80	2,03	20,15
Cru			0,97	2,91	24,14
Tornado	38	150	0,89	2,20	20,52

A influência das variáveis independentes (tempo e temperatura) sobre o teor de ácido acético, açúcares redutores e grupo amino-terminal dos 11 experimentos foi analisada estatisticamente através do ajuste de superfícies de resposta. Os resultados obtidos nesta análise estão apresentados na Tabela 13.

Como pode ser observado na Tabela 13, existe um efeito linear significativo ( $p < 0,05$ ) das variáveis tempo e temperatura sobre o teor de ácido acético. Os valores negativos dos parâmetros que representam os efeitos lineares de tempo e temperatura indicam que o aumento dessas variáveis, dentro das faixas estudadas neste trabalho, contribui para a diminuição do teor de ácido acético.

**Tabela 13.** Estimativa dos efeitos e coeficientes das regressões do conteúdo de ácido acético, açúcares redutores e grupo amino-terminal, em função do tempo e temperatura de tratamento térmico após torração.

Variáveis dependentes	Fator	Efeito	Coefficiente	Erro padrão	p
ác. acético	Int. principal <sup>1</sup>	0,80000	0,80000	0,00577	0,00005
	tempo (L)	-0,09949	-0,04974	0,00353	0,00501
	tempo (Q)	0,00375	0,00187	0,00420	0,69949
	Temperatura (L)	-0,06096	-0,03048	0,00353	0,01318
	Temperatura (Q)	0,00875	0,00437	0,00420	0,40768
	t x T	-0,01000	-0,00500	0,00500	0,42265
açúcares redutores	Int. principal <sup>1</sup>	2,04666	2,04666	0,00881	0,00001
	tempo (L)	-0,09957	-0,04978	0,00540	0,01156
	tempo (Q)	-0,09416	-0,04708	0,00642	0,01813
	Temperatura (L)	-0,02932	-0,01466	0,00540	0,11314
	Temperatura (Q)	-0,16916	-0,08458	0,00642	0,00572
	t x T	0,14500	0,07250	0,00763	0,01091
grupo amino-terminal	Int. principal <sup>1</sup>	19,7166	19,7166	0,22163	0,00012
	tempo (L)	-1,6840	-0,8420	0,13566	0,02498
	tempo (Q)	-0,5829	-0,2914	0,16147	0,21283
	Temperatura (L)	-0,1071	-0,0535	0,13566	0,73112
	Temperatura (Q)	-1,4379	-0,7189	0,16147	0,04691
	t x T	0,8200	0,4100	0,19185	0,16606

<sup>1</sup> Interação principal

L = Efeito linear

Q = Efeito quadrático

Observa-se na mesma tabela que os efeitos linear e quadrático da variável tempo e quadrático da temperatura tanto quanto a interação das duas têm uma influência significativa sobre a diminuição dos teores de açúcares redutores nos “nibs” de cacau. O efeito negativo sobre a variável dependente indica que um aumento das variáveis tempo e temperatura implicam em uma diminuição da concentração de açúcares redutores no “nib” de cacau.

Analisando o caso do grupo amino-terminal, pode-se observar que o efeito linear da variável tempo e o efeito quadrático da variável temperatura influem significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre a diminuição do grupo amino-terminal. Como acontece com os outros dois parâmetros estudados, o valor negativo do coeficiente indica que o aumento das variáveis (tempo e temperatura) contribui para a diminuição do grupo amino-terminal nos “nibs” de cacau.

REINECCIUS *et al* (1972) mostraram que a concentração total de açúcares redutores e de aminoácidos livres, em amêndoas de cacau, é reduzida durante a torração, as reações que envolvem estes componentes da amêndoa de cacau durante o aquecimento dão origem a compostos que fazem parte do sabor característico de chocolate. ADRIAN (1973) citou que a reação entre um açúcar redutor puro e o ácido glutâmico puro ou a fenilalanina pura, deu origem a um sabor de chocolate, e a reação entre um açúcar redutor puro e a valina deu origem a um sabor de chocolate açucarado.

Os resultados obtidos no tratamento térmico aplicado após a torração, sugerem que as reações estudadas por vários pesquisadores, continuam a acontecer mesmo em temperaturas menores às normalmente utilizadas no processo de torração. Com isso, compostos aromáticos desejáveis estariam sendo produzidos, enriquecendo a fração aromática do cacau, sem a necessidade de se utilizar temperaturas elevadas ou tempos muito longos, os que poderiam produzir compostos aromáticos, alterando o sabor característico de chocolate e comprometendo sua qualidade.

Excluindo os parâmetros não significativos ( $p > 0,05$ ) de cada modelo, novos modelos foram ajustados para cada uma das variáveis resposta. A Tabela 14 apresenta os novos modelos ajustados para cada resposta.

**Tabela 14.** Modelos ajustados para as respostas.

Respostas	Modelo	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
ácido acético	$1,034 - 0,001t - 0,002T$	0,92	0,210
açúcares redutores	$2,391 - 0,01t - 0,00002t^2 - 0,0001T^2 + 0,0002 t T$	0,64	0,018
grupo amino-terminal	$20,58 - 0,024t - 0,000067T^2$	0,83	0,260

<sup>1</sup> Valor p associado ao teste F para falta de ajuste

Observa-se na Tabela 14 que os modelos ajustados para o teor de ácido acético, açúcares redutores e grupo amino-terminal, apresentam coeficientes de determinação da regressão de 92, 64 e 83% respectivamente. Os coeficientes de regressão para os modelos preditivos de ácido acético e grupo amino-terminal

são bastante altos. No caso do coeficiente para o modelo preditivo de açúcares redutores, a falta de ajuste é significativa ( $p = 0,018$ ), isto pode ser devido a outros fatores não controlados, que influem no comportamento destes açúcares durante o aquecimento.

As superfícies de resposta ajustadas para o ácido acético, açúcares redutores e para o grupo amino-terminal, são apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9 respectivamente.

