

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

ESTUDO DO VALOR NUTRITIVO E DA FRAÇÃO ALBUMINA DOS
EXTRATOS DE PROTEÍNA SOLÚVEL DE AMÊNDOAS DE CACAU
(*Theobroma cacao* L) EM FUNÇÃO DO GRAU DE TORRAÇÃO

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

Luis Alberto Abecia Soria
Engenheiro de Alimentos

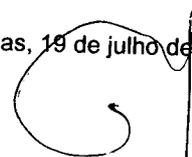
Dr. Nelson Horacio Pezoa Garcia
Orientador

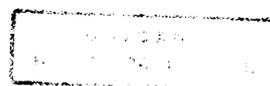
Campinas, julho de 1999

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Luis Alberto Abecia Soria aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de julho de 1999.

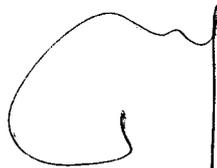
Campinas, 19 de julho de 1999


Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa
Garcia
Presidente da Banca

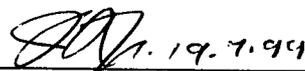


672516

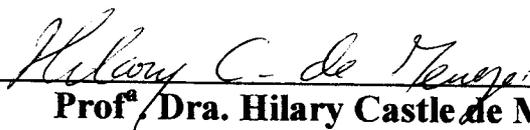
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa Garcia
(orientador)



Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
(miembro)



Prof^a. Dra. Hilary Castle de Menezes
(miembro)

Prof^a. Dra. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix
(miembro)

Campinas, julho de 1999

**À minha mãe Cristina (in
memoriam), com muito amor e
saúde.**

AGRADECIMENTOS

A DEUS

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

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán, pela colaboração, amizade e pelas importantes sugestões dadas na fase de execução e correção da tese.

À Prf^a. Dra. Hilary Castle de Menezes, pela colaboração e pelas sugestões dadas na fase de correção da tese.

À Sandra, pelo amor, carinho e pelo companheirismo constante.

Ao meu pai, Carlos, pelo apoio e incentivo em todo momento.

Ao Edy e Bel, pela amizade, alegria e inúmeras caronas, muito obrigado.

Ao Randolpho e Carla, pelo apoio, amizade e ajuda na impressão da tese.

Ao Marcus, pela amizade e apoio muito obrigado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP pelos projetos de infra-estrutura nos Dptos. de Tecnologia de Alimentos e Planejamento Alimentar & Nutrição da FEA.

À Aninha, pela paciência, ajuda, amizade e carinho.

Ao Waldeci, pela prontidão, amizade e criatividade.

À Maria Lúcia Tucci, pela gentileza e pela ajuda.

Às técnicas do Departamento de Nutrição - DEPAN, D. Carla, D Eliete e D. Soely pela ajuda e prontidão.

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

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

Ao Geraldo, pela amizade e pela ajuda.

Ao Walter, pelo apoio e amizade.

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

À ROCHE pela doação das vitaminas utilizadas no ensaio biológico.

À Refinações de Milho Brasil pela doação do amido de milho e amido de milho dextrinizado, utilizados no ensaio biológico.

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

Luis Abecia Soria

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMO	IV
SUMARY	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Generalidades sobre o cacau	7
3.2. Aspectos nutricionais do cacau	11
3.2.1. Lipídeos	11
3.2.2. Carboidratos	15
3.2.3. Proteínas	16
3.2.3.1 Efeitos na saúde e fatores antinutricionais do cacau	35
3.2.3.2. Frações protéicas do cacau	43
3.2.3.3. Reação de Maillard	44
3.3. Etapas do processamento do cacau	48
3.3.1. Pré-processamento	48
3.3.2. Colheita e quebra do fruto	49
3.3.3. Fermentação das sementes	50
3.3.4. Secagem das amêndoas	52
3.3.5. Torração das amêndoas	53
3.4. Avaliação nutricional dos alimentos	55

4. MATERIALE MÉTODOS	57
4.1. Material	57
4.1.1. Matéria prima	57
4.1.2. Vidraria, equipamentos e aparelhos utilizados.....	57
4.1.3. Animais utilizados no ensaio biológico	58
4.1.4. Reagentes.....	58
4.1.5. Caracterização da matéria prima (amêndoas)	59
4.2. Métodos.....	60
4.2.1 Processamento da matéria-prima.....	60
4.2.1.1. Preparo dos <i>nibs</i>	60
4.2.1.2. Análise das características fisico-químicas dos <i>nibs</i>	60
4.2.1.3. Torração dos <i>nibs</i> de cacau.....	61
4.2.1.4. Obtenção dos flocos de Cacau.....	61
4.2.1.5. Extração da gordura dos flocos de Cacau	61
4.2.1.6. Determinação das curvas de solubilidade (INS).....	62
4.2.1.7. Obtenção dos concentrados protéicos	62
4.2.2 Preparo das amostras para a determinação do perfil de aminoácidos	63
4.2.2.1 Determinação do perfil de aminoácidos.....	64
4.2.3 Preparo das amostras para a determinação da fração albumina	65
4.2.3.1. Determinação da fração albumina	65
4.2.4. Ensaio biológico	66
4.2.4.1. Preparo dos animais	66

4.2.4.2. Preparo das dietas.....	66
4.2.4.3. Teste aplicado	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1. Caracterização de matéria prima.....	69
5.1.1. Teste de corte.....	69
5.1.2. Análise físico-químicas dos <i>nibs</i> de cacau.....	70
5.2. Torração	73
5.3. Extração das proteínas	74
5.4. Fração albumina	87
5.5. Análise aminoacídica.....	88
5.6. Ensaio biológico	105
6. CONCLUSÕES	117
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	119
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

ÍNDICE DE TABELAS

1. Composição química média das amêndoas de cacau, expressa em relação à matéria seca	9
2. Constituintes nutricionais dos produtos de cacau e leite em pó.....	13
3 Efeito da Torração sobre a composição da fração de açúcares de amêndoas não fermentadas de Sanchez e de amêndoas bem fermentadas de Ghana.....	17
4. Composição centesimal em base seca aproximada de amêndoas de cacau fermentadas durante diferentes períodos de tempo	21
5. Perda de aminoácidos livres durante a torração, à 150 °C, por 30 minutos, das amêndoas bem fermentadas provenientes de Ghana e das amêndoas não fermentadas provenientes de Sanchez (República Dominicana).....	23
6. Composição em aminoácidos das amêndoas de cacau.....	27
7. Composição em aminoácidos da torta de cacau desengordurada proveniente de três variedades do Sudeste da Nigéria (g/16g N)	29
8. Mudança no conteúdo de aminoácidos de amêndoas de cacau durante fermentação em Bandeja e em Montes	31
9. Valor nutritivo do leite e do leite com chocolate, nutrientes contidos em 8 oz.....	33
10. Níveis de HCN, oxalato e teobromina em amêndoas fermentadas durante diferentes períodos de tempo	37
11. Atividade inibidora (<i>in vitro</i>) da proteína de 21 kDa proveniente da semente de cacau (fresca), em distintos substratos.	41
12. Mudanças na solubilidade das frações protéicas durante a fermentação.	45

13. Mudanças na solubilidade das frações protéicas durante a torração.....	45
14. Mudanças na solubilidade das frações protéicas durante a conchagem.	45
15. Resultados da prova de corte (100 amêndoas).....	71
16. Composição química dos <i>nibs</i> de cacau.	71
17. Composição física da amêndoa integral de cacau.....	71
18. Índice de nitrogênio solúvel em função do pH do cacau fermentado, seco e desengordurado.	77
19. Extensão da recuperação de proteína nos diferentes tempos de torração estudados.	83
20. Porcentagens em base seca da fração albumina presente nos concentrados protéicos de cacau tratado termicamente.....	89
21. Composição em aminoácidos dos concentrados protéicos em função do tempo de torração.....	93
22. Composição das dietas utilizadas para o experimento em cada um dos 8 grupos de ratos.	107
23. Variação dos pesos médios dos grupos de ratos alimentados com proteína de cacau durante duas semanas.	109
24. Valores de NPR e RNPR das dietas em estudo e NPR da dieta controle (Caseína como fonte de proteína).....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Perfil de valores médios de temperatura na camisa de aquecimento e dentro da cavidade do forno elétrico rotativo, durante a torração dos <i>nibs</i> de cacau.....	75
2. Solubilidade do nitrogênio da farinha desengordurada de cacau cru em função do pH de extração.....	79
3. Teores de proteína recuperada no concentrado protéico em relação à proteína inicial no pó de cacau, torrado em diferentes tempos, e teores de proteína nos concentrados obtidos e utilizados no ensaio biológico.....	85
4. Variação gráfica da porcentagem da fração albumina nos concentrados protéicos de cacau tratados termicamente por diferentes tempos.....	91
5. Evolução das concentrações dos três aminoácidos que mostraram taxas de perdas mais constantes nos concentrados protéicos durante a torração de cacau.....	97
6. Concentrações de alguns aminoácidos que têm tendência à estabilização depois dos 42 minutos de tratamento.....	99
7. Concentrações de aminoácidos susceptíveis à oxidação durante o tratamento térmico.....	103
8. Evolução ponderal dos ratos submetidos às dietas com fontes protéicas provenientes do cacau torrado em diferentes tempos e dietas controle (caseína e aprotéica).....	111

RESUMO

A determinação do tempo de torração do cacau tem sido baseada tradicionalmente nos atributos de sabor e aroma do produto final. Contudo, a contribuição das proteínas do cacau torrado ao valor nutricional do chocolate é um fator que tem recebido pouca atenção. O objetivo do presente trabalho foi aprofundar o estudo de observações obtidas neste laboratório que contestam a noção de que as proteínas de cacau torrado não possuem valor nutricional. Para tal objetivo, o cacau foi torrado na forma de *nibs* por diferentes tempos, foram obtidos os concentrados protéicos de cada tratamento, para depois serem parcialmente caracterizados e utilizados como fonte de proteína em dietas para ratos. 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 0, 30, 34, 38, 42 e 46 min, moídos e desengordurados com hexano. Os pós de cacau foram suspensos (pH 9,5), os precipitados descartados e os sobrenadantes precipitados (pH 4,5). Após liofilização, os precipitados continham 61,2; 58,3; 57,6; 57,8; 48,4 e 46,0% de proteína, respectivamente. Para a identificação e quantificação da fração albumina, alíquotas dos concentrados foram dissolvidos em água desionizada (10 mg.ml⁻¹, pH 9,0), filtrados (0,22 µm) e analisados através de eletroforese capilar. Amostras filtradas foram injetadas (50 mBar, 4 segundos) em eletroforetógrafo Hewlett-Packard 3D, equipado com capilar de sílica fundida (72 cm, 75 µm diâmetro interno, 25 kV; tampão de borato 50 mM, pH 9,5) e os perfis eletroforéticos foram comparados com padrão de BSA (Bovine Serum Albumin). Todas as concentrações de albumina presentes nos concentrados

foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre si, uma diminuição cíclica da concentração da fração albumina nos concentrados protéicos de cacau foi observada a partir de tempos mais curtos de torração (inclusive o zero) até o tempos maiores. Os teores de albumina encontrados foram de 35,7; 45,4; 34,3 e 40,7% respectivamente para os tempos mais curtos de torração. Por sua vez, as concentrações de albumina nos concentrados tratados por tempos mais longos resultaram em diminuição mais acentuada (28,3 e 18,1% para 42 e 46 min respectivamente). Para a segunda parte do estudo, o valor nutricional das proteínas de cacau torrado por diferentes tempos foi analisado usando os concentrados protéicos como única fonte de proteína em dietas para ratos. Dietas (AIN 93-G) contendo 10% de proteína (cacau) foram preparadas e administradas a ratos machos da raça Wistar, sob condições ambientais apropriadas, durante 14 dias. Os valores de RNPR% (*Net Protein Ratio Relative*) obtidos, apontaram um decréscimo inversamente proporcional ao tempo de torração (70,4; 68,7; 68,3; 66,1; 50,8 e 48,8%, respectivamente). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas entre os tempos 0 e 38 ou maiores. Por outro lado, entre as amostras 42 e 46 min não houve diferença significativa. Na análise de aminoácidos dos concentrados protéicos observou-se que principalmente a lisina, valina e treonina tiveram perdas significativas a partir dos primeiros minutos de aquecimento. Conclui-se que enquanto pequenas mudanças ocorrem na extratabilidade das proteínas do cacau torrado a 150 °C, entre os 30 e 38 min, nenhuma perda significativa de valor nutritivo foi registrada até os tempos considerados ótimos do ponto de vista sensorial.

SUMMARY

Optimal roasting time for cocoa has traditionally been selected based on considerations sensory properties. The contribution of the proteins in the roasted bean to the total nutritive value of the chocolate, however, is a factor that has received relatively little attention. The purpose of this study was to further previous findings from this laboratory that question the general belief that the protein in roasted cocoa has no nutritive value. Therefore, we proceeded to roast the nibs for different times, extract, partly characterize and feed the isolated protein to rats. For the first part of the work, cocoa (*Theobroma cacao* L; Forasteiro cultivar, Bahia state, Brazil) beans (*nibs*), roasted at 150 °C for 0, 30, 34, 38, 42 and 46 min, were laminated and solvent extracted. The “chocolate” powders were suspended (pH 9.5), the sediments discarded and the resulting extracts isoelectrically precipitated (pH 4.5). The lyophilized precipitates contained 61.2, 58.3, 57.6, 57.8, 48.4 and 46.0 % protein, respectively. For identification and quantification of the albumin fractions, aliquots of the extracts were dissolved in deionized water (10 mg.mL⁻¹, pH 9.0), filtered (0.22 µm) and analyzed by capillary electrophoresis. Clear samples were injected (50 mBar, 4 sec) in a Hewlett-Packard 3D CE, fitted with a fused silica capillary (72 cm, 75 µm id; 25kV; 50 mM borate running buffer, pH 9.5) and the electropherogram profiles compared with that of an authentic bovine serum albumin standard. Although all albumin concentrations significantly ($P < 0.05$) differed from each other, a cyclic, decreasing pattern of extractable albumin was observed from the shorter (zero included) to the longer roasting times. Therefore, 35.7, 45.4, 34.3, and

40.7%, of albumin, respectively, were found in the extracts of samples roasted for the shorter times, whereas the two longest treatments resulted in steadily decreasing proportions (28.3 and 18.1%, for 42 and 46 min, correspondingly) of albumin. For the second part of the study, the nutritional value of the proteins from cocoa roasted for the different times was assessed by using the extracts as the only source of protein in a standard rat diet. Standard AIN 93-G, 10% (cocoa) protein diets were prepared and fed to weanling Wistar male rats, under appropriate housing conditions, for 14 days. Net Protein Ratios relative to casein (RNPR%) indicated that values decreased inversely proportional with the roasting time (70.4, 68.7, 68.3, 66.1, 50.8 and 48.8%, correspondingly). Significant differences ($P < 0.05$, Tukey test) were evident between times 0 and 38 minutes or longer, although 42 and 46 min were indistinguishable from each other. Amino acid analyses of the protein isolates indicated that only lysine, valine and threonine are steadily lost from the beginning of heating. It is concluded that whereas little change occurs in the extractability of protein of the roasted cocoa bean, the nutritive value of the isolated proteins decreases insignificantly, when roasted at 150 °C, from 30 to 38 min, which are sensorially acceptable processing times. Whether the unextracted forms of nitrogen observed at 42 and 46 min would have any biological effect on the rat, is something that needs to be assessed separately.

1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é cultivado atualmente em países das Américas do Sul, Central e do Norte, além de países da África, Ásia e Oceania. O beneficiamento das sementes deste fruto dá origem a diversos produtos, como a manteiga de cacau, o liquor, o cacau em pó, o chocolate e numerosos derivados achocolatados. Normalmente o chocolate e alguns derivados do cacau podem ser consumidos tanto de forma isolada como juntamente com outros alimentos.