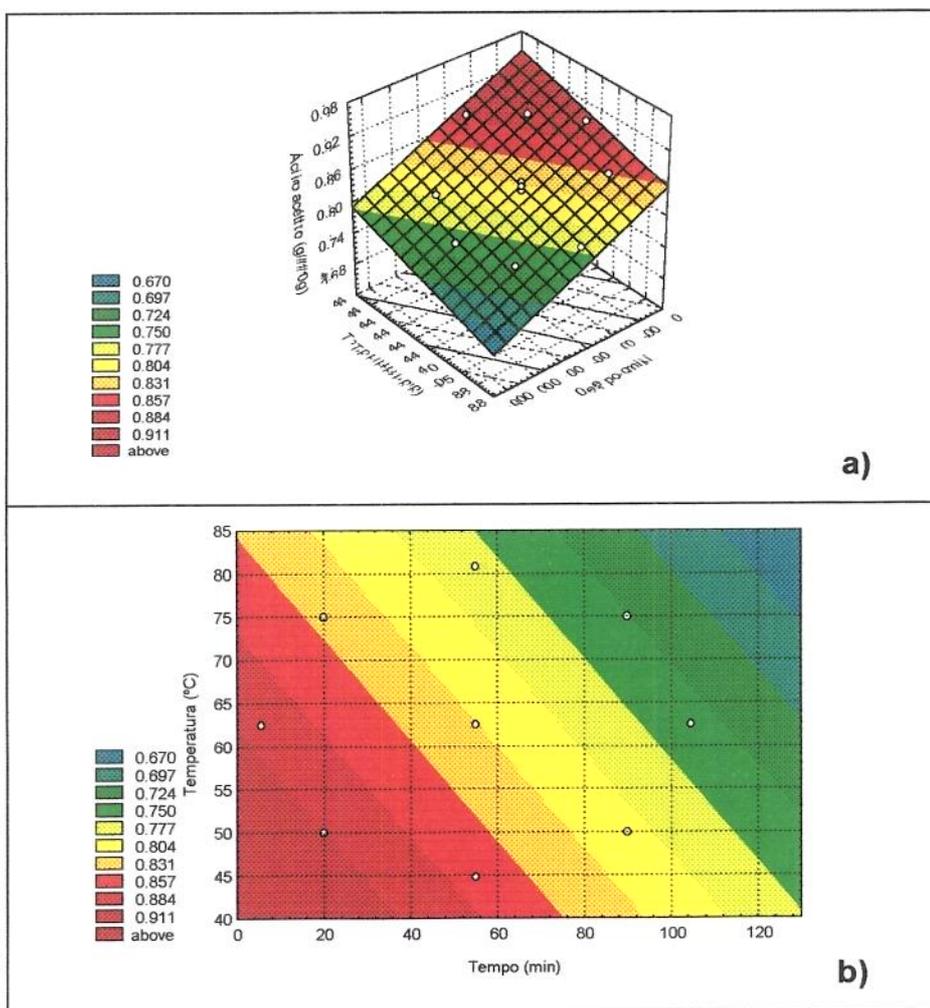


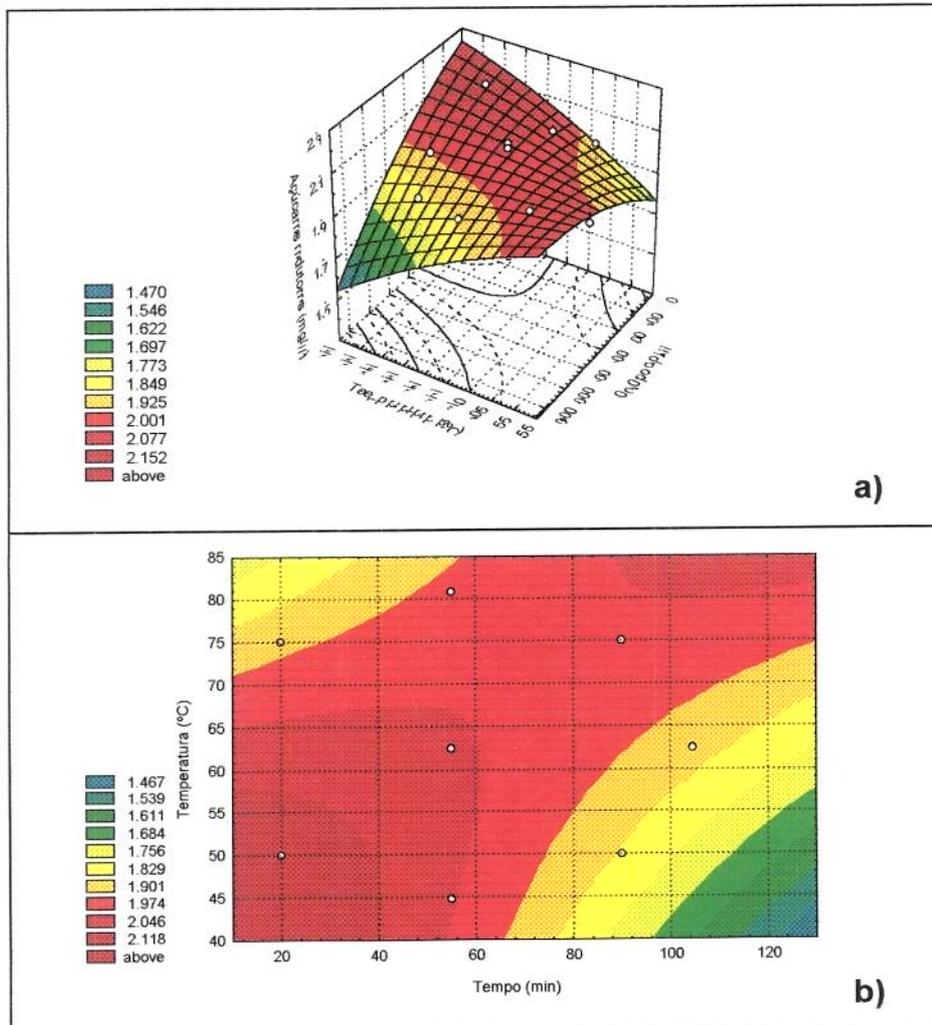
Figura 7. Superfície de resposta e gráfico de contorno para o ácido acético (g/100g), a) superfície de resposta, b) gráfico de contorno.

As perdas do ácido acético (Figura 7), nas condições do experimento, começam a se mostrar significativas a partir dos 40 minutos a 85 °C, onde se pode apreciar já uma perda de mais de 12% (0,10g). Se mantemos a temperatura a 85 °C e prolongamos o tempo por 95 min, a redução do ácido em questão atinge os 21% (0,18g) e ainda pode-se observar uma diminuição deste ácido de 25% (0,22g), quando são ultrapassados os 115 min de tratamento, tempo que não pode ser considerado demasiado prolongado, se pensamos nos longos tratamentos de conchagem que são realizados, entre outros objetivos, para reduzir este ácido e desenvolver o sabor.

Pode-se observar através da superfície de resposta correspondente ao resultado de ácido acético (Figura 7), que com temperaturas amenas de tratamento térmico adicional, entre 70 e 80 °C, faixa utilizada normalmente na operação de conchagem e tempos entre 62 e 85 min, é possível reduzir a concentração do ácido acético na ordem de 12 a 16% (0,10-0,14g). Deve-se ressaltar que na operação de conchagem do liquor de cacau as perdas do ácido acético relatadas são da ordem de 15% em 12 horas de operação (LEY, 1988)

Observando a Figura 8, é possível perceber que a partir dos 55 °C e 60 min de tratamento começa a se verificar uma diminuição significativa dos açúcares redutores de mais de 10% (0,22mg), a qual é intensificada consideravelmente quando o tempo de tratamento atinge 95 min, onde a redução de açúcares redutores chega a 17% (0,37mg). A diminuição de açúcares redutores, torna-se cada vez mais significativa na medida em que o tempo e/ou a temperatura são aumentados, atingindo uma diminuição de mais de 33% (0,72mg) no tratamento a 40 °C durante 115 min. Este consumo durante o tratamento térmico adicional é um indicador de que nessas condições a reação de Maillard se desenvolve ativamente, contribuindo com a formação de compostos responsáveis pelo sabor de chocolate, embora saibamos que nem todos os açúcares redutores e

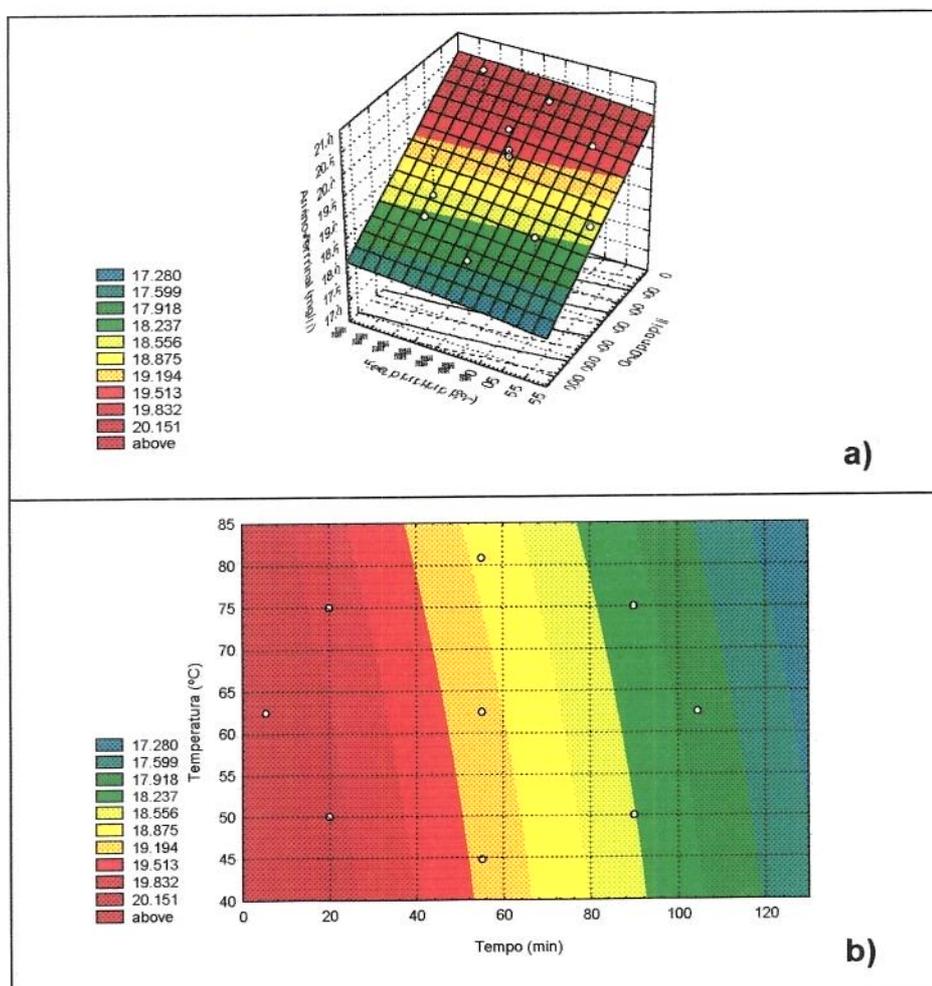
aminoácidos consumidos durante o tratamento térmico são utilizados nesta importante reação de escurecimento e de formação de compostos aromáticos.



**Figura 8.** Superfície de resposta e gráfico de contorno para os açúcares redutores (mg/g), **a)** superfície de resposta, **b)** gráfico de contorno.

A Figura 9 mostra que a partir dos 40 °C e 40 min de tratamento, pode ser percebida uma diminuição da fração amino-terminal já da ordem de 5% (1,02mg). Temperaturas entre 70 e 80 °C e tempos de 70 a 72 minutos resultam em uma diminuição de aproximadamente 10% (2,05mg). Mantendo-se a faixa entre 70 e 80 °C e aumentando o tempo da operação para 120 min, o decréscimo do grupo amino-terminal ultrapassa os 14% (2,87mg). No entanto é possível observar que a

temperatura tem pouca influência sobre a redução do grupo amino-terminal comparada com a influência exercida pelo tempo.