Existe ainda a idéia, não apenas entre alguns consumidores como também entre certos produtores de chocolate e produtos achocolatados, de que estes produtos são meros proporcionadores de prazer ou, quando não isso, se ressalta apenas o valor energético deste alimento, considerando somente seu alto teor de gorduras e de açúcar. Estes dois grandes componentes constituem, efetivamente, os ingredientes mais importantes de quase todos os produtos elaborados a partir do cacau. No entanto o cacau desengordurado possui um teor protéico apreciável, que não deve ser desprezado. Segundo COOK (1972) o consumo racional do chocolate contribui para a caracterização de uma dieta apropriada e saudável, produzindo energia para o organismo.

O valor nutricional das proteínas do cacau não deve ser subestimado, mesmo considerando a possibilidade da redução deste valor devido aos tratamentos térmicos aplicados durante o processamento, sendo que pouco se conhece sobre estas mudanças. Acredita-se que o tratamento térmico aplicado

ao cacau durante a torração possa ser comparado ao tratamento térmico empregado em outros alimentos, os quais não experimentam perdas significativas no seu valor nutricional. Muito pelo contrário, certos alimentos, ao serem submetidos a algum processamento térmico, acabam aumentando a sua digestibilidade. É o caso, por exemplo, dos alimentos processados por extrusão termoplástica, onde a matéria-prima no interior do cilindro do equipamento extrusor pode alcançar temperaturas próximas a 120°C. Em alguns processos de conservação térmica (apertização), alimentos como hortaliças ou leguminosas também podem ser submetidos a temperaturas da ordem de 120 °C. Sabe-se que, durante a operação de torração do cacau, em nenhum caso a temperatura deve ultrapassar 120 °C nos cotilédones inteiros ou fragmentados.

Embora muitas pesquisas tenham sido desenvolvidas a respeito das reações que ocorrem durante o processamento das amêndoas de cacau para a obtenção de chocolate e produtos achocolatados, pouco se sabe sobre o impacto nutricional destes produtos.

O conteúdo protéico do cacau (12-14 % no liquor e 21-22 % no pó desengordurado) não desperta maior interesse do ponto de vista do aporte nutricional devido aos supostos danos proporcionados pelo calor durante o processamento (torração). Embora o tratamento ocasione a desnaturação das proteínas, observa-se que muitos outros alimentos, de valor nutricional expressivo, são submetidos a tratamentos similares ao do processo de torração do cacau.

Usualmente o valor nutricional das proteínas é determinado em animais de laboratório (ratos da raça Wistar), através da eficiência das mesmas em promover o crescimento de ratos recém desmamados

Considerando que o cacau é um produto de grande importância para a economia brasileira e que o chocolate é um ingrediente de uso amplamente difundido em alimentos para consumo infantil, o presente trabalho estudou a possível variação do valor nutricional das proteínas de cacau durante o processo térmico a que são submetidos os grãos. Para tanto, foram verificadas as alterações no valor nutricional da proteína isolada de cacau, obtida após diferentes tempos de torração, através do ensaio biológico NPR (*Net Protein Ratio*) do estudo do perfil de aminoácidos e da fração albumina.

A confirmação da perda insignificante de valor biológico das proteínas extratáveis do pó de cacau durante o processo térmico poderia estimular o setor cacauero, com o desenvolvimento de novos produtos nutricionais derivados principalmente do pó de cacau, podendo resultar em uma maior valorização do produto no mercado local. Ao mesmo tempo, a população de todas as camadas sociais poderiam ter uma opção de consumo de alimento de alta aceitação sensorial e bom valor nutricional, de interesse também para programas de alimentação institucional.

2. OBJETIVOS

Estudar, através do ensaio biológico NPR (*Net Protein Ratio*), do perfil de aminoácidos e do estudo da fração albumina, possíveis alterações no valor nutricional da proteína isolada de cacau, em função do tempo de torração.

Contribuir para a elucidação do envolvimento da proteína nas perdas nutricionais do cacau tratado termicamente.

Determinar parâmetros mais adequados para a otimização do processo de torração do cacau, sob o ponto de vista nutricional.

Contribuir para um melhor entendimento de se as possíveis perdas nutricionais do cacau torrado estão mais intimamente associadas à perda de biodisponibilidade das proteínas ou à produção de fatores antinutricionais ou tóxicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Generalidades sobre o cacau

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

Dentro do fruto encontram-se aproximadamente 35 a 50 sementes, que representam entre de 13,5 a 29% da massa total do fruto. O comprimento das sementes varia entre 21 e 29 mm, a largura entre 10 e 17 mm, e sua espessura entre 8 e 12 mm, pesando de 1,4 a 3g. cada uma. Essas sementes, cobertas por uma polpa mucilaginosa doce, acidulada e de sabor agradável, são constituídas por um germen e dois cotilédones recobertos por um tegumento denominado testa (ZAMALLOA, 1994).

Embora a composição físico-química e os critérios desta composição, como o teor de gordura, de proteína, de carboidratos, a cor e o pH sejam com frequência usados como base para avaliação da qualidade das amêndoas secas, o critério final de qualidade é o sabor após a torração. O sabor além de estar fortemente relacionado à variedade, é bastante influenciado pelas técnicas de pré-processamento; porém o desenvolvimento potencial do sabor depende principalmente dos processos de fermentação e secagem (ZAMALLOA, 1994).

Todas estas variáveis serão responsáveis pelo sabor suave ou forte do cacau após as etapas de processamento (torração, conchagem, etc.). A Tabela 1 apresenta a composição química média de amêndoas de cacau.

O pré-processamento inicia-se com a abertura dos frutos para a remoção das sementes junto com a polpa mucilaginosa, conjunto que será submetido às operações de fermentação, secagem e armazenagem (ROHAM, 1990).

O chocolate tem duas características fundamentais que o distinguem: seu sabor e sua textura. Apesar de existirem muitos sabores diferentes de chocolate, todos devem estar livres de sabores desagradáveis e incorporar pelo menos algum dos sabores agradáveis que o consumidor associará ao produto. Uma particularidade básica da textura do chocolate é que deve ser sólido à temperatura ambiente e fundir-se rapidamente na temperatura da boca (36 °C), produzindo um fluido macio ao contato. O processamento do chocolate está orientado para a obtenção destas duas características (BECKETT, 1988).

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

COMPOSTOS	% EM RELAÇÃO À MATÉRIA SECA
Manteiga de cacau	56,0
Cinzas	2,8
Teobromina	1,4
Cafeína	0,2
Polifenóis	6,5
Proteína bruta	12,0
Açúcares	1,2
Amido	6,3
Pentosanas	1,6
Celulose	9,5
Ácidos carboxílicos	1,7
Diversos	0,8

FONTE: MINIFIE, 1970

3.2. Aspectos nutricionais do cacau

O valor nutricional dos alimentos está relacionado com a quantidade e tipo das suas proteínas, carboidratos, gorduras, minerais, vitaminas e outros constituintes importantes, como: alcalóides, taninos, etc. A Tabela 2 apresenta dados da composição de produtos de cacau e leite em pó, que podem ser usados para comparações bibliográficas. Os valores energéticos nesta tabela foram calculados com o fator 8,7 Calorias/grama de gordura e 4 Calorias/grama de carboidrato. As Tabelas de estudo da F.A.O. dão valores de 8,37 até 8,84 Calorias para cada grama de gordura vegetal, 3,11 até 4,05 Calorias/grama para proteínas vegetais e 3,6 até 4,12 para carboidratos vegetais (COOK, 1972).

Observa-se na Tabela 2 que o teor de proteína do cacau em pó equivale praticamente ao dobro do teor presente no liquor de cacau, contudo outros subprodutos de cacau apresentam teores de proteína significativamente menores. Em relação ao valor calórico, vemos que no pó de cacau este é substancialmente menor do que o presente nos outros produtos.

3.2.1. Lipídeos

A digestibilidade e a assimilação da manteiga de cacau e das gorduras do leite é muito alta (CHATT, 1953; JENSEN, 1931; JORDAN, 1934; citados por COOK, 1972). Essa assimilação está relatada em valores que oscilam entre

95 e 98%. A gordura do coco e de outros vegetais é assimilada de maneira similar à do cacau (COOK, 1972).

A composição de ácidos graxos da manteiga de cacau é pouco comum: mais de 33% desses ácidos graxos saturados são representados pelo ácido esteárico (18:00); este ácido normalmente representa apenas 1 a 3% dos ácidos graxos em outros óleos. Esta característica da gordura de cacau sugere que a sua capacidade de não aumentar o colesterol do soro sanguíneo tanto quanto seria esperado possa estar relacionada ao alto conteúdo desse ácido graxo ou a outros fatores de sua fração não saponificável (DENKE, 1994).

A presença de altos níveis de gordura no liquor (acima de 52% em base seca) e em misturas e coberturas é importante porque estas gorduras têm maior quantidade de energia que as proteínas e carboidratos. Em contrapartida, as gorduras são digeridas lentamente em comparação com os carboidratos, que liberam energia mais rapidamente. Esta digestão demorada das gorduras resulta em uma maior sensação de saciedade do apetite, o que torna o cacau uma fonte de energia de longa ação, comparado com as mesmas calorias ingeridas na forma de carboidratos (COOK, 1972).

Tabela 2. Constituintes nutricionais dos produtos de cacau e leite em pó.

Produto	Umidade (%)	Gordura Total (%)	Proteína (%)	Carboidratos (%)	Teobromina (%)	Cinzas Totais (%)	Calorias por 100 gramas
Liquor de Cacau	1,0	53,0	12,0	25,0	1,5	3,2	615
Cacau em Pó	4,0	10,0	22,4	46,7	2,8	6,0	375
Chocolate Doce Escuro (a)	0,6	31,0	3,0	63,5	0,38	0,8	537
Chocolate Doce Escuro (b)	0,6	31,0	3,0	58,8	0,63	1,34	536
Chocolate Bittersweet (c)	1,0	37,1	8,4	47,5	1,05	2,24	550
Chocolate ao Leite (d)	0,9	32,0	6,0	59,5	0,18	1,39	541
Cobertura de Sorvete (e)	0,3	60,0	2,0	46,3	0,26	0,54	676
Cobertura Escura para Confeitaria (f)	0,6	33,0	3,6	60,1	0,45	0,97	544
Leite em Pó	2,0	30,5	25,2	36,7		5,6	513

(a) Liquor de cacau 25 %, açúcar 57,25 %, M.C. adicionada 17,75 %.

(b) Liquor de cacau 42 %, açúcar 48,26 %, M.C. adicionada 9,74 %.

(c) Liquor de cacau 70 %, açúcar 30 %.

(d) Liquor de cacau 12 %, açúcar 49,85 %, Leite em pó 18 %, M.C. 20,15 %.

(e) Liquor de cacau 17 %, açúcar 82 %, óleo 51 %.

(f) Pó de cacau 14 %, Liquor de cacau 4 %, açúcar 52,52 %, gordura 29,48 %.

M.C. = Manteiga de Cacau.

FONTE: COOK, 1972.

3.2.2. Carboidratos

É bem conhecido que a rápida disponibilidade de energia dos carboidratos é muito importante na realização de atividades físicas, desde o trabalho de um funcionário até a brincadeira de uma criança. Este é o motivo pelo qual o chocolate, as balas, as bolachas, os bolos, os sorvetes, o leite achocolatado e alimentos similares são comumente consumidos por trabalhadores, atletas e crianças ativas nos intervalos das refeições (COOK, 1972).

Os açúcares presentes no cacau são essenciais ao desenvolvimento do aroma típico do chocolate através de reações de escurecimento não-enzimático, embora estes açúcares (50-1000mg de sacarose/100g de amêndoas de cacau, 500-900 mg de açúcares redutores e 800-1900 mg de açúcares totais), se encontrem apenas em pequenas quantidades nas amêndoas de cacau. REINECCIUS *et al.* (1972a) relataram que quase a totalidade da sacarose é hidrolizada durante a primeira metade do processo fermentativo, e estes mesmos pesquisadores (REINECCIUS *et al.*, 1972b) identificaram e quantificaram açúcares livres em amêndoas de cacau não fermentadas e bem fermentadas, antes e depois da torração (Tabela 3).

Observa-se que tanto nas amêndoas não torradas provenientes de Sanchez (onde estas geralmente não são fermentadas) e nas amêndoas também não torradas de Ghana (onde a fermentação é praticada), os mesmos açúcares estão presentes, porém, em proporções diferentes. Percebe-se uma variação

entre a concentração de sacarose das amêndoas não torradas dessas duas origens. Para os autores, as grandes diferenças encontradas entre as concentrações de frutose e glicose numa mesma amostra, foram surpreendentes, especialmente nas amostras de amêndoas bem fermentadas provenientes de Ghana. Durante a fermentação, a glicose parece ser preferencialmente metabolizada ou polimerizada, à medida que a sacarose é hidrolizada. A aparente correlação entre a fermentação e o grau com que as cetoses (por exemplo, a frutose) dominam a fração de açúcares redutores tem especial significado para a reação de escurecimento de Maillard, especialmente no desenvolvimento de sabor do chocolate durante a torração das amêndoas de cacau (REINECCIUS *et al.*, 1972b).

3.2.3. Proteínas

O valor nutricional das proteínas como formadoras dos tecidos do corpo é bem conhecido. O valor calórico da proteína assume realmente uma importância secundária. As proteínas somente são usadas como fonte de energia quando o organismo não dispõe de quantidades de gorduras ou carboidratos suficientes para a produção de calor ou energia, ou quando a ingestão protéica é excessiva (COOK, 1972).

Tabela 3. Efeito da Torração sobre a composição da fração de açúcares de amêndoas não fermentadas de Sanchez e de amêndoas bem fermentadas de Ghana.

Açúcar	Composição Percentual da Fração de Açúcares					
	Amêndoas de cacau de Sanchez (não fermentadas)			Amêndoas de cacau de Ghana (bem fermentadas)		
	Não Torradas	Torradas à 150 °C		Não Torradas	Torradas à 150 °C	
		30 min.	45 min.		30 min.	45 min.
Pentol	1,3	1,4	1,8	2,4	3,5	10,0
Frutose	17,5	14,7	12,8	57,0	52,5	22,2
Sorbose	1,3	0,7	0,0	7,6	5,2	3,4
Glicose	15,3	9,9	7,0	9,2	10,1	10,1
Manitol	1,5	3,5	4,1	14,0	14,6	34,5
Não identificado	1,3	1,4	1,0	1,2	1,2	2,7
Inositol	1,5	2,1	1,8	2,8	2,1	3,4
Sacarose	60,7	66,2	73,2	7,1	10,5	20,1

FONTE: REINECCIUS *et al.*, 1972b.

O teor de proteínas presente nas sementes do cacau sofre variações durante a fermentação; normalmente esta etapa é realizada durante 6 ou no máximo 7 dias. Pesquisas realizadas por AREMU (1995) apontam mudanças interessantes no perfil das proteínas do cacau, assim como nos teores de teobromina, fósforo e outros componentes da semente do cacau, comparando estas sementes frescas com amêndoas fermentadas por até 12 dias; as determinações de proteína foram realizadas ao início da fermentação e aos 3, 6, 9 e 12 dias. No mencionado trabalho também foram determinados os teores de vários outros compostos que têm relação com os aspectos nutricionais do cacau (Tabela 4).

O teor de proteínas das sementes frescas (17,5% em base seca), não foi afetado depois de três dias de fermentação (17,6% em base seca), mas foi aumentando significativamente ($p < 0.01$) até o sexto dia (19,8% em base seca) e diminuindo posteriormente.