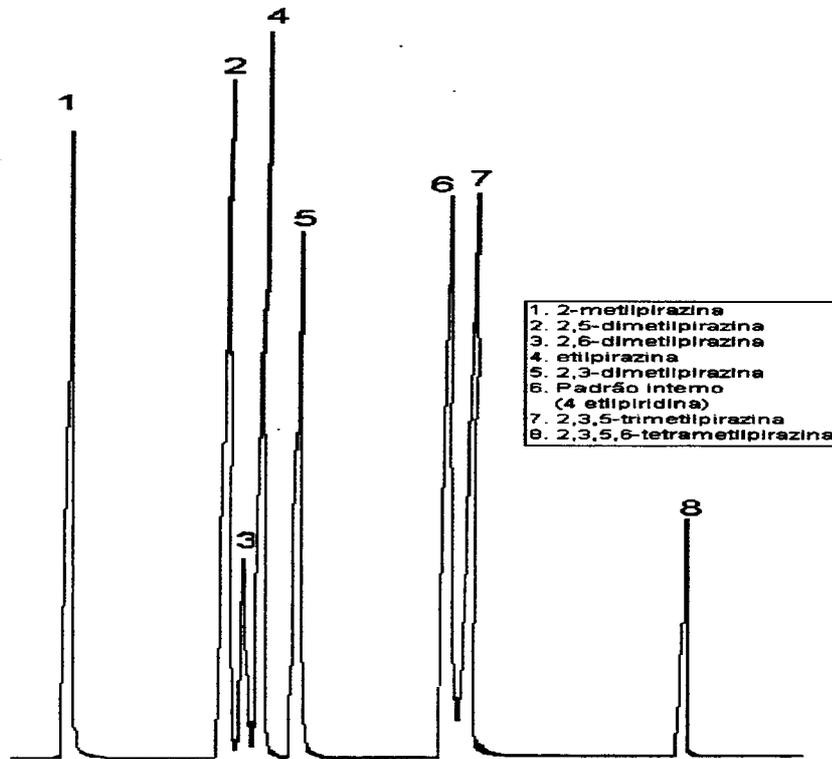


**Figura 9.** Superfície de resposta e gráfico de contorno para o grupo amino-terminal (mg/g), **a)** superfície de resposta, **b)** gráfico de contorno.

A Figura 10 ilustra o cromatograma obtido para a separação dos padrões das pirazinas estudadas na fração aromática, bem como do padrão interno, indicando a ordem de saída para cada um deles. A seguir a Figura 11 apresenta um cromatograma típico da fração aromática do cacau torrado a 150 °C por 38 minutos.

Os tempos médios de retenção obtidos foram: 9,42 min para a metil, 11,20 min para a 2,5-dimetil, 11,45 min para a 2,6-dimetil, 11,80 min para a etil, 11,96

min para a 2,3-dimetil, 13,89 min para o padrão interno, 14,17 min para a 2,3,5-trimetil e 16,23 min para a 2,3,5,6-tetrametilpirazina.

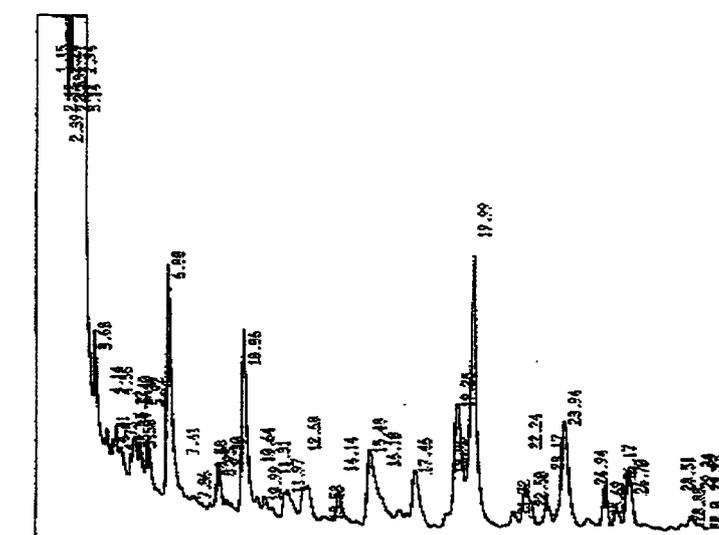


**Figura 10.** Cromatograma dos padrões de pirazinas e padrão interno

A Tabela 15 apresenta os valores médios obtidos das concentrações de pirazinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), nas amostras de cacau torrado e tratado termicamente.

**Tabela 15.** Valores médios das concentrações de pirazinas para as amostras de cacau torrado e tratado termicamente.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Alquilpirazinas (µg/kg de liquor)						
			Metil	2,5-di	2,6-di	etil	2,3-di	2,3,5-tri	2,3,5,6-tetra
1	20	50	256,56	1082,03	ND	102,28	201,11	1079,35	1194,67
2	90	50	769,86	2530,39	380,00	95,59	116,32	1328,13	3118,38
3	20	75	249,27	841,07	259,30	91,26	100,82	826,67	1309,81
4	90	75	639,20	1943,70	334,40	116,60	141,90	758,63	2455,73
5	5,5	62,5	572,57	2377,11	605,24	157,39	156,37	1715,52	2644,94
6	104,5	62,5	193,27	759,00	ND	ND	81,47	281,84	603,79
7	55	44,8	265,82	842,48	ND	127,05	434,38	1488,00	1401,16
8	55	80,8	400,84	1296,17	240,00	132,50	325,89	687,38	1452,87
9	55	62,5	334,99	1497,84	ND	111,21	209,34	1294,39	1242,80
10	55	62,5	448,80	1724,25	ND	120,13	154,80	928,20	1792,50
11	55	62,5	435,20	1421,20	ND	116,60	167,45	1507,34	1530,77
Torrado	38	150	409,05	799,02	282,96	309,24	193,00	2202,19	2274,97



É importante destacar aqui que o comportamento das pirazinas durante o aquecimento adicional do cacau após a torração não é estável nem preditivo. Outro ponto importante é o fato de que as concentrações da 2,6-dimetilpirazina, em alguns ensaios, não foram detectadas, este fato vem a ter uma influência marcante na análise dos resultados através da superfície de resposta. FADINI (1998) identificou um aumento na concentração da maioria das pirazinas junto com o tempo de torração, no entanto foram identificadas diminuições nas concentrações da 2,3,5-trimetil e 2,3,5,6-tetrametilpirazinas após um pico máximo de concentração, este declínio nas concentrações foi relacionado com os melhores atributos sensoriais em todos os casos, a análise sensorial mostrou que as melhores amostras obtidas não são aquelas que contêm o pico máximo obtido para a 2,3,5,6-tetrametilpirazina, mas sim aquelas onde a concentração deste composto aromático já está em declínio.

Foi interessante observar que a concentração de algumas pirazinas aumentou, em alguns ensaios, durante o tratamento térmico após torração. FADINI (1998) relatou que a concentração de pirazinas durante o processo de torração (150 °C) aumenta até um ponto máximo e depois sofrem uma diminuição atingindo concentrações adequadas desde o ponto de vista sensorial. Como o tratamento térmico após a torração foi realizado a temperaturas bem menores das utilizadas numa torração, uma análise sensorial se faz necessária para poder avaliar a influência desta variação nas concentrações das pirazinas durante este tratamento, acompanhando sempre a diminuição do teor de ácido acético.