Mais importantes são as quantidades e as variedades dos aminoácidos presentes nas proteínas. As proteínas podem ser visualizadas como uma cadeia de pérolas onde cada pérola representaria um aminoácido. Durante a digestão e a assimilação, essas cadeias de aminoácidos são quebradas, com a conseqüente liberação de aminoácidos, os quais, na forma livre, passam diretamente à circulação sanguínea. Dos 18 aminoácidos presentes nos tecidos do corpo, a maioria pode ser sintetizada pelo organismo. De qualquer maneira, existe um número de aminoácidos que não é sintetizada pelo organismo, devendo estes ser obtidos através de alimentos que os contenham. São oito os aminoácidos

essenciais, sendo que o leite, as carnes e os ovos contém todos eles (COOK, 1972).

A aceitação de uma proteína como matéria-prima na indústria de alimentos não está condicionada apenas às suas propriedades nutritivas. Suas propriedades funcionais afetam de forma decisiva sua possibilidade de uso em alimentos industrializados (MANGINO, 1984; citado por DE MELLO, 1989).

A Tabela 5 apresenta os resultados do estudo conduzido por REINECCIUS *et al.* (1972b), no qual foi estudado o consumo de aminoácidos livres em amêndoas de cacau provenientes de Ghana e de Sanchez (República Dominicana) durante o processo de torração à 150 °C, por 30 minutos. As concentrações dos aminoácidos diminuíram durante o processo de torração, como era de se esperar. Após o aquecimento prolongado (90 minutos), aminoácidos livres ainda se encontravam presentes em ambos os lotes de amêndoas.

A capacidade das proteínas de gelificar, emulsionar e formar espumas é uma indicação de seu comportamento funcional em alimentos (ANGLEMIER & MONTGOMERY, 1976; citados por DE MELLO, 1989).

Tabela 4. Composição centesimal em base seca aproximada de amêndoas de cacau fermentadas durante diferentes períodos de tempo¹

Tempo de fermentação (dias)	Proteína* (% b.s.)	Fibra* (% b.s.)	Cinzas* (%), b.s.	Cálcio** (mg/100 g) b.s.	Fósforo** (mg/ 100 g) b.s.
0	17,5a	5,9a	4,4ab	29,2a	201,0a
3	17,6a	5,6a	3,2bc	60,4b	189,0a
6	19,8b	3,3b	5,4a	53,8b	187,5a
9	14,6c	3,1b	5,6a	38,1a	124,5b
12	15,2c	3,1b	3,9bc	29,3a	102,0b

FONTE: AREMU, 1995.

¹ Amêndoas provenientes da Nigéria

Obs.: Cada valor representa a média de determinações em triplicata

* Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si, a um nível de significância de 1%.

** Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si, a um nível de significância de 5%.

Tabela 5. Consumo de aminoácidos livres durante a torração, à 150 °C, por 30 minutos, das amêndoas bem fermentadas provenientes de Ghana e das amêndoas não fermentadas provenientes de Sanchez (República Dominicana)

Aminoácidos	Amêndoas de Cacau Ghana			Amêndoas de Cacau Sanchez		
	Não Torradas	Consumo de aminoácidos livres durante a torração		Não Torradas	Consumo de aminoácidos livres durante a torração	
	mg/100g	mg/100g	%	mg/100g	mg/100g	%
Lisina	58,3	21,9	48	31,9	18,4	58
Histidina	7,6	1,2	16	6,4	1,1	17
Arginina	41,3	11,8	29	34,3	22,7	66
Ác. Aspártico	55,2	15,6	28	26,2	10,9	42
Treonina	21,7	6,9	32	26,9	14,2	52
Serina	55,6	20,4	37	41,7	19,5	47
Ác. Glutâmico	64,0	32,6	51	43,4	29,6	68
Prolina	32,2	7,3	23	43,4	11,4	26
Glisina	7,9	0,4	5	11,9	6,4	54
Alanina	57,0	14,4	25	65,4	30,6	47
Valina	46,2	10,3	22	57,5	29,2	51
Isoleucina	30,1	4,3	14	29,5	6,8	22
Leucina	103,5	29,9	29	108,1	72,0	67
Tirosina	43,4	7,5	17	65,7	39,9	61
Fenilalanina	95,7	22,1	23	88,7	61,2	69
Total	719,7	199,3	26	674,6	367,5	55

Obs.: As amêndoas de Ghana eram bem fermentadas e as de Sanchez não foram submetidas à fermentação; estas só foram retiradas dos frutos e posteriormente secas ao sol.

FONTE: REINECCIUS *et al.* (1972b).

As proteínas dos vegetais são todas "imperfeitas" como fontes individuais de aminoácidos essenciais, mas comumente podem satisfazer as necessidades de aminoácidos através de uma dieta variada. Na Tabela 6 apresenta-se uma lista de 18 aminoácidos, mostrando seus requerimentos nutricionais diários assim como quantidades específicas, quando se trata de aminoácidos que não são sintetizados pelo corpo humano. O valor zero indica que o aminoácido em questão é sintetizado pelo corpo humano (ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA, 1960; citada por COOK, 1972).

MALY (1955; citado por COOK, 1972), detectou 14 aminoácidos na proteína de amêndoas de cacau (Tabela 6) e detectou também os aminoácidos livres no cotilédone de cacau.

OFFEM (1990), em uma pesquisa realizada com cacau desengordurado de três variedades diferentes, determinou a variação na composição de aminoácidos (Tabela 7)

SEIKI (1973) relatou a composição de aminoácidos de cacau, apresentada na Tabela 8, obtida durante a fermentação, realizada mediante dois métodos diferentes (em bandeja e em montes).

As substâncias nitrogenadas do cacau são constituídas em boa parte por proteínas, as quais, sob o efeito da torração, têm a sua digestibilidade incrementada. Na digestão artificial, cerca de 19 a 23% das substâncias nitrogenadas das sementes cruas são dissolvidas, ao passo que depois da

torração este teor sobe para até 39-40%. Esta situação é modificada não somente pela subdivisão das partículas do cacau, na obtenção do cacau em pó e do chocolate, mas também pelo tratamento das partículas com substâncias alcalinas. Depois desses processos a digestibilidade pode atingir até 80 % das substâncias nitrogenadas (DUARTE e NUÑEZ, 1980).

CHATT (1953; citado por COOK, 1972) relatou que a contribuição biológica das proteínas de cacau é de 37-38 %; pequena se comparada com a do leite, que é de 84 %.

JENSEN (1931; citado por COOK, 1972) assinalou que, do total das proteínas do cacau, 38 % são digeríveis, 37 % são usadas para "manutenção", e 14 % são usadas "dieteticamente"; comparado-se respectivamente com 95, 82,5 e 80 % das proteínas do leite.

Mesmo com essas indicações um pouco desfavoráveis, as proteínas do cacau não representam uma desvantagem, particularmente quando são comparadas com outros alimentos de origem vegetal. Na Tabela 9 fica evidente a rica fonte protéica/calórica que representa a associação chocolate/leite, elevado pelo valor nutricional das proteínas deste último (COOK, 1972).

Tabela 6. Composição de aminoácidos nas amêndoas de cacau

Aminoácido	Mínimo necessário para o homem ^a	Aminoácidos na proteína da amêndoa de cacau ^b	Aminoácidos livres no cotilédone de cacau ^b
Glicínia	0	+	
Alanina	0	+	+
Valina	0.8	+	+
Leucina	1.1	+	+
Isoleucina	0.7		
Serina	0.0	+	
Treonina	0.5	+	
Cisteína	0.0	+	+
Metionina	1.1	+	+
Ácido Aspártico	0.0	+	+
Ácido Glutâmico	0.0	+	+
Lisina	0.8	+	+
Arginina	0.0	+	
Fenilalanina	1.1	+	
Tirosina	0.0		
Histidina	0.0		
Triptofano	0.25		
Prolina	0.0	+	

^a ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA (1960)

^b MALY (1955)

FONTE: COOK, 1972.



Tabela 7. Composição de aminoácidos da torta de cacau desengordurada proveniente de três variedades do Sudeste da Nigéria (g/16g N)

Aminoácido	Variedade do cacau e ano de plantio				
	F ₃ Amazon (1967)	F ₃ Amazon (NIFOR) (1967)	F ₃ Amazon (1977)	Amelonado (1967)	Tritario (1967)
Aspártico	5,07±0,16	4,86±0,28	4,28±0,60	4,86±0,36	5,09±0,08
Treonina	1,84±0,46	2,02±0,21	1,65±0,26	1,86±0,11	1,82±0,32
Serina	4,87±0,55	4,97±0,34	4,08±0,15	4,77±0,33	4,63±0,44
Ác. Glutâmico	3,23±0,19	3,26±0,20	2,69±0,23	3,36±0,20	3,46±0,27
Prolina	3,06±0,15	3,18±0,34	2,89±0,10	3,26±0,20	3,65±0,20
Glicina	1,71±0,08	1,82±0,04	1,52±0,07	1,92±0,37	1,76±0,17
Alanina	0,34±0,06	0,36±0,08	0,29±0,03	0,35±0,04	0,37±0,17
Valina	4,86±0,11	5,07±0,43	4,69±0,14	5,02±0,26	5,16±0,09
Cistina	3,40±0,12	3,56±0,27	2,86±0,20	3,26±0,04	3,18±0,13
Metionina	0,21±0,03	0,22±0,01	0,37±0,09	0,26±0,08	0,25±0,02
Isoleucina	7,38±0,04	7,61±0,05	7,69±0,08	7,25±0,14	7,32±0,16
Leucina	5,07±0,18	5,53±0,16	4,65±0,34	5,11±0,22	5,21±0,22
Tirosina	2,12±0,05	2,24±0,09	1,89±0,26	2,41±0,06	2,51±0,14
Fenilalanina	2,43±0,24	2,51±0,18	2,32±0,07	2,58±0,18	3,02±0,06
Lisina	17,47±0,35	18,58±0,92	21,25±0,50	20,72±0,36	21,07±0,57
Histidina	1,23±0,06	1,02±0,06	1,06±0,22	1,35±0,27	1,47±0,09
Arginina	3,26±0,21	3,08±0,36	3,02±0,15	3,46±0,26	2,98±0,47
Triptofano	0,98±0,04	1,03±0,23	0,91±0,12	1,07±0,14	1,22±0,08

FONTE: OFFEM, 1990.

Tabela 8. Mudança no conteúdo de aminoácidos de amêndoas de cacau durante fermentação em Bandeja e em Montes. mg de Aminoácido/100 g de Amêndoas

Aminoácido	0	Método em Bandeja (horas)					Método em Montes (horas)				
		24	48	72	96	168	24	48	72	96	168
Lisina	11	16	42	60	34	47	18	28	42	46	43
Histidina	10	18	21	25	16	14	11	19	12	15	9
Arginina	3	17	44	65	37	45	13	20	34	36	37
Aspártico	5	7	17	24	20	23	5	6	10	11	10
Treonina	5	7	18	24	23	25	6	9	10	12	12
Serina	24	28	57	73	66	69	27	29	36	40	33
Ac. Glutâmico	72	32	42	53	47	56	27	34	32	41	27
Prolina	10	11	23	24	23	26	13	16	12	14	11
Alanina	38	35	66	83	58	62	31	41	36	55	37
Valina	18	21	51	60	52	52	24	28	27	45	28
Metionina	3	6	12	19	12	10	5	7	11	14	13
Isoleucina	19	19	40	45	39	42	21	24	24	31	22
Leucina	24	43	10	130	97	100	46	63	90	107	88
Tirosina	26	46	75	97	80	75	40	49	50	64	46
Fenilalanina	24	45	107	133	89	88	41	59	68	92	69
Total	292	351	725	915	693	734	328	432	496	623	485

FONTE: SEIKI, 1973.

Tabela 9. Valor nutritivo do leite e do leite com chocolate, nutrientes contidos em 8 oz.(226,8 g)

Nutrientes	Leite	Leite achocolatado
Proteínas	8,5	7,9
Cálcio	0,29	0,26
Fósforo	0,22	0,22
Vitamina A U.I.	375	338
Tiamina	0,08	0,07
Riboflabina	0,41	0,37
Niacina	0,21	0,37
Calorias (Kcal/100g.)	168	205

FONTE: COOK, 1972.

3.2.3.1 Efeitos na saúde e fatores antinutricionais do cacau

A fim de verificar se o cacau teria alguma influência sobre a reprodução dos ratos, HOESTETLER *et al.* (1990) conduziram um ensaio com ratos alimentados com dietas contendo pó de cacau, em concentrações de 1,5%, 2,5% e 5,0%. As conclusões mais importantes obtidas neste trabalho foram as seguintes:

1º) A adição de pó de cacau nas dietas, nas concentrações já indicadas, provocou pequenas ou nenhuma mudança no consumo de alimento nos grupos de ratos, em relação à dieta controle, durante as três gerações;

2º) O consumo da dieta das fêmeas de todos os grupos foi semelhante ao longo das três gerações; da mesma forma aconteceu com os machos, com exceção daqueles pertencentes à terceira geração, submetidos à dieta contendo 5,0% de pó de cacau, os quais tiveram um consumo cerca de 10% inferior ao consumo do grupo controle correspondente;

3º) Pequenas reduções, mas estatisticamente significativas ($p=0,05$), nas médias de peso corporal, em relação aos grupos controle, foram observadas nos ratos machos pertencentes à segunda e terceira gerações, alimentados com dietas contendo 3,5% e 5,0% de pó de cacau. No caso das fêmeas, estas apresentaram uma diminuição no ganho de peso na segunda e terceira gerações somente quando submetidas à dieta contendo 5,0% de pó de cacau. Na

primeira geração, as dietas contendo pó de cacau não causaram efeito no ganho de peso em nenhum dos grupos.

4º) A exposição dos ratos das três gerações às dietas contendo pó de cacau até 5,0% não afetou nenhum dos índices reprodutivos monitorados, os quais foram: cruzamento, fertilidade, concepção, gestação, viabilidade e lactação. Foi observado nos ratos da terceira geração um aumento na incidência de atrofia testicular, no grupo alimentado com a dieta contendo 5,0% de pó de cacau. Segundo FRIEDMAN *et al.* (1979), GANS (1982) e TARKA *et al.* (1981), citados neste trabalho, estudos reprodutivos realizados anteriormente indicaram uma associação entre altas concentrações de teobromina e cafeína nas dietas e atrofia testicular em ratos.

Os compostos presentes no cacau e relacionados a fatores antinutricionais sofrem variações durante o processo de obtenção do chocolate. AREMU (1995) pesquisou estas mudanças durante a fermentação das sementes do cacau: sementes frescas foram submetidas à fermentação e compostos considerados antinutricionais foram quantificados durante essa fermentação, aos 3, 6, 9, e 12 dias. A Tabela 10 apresenta os valores destes compostos; pode-se observar que a diminuição no teor de teobromina durante a fermentação só é significativa ($p < 0,05$) depois de 6 dias do processo, o que não tem importância prática, já que o processo nunca será realizado por mais de 7 dias.

Tabela 10. Níveis de HCN, oxalato e teobromina em amêndoas fermentadas durante diferentes períodos de tempo¹

Tempo de fermentação (dias)	Ácido cianídrico (HCN) (mg/100 g)	Oxalato total (mg/100 g)	Oxalato solúvel (mg/100 g)	Teobromina (%)
0	7,1a	194,3a	29,3a	2,9a
3	6,5ab	172,5ab	26,4ab	2,7ab
6	6,0ab	157,7b	23,5ab	2,5b
9	5,4ab	113,7c	20,5ab	2,1c
12	4,3b	77,0d	17,6b	1,7c

¹ Amêndoas provenientes da Nigéria

FONTE: AREMU, 1995.

Obs.: Cada valor representa a média de determinações em triplicata

* Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si, a um nível de significância de 5%.

Os teores de oxalato têm uma diminuição significativa ($p < 0,05$) já a partir de 6 dias de fermentação; no caso do ácido cianídrico (HCN), a diminuição não é significativa ($p < 0,05$) até os 6 dias, só depois de 12 dias que a diminuição é significativa; igualmente ao caso da teobromina, esta diminuição não tem importância prática.

BRUSICK *et al.* (1986); citado por DRUMMOND (1998), em um estudo realizado com ratos de laboratório, relatou que o pó de cacau não apresentou atividade cancerígena no teste de Ames, no teste com linfomas de camundongo, nos ensaios citogenéticos para aberrações cromossômicas e SCE (*Sister Chromatid Exchanges*) e no ensaio de transformação de células usando Balb/c-3T3. No entanto a teobromina, na mesma bateria de testes, mas em doses substancialmente mais elevadas do que nos níveis normais de teobromina encontrados no cacau, apresentou evidência de atividade cancerígena, especialmente na capacidade de induzir SCE e provavelmente, mutação nas células de camundongo L5178Y.

Alguns pesquisadores têm relatado dados importantes envolvendo proteína do cacau e atividade inibidora de tripsina. DODO *et al.* (1992) determinaram em um estudo envolvendo comparações aminoacídicas, similaridades entre uma proteína 21 kDa proveniente da semente do cacau e uma proteína inibidora de alfa-amilase/subtilisina proveniente da cevada. Surpresos com este resultado, passaram a extrair e purificar a proteína de 21 kDa da semente fresca de cacau, variedade Forasteiro, para depois realizar com ela estudos e ensaios da atividade inibidora de alfa-amilase, subtilisina,

quimotripsina e tripsina. Os resultados (Tabela 11) revelam a atividade inibidora de tripsina da proteína de cacau em sementes frescas (não fermentadas). Os pesquisadores acreditam que após a fermentação as amêndoas possam ainda ter atividade inibidora de tripsina, já que durante este processo as sementes não sofrem temperaturas superiores a 50 °C. No entanto, eles também acreditam que esta atividade não exista no produto terminado, devido ao tratamento térmico pelo qual as amêndoas devem passar durante o processamento para a obtenção do chocolate, processo em que temperaturas próximas de 150 °C devem ser atingidas no interior do equipamento, durante tempos superiores a 20 minutos.

Pesquisas realizadas por SOTELO & ALVARES (1991), em sementes e folhas de cacau provenientes do México, determinaram também a atividade inibidora de tripsina quando testadas contra o substrato sintético benzoil-DL-arginina p-nitroanilida.

Tabela 11. Atividade inibidora (*in vitro*) da proteína de 21 kDa proveniente da semente de cacau (fresca), em distintos substratos.

Substrato	Atividade inibidora de tripsina, <i>in vitro</i>, da proteína de 21 kDa proveniente da semente de cacau (fresca)	Atividade inibidora de quimotripsina/tripsina da proteína da soja
Alfa-amilase do malte de cevada	Nenhuma	
Subtilisina Calsberg	Nenhuma	
Alfa-quimotripsina do pâncreas bovino	7,5% (10 minutos de incubação)	56% (10 minutos de incubação)
Tripsina do pâncreas bovino	65% (5 minutos de incubação)	31% (5 minutos de incubação)

Obs.: Na análise da tripsina do pâncreas bovino, ambas as proteínas (cacau e soja), perderam totalmente a atividade inibidora, após terem sido previamente aquecidas em água em ebulição durante 10 minutos.

FONTE: DODO *et al.*, 1992.

3.2.3.2. Frações protéicas do cacau

Durante o amadurecimento dos frutos de cacau e também durante a fermentação e as outras etapas do processamento a solubilidade de suas proteínas diminui. A solubilidade das frações protéicas do cacau durante o seu processamento varia consideravelmente: enquanto algumas frações sofrem queda na solubilidade, outras têm esta solubilidade aumentada. O conteúdo total de proteína no cacau durante estas etapas aparentemente não é modificado. Segundo o trabalho desenvolvido por ZAK e KEENEY (1976), as distintas frações protéicas têm a sua solubilidade afetada durante estas etapas do processamento. Na Tabela 12 se apresentam estas mudanças durante a etapa de fermentação, na Tabela 13 são apresentadas as mudanças na solubilidade durante a torração e na Tabela 14 são apresentadas as mudanças na etapa de conchagem.

Como foi visto nos dados apresentados, a proteína do cacau sofre alterações progressivas durante a fermentação e a torração das amêndoas e também quando o chocolate com adição de açúcar é submetido ao processo de conchagem. Envolvidos nestes vários estágios,, os componentes da proteína do cacau e o açúcar são parcialmente hidrolizados (reações de Maillard, oxidação e reações com taninos e fenóis). Finalmente, todas as proteínas continuam no produto em forma complexada e insolúvel (ZAK & KEENEY, 1976).

3.2.3.3. Reação de Maillard

Com o interesse de verificar as conseqüências fisiológicas que dietas com misturas de aminoácidos e glicose submetidas a um escurecimento não enzimático têm sobre ratos de laboratório, SGARBIERI *et al.* (1973) conduziram um estudo com 3 grupos de 10 ratos cada um durante 22 dias. O grupos de ratos foram alimentados com as mesmas dietas, mas cada uma delas continha misturas diferentes de aminoácidos, glicose e dextrina, descritas a seguir:

Mistura 1, (controle): a mistura (aminoácidos, glicose e dextrina) foi mantida por 30 dias em *freezer*, à -20 °C; logo após este período essa mistura foi adicionada aos outros ingredientes da dieta adequada ao crescimento dos ratos.

Mistura 2, (escurecida não suplementada): a mesma mistura descrita para o grupo 1 foi mantida a 37 °C por 30 dias, permitindo desta forma o desenvolvimento do escurecimento não enzimático. Durante a reação de escurecimento não enzimático, uma certa quantidade de cada aminoácido foi perdida.

Tabela 12. Mudanças na solubilidade das frações protéicas do cacau durante a fermentação, (%).

Fração protéica	Dias de Fermentação						
	0	1	2	3	4	5	6
Albumina	41,3	47,3	56,1	72,5	68,5	69,2	70,7
Globulina	21,0	28,2	24,2	13,7	14,6	14,6	15,0
Prolamina	12,8	4,6	3,8	3,1	4,6	5,4	3,8
Glutelina	24,8	19,8	15,9	10,7	12,3	10,8	10,5

FONTE: ZAK & KEENEY, 1976.

Tabela 13. Mudanças na solubilidade das frações protéicas do cacau durante a torração, (%).

Fração protéica	Cru	Torrado
Albumina	62,9	79,5
Globulina	12,	3,6
Prolamina	14,2	6,8
Glutelina	10,9	9,7

FONTE: ZAK & KEENEY, 1976.

Tabela 14. Mudanças na solubilidade das frações protéicas do cacau durante a conchagem.

Fração protéica	Tempo de conchagem (h)		
	0	12	24
Albumina	98,2	98,4	100,0
Globulina	1,8	1,6	0,0
Prolamina	0,0	0,0	0,0
Glutelina	0,0	0,0	0,0

FONTE: ZAK & KEENEY, 1976.

Mistura 3, (escurecida suplementada): mistura igual à mistura 2, adicionada daqueles aminoácidos que participaram de ligações químicas ou foram destruídos durante a reação de escurecimento, esta adição foi realizada com o fim de que a composição de aminoácidos desta mistura fosse idêntica à da mistura adicionada à dieta do grupo 1.

Existiram diferenças altamente significativas entre os valores nutritivos das misturas controle, escurecida não suplementada e escurecida suplementada. O grupo de ratos alimentados com a dieta contendo a mistura escurecida não suplementada (Mistura 2) quase não ganhou peso durante os 22 dias do experimento, e aqueles alimentados com a dieta contendo a mistura suplementada (Mistura 3) não cresceram da mesma forma e com a rapidez com que cresceram os ratos do grupo alimentado com a dieta contendo a mistura controle (Mistura 1).

A eficiência de nitrogênio (NER) média determinada ao final do experimento para cada grupo foi esta: $22,72 \pm 2$ para o grupo com a Mistura 1; $3,77 \pm 1,21$ para o grupo com Mistura 2 e $14,20 \pm 2,00$ para o grupo com a Mistura 3. As análises de variância para os dados de NER indicaram que as diferenças entre os tratamentos foram altamente significativas ($p < 0,001$), e os valores baixos de NER para as misturas que sofreram a reação de Maillard sugeriram que:

1º) Os aminoácidos essenciais e os não essenciais poderiam ter sido quimicamente alterados até o ponto de não se encontrarem mais à disposição para o rato como fonte de nitrogênio;

2º) Os aminoácidos essenciais tornaram-se bastante indisponíveis, causando uma grande diminuição na eficiência de toda a dieta;

3º) Os compostos formados durante o processo de escurecimento da mistura de aminoácidos e açúcares poderiam ter sido tóxicos para os animais, o que foi também sugerido pela persistente diarreia e pelo alargamento do *caecum* dos ratos que consumiram as dietas escurecidas;

4º) O suplemento da mistura “escurecida” não restaurou toda a perda de eficiência da mesma. Como foi confirmado pelas análises aminoacídicas e pelo ensaio com os ratos, a mistura escurecida não suplementada estava altamente desbalanceada, com deficiência, principalmente, de histidina, triptofano e lisina

3.3. Etapas do processamento do cacau

3.3.1. Pré-processamento

A produção de chocolate pode se dividir em duas grandes fases: o pré-processamento e o processamento propriamente dito.

- O pré-processamento compreende as etapas de colheita do fruto, partido ou quebra do mesmo, retirada das sementes, fermentação das sementes e secagem das amêndoas (amêndoa é o nome que a semente recebe após ter perdido o seu poder de germinação durante a fermentação).

- O processamento é a fase subsequente que envolve a obtenção das principais matérias-primas: liquor, manteiga e pó de cacau, e a fabricação propriamente dita do chocolate e produtos achocolatados, a partir das amêndoas previamente torradas.

3.3.2. Colheita e quebra do fruto

Os frutos que estão adequadamente maduros são colhidos. Somente esses possuem açúcar em quantidade adequada para se conseguir uma boa fermentação das sementes. Não se deve aguardar muito tempo para se colher um fruto maduro, devido aos riscos de sobrematuração, germinação avançada das sementes e apodrecimento das mesmas, o que acarretaria um grave defeito na classificação. No entanto, também é igualmente grave colher os frutos antes de sua maturação, devendo isto ser evitado de qualquer maneira. Os frutos imaturos além de serem muito ácidos, contém menos açúcar e grãos menores, fermentam mal e rendem menos peso ao produto final (MARAVALHAS, 1971).

As sementes e a polpa devem ser transferidas imediatamente para os cochos de fermentação. Se a quebra for realizada longe deste local, elas devem

ser transferidas no mesmo dia. Eventualmente, pode-se admitir um intervalo de um dia entre a quebra e o transporte para o cocho. Nunca se deve misturar num mesmo cocho, sementes provenientes de quebras efetuadas em dias diferentes (MARAVALHAS, 1971).

3.3.3. Fermentação das sementes

A fermentação é a etapa em que a polpa e as sementes já retiradas do fruto sofrem a ação de microrganismos do meio ambiente. O alto conteúdo de açúcares da polpa fresca que recobre as sementes, seu baixo valor de pH (cerca de 3,6) e seu baixo teor de oxigênio constituem um excelente meio para o desenvolvimento de leveduras. A polpa é fortemente aderida às sementes e composta de aproximadamente 85% de água e 11% de açúcares, além de pequenas quantidades de ácido cítrico, pentosanas e proteínas (MINIFIE, 1989).

Existem três principais métodos de fermentação, usados em várias partes do mundo: em montes, em caixas de madeira e em bandejas (CARR, 1980). De maneira geral, o tipo de fermentação predominante no Brasil é o que utiliza caixas de madeira com orifícios na sua base.

No primeiro dia de fermentação as leveduras iniciam a conversão anaeróbica dos açúcares da polpa em etanol, caracterizando a primeira grande atividade microbiológica da fermentação do cacau: a fermentação alcoólica, que pode ser facilmente detectada pelo aroma do etanol (MINIFIE, 1989).

Ao final das primeiras 24-36 horas (dependendo da região), a primeira aeração da massa de sementes é realizada através do seu revolvimento. Em seguida, novas aerações são feitas, 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 aeróbicos, como as bactérias acéticas *Acetomonas* e *Acetobacter* (SHAUGHNESSY, 1962; DOELLE, 1969, citados por PEZOA, 1989).

Após a fermentação alcoólica, rapidamente inicia-se a fermentação acética. Sem dúvida, o aroma predominante em qualquer cacau fermentado é o do ácido acético. O substrato etanol habilita as bactérias acéticas a transformarem-no em ácido acético e água, na presença de oxigênio. Esta reação é exotérmica causando a elevação da temperatura para 50 °C ou mais (CARR, 1980).

Os ácidos acético, láctico e outros difundem-se através da testa para o interior da semente e em conjunto com o aumento de temperatura (45-50°C) e com a difusão do etanol, provocam a morte do gérmen, ou seja, eliminam o poder de germinação da semente (LOPEZ & McDONALD, 1982; citados por CARR, 1980). A partir deste momento, as sementes passam a ser chamadas de amêndoas.

A duração da fermentação deve ser de cinco a sete dias. Menos de cinco e mais de sete dias não são recomendáveis (MARAVALHAS, 1971).

Ao final da fermentação, as amêndoas de cacau devem apresentar uma coloração interna marrom e não violeta. A presença de amêndoas de cacau de cor violeta é característica de um produto mal fermentado e está relacionada com um fraco sabor de chocolate (FORSYTH & QUESNEL, 1957; ROHAN, 1958; LOPEZ & McDONALD, 1981; citados por ZAMALLOA, 1994).

3.3.4. Secagem das amêndoas

Os objetivos desta operação são:

- A redução do teor de umidade de 40-50% para 6-8% (ROHAN, 1967; LOPEZ & QUESNEL, 1973; citados por ZAMALLOA, 1994).

- O bloqueio das reações enzimáticas, químicas e a diminuição dos riscos de desenvolvimento dos microrganismos (JAQUET *et al.*, 1980).

A operação de secagem é muito importante, pois dela depende o aspecto externo do produto final. A secagem deve ser conduzida de forma a se obter um teor de umidade em torno de 7%. Secagem excessiva torna a casca quebradiça, enquanto que excesso de umidade facilita o desenvolvimento de mofo (MARAVALHAS, 1971).

3.3.5. Torração das amêndoas

A torração é um tratamento térmico em que o cacau é submetido a uma temperatura ambiente do equipamento de aproximadamente 150° C, durante um tempo estabelecido de acordo com a origem e o tipo de amêndoa, os períodos de colheita, os tratamentos anteriores à torração, a umidade e as características de sabor desejadas (BAUERMEISTER, 1981; LEE & JACKSON, 1975; citados por PEZOA, 1989), lembrando que a temperatura dos cotilédones não deve ultrapassar os 120°C.

Para que sejam submetidas à torração, as amêndoas devem passar por um processo de limpeza, com a finalidade de separá-las de materiais estranhos, através da utilização de peneiras, corrente de ar e separadores magnéticos (PEZOA, 1989).

O objetivo principal da torração é desenvolver o sabor de chocolate, principalmente via reação de Maillard, a partir dos precursores de sabor formados durante a fermentação, como os açúcares redutores e os aminoácidos livres.

Alguns fenômenos ocorrem paralelamente ao desenvolvimento do sabor de chocolate durante a torração:

- Desenvolvimento da cor típica do chocolate.

- Redução dos teores dos ácidos voláteis, principalmente daqueles que são indesejáveis, como os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, etc.

- Inativação das enzimas, principalmente das lipolíticas, capazes de degradar a manteiga de cacau.

- Redução do teor de água das amêndoas, de aproximadamente 8 para cerca de 2%.