Apesar de não ser possível a obtenção de uma equação preditiva para cada uma das pirazinas, é importante ressaltar que a partir dos dados obtidos e baseados nos dados apresentados por BAUERMEISTER (1981), a 2,3,5,6-tetrametilpirazina é considerada como uma boa indicadora do grau de torração. O fato de que se acompanhamos os resultados para a diminuição do teor de ácido

acético, e fixamos nossos tempos acima de 70 minutos e a temperatura em torno de 75 °C, teríamos as condições utilizadas no ensaio 4, ensaio no qual a concentração da tetrametilpirazina se vê praticamente inalterada com relação ao cacau torrado. Paralelamente, o comportamento das outras pirazinas, nestas condições, é muito variável, uma conclusão a respeito dos atributos sensoriais, do cacau, obtidos após o tratamento térmico só seria possível, como já foi mencionado, através de uma análise sensorial.

#### **5.4. Tratamento enzimático com PPO**

Através dos resultados da caracterização das amêndoas de cacau obtidos na prova de corte, foi verificado que a quantidade de amêndoas violetas, indicadoras de uma fermentação insuficiente, foi bastante elevada. BRACCO, 1969 citado por YOSHIYAMA & ITO (1996) relata que à medida que aumenta a fermentação das amêndoas do cacau, a concentração de flavan-3-óis diminui em relação à concentração de polifenóis totais e que essa proporção seria um indicador importante para mostrar o grau de fermentação. YOSHIYAMA & ITO (1996) determinaram que a concentração de flavan-3-óis em amêndoas bem fermentadas (marrons) é aproximadamente a metade da concentração em amêndoas pouco fermentadas (violetas).

A Tabela 16 apresenta os resultados da quantificação de fenóis totais em pó de cacau desengordurado obtido a partir de “nibs” de cacau tanto autoclavados como não autoclavados e com e sem tratamento enzimático.

A diminuição de fenóis totais no tratamento enzimático dos “nibs” não autoclavados chegou a 15% após 210 min, já no caso dos “nibs” autoclavados esta perda chegou a 24%. Estas porcentagens foram obtidas em relação a “nibs” não autoclavados e sem tratamento enzimático. Estes resultados são consistentes com os relatos de YOSHIYAMA & ITO (1996), no sentido de que a diminuição de

fenóis totais com o uso de PPO em “nibs” de cacau insuficientemente fermentados, atingiu valores em volta de 25%.

**Tabela 16.** Concentração de fenóis totais em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase

Tratamento enzimático (min)	Não Autoclavado (%)	Autoclavado (%)
sem enzima	26,45 ± 0,5	25,28 ± 0,5
30	25,75 <sub>a</sub> ± 0,4	24,94 <sub>a</sub> ± 0,4
60	24,54 <sub>b</sub> ± 0,3	24,17 <sub>a</sub> ± 0,4
90	23,21 <sub>c</sub> ± 0,5	23,66 <sub>ab</sub> ± 0,3
150	22,58 <sub>c</sub> ± 0,3	21,07 <sub>bc</sub> ± 0,4
210	22,34 <sub>c</sub> ± 0,3	19,87 <sub>c</sub> ± 0,4
360	20,80 <sub>d</sub> ± 0,4	20,24 <sub>c</sub> ± 0,3

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

A Tabela 17 apresenta os resultados da quantificação de taninos em pó desengordurado obtido a partir de “nibs” autoclavados e não autoclavados tratados enzimaticamente. Pode-se observar que a diminuição de taninos após 210 min de tratamento chegou a 15% no caso dos “nibs” não autoclavados e a 26% nos “nibs” autoclavados.

**Tabela 17.** Concentração de taninos em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase

Tratamento enzimático (min)	Não Autoclavado (%)	Autoclavado (%)
sem enzima	7,81 ± 0,2	7,26 ± 0,1
30	7,85 <sub>a</sub> ± 0,2	7,08 <sub>a</sub> ± 0,2
60	7,83 <sub>a</sub> ± 0,1	6,47 <sub>ab</sub> ± 0,2
90	7,47 <sub>ab</sub> ± 0,2	6,23 <sub>bc</sub> ± 0,1
150	6,64 <sub>bc</sub> ± 0,2	6,08 <sub>bcd</sub> ± 0,1
210	6,59 <sub>bc</sub> ± 0,1	5,71 <sub>cd</sub> ± 0,2
360	6,23 <sub>c</sub> ± 0,2	5,39 <sub>d</sub> ± 0,1

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

Observa-se na Tabela 18, que apresenta os resultados da quantificação de flavan-3-óis em pó desengordurado obtido a partir de “nibs” autoclavados e não autoclavados tratados enzimaticamente, que a perda de flavan-3-óis após 210

min de tratamento chegou a 10% no caso dos “nibs” não autoclavados e a 23% nos “nibs” autoclavados.

A autoclavagem aqui, como em todos os outros tratamentos, teve uma influência positiva no que diz respeito à ação da enzima, aumentando consideravelmente a diminuição dos compostos polifenólicos.

Os resultados apresentados na Tabela 18 diferem dos resultados relatados por YOSHIYAMA & ITO (1996), que obtiveram uma redução na ordem de 55%. Essa diferença, com nossos resultados, pode ser atribuída às condições de processo e mesmo à origem da PPO utilizada.

Na Tabela 19 pode-se observar os resultados da quantificação de antocianidinas realizada em pó desengordurado que fora obtido a partir de “nibs” autoclavados e não autoclavados tratados enzimaticamente.

Novamente a diminuição dos compostos polifenólicos em “nibs” autoclavados foi maior comparada com a diminuição em “nibs” não autoclavados, contudo a diminuição dos compostos polifenólicos foi significativa nos dois tratamentos.