Para ser torrado, o cacau pode se apresentar de diferentes formas: como amêndoas inteiras, como *nibs* (amêndoas fragmentadas em pedaços menores) ou como uma massa líquida, a pasta de cacau, também chamada de liquor de cacau. Ao se utilizar *nibs* ao invés de amêndoas inteiras, como no processo convencional, a diferença de intensidade de torração, devida à diferença de temperatura nas diversas partes da amêndoa (centro, meio e superfície) é diminuída, conseguindo-se melhor transferência de calor e, por consequência, redução no consumo de energia. A pasta de cacau tem a vantagem de ter uma estrutura homogênea, particularmente no que diz respeito à granulometria das partes sólidas, podendo-se evitar aquelas diferenças de intensidade de tostado devidas à heterogeneidade das dimensões dos *nibs* e das amêndoas de cacau (BERTINI, 1989).

3.4. Avaliação nutricional dos alimentos

Os ensaios biológicos para avaliação nutricional dos alimentos baseiam-se na medida do crescimento e na retenção de nitrogênio em animais. Para que a precisão dos resultados seja satisfatória, os ensaios devem ser realizados com vários animais em cada grupo, as condições experimentais devem ser padronizadas e os resultados interpretados estatisticamente. Geralmente, o nível protéico é baixo na dieta (em torno de 10% p/p), de maneira que a quantidade de proteína disponível acaba sendo inferior às necessidades médias do animal. O fornecimento dos demais nutrientes deve ser adequado ao crescimento normal dos animais. Nestas condições, a proteína é utilizada eficazmente (quase toda a proteína é utilizada para formação de massa muscular e uma pequena parte dela é transformada em energia) e os resultados experimentais mostram as diferenças de valor nutritivo das proteínas em estudo (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Desde 1919 o PER (*Protein Efficiency Ratio*) tem sido reconhecido como o método preferido para a avaliação da qualidade das proteínas em muitos países, por se acreditar ser este método o melhor indicador do desempenho das proteínas em testes clínicos com animais (HENLEY, E.; KUSTER, J., 1994).

Atualmente, os conhecimentos sobre as necessidades de aminoácidos para seres humanos têm deixado em evidência as limitações do PER. Esse método (PER), que mede a habilidade da proteína em promover o crescimento

de ratos pequenos, superestima seriamente o valor de certas proteínas animais para o crescimento dos seres humanos, enquanto subestima o valor das proteínas vegetais para o mesmo fim (HENLEY, E.; KUSTER, J., 1994).

O rápido crescimento dos ratos aumenta as suas necessidades de certos aminoácidos essenciais, as quais são diferentes das dos seres humanos. Este foi o motivo para se considerar o PER um método não tão exato (HENLEY, E.; KUSTER, J., 1994).

O método PER considera e enfatiza o crescimento, enquanto o método NPR (*Net Protein Ratio*) considera também as necessidades protéicas para manutenção, o que faz deste (NPR) um método mais adequado de avaliação quando se trabalha com ratos, pelo fato de que estes apresentam taxa de velocidade de crescimento maior do que as crianças. Quantidades maiores de aminoácidos essenciais são requeridas pelos animais para atender a esta necessidade, podendo assim haver uma superestimação quando se faz a análise do PER de determinada proteína (DOS SANTOS, C., 1994).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matéria prima

As amêndoas de cacau, fermentadas e secas, da variedade “Forasteiro”, foram fornecidas pela indústria processadora de grãos de cacau INDECA S. A., localizada na cidade de Embu, São Paulo. Estas amêndoas foram produzidas pelos Irmãos Brandão, estado da Bahia.

4.1.2. Vidraria, equipamentos e aparelhos utilizados

- Destilador de Nitrogênio Tecnal, modelo TE-036.
- Desintegrador de Facas ICMA Tipo Rietz.
- Torrador rotativo elétrico de laboratório, PROBAT-WERKE
- Moinho de cilindros paralelos DTA/FEA/UNICAMP.
- Separador de testa e cotilédones de amêndoas por fluxo de ar, fabricado no DTA/FEA/UNICAMP.
- Peneiras (2,38 e 5,66 mm.)
- Extrator de gorduras tipo Soxhlet Fanem, modelo 170-1 (5 litros)
- Bloco digestor de proteínas TECHNICON - 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.
- Analisador de Aminoácidos P4000 (Thermo Separation Products), com reator PCX3100 (Pickering Laboratories).
- Liofilizador EDWARDS Super Modulyo-Piranisol.
- Moinho IKA- UNIVERSAL MUHLE M20 Janke & Sunsel Gmbhn. Cokg.
- Equipamento de Eletroforese Capilar Hewlett Packard 3D.
- Outros aparelhos e materiais comuns de laboratório e planta piloto.

4.1.3. Animais utilizados no ensaio biológico

No ensaio biológico com as dietas, utilizaram-se 48 ratos machos albinos heterogênicos, da linhagem Wistar, SPF, com 21 dias de idade e peso médio de $57,18g \pm 13,1$, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo.

4.1.4. Reagentes

Os reagentes utilizados nas análises químicas foram todos de padrão analítico (p.a.) e de diferentes procedências (marcas): Merck, Cinética Química Ltda., Synth e Grupo Química.

4.1.5. Caracterização da matéria prima (amêndoas)

Coletaram-se aleatoriamente três lotes de 100 amêndoas, e avaliou-se cada lote quanto à sua qualidade de fermentação, através da Prova de Corte (*Cut-Test*), seguindo-se o procedimento descrito a seguir: com o auxílio de um canivete, cortou-se longitudinalmente cada uma das amêndoas, conservando-se apenas uma das metades de cada uma delas. Colocaram-se as metades em uma bandeja especialmente preparada para este fim e contou-se o número de amêndoas mofadas, danificadas por insetos, ardósias, germinadas, achatadas e com outros defeitos. Os resultados (Tabela 15) foram interpretados de acordo com o método proposto na resolução número 42 de Conselho Nacional do Comércio Exterior (CONCEX, 1968)

Também foi realizada a quantificação do teor médio de cotilédones, testa e gérmen das amêndoas recebidas; para este fim pesaram-se primeiramente três lotes de 100 gramas de amêndoas, separou-se manualmente cada um dos componentes das amêndoas indicados anteriormente e pesaram-se as frações obtidas. Desta maneira pôde se ter uma idéia do rendimento (Tabela 17) das amêndoas de cacau.

4.2. Métodos

4.2.1 Processamento da matéria-prima

4.2.1.1. Preparo dos *nibs*

As amêndoas inteiras, fermentadas e secas, foram quebradas em moinho de facas tipo Rietz (IMCA) em fragmentos menores (*nibs*). Em seguida, os *nibs* foram separados da testa e germen com o auxílio de uma coluna de ar. Assim isolados, os *nibs* foram selecionados por tamanho, através de peneiragem. Os *nibs* menores que 2,38 mm foram eliminados e os maiores que 5,66 mm voltaram para nova fragmentação. O objetivo desta operação é ter *nibs* de tamanho uniforme para obter homogeneidade na operação de torração e também limitar o conteúdo de testa e gérmen para que estes não ultrapassem 5 % do peso total.

4.2.1.2. Análise das características físico-químicas dos *nibs*

Os *nibs* foram analisados quanto a:

- Teor de umidade: método 13.002 de AOAC (1984).
- pH: método 13.010 de AOAC (1984).
- Acidez titulável: método descrito por Lopez (1983).
- Teor de Proteína: método 13.011 de AOAC (1984)
- Teor de Gordura: método 13.033 de AOAC (1984)
- Teor de Cinzas: método 13.005 de AOAC (1984)

4.2.1.3. Torração dos *nibs* de cacau

A torração foi realizada em torrador rotatório elétrico com controle digital de temperatura altamente sensível, em lotes de 250 g. de *nibs* já selecionados. Esta operação foi conduzida a temperatura de 150 °C na camisa de aquecimento do aparelho, com tempos de permanência de 30, 34, 38, 42 e 46 minutos para cada lote de 250 g. O material torrado foi imediatamente resfriado, acondicionado em embalagens de filme de polietileno e estocado em freezer (- 18 °C) até o momento de sua utilização.

4.2.1.4. Obtenção dos flocos de Cacau

Os lotes de *nibs* já torrados foram laminados para facilitar a extração da gordura dos mesmos, com este objetivo foram passados através de um moinho de cilindros paralelos e ajustáveis, até se obter uma granulometria adequada.

4.2.1.5. Extração da gordura dos flocos de Cacau

Os flocos foram acondicionados em cone de papel de filtro e colocados em sacola de pano para evitar que o peso dos flocos rasgasse o papel filtro. Os flocos assim acondicionados foram desengordurados com hexano p. a., em extrator tipo Soxhlet de 5 litros de capacidade, durante 20 horas.

4.2.1.6. Determinação das curvas de solubilidade (INS)

Previamente ao preparo dos concentrados protéicos de cacau, foram obtidas curvas de solubilidade das proteínas do pó de cacau cru em diferentes valores de pH, a fim de se determinar as melhores condições para a extração das proteínas. O procedimento adotado foi o seguinte: amostras desengorduradas de cacau cru (1 g) foram solubilizadas em água destilada (10 ml) e o pH da solução foi ajustado com ácido cítrico e com hidróxido de sódio (0,1 N), numa faixa que variou entre 3,0 e 12,0, com intervalos de 0,5. Depois a solução foi submetida a agitação e posteriormente centrifugada. Aliquotas do sobrenadante foram usadas para a determinação de proteína. Apesar de ter sido utilizada metodologia de extração de isolados protéicos, o baixo teor de proteína dos precipitados (abaixo de 60%) indicou que os precipitados deveriam ser mais propriamente chamados de concentrados protéicos.

A solubilidade das proteínas foi determinada então através do Índice de Nitrogênio Solúvel (INS), segundo o método modificado de DENCH *et. al.* (1981) (citados por PEZOA, 1989). O INS foi determinado pela relação:

$$\text{INS} = (\% \text{ de Nitrogênio Solúvel} / \% \text{ de Nitrogênio Total}) \times 100$$

4.2.1.7. Obtenção dos concentrados protéicos

A obtenção dos concentrados protéicos do cacau foi realizada a partir do liquor torrado em diferentes tempos, desengordurado e transformado em pó, o

qual foi suspenso em soluções alcalinas até o pH de 9,5, em uma relação de pó de cacau/solução alcalina de 1:10. Este pH foi utilizado devido ao fato de a solubilidade das proteínas em meios de pH superiores não ter sido consideravelmente maior (Figura 2); assim, evitou-se expor a proteína a condições alcalinas mais severas. Neste pH (9,5), a maior parte das proteínas foram solubilizadas, conseguindo-se assim a remoção de material não desejado (principalmente fibras) por centrifugação. O material precipitado foi re-suspenso em solução alcalina pH 9,5, por três vezes sucessivas, a fim de se obter a maior recuperação possível de proteínas. O sobrenadante foi acidificado até o ponto isoelétrico das proteínas (pH de 4,5) e conseguir assim a remoção do precipitado protéico por centrifugação e conseqüente eliminação de sais minerais, carboidratos e outros materiais solúveis nestas condições. As operações, tanto a de re-suspensão do precipitado protéico quanto a de ajuste do sobrenadante novamente a pH 4,5, foram repetidas três vezes até eliminar ao máximo o material não protéico e no final obter-se um sobrenadante praticamente transparente. Este precipitado foi acondicionado em bandejas para depois ser liofilizado e, uma vez seco, utilizado como fonte de proteínas na formulação das dietas para avaliação nutricional.

4.2.2. Preparo das amostras para a determinação do perfil de aminoácidos

O procedimento de hidrólise e análise automática realizou-se com amostras dos concentrados desengordurados e secos; foram pesadas amostras finamente moídas, contendo 25 mg de proteína, em tubo Pyrex (n° 9825, de 12

x 150 mm), acrescentaram-se aproximadamente 30 ml de ácido clorídrico 6N e tampou-se o tubo com tampa provida de arruela de Teflon. A hidrólise foi conduzida em estufa a 110 °C durante 22 horas. Após a hidrólise, as amostras foram retiradas e resfriadas para posteriormente serem filtradas em funil com vidro sinterizado de pequena porosidade, completando-se o volume com água destilada a 100 ml. Deste volume retirou-se uma alíquota de 20 ml, a qual foi evaporada em sistema de rotoevaporador com vácuo e banho-maria a 40-50 °C, da seguinte forma: uma primeira evaporação do ácido foi seguida de duas evaporações após acréscimo de 10 ml de água destilada cada vez, para a remoção do ácido. O material, após a terceira evaporação foi redissolvido em 5 ml de tampão citrato de sódio pH 2,2, filtrado através de membrana Millipore (tamanho de poro de 0,22 µm). Alíquotas de 2 µl foram injetadas no equipamento para serem analisadas.

4.2.2.1. Determinação do perfil de aminoácidos

As determinações de aminoácidos totais nos concentrados protéicos foram realizadas em analisador automático de aminoácidos P4000 (Thermo Separation Products), com reator PCX3100 (Pickering Laboratories), com as seguintes características de operação:

- Coluna Na⁺: 8µm, 3mm de diâmetro e 250 mm de comprimento.
- Tampões citrato de sódio: A pH 3,15; B pH 7,4.
- Tampão da amostra: pH 2,2.
- Regenerante: Na⁺ 0,2 N

- Temperaturas: coluna 55 °C, reator 130 °C
- Taxas de fluxo: tampões e ninidrina: 0,3 ml/min.
- Tempo de análise: setenta e dois minutos, incluindo a regeneração da coluna.

4.2.3. Preparo das amostras para a determinação da fração albumina

Para o preparo do material para a análise da fração albumina foram solubilizadas amostras dos concentrados protéicos, finamente moídas, em água desionizada (10 mg/ml, pH ajustado para 9,3 com NaOH 0,1N), posteriormente estas amostras foram filtradas através de membrana Millipore (porosidade de 0,22 μm).

4.2.3.1. Determinação da fração albumina

A análise foi realizada em equipamento de Eletroforese Capilar HP 3D, provido de detetor de arranjo de diodos e capilar de sílica fundida de 72 cm de comprimento e 75 μm de diâmetro interno. A análise foi conduzida com tampão borato 50 mM pH 9,3, e a injeção realizada sob pressão de 50 mBar, durante 4 sec.

4.2.4. Ensaio biológico

4.2.4.1. Preparo dos animais

Um lote de 48 animais recém desmamados foi recebido, pesado e colocado em gaiolas individuais no Biotério da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA). Imediatamente após a chegada dos ratos, os mesmos foram adaptados durante dois dias, com água e alimento *ad libitum*. Após o período de adaptação, selecionaram-se grupos de 6 animais por dieta de modo que as médias de peso de cada grupo fossem semelhantes entre si e em relação à média de peso geral. A temperatura do ambiente foi mantida em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e a iluminação foi em ciclos de luz/escuro de 12 horas. O peso e o consumo alimentar dos animais foi registrado aos 3°, 7°, 11° e 14° dias do experimento.

4.2.4.2. Preparo das dietas

As dietas foram preparadas de acordo com o *American Institute of Nutrition Rodents Diets* (Tabela 21), de forma a constituírem as dietas destinadas à aplicação do teste nutricional NPR e a determinação do RNPR% (*Relative Net Protein Ratio*). O conteúdo de proteína foi ajustado para 10 % em cada uma das dietas, com exceção da dieta aprotéica. Preparou-se uma dieta com caseína como fonte de proteína e 6 dietas com fonte de proteína única e exclusivamente proveniente dos concentrados protéicos.

4.2.4.3. Teste aplicado

Quociente de Eficiência Líquida de Proteína (NPR) (BENDER & DOELL, 1957).

$$\text{NPR} = \frac{\text{Ganho de peso do animal teste (g)} + \text{Média de perda de peso do grupo em dieta aprotéica (g)}}{\text{Proteína consumida pelo animal teste (g)}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da matéria-prima

5.1.1. Teste de corte

Ocasionada pela falta de matéria-prima no mercado nacional, tem existido nos últimos anos no Brasil uma desuniformidade nos lotes de cacau comercial. O produto apresenta na grande maioria das vezes falta de tempo de fermentação, o que leva à presença de amêndoas com coloração marrom insuficiente e aroma característico de cacau mal fermentado. Estima-se que a grande maioria do cacau comercial brasileiro esteja sendo comercializada desta forma.

Os resultados da prova de corte (Cut Test), realizada em triplicata e considerando 100 amêndoas em cada teste, estão apresentados na Tabela 15. Os dados evidenciam o que foi exposto sobre a falta de tempo de fermentação. Em todos os aspectos considerados para a avaliação (Ardósias, Germinadas, Mofadas, Danificadas por Insetos e Achatadas), as amêndoas utilizadas no experimento encontraram-se dentro das especificações do CONCEX, 1968. No que diz respeito às amêndoas pouco fermentadas, o número destas (25) foi preocupante. Lamentavelmente, na atualidade uma importante porcentagem da produção nacional se encontra, segundo os próprios comercializadores, nestas condições.

Amêndoas mal fermentadas apresentam níveis elevados de compostos polifenólicos. Os compostos polifenólicos oxidados (quinonas) reagem ou complexam com aminoácidos naturalmente presentes, assim como os gerados por reações proteolíticas (FORSYTH *et al.*, 1958), formando derivados durante o processamento do cacau e se traduzindo em prejuízo para a qualidade do sabor do chocolate. Segundo KEENEY (1972) alguns aminoácidos, peptídeos e compostos polifenólicos aumentam o amargor, afetando o sabor final do chocolate.

5.1.2. Análises físico-químicas dos *nibs* de cacau

Na Tabela 16 é apresentada a caracterização química em base seca do material (*nibs*) utilizado no presente estudo.

Foi determinada também a composição física do material (amêndoas) utilizado no experimento; os resultados da determinação se encontram na Tabela 17. Os teores médios de cotilédones, testa e gérmen das amêndoas recebidas para o desenvolvimento do trabalho encontram-se dentro dos valores médios relatados na literatura (ZAMALLOA, 1994).

O rendimento em *nibs*, logo após a quebra e separo da testa e germen por peneiragem ficou na faixa de 75%.

Tabela 15. Resultados da prova de corte (Cut test)*

Defeitos	# de amêndoas
Ardósias	1,0
Germinadas	0,0
Mofadas	0,0
Danificadas por insetos	3,0
Achatadas	0,0
Pouco fermentadas	25,0

* 98.5 g., peso médio de 100 amêndoas

Tabela 16. Composição química dos *nibs* de cacau.

Composto	Porcentagem
Proteína	13,6
Fibras	5,54
Lipídios	53,65
Umidade	7,2
Cinzas	2,82
Outros Componentes ¹	17,19

¹ “Outros Componentes” representa o teor calculado por diferença, que inclui compostos tais como carboidratos, ácidos, taninos, alcalóides, etc.

Tabela 17. Composição física da amêndoa integral de cacau

Componentes	(%)¹
Cotilédone	84,50
Gérmen	0,91
Testa	14,59

¹ Os resultados apresentados na Tabela 17 foram obtidos com base em avaliações de lotes de 100 gramas de amêndoas em triplicata.

Quando comparamos os resultados aqui obtidos com aqueles relatados por MINIFIE (1970), pode-se observar que os teores de cinzas praticamente não diferem, enquanto que os teores de proteínas e lipídeos encontram-se um pouco abaixo dos níveis já relatados. Estas variações acontecem em função de muitas variáveis, como região de cultivo, pré-tratamentos (fermentação, secagem, etc.) e variedade de frutos, entre outras.

5.2. Torração

Durante a torração dos *nibs* de cacau a temperatura da camisa do forno rotativo elétrico utilizado foi controlada e mantida constante durante todo o processo em 150 °C. Simultaneamente foi controlado, com a ajuda de um termômetro digital, ao longo do processo, o perfil de temperatura dentro da cavidade de torração, (perfil apresentado na Figura 1).

O perfil apresentado na Figura 1 representa as médias das temperaturas registradas durante todas as torrações das amostras estudadas. A existência de uma boa reprodutibilidade durante o processo das diferentes amostras, permitiu garantir uniformidade em todos os casos.

A temperatura máxima atingida dentro da cavidade do forno elétrico antes dos *nibs* serem colocados para a torração, foi de 136 °C. Uma vez colocados os *nibs*, esta temperatura desce rapidamente para 61 °C, até o primeiro minuto do processo, subindo novamente até atingir o máximo de 151 °C para os tempos de 42 e 46 minutos de torração. As amostras torradas

durante 38 minutos atingiram máximos de 147 °C e as amostras torradas durante 30 e 34 minutos atingiram temperaturas finais de 143 e 147 °C, respectivamente.

5.3. Extração das proteínas

A solubilidade do nitrogênio (INS) em função do pH de cacau fermentado e seco (cru), apresenta um perfil comum para proteínas vegetais (Figura 2 e Tabela 18). Os resultados obtidos nesta análise enquadram-se nos valores obtidos por PEZOA (1985) para proteínas de isolado protéico de soja. CIRCLE & SMITH (1972) também relatam perfis muito parecidos com os encontrados na análise das proteínas do cacau, para a solubilidade de proteína de soja.

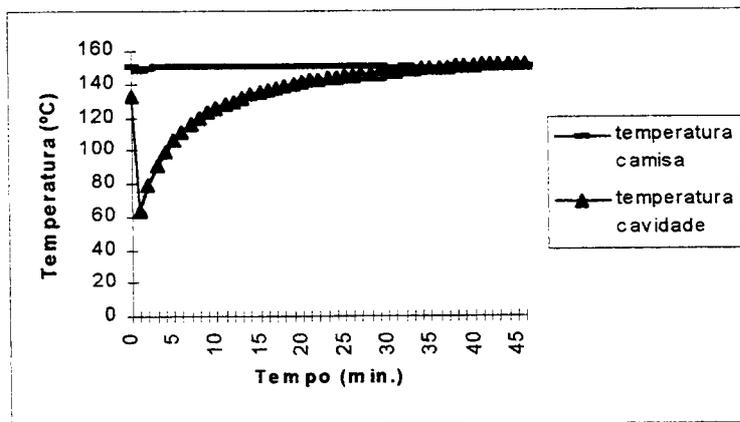


Figura 1. Perfil de valores médios de temperatura na camisa de aquecimento e dentro da cavidade do forno elétrico rotativo, durante a torração dos *nibs* de cacau.

Tabela 18. Índice de nitrogênio solúvel em função do pH do cacau fermentado, seco e desengordurado.

pH	(INS)
2,5	74,6
3,0	62,5
3,5	42,3
4,0	9,3
4,5	7,2
5,0	9,5
5,5	20,5
6,0	39,5
6,5	46,3
7,0	59,3
7,5	63,5
8,0	75,6
8,5	80,5
9,0	85,6
9,5	93,6
10,0	94,5
10,5	95,5
11,0	96,6

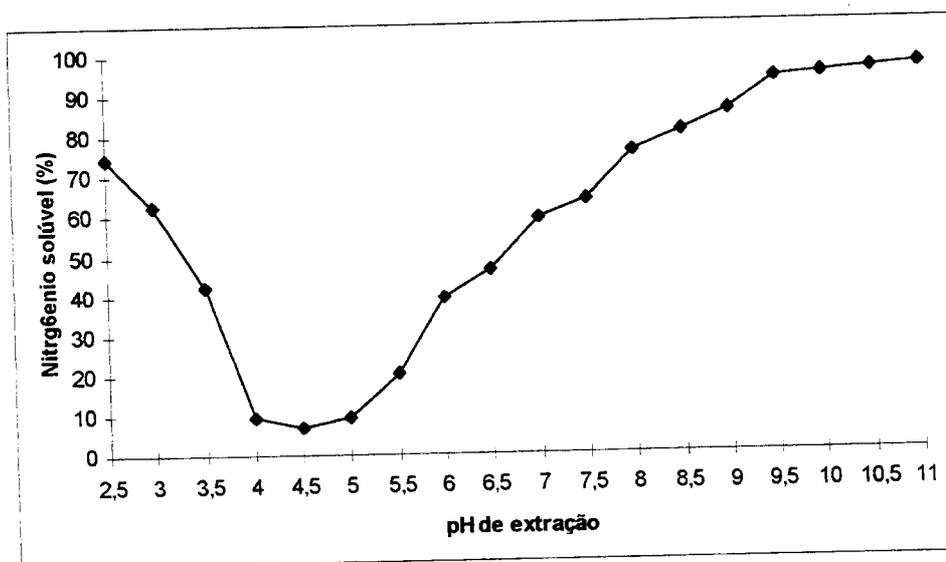


Figura 2. Solubilidade do nitrogênio da farinha desengordurada de cacau cru em função do pH de extração.

Os resultados de porcentagem de extração relacionada ao grau de torração evidenciaram a influência da temperatura na solubilidade das proteínas, observando-se que a queda na recuperação de proteínas é significativa quando se ultrapassa o tempo normal de torração. Ressalta-se que o tempo preferido nos testes sensoriais foi de 38 minutos (Figura 3 e Tabela 19). Na mesma Tabela estão apresentadas as porcentagens de proteína presente nos concentrados protéicos secos, obtidos a partir de cacau torrado nos tempos especificados. Observa-se que a etapa de torração tem influência sobre os conteúdos de proteína nos concentrados; isto era de se esperar, depois de se observar a influência do processamento térmico nos teores de recuperação da proteína.

Analisando os resultados da Tabela 19, observa-se que existe uma diminuição no teor de proteína dos concentrados em função do tempo de torração. Todavia, a proteína extratável permaneceu surpreendentemente elevada durante os primeiros 38 minutos do tratamento térmico, o que indica que a desnaturação térmica inicial não resultou em perda significativa de solubilidade. Já as perdas registradas para 42 e 46 minutos, de tratamento térmico, representaram queda da solubilidade, mas ainda não muito grande.

Na matriz dos *nibs*, não se sabe qual foi a temperatura final das proteínas. Entretanto, estima-se que a mesma tenha atingido valores acima dos 100 °C, ao menos para os tempos mais longos. Nessas temperaturas, albuminas e globulinas em solução devem já atingir desnaturação e precipitação. Portanto, os resultados sugerem que os componentes do *nib*, que não os de natureza

protéica, estão se associando as proteínas e aumentando a sua resistência à desnaturação térmica, na medida em que calor é aplicado.

Não foi investigada a natureza da fração complementar da proteína nos concentrados (parte não protéica). Entretanto, é de se supor que somente substâncias química ou fisico-quimicamente ligadas às proteínas podiam estar co-precipitando com estas, dado o processo de isolamento que se adotou. Considerando que as substâncias fenólicas (polifenóis) possuem reconhecida reatividade com as proteínas (ZAK & KEENEY, 1976), os resultados aqui apresentados sugerem que os polifenóis exercem inicialmente uma associação leve com as proteínas, protegendo-as contra a desnaturação térmica e, mais tarde, tal associação se torna mais estável (reação química), resultando em complexos insolúveis. Esta hipótese é consistente com os relatos de FORSYTH *et al.* (1958) e KEENEY (1972) (citados por DIMICK & HOSKIN, 1981) no sentido de que aminoácidos livres na amêndoa de cacau, produto da ação proteolítica durante a fermentação, reagem durante a torração, formando complexos insolúveis com compostos polifenólicos oxidados (quinonas), os que são responsáveis em parte pelo sabor amargo do cacau torrado.

Tabela 19. Extensão da recuperação de proteína nos diferentes tempos de torração estudados.

Tratamento (min)	Proteína recuperada (%) ¹	(%) de proteína no concentrado protéico (b.s.) ¹
Cru	88,4a	61,20a ± 0,52
30	86,52a	58,33b ± 0,81
34	84,65b	57,55c ± 0,62
38	86,12a	57,80c ± 0,53
42	72,65c	48,39d ± 0,87
46	65,32d	46,04e ± 0,64

¹ Todos os valores da mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância)

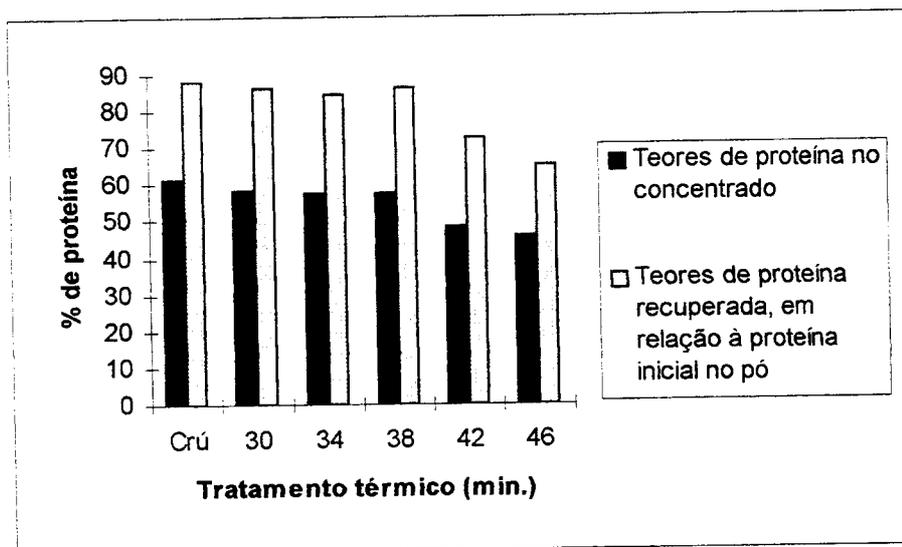


Figura 3. Teores de proteína recuperada no concentrado protéico em relação à proteína inicial no pó de cacau, torrado em diferentes tempos, e teores de proteína nos concentrados obtidos e utilizados no ensaio biológico.

5.4. Fração albumina

A Tabela 20 apresenta os valores percentuais, em base seca, das frações albumina presentes nos concentrados protéicos. Observa-se que existe uma variação dessas porcentagens, considerável e significativa ($p < 0,05$) em função do tempo de torração. Contudo, nos tratamentos mais curtos (30, 34 e 38 min), as porcentagens apresentaram uma evolução cíclica, ou seja, um perfil sinusoidal muito interessante do ponto de vista físico-químico. Vale a pena ressaltar aqui que o aumento na concentração da fração albumina nos concentrados (amostras 30 e 38) pode ter acontecido devido ao aumento da solubilidade da fração albumina, por sua vez, oriundo do tratamento térmico. Este efeito é refletido no aumento da concentração dessa fração protéica no concentrado, o que possivelmente explique o motivo pelo qual esses concentrados não apresentaram diferença marcante em relação ao concentrado proveniente de proteína de cacau cru. No caso da amostra torrada durante 30 minutos, a concentração da fração albumina apresenta um aumento com respeito à concentração da fração no concentrado do cacau cru. Já no caso da amostra tratada durante 34 minutos a concentração cai, aumentando novamente no cacau tratado durante 38 minutos. Por fim, a concentração cai definitivamente nas amostras tratadas durante 42 e 46 minutos. Este comportamento da fração albumina pode ser observado de uma melhor maneira na Figura 4.

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem dos resultados apresentados por ZAK & KEENEY (1976), nos quais a fração albumina

aumenta em sua concentração durante o processo térmico, inversamente aos dados obtidos na quantificação dessa fração neste trabalho. A razão para este comportamento não ser coincidente nos dois casos ainda não foi estabelecida. Entretanto, não se tendo condições exatamente iguais nos dois casos, é possível que se esteja focalizando fases diferentes de um processo que mostra evolução cíclica.

Observando-se a Figura 4 e comparando-a com a Figura 3, observa-se que o aumento na concentração de fração albumina na amostra 38 pode ter relação direta, como já foi comentado, com o aumento na porcentagem de recuperação de proteína no concentrado 38. Esta porcentagem (86,12%) teve um aumento em relação à amostra 34 (84,65%). Na Tabela 19 observa-se que este aumento está refletido no aumento da concentração de proteína deste (57,80%) em relação ao concentrado 34 (57,55%).