**Tabela 18.** Concentração de flavan-3-óis em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase

Tratamento enzimático (min)	Não Autoclavado (%)	Autoclavado (%)
sem enzima	23,16 ± 0,3	23,28 ± 0,4
30	23,10 <sub>a</sub> ± 0,3	19,71 <sub>a</sub> ± 0,3
150	22,47 <sub>a</sub> ± 0,3	20,59 <sub>a</sub> ± 0,3
210	20,80 <sub>a</sub> ± 0,4	17,75 <sub>a</sub> ± 0,4
360	18,39 <sub>a</sub> ± 0,2	16,02 <sub>a</sub> ± 0,2

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

A diminuição de antocianidinas após 210 min de tratamento chegou, no caso dos “nibs” não autoclavados, a 18% e a 51% nos “nibs” autoclavados. Como aconteceu com os resultados encontrados para a redução de fenóis totais, os resultados na diminuição de antocianidinas são próximos dos dados relatados por YOSHIYAMA & ITO (1996). Estes pesquisadores determinaram que após o tratamento enzimático com PPO, o teor de redução das antocianidinas em pó de cacau pouco fermentado, ficou em torno de 55%, e que foi o mais alto comparado com os outros polifenóis. Após observar a redução destes compostos (antocianidinas), durante o tratamento enzimático e baseados nos relatos de HANCOCK (1988) e GOLDSTEIN (1963), que relacionam a redução de antocianidinas e taninos com uma diminuição da adstringência no cacau, é possível sugerir que esta diminuição tem uma relação direta com uma queda na adstringência característica de amêndoas pouco fermentadas (violetas). Esta diminuição foi levantada por alguns provadores durante a análise sensorial realizada com o produto tratado enzimaticamente.

QUESNEL, 1968 citado por YOSHIYAMA & ITO (1996) relatou que entre os polifenóis encontrados nas amêndoas cruas não fermentadas, o dímero de proantocianidina e o polímero (fração III) possuem uma forte adstringência, sugerindo que estes elementos complexos permanecem em amêndoas insuficientemente fermentadas sem sofrer oxidação durante os primeiros dias da fermentação. FORSYTH, (1952), explica também que a quantidade de polifenóis contidos nas amêndoas insuficientemente fermentadas é grande como resultado da falta de polimerização oxidativa normal, durante os primeiros dias do processo de fermentação.

**Tabela 19.** Quantificação de antocianidinas em pó de cacau desengordurado, tratado com polifenoloxidase

Tratamento enzimático (min)	Não Autoclavado <sup>1</sup> (%)	Autoclavado <sup>1</sup> (%)
sem enzima	2,12 ± 0,1	1,83 ± 0,1
30	1,88 <sub>a</sub> ± 0,1	1,61 <sub>a</sub> ± 0,2
60	1,87 <sub>a</sub> ± 0,1	1,48 <sub>ab</sub> ± 0,1
90	1,73 <sub>b</sub> ± 0,2	1,40 <sub>ab</sub> ± 0,1
150	1,72 <sub>b</sub> ± 0,1	1,21 <sub>bc</sub> ± 0,2
210	1,73 <sub>b</sub> ± 0,2	1,02 <sub>c</sub> ± 0,1
360 {6}	1,63 <sub>c</sub> ± 0,2	1,03 <sub>c</sub> ± 0,1

<sup>1</sup> Valores obtidos na leitura de absorvâncias, (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).

Além da diminuição dos compostos polifenólicos, observou-se que os “nibs” de cacau após o tratamento enzimático, sofreram uma mudança notável para a cor marrom acompanhando o andamento da reação.

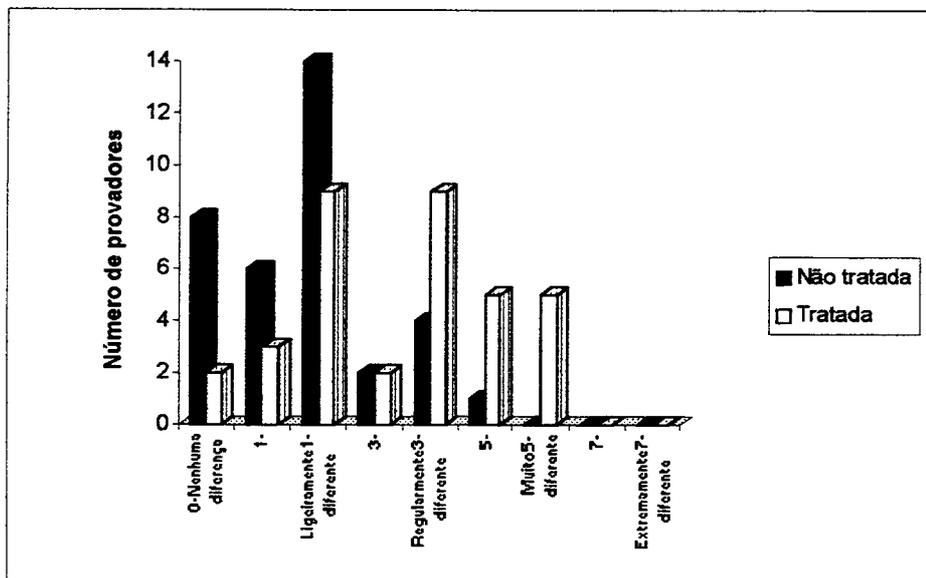
Após o tratamento enzimático realizado nos “nibs” de cacau é possível observar, de uma maneira geral, que as concentrações de fenóis totais, taninos, flavan-3-óis e de antocianidinas diminuem consideravelmente com a ação da enzima polifenoloxidase, contudo não existiu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no resultado após 210 min no tratamento de “nibs” autoclavados.

#### 5.4.1. Análise sensorial

Com base nos resultados das análises realizadas após o tratamento enzimático, foi conduzida uma análise sensorial (teste de aceitação) com um produto formulado (chocolate amargo) com a amostra que apresentou a maior diminuição dos compostos fenólicos (autoclavada e 210 min de tratamento), o objetivo desta análise foi avaliar a influência da diminuição destes compostos no sabor do cacau.

As amostras submetidas ao teste “diferença do controle” com uma equipe de 35 provadores não treinados apresentaram diferença na avaliação sensorial

(Figura 12), os dados obtidos no teste foram analisados estatisticamente e apontaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as duas amostras.



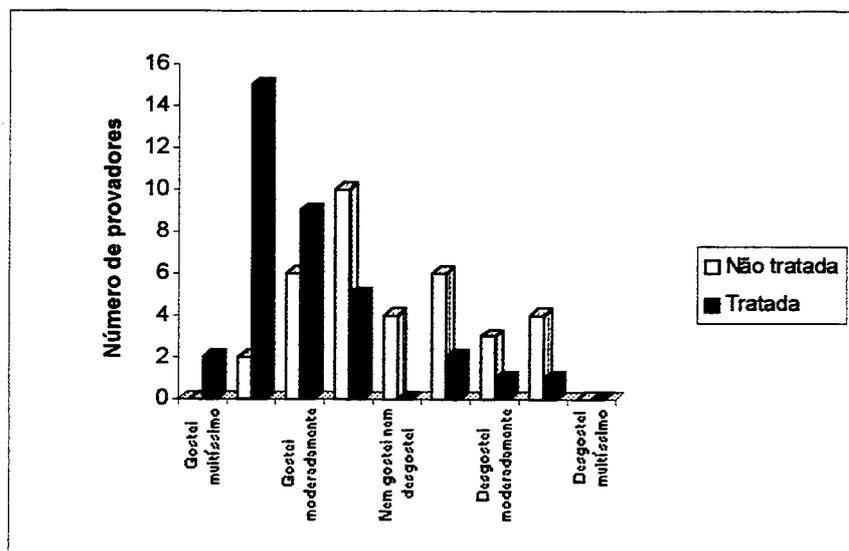
**Figura 12.** Histograma referente aos resultados do teste “diferença do controle”

A amostra tratada enzimaticamente submetida ao teste de aceitação com uma equipe de 35 provadores não treinados apresentou melhores características de sabor, comparada com a amostra não tratada, observando a Tabela 20, verifica-se que no teste sensorial houve diferença entre as amostras. Isto significa que o tratamento enzimático aplicado, alterou as propriedades sensoriais das amostras. Essa alteração sensorial foi percebida de modo significativo pelos provadores, existindo diferença a nível de 5% na avaliação hedônica para o sabor.

A Figura 13 apresenta o histograma de avaliação, quanto ao sabor, dos produtos obtidos a partir dos “nibs” de cacau tratados e não tratados enzimaticamente.

**Tabela 20.** Média das notas da avaliação hedônica, quanto ao sabor das amostras tratada e não tratada

Amostra	Avaliação do sabor
Não tratada	5,11
Tratada	6,97



**Figura 13.** Histograma da avaliação quanto ao sabor do produto obtido de “nibs” tratados e não tratados enzimaticamente

Pode-se observar na Figura 13, que a maioria dos provadores deram notas entre 6 e 9 para a amostra de “chocolate amargo” produzida a partir de “nibs” de cacau autoclavados e tratados enzimaticamente, caracterizando-o com uma aceitação muito boa.

Segundo os comentários anotados na ficha de avaliação, vários provadores (65%) apontaram que o produto tratado apresentou sabor menos agressivo comparado com o produto não tratado, outros comentários fizeram referência ao sabor acentuado e característico de chocolate, alguns provadores (30%) indicaram diferenças em termos de adstringência e amargor entre as duas amostras.

## 6. CONCLUSÕES

Considerando os dados aqui apresentados sobre “nibs” de cacau tratados térmica e enzimaticamente com o objetivo de melhorar o seu sabor, podem ser extraídas as seguintes conclusões:

É possível obter uma diminuição significativa do teor de ácido acético presente nos “nibs” de cacau, através do tratamento térmico após torração, na faixa de 62 a 85 minutos de tratamento com temperaturas, na camisa de aquecimento, na faixa de 70 e 80 °C.

Existe uma diminuição significativa do teor de açúcares redutores durante o tratamento térmico após torração acima de 75 °C para tempos de tratamento curtos (10-15 min) e em volta de 50 °C para tempos maiores de tratamento (acima de 85 min).

A concentração do grupo amino-terminal tem uma diminuição significativa durante o tratamento térmico após torração a temperaturas acima dos 45 °C e tempos em volta de 80 minutos, no entanto é possível observar que a temperatura tem pouca influência sobre a redução do grupo amino-terminal, já o tempo tem uma influência maior a respeito da mencionada redução.

O comportamento dos compostos aromáticos (pirazinas) foi analisado através de superfície de resposta não se obtendo equações preditivas significativas. A falta de ajuste do experimento foi muito grande e o  $R^2$  muito baixo. Esta falta de ajuste pode ter ocorrido devido a fatores desconhecidos que interferem durante o tratamento térmico adicional, realizado após a torração.

Uma redução significativa dos compostos fenólicos, presentes no cacau insuficientemente fermentado, pode ser obtida com o uso da enzima

polifenoloxidase. O tratamento enzimático em “nibs” autoclavados, resultou na alteração do sabor do cacau insuficientemente fermentado, diminuindo a adstringência e o amargor, essa alteração sensorial foi percebida de modo significativo pelos provadores, existindo diferença a nível de 5% na avaliação hedônica para o sabor entre a amostra tratada e a não tratada.

A autoclavagem dos “nibs” permitiu uma maior eficiência da enzima polifenoloxidase.

Obteve-se uma redução significativa dos teores de antocianidinas em “nibs” autoclavados e tratados enzimaticamente, onde conseqüentemente a cor violeta característica da pigmentação destas antocianidinas diminuiu, dando lugar a cor marrom característica de um cacau bem fermentado.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Realizar estudos onde todas as combinações dos níveis de tempo e temperatura sejam observadas (fatorial completo). Isso permitirá investigar de forma mais clara as possíveis interações entre tempo e temperatura no comportamento dos compostos aromáticos (pirazinas) durante o tratamento térmico após a torração.

Realizar uma análise sensorial para poder avaliar a influência do tratamento térmico após torração no sabor do produto.

Estudar a eficiência de enzimas (PPO) de diferentes origens.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAN, J. La réaction de Maillard vue sous l'angle nutritionnel. IV.- Arômes engendrés par la réaction de Maillard. **Industries - Alimentaries - et - Agricoles**, 90 (5), p. 559-564, 1973.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**: edited Ig W. Horwitz 13. ed. Washington, 1984, 850p.

BAREL, M.; GUYOT, B.; VINCENT, J. C. Les fractions protéiques du cacao avant et après torréfaction. Influence de la fermentation. **Café, Cacao Thé**. (27): 127-144, 1983.

BAREL, M.; LEON, D.; VICENT, J. C. Influence du temps de fermentation du cacao sur la production des pyrazines du chocolat. **Café, Cacao, Thé**. (29): 277-286, 1985.

BARROS, N. B.; SCARMINIO, S. I.; BRUNS, E. R. **Planejamento e otimização de experimentos**; Ed. Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, 1995. 299p.

BARTOLOMÉ, B.; JIMÉNEZ-RAMSEY, L. M.; BUTLER, L. G. Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. **Food Chem.**, 53 (4), 357-362, 1995

BAUERMEISTER, P. Cocoa liquor roasting. **The Manufacture Confectionary** (10): 43-45.1981.