5.5. Análise aminoacídica

A Tabela 21 mostra as médias dos perfis de aminoácidos encontrados nos concentrados protéicos extraídos dos pós de cacau torrados por vários tempos, os quais foram utilizados como fonte de proteína nas dietas usadas no ensaio biológico. Pode-se observar uma clara perda da maioria dos aminoácidos a cada intervalo uniforme de tempo.

Tabela 20. Porcentagens em base seca da fração albumina presente nos concentrados protéicos de cacau tratado termicamente.

Tratamento	(%) Fração albumina¹
Cru	35,65a ± 2,54
30	45,37b ± 1,43
34	34,29c ± 1,45
38	40,73d ± 0,98
42	28,25e ± 2,01
46	18,10f ± 1,45

¹ Valores da fração albumina com letra diferente são significativamente diferentes entre si, a um nível de significância de 5%.

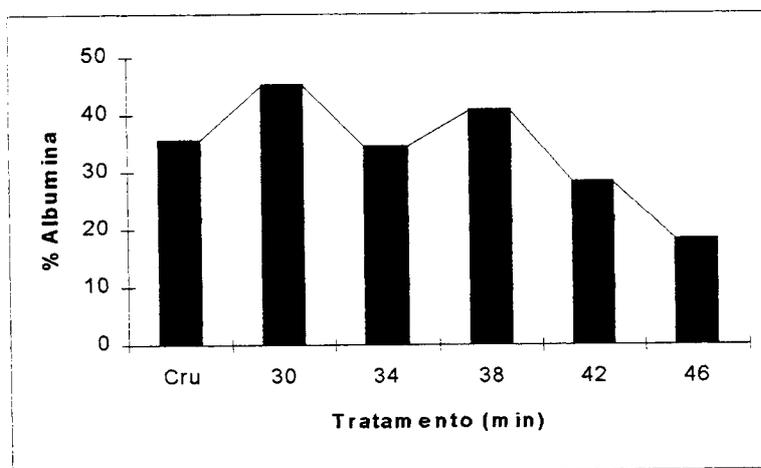


Figura 4. Variação gráfica da porcentagem da fração albumina nos concentrados protéicos de cacau tratados termicamente por diferentes tempos.

Tabela 21. Composição em aminoácidos dos concentrados protéicos em função do tempo de torração¹

Aminoácido	Cru	30	34	38	42	46
Aspártico	119,49	108,05	96,21	96,14	69,33	72,21
Treonina	39,10	33,20	26,37	25,36	22,26	26,43
Serina	14,56	14,73	12,73	12,24	10,13	11,81
Ac. Glutâmico	248,80	251,17	239,00	222,23	152,92	151,75
Prolina	24,77	21,82	21,41	17,36	14,74	11,17
Glicina	48,13	46,35	42,95	38,91	29,23	28,92
Alanina	41,36	38,36	38,19	35,04	29,56	29,38
Cistina	27,81	29,51	28,43	25,30	20,60	20,53
Valina	70,26	64,80	47,42	43,34	35,57	43,58
Metionina	11,07	11,09	11,87	11,59	8,35	7,22
Isoleucina	28,01	24,64	22,64	20,82	15,73	15,40
Leucina	61,98	57,09	56,83	52,14	41,63	41,18
Tirosina	39,31	39,13	38,38	35,68	25,80	26,25
Fenilalanina	49,83	48,69	47,33	45,43	34,21	34,52
Lisina	59,62	51,04	46,87	39,50	25,52	30,11
Amônia	11,82	11,82	11,47	10,57	7,84	7,17
Histidina	18,21	18,58	17,57	17,36	10,90	11,92
Arginina	94,36	80,83	86,34	79,34	56,35	57,80
Totais²	1008,48a	950,90b	892,03c	828,35d	610,67e	627,37f

¹ Os valores (mg de aminoácido por g de proteína) representam médias de duas determinações.

² Tanto os valores individuais de um mesmo aminoácido como os valores totais foram significativamente diferentes entre os diversos tempos (Teste de Tukey a 5% de significância)

A maioria dos aminoácidos sofrem perdas, que poderiam ser consideradas pequenas, até aproximadamente os primeiros 38 minutos de tratamento térmico, excetuando-se a lisina, arginina, valina e treonina, estes aminoácidos tiveram perdas acentuadas já a partir dos primeiros 30 minutos de torração (Figura 5). BERTINI (1989) relata que certos aminoácidos, aquecidos à temperatura de 100 e 150 °C, na presença de glicose, produzem aromas de chocolate fraco e chocolate mais acentuado; esses aminoácidos são a treonina e a valina, respectivamente. Exatamente estes são os aminoácidos que têm uma perda mais acentuada a partir do minuto 30.

LOPEZ & QUESNEL (1971; citados por MERMET *et al.*, 1992) mostraram que a torração de misturas simples de açúcares e aminoácidos conduziu ao desenvolvimento de aroma de cacau, porém diferente do aroma natural adquirido após a torração. Este aspecto poderia explicar parte da perda significativa dos aminoácidos durante a torração, especialmente depois do minuto 38.

Parte da diminuição na concentração de ácido glutâmico e de fenilalanina pode estar relacionada, também, à formação de aroma de chocolate. ADRIAN (1973) citou em seu trabalho 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 pura deu origem a um sabor de chocolate açucarado.

As perdas da lisina (aproximadamente 33% aos 38 min.) e arginina são compreensíveis, devido à reatividade de suas cadeias laterais. Contudo, as perdas de aminoácidos de cadeia lateral não reativa, como a valina, (que teve um decréscimo de aproximadamente 39% nos primeiros 38 minutos de tratamento térmico), só poderiam ser explicadas se o aminoácido fosse N-terminal.

Outro aminoácido de cadeia lateral instável, cuja perda aproximada de 35% aos 38 min está também relacionada com o valor nutricional, é a treonina. Foi interessante observar, todavia, que a serina não mostrou alterações análogas, apesar da sua similaridade química com a treonina.

As perdas ocorridas após os 38 minutos de tratamento térmico foram numericamente consideráveis para todos os aminoácidos, sendo que a partir dos 42 minutos de tratamento térmico houve tendência ao aprofundamento e estabilização das perdas (Figura 6). O aprofundamento das perdas entre os tempos 38 e 42 chamou a atenção por ser geral e mostrar pouca ou nenhuma tendência ao retorno. De um lado, após o trigésimo-oitavo minuto parece ter-se atingido um estado de perda de umidade e/ou irreversibilidade do processo que permitia a variação cíclica da solubilidade e extratabilidade. Do outro, é provável que a partir do minuto 38 se inicie uma nova fase de perdas, não mais por associação e dissociação físico-química das macromoléculas, e sim por quebra irreversível de cadeias laterais.

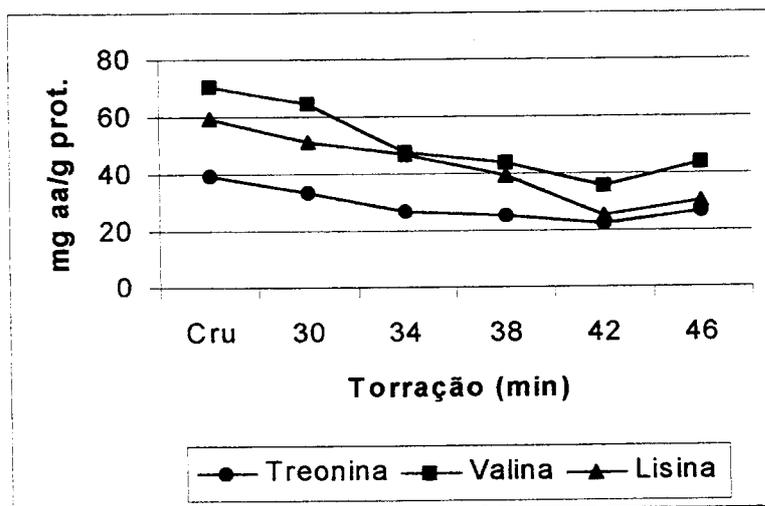


Figura 5. Evolução das concentrações dos três aminoácidos que mostraram taxas de perdas mais constantes nos concentrados protéicos durante a torração de cacau.

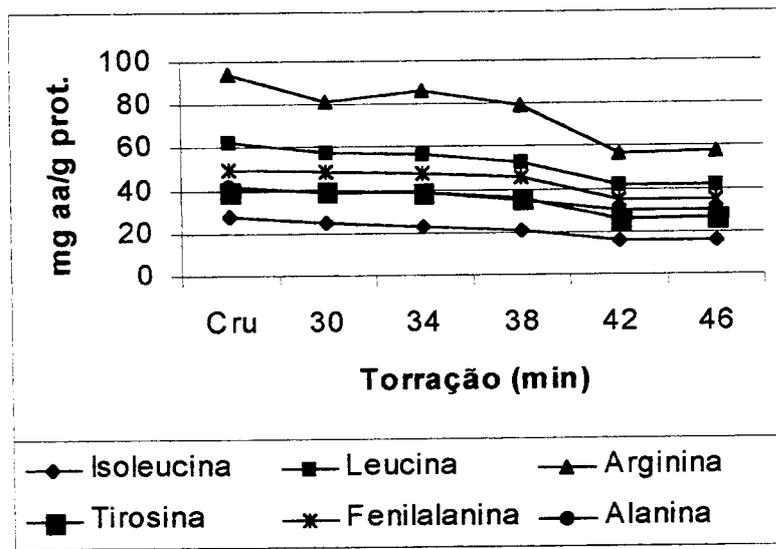


Figura 6. Concentrações de alguns aminoácidos que têm tendência à estabilização depois dos 42 minutos de tratamento.

Também não passou despercebido o fato de que, apesar desta fase mostrar perda estável de teor de proteína nos concentrados, os três aminoácidos mais sensíveis (valina, lisina e treonina) exibiram recuperação coerente (Figura 5)

Foi por demais interessante observar que os aminoácidos susceptíveis à oxidação, como são a metionina e a cistina (Figura 7), durante o aquecimento não apresentaram maiores perdas, comparando com outros aminoácidos, até os 38 minutos. Tal observação foi inesperada, visto que reações de óxido-redução são comuns determinantes da solubilidade de proteínas durante o aquecimento (FUKUSHIMA, 1980). Em adição, aminoácidos como cistina, serina e treonina são precursores da desidroalanina após beta-eliminação durante o aquecimento (WATANABE *et al.*, 1977; FRIEDMAN, 1984; WHITAKER *et al.*, 1980). Parece evidente então que reações irreversíveis, como a beta-eliminação, somente venham a acontecer depois de 38 minutos de aquecimento.

REINECCIUS *et al.* (1972b) relataram que a perda de aminoácidos em amêndoas fermentadas durante a torração (150 °C, 30 min) foi de 26%. Este valor fica distante do valor encontrado para a perda de aminoácidos do cacau torrado durante 38 minutos (à temperatura de 150 °C na camisa de aquecimento) no presente trabalho (17%); esta comparação é realizada porque supomos que o tempo e a temperatura utilizados no trabalho citado foram escolhidos por serem os mais apropriados para a obtenção de um cacau com características sensoriais próprias para a produção de chocolate, tempo que no

nosso caso foi de 38 minutos. Esta diferença pode dever-se além do fato da torração ter sido realizada na forma de amêndoas inteiras, ao tipo de equipamento utilizado para realizar a torração, já que esses equipamentos têm taxas de aquecimento variáveis e dispositivos de controle de temperatura e sistemas de isolamento diferentes.

ROHAN & STEWART (1967) relataram que a perda dos aminoácidos durante a torração (28 min à temperatura de 182-3 °C) fica em torno de 53%. Como foi mencionado anteriormente estes resultados não podem ser facilmente comparados com os obtidos no presente trabalho, devido à diversidade de equipamentos utilizados para o tratamento térmico. Vale a pena lembrar que no processo térmico do nosso trabalho, a temperatura foi ajustada na camisa de aquecimento em 150 °C; no entanto os *nibs* sofreram aquecimento gradativo que começou em torno de 60 °C no fim dos primeiros 60 segundos de processamento.

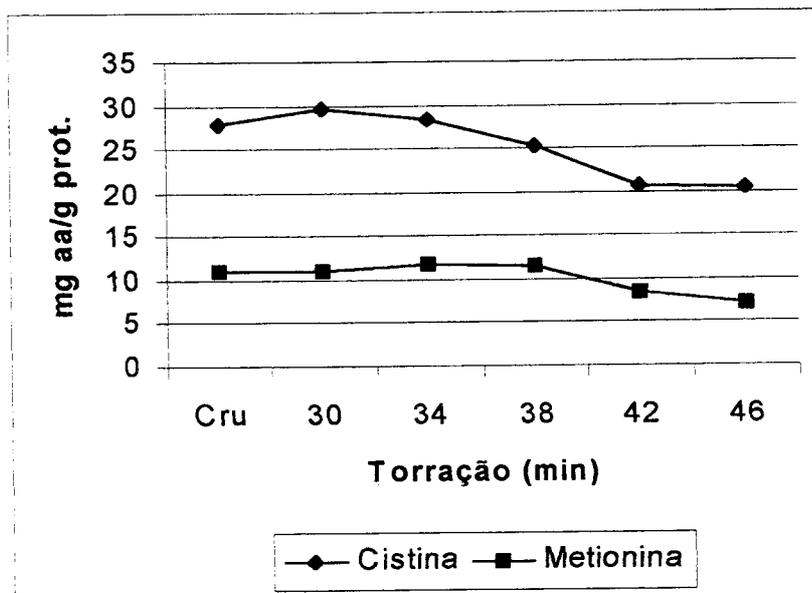


Figura 7. Concentrações de aminoácidos susceptíveis à oxidação durante o tratamento térmico.

5.6. Ensaio biológico

A composição de cada uma das dietas utilizadas no experimento está descrita na Tabela 22. As dietas foram ajustadas para aproximadamente 10% de proteína, proveniente exclusivamente do cacau, com exceção da dieta padrão (que continha 10% de caseína) e a dieta aprotéica.

As curvas de ganho de peso dos ratos no ensaio biológico (Figura 8) representam a influência da torração na qualidade nutricional das proteínas do cacau. Observou-se que as tendências de variação de peso foram suaves e que o ganho de peso dos ratos com as dietas com proteínas de cacau ficou em torno de 40% do obtido com a dieta controle com caseína, com exceção das cacaos torrados por 42 e 46 minutos. Estes últimos não promoveram qualquer crescimento, indicando valor suficiente apenas para a manutenção da massa corporal inicial; ou seja produziram balanço zero.

Acompanhando o experimento através da Tabela 23, pode-se observar que os grupos experimentais evoluíram de peso diferenciando-se significativamente em três categorias, no final do período de duas semanas: 1) o conjunto composto pelos grupos Cru, 30 e 34 min; 2) o conjunto dos menos torrados (30, 34 e 38 min) e 3) o dos mais torrados (42 e 46 min). As diferenças nas taxas de crescimento não foram significativas os suficiente no fim da primeira semana, para discernir mais do que um grupo.

Fica evidente neste estudo que a torração (150 °C) por tempos iguais ou superiores a 42 minutos, levam à diminuição do valor biológico das proteínas até um ponto que produz crescimento zero. Evidenciou-se também que o cacau torrado durante 38 minutos estimulou um crescimento que, mesmo sendo numericamente inferior àqueles dos torrados por 30 e 34 minutos, não foi estatisticamente diferente. Tendo em vista que o tempo de 38 minutos foi o que teve melhor nota na apreciação sensorial, podemos afirmar que não é necessário destruir todas as propriedades biológicas das proteínas do cacau para poder obter as características sensoriais de um bom chocolate.

Por outro lado, restam poucas dúvidas de que a torração ocasionou um certo grau de deterioração das proteínas. Sabe-se que normalmente a proteína levemente aquecida é mais nutritiva do que a proteína crua. Entretanto, a proteína do cacau torrado por 30 min já possui valor inferior à proteína do cacau cru.