- BECKETT, S.T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**; Trad. de Mariano González Alonso. 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 432p.
- BELITZ & GROSCH **Química de los alimentos**; 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1988, 813p.
- BERTINI, A. Torrefacción del licor de cacao. **Alimentaria**. 26 (204), 33- 39, 1989.
- BRADEAU, J. **El cacao: técnicas agrícolas y producciones tropicales**. Barcelona:Blume, 1970. 297p.
- CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. Monosacharides. In carbohydrate analysis. **A Practical Approach**. IRL Press, Oxford. 1986, 228p.
- CHURCH, F. C.; POSTER, D. H.; CATIGNANI, G. L. & SWAISGOOD, H. E. An  $\alpha$ -phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. **Analytical Biochemistry**, 1985, 146, 343-348.
- CONSELHO NACIONAL DO COMÉRCIO EXTERIOR (BRASIL) Resolução nº 42. Rio de Janeiro. 1968. 9p.
- CROSS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT J. C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. **Café Cacao Thé**. 16(2), 109-113, 1982.
- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. **Journal Science Food Agriculture**. (8), 505-509, 1957.
- FORSYTH, W. G. C. Cacao polyphenolic substances. 2. Changes during fermentation. **Biochem. J.** (51): 516-520, 1952.

- HAGERMAN, A. E.; BUTLHER, 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, 1988. p. 9-32.
- HANSEN, C. E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. **J. Sci. Food Agric.** (77): 273-281, 1988.
- HOLDEN, M. Processing of raw cocoa. III– Enzymic aspects of cocoa fermentation. **J. Sci. Food Agric.** (10): 691-700, 1959.
- HOSKIN, J.C; DIMICK, P.S. **Fabricación y utilización industrial del chocolate:** Química del desarrollo del sabor en el chocolate. 1.ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1988. p. 121-136.
- JEANJEAN, C. E. Qualité du cacao, influence de la fermentation et du séchage. **Plantations, recherche, developpement.** Maio-Junho 1995.
- KIRCHHOFF, P. M.; BIEHL, CRONE, G. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. **Food Chemistry.** London, (31): 295-311, 1989.
- LARA, W.; NAZÁRIO, G.; WOHLERS, M.E.; PREGNOLATTO, W.; REBOCHO, D. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz:** Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.ed. São Paulo, 1976. Volume 1.

- LEY, D. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**; Conchado. 1.ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1988. p. 137-157
- LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V.C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavor. **Journal Science Food Agriculture**. 24(3), 319-324,1973.
- LOPEZ, A.S. & McDONALD, C.R. A definition of descriptors to be used for the qualification of chocolate flavors in organoleptic testing. **Theobroma**. 11(3),209-217, 1981.
- LOPEZ, A. S. F.; McDONALD, C. R. Preliminary test of a simple and inexpensive system for the mechanical aeration of boxtype cacao fermentation. **Theobroma**. 12(2): 57-83, 1982.
- LOPEZ, A. S. F. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. **Theobroma**. 13(3): 233-248, 1983.
- 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. Considerações sobre o beneficiamento do cacau na Bahia. **Cacau Atualidades**. 8(4),12-15, 1971.
- MARTIN, J. R. A. **Chocolate**. Academic Press Inc., 1987. 132p.
- MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa, and confectionery: science and technology**. 3. ed. New York: An AVI Book published by Van Nostrand Reinhold, 1989. 904p.

- MINSON, E. Chocolate manufacture-beans through liquor production. **The Manufacturing Confectioner**. 61-67, 1992.
- MOTODA, S. Formation of aldehydes from amino acids by polyphenol oxidase. **J. Ferment. Technol.** 57(5), 395-399, 1979.
- 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 cacao fermentation in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**. 49 (6):14070-4, 1984.
- PEZOA, G. N. H. **Contribution a l'étude d'un capteur por controlar en continu le procédé de torrefaction**. 1989. 170p. These (Docteur) - Université de Technologie de Compiègne, France.
- 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
- QUESNEL, V. C. Agents inducing the death of cacao seed during fermentation. **Journal Science Food Agriculture**. (16):441-447,1965.

- REEVES, S. G.; MCDOWELL, I.; BEHN, K.; DENCH, J. Biochemical Studies of Cocoa Bean o-diphenol O<sub>2</sub> Oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chemistry**. 290-219, 1988.
- REINECCIUS, G. A.; KENNY, P. G.; WEISSBERGER, W. Factors affecting the concentration of pirazines in cocoa beans. **Journal Agriculture Food Chemistry**. 20(2): 202-206, 1972.
- ROBINSON, D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**; 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1991, 516p.
- ROHAM, T. A. Processing of raw cocoa. I small-scale fermentation. **Journal Science Food Agriculture**. (9):104-111, 1958.
- ROHAM, T. A. The precursors of chocolate aroma: comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. **Journal Food Science**. 29(4):456-459, 1964.
- ROELOFSEN, P. A. Fermentation drying and storage of cocoa beans. **Advances in Food Research**. 226-229, 1958.
- SHAUGHNESSY, W. J. Cocoa beans- planting through fermentation- its effect on flavor. **The Manufacturing Confectioner**. (11): 51-58, 1992.
- SHIBAMOTO, T. Occurrence of mutagenic products in browning model systems. **Food Technology**. (3):.59-62, 1982.
- SILWAR, R. R. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of cocoa flavor, quantitative determination of steam volatile aroma constituents. **Café, Cacao, Thé**. 32(3): 243-250, 1988.

- VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*)**. Campinas, 1999. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- VILLENEUVE, F.; CROS, E.; MACHEIX, J. J. Effet de la Fermentation sur les activités peroxydasiques et polyphénoloxydasiques de la fève de cacao. **Café Cacao Thé**. (24): 113-120, 1985.
- WILSKA-JESZKA, J.; KORZUCHOWSKA, A. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation- influence on the colour of strawberry and chokeberry juices. **Zlebensm Unters Forsch**. (203): 38-42, 1996.
- 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.
- WOOD, G.A.R. **From harvest to store**. In: Wood, Gar & Lass, R.A. *Cocoa*. 4.ed, New York, Longman Scientific & Technical, 1989, p. 444-504.
- ZAMALLOA, W.A.C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no Estado de São Paulo**. Campinas, 1994. 111p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.