As proteínas do cacau aqui considerado como sobretorrado, por sua vez, não perderam a totalidade de seu valor biológico. O fato de não promoverem o crescimento do animal não deve ser interpretado como sendo desprovidas de qualquer valor biológico. Isto pode ser corroborado observando o balanço metabólico (crescimento) negativo do grupo com dieta aprotéica.

Tabela 22. Composição das dietas utilizadas para o experimento em cada um dos 8 grupos de ratos.

Produto	Grupo Padrão (%)	Grupo Aprotéico (%)	Grupo Cru (%)	Grupo 30' (%)	Grupo 34' (%)	Grupo 38' (%)	Grupo 42' (%)	Grupo 46' (%)
Amido de Milho	47,40	59,45	43,06	42,30	42,07	42,14	38,78	37,72
Malto-Dextrina	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50
Mistura Vitamínica	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de Soja	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
Fibra	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Mistura Mineral	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
L-Cistina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Tert-butilhidroquinona	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
Proteína ¹	10 ²	0	10 ³					
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

¹ A quantidade de caseína e de concentrado protéico foi calculada de maneira a se ajustar a 10% o teor de proteínas.

² A caseína comercial utilizada continha 83, 24% de proteína.

³ Proteína proveniente do cacau.

Tabela 23. Variação dos pesos médios¹ dos grupos de ratos alimentados com proteína de cacau durante duas semanas

Dietas	DIAS				
	Início	3	7	11	14
Controle (caseína)	57,15a ± 9,98	73,35a ± 9,74	89,97a ± 10,65	115,20a ± 11,43	130,98a ± 11,65
Cru	57,40a ± 8,65	61,33b ± 8,65	68,72b ± 9,90	79,08b ± 10,87	87,53b ± 12,43
30	57,35a ± 7,54	59,42b ± 9,98	65,50bc ± 10,15	75,23bc ± 12,14	84,30bc ± 12,45
34	56,60a ± 8,87	59,10b ± 9,32	64,70bcd ± 9,54	73,17bc ± 11,43	82,17bc ± 12,34
38	56,95a ± 8,90	58,80b ± 8,87	63,80bcd ± 10,54	70,07c ± 10,43	80,25c ± 10,54
42	56,20a ± 9,64	57,22bc ± 9,12	59,77d ± 8,54	62,53d ± 9,12	64,92d ± 10,32
46	57,55a ± 7,54	58,30bc ± 8,54	60,10cd ± 9,87	61,70d ± 9,97	63,70d ± 10,09
Controle (aprotéica)	58,22a ± 9,56	54,15c ± 8,87	52,08e ± 8,43	50,00e ± 7,54	47,52e ± 6,43

¹ Todos os valores em gramas de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância)

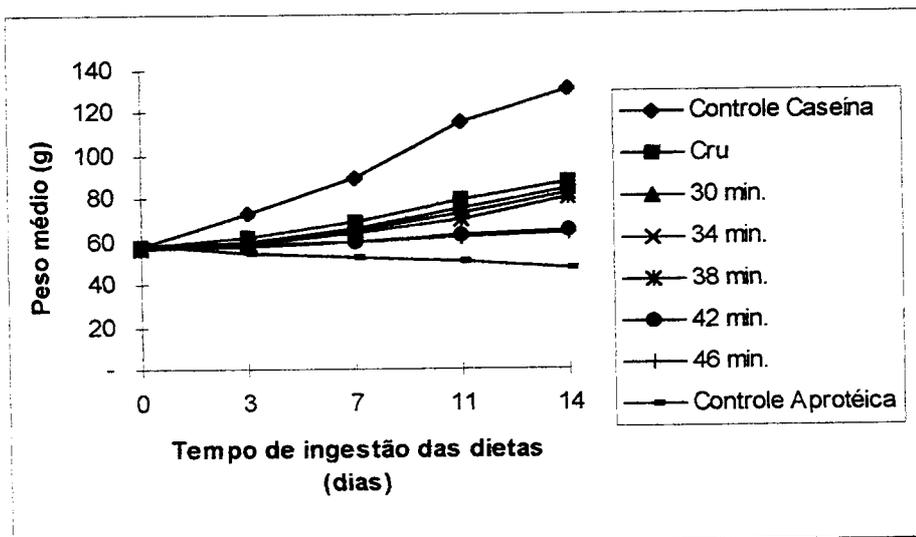


Figura 8. Evolução ponderal dos ratos submetidos às dietas com fontes protéicas provenientes do cacau torrado em diferentes tempos e dietas controle (caseína e aprotéica).

Dessa forma, mesmo no cacau torrado por 46 minutos, as proteínas possuem suficiente poder biológico para garantir a manutenção do peso do animal.

Na Tabela 24 estão apresentados os valores de NPR e RNPR encontrados no presente estudo. Com relação aos valores de RNPR, pode-se observar que os grupos 30 e 34 min não foram significativamente inferiores ao cacau cru. Entretanto, o grupo 38 min foi significativamente inferior apenas ao grupo cru, mas não aos torrados por tempos mais curtos. Já os grupos 42 e 46 min foram indiscutivelmente inferiores a todos os demais grupos.

Tabela 24. Valores de NPR e RNPR das dietas em estudo e NPR da dieta controle (Caseína como fonte de proteína)

Dietas (Tempo de torração)	NPR¹	RNPR¹
Controle (Caseína)	4,63 ± 0,12	100
Cru	3,26a ± 0,11	70,41a
30	3,18ab ± 0,13	68,68ab
34	3,16ab ± 0,10	68,25ab
38	3,06b ± 0,09	66,09b
42	2,35c ± 0,12	50,75c
46	2,26c ± 0,14	48,81c

¹ Os valores de NPR e RNPR de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância)

6. CONCLUSÕES

Considerando os dados aqui apresentados sobre *nibs* de cacau fermentado e aquecido de forma controlada, por um período total de 46 minutos, temperatura final interna da câmara de torração de 150 °C e parâmetros das proteínas coletados em intervalos de tempo uniformes, podem ser extraídas as seguintes conclusões:

Até ser atingido o tempo mais adequado de torração (38 minutos) não houve influência significativa ($p < 0,05$) do tempo de torração na solubilidade, e consequentemente, na recuperação de proteínas nos concentrados protéicos.

O ganho de peso dos ratos submetidos à dieta com proteínas de cacau cru, em volta de 40% do ganho dos ratos submetidos à dieta com caseína foi superior aos obtidos com as proteínas dos cacaos torrados, mas não estatisticamente significativo.

A diminuição de valor nutricional das proteínas de cacau torrado para o intervalo de 30 a 38 min não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Considerando que testes sensoriais apontaram a torração, no tipo de equipamento usado neste estudo, a 150 °C, por 38 min, como a que confere o melhor sabor ao cacau, estas condições poderiam ser as recomendadas para o setor industrial.

Os valores de ganho de peso para os grupos de ratos alimentados com proteínas obtidas de cacau torrado durante 42 e 46 minutos foram próximos de zero, indicando que as formas de nitrogênio extraído do cacau torrado por esses tempos tiveram a capacidade apenas de manter o peso do rato durante o período de avaliação.

Todas as concentrações da fração albumina analisadas dos concentrados protéicos estudados foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre si. Uma diminuição cíclica da quantidade de albumina extraída foi observada desde a amostra crua até a amostra torrada por 42 minutos. Tal comportamento pode resultar de rearranjos físico-químicos parcialmente reversíveis da proteína até os 42 minutos.

A maioria dos aminoácidos provenientes de cacau torrado, até os 38 minutos, sofreu perdas consideradas pequenas na sua concentração, excetuando-se a lisina, valina e treonina, as quais foram acentuadas já a partir dos primeiros 30 minutos de torração.

As perdas de aminoácidos, ocorridas após os 38 minutos de torração, foram consideráveis para todos os aminoácidos, sendo que nos últimos 4 minutos de tratamento térmico (42 a 46 min), houve uma tendência à estabilização.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Pesquisar a influência da fermentação na solubilidade e no valor nutricional das proteínas de cacau.

Aprofundar o estudo sobre o efeito cíclico observado na concentração da fração albumina e na solubilidade das proteínas torradas em função do tempo. Verificar a relevância desse fenômeno no desenvolvimento das qualidades sensorial e nutricional.

Estudar a influência da umidade inicial, assim como a sua variação subsequente, das amêndoas sobre a concentração dos aminoácidos após a torração.

Aprofundar o estudo sobre as proteínas de cacau torrado e sobretorrado, utilizando métodos de avaliação da qualidade de proteínas, inclusive o balanço de nitrogênio.

Estudar a participação das proteínas da fração globulina nos temas acima sugeridos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC 1984 Official Methods of Analysis. (14 ed). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- AREMU, C. Y.; AGIANG, M. A.; AYATSE, J. O. I., Nutrient and antinutrient profiles of raw and fermented cocoa beans. **Plant Foods for Human Nutrition** 48: 217-223, 1995
- BAGNIS, G. C. **Isolado protéico de girassol, obtenção e propriedades**; Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1984
- BAREL, B; GUYOT, B; VINCENT, J.C., Les fractions proteiques du cacao avant et apres torrefaction. influence de la fermentation. **Café Cacao Thé** v. 27 n. 2: p. 127-144, 1983.
- BENDER, A. E. **Nutrición y Alimentos Dietéticos**, 1973, Editorial Acribia, Zaragoza.
- BENDER, A. E. & DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **The British Journal of Nutrition**, 11 :138-143, 1957.
- BERTINI, A. Torrefacción del liquor de cacao. **Alimentaria** 26(204): 33-39, 1989.

- CIRCEL, S. J.; SMITH, A. K. **Soybean: chemistry and technology**, Wesport. AVI PUBLISHING v.1, p.294-338, 1972.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D., **Proteínas Alimentarias**, Editorial Acribia, Zaragoza, 1989.
- CONSELHO NACIONAL DO COMÉRCIO EXTERIOR (BRASIL).
Resolução nº 42. Rio de Janeiro. 1968. 9p.
- COOK, R. C. **Chocolate Production and Use**. 1 ed. New York Books for Industry Inc; 1972. 503p.
- DE MELLO, E. M. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de soro de queijo, por ultrafiltração**; Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1989.
- DE MELO, J. G. **Avaliação bioquímica e nutricional da proteína da farinha desengordurada de amêndoa de babaçu**, Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1983.
- DENKE, M. A. Effects of cocoa butter on serum lipids in humans: historical highlights. **Am. J. Clin. Nutr**, p.1014S-1016S, 1994, Suppl. 60.

- DIMICK, P. S.; HOSKIN, J. M. Chemical-physical aspects of chocolate processing - A Review. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J**, v.14, n.4, p.269-281, 1981.
- DODO, H. W.; FRITZ, P. J.; FURTEK, D. B. A cocoa 21 kilodalton seed protein has trypsin inhibitory activity. **Café, Cacao, Thé**, v. 36, n. 4, p. 276-284, 1992.
- DOS SANTOS, C. **Estudo comparativo do valor biológico das proteínas do leite de vaca e de soja em fórmulas infantis**, Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1994.
- DOUGLAS, TIMBLE, e KEENEY. Extraction, fractionation, and amino acid composition of brazilian comum cacao. **J.Agric. Food Chem.**, v.25, n.2, 1977.
- DRUMMOND, M. C. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Teobroma cacao* L), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**, Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1998.
- FADINI, A. L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração do cacau frente ao processo por microondas**, Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1998.

- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C.; ROBERTS, J. B. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. **J. Sci. Food Agric**, v.9, p.181, 1958
- FRIEDMAN, M.; GUMBMANN, M.; MASTERS, P. M. Protein -Alkaline Reactions: Chemistry, toxicology and nutritional consequences. Em M. Friedman (ed.) **Nutritional and toxicological aspects of food safety**, cap. 18, New York, Plenum Press, 1984.
- FUKUSHIMA, D. Deteriorative changes of proteins during soybean food processing and their use in foods. **Chemical Deterioration of Proteins**. Ed. Whitaker J. R. e Fujimaki, M. ACS Symposium Series, nº 123 Washington, D.C., 213-240. 1980
- GILABERT, E. M. V. **Comparação das propriedades reológicas da massa de cacau torrada convencionalmente e por microondas**, Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1997.
- HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**. April, 1994.
- HOSTETLER, K. A.; MORRISSEY, R. B.; TARKA, S. M.; APGAR, J. L.; SHIVELY, C. A. Three-generation reproductive study of cocoa powder in rats. **Fd. Cem. Toxic.**, v. 28, n. 7, p. 483-490, 1990.

- JAQUET, M; VINCENT, J. C.; HAHN, J.; LOTODÉ, R. Le sechage artificiel des fèves de cacao. **Café Cacao Thé**, v. 24 n. 1: 43-56, 1980.
- KEENEY, P. G. Various interactions in chocolate flavor. **J. Am. Oil Chem. Soc**, v.49, p.567, 1972.
- MARAVALHAS, N. Armazenagem intermediária do cacau comercial. **Cacau Atualidades**. (13): 3-11, 1976.
- MERMET, G.; CROS, E.; GERGES, G. Étude préliminaire de L'optimisation des parametres de torréfaction do cacao. **Café, Cacao, Thé**, v.36, n.4, p.285-290, 1992.
- MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa and confectionery science and technology**. West Port, AVI, 1970, 480p.
- MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa, and confectionery: science and technology**, 3. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 904p.
- OFFEM, O. J. Individual variation in the amino acid and chemical composition of defatted cocoa bean meal of three varieties of cocoa (*Theobroma cacao*) from South-eastern Nigeria. **J. Sci. Food Agric.** **52**, 129-135. 1990.

- PEZOA, G. N. H. **Contribution a l'étude d'un capteur por controlar en continu le procédé de torréfaction.** França, 1989. 170p. These Docteur Université de Technologie de Compiègne.
- PEZOA G. N. H. **Estudo sobre utilização de hidrociclones para a separação de partículas no processamento de concentrado e isolado protéico de soja,** Tese de Mestrado, FEA, Unicamp, 1985.
- PETTIPHER, G. L. The extraction and partial purification of cocoa storage proteins. **Café Cacao The**, vol. XXXIV, No.1, janv-mars 1990.
- REINECCIUS, G. A.; ANDERSEN, D. A.; KAVANAGH, T. E.; KENNEY, P. G. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. **J. Agr. Food Chem**, v.20, n.2, p.199-201, 1972a.
- REINECCIUS, G. A.; KENNEY, P. G.; WEISSBRGER W. Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa bean. **J. Agric. Food Chemistry**, v.20, n.2, p.202-206, 1972b.
- ROHAN, T. A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: changes in the free amino acids during the roasting of cocoa beans. **J. of Food Science**. 31: 202-205, 1967.

- SARWAR, G. et. al. Relationship between amino acid scores and protein quality indices based on rat growth. **Plt. Fd. Hum. Nutrition. 39**: 33-44. 1989.
- SEIKI, K. Chemical changes during cocoa bean fermentation using the tray method in Nigeria. **Rev. Int. Choc. (RIC) 28**, 38-42. 1973.
- SGARBIERI, W. C. **Alimentação e Nutrição**. Brasil, Editora da UNICAMP, 1987 387p.
- SOTELO, A.; ALVAREZ, R. G. Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. **J. Agric. Food Chem.**, n. 39, p. 1940-1943, 1991.
- WATANABE K.; KLOSTERMEYER, H. Formation of dehydroalanine, lanthionine and lysinoalanine during heat treatment of beta-lactoglobulin A. **Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 164(2) 77-79, 16 ref.
- WHITAKER, J. R. Changes occurring in proteins in alkaline solution. em **Chemical Deterioration of Proteins**. Ed. Whitaker, J. R. & Fujimaki, M. ACS Symposium Series, nº 123: Washington, D.C. 1980

ZAK, L. Z.; KEENEY P. G. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.** v.24, n.3, p.483-486, 1976.

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 (Mestr.)-FEA-Unicamp.