

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

**Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a
fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.);
e propostas de tratamentos para o melhoramento do sabor**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Edy Sousa de Brito, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de junho de 2000.

Campinas, 30 de junho de 2000.

Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García
Presidente da Banca

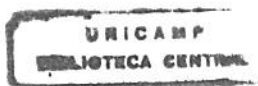
Tese apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos
para a obtenção do título de
Doutor em Tecnologia de
Alimentos

Edy Sousa de Brito

Orientador: Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García

Campinas, 2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



200013003

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	I/Unicamp
	B777e
V.	Ex.
TOMBO BC/	42134
PROC.	06-278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 00,00
DATA	08/09/00
N.º CPD	

CM-00144237-4

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

B777e Brito, Edy Sousa de
Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.); e propostas de tratamentos para o melhoramento do sabor / Edy de Sousa Brito. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

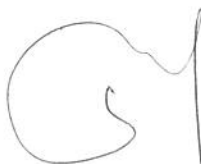
Orientador: Nelson Horacio Pezoa Garcia
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Cacau. 2.Processamento. 3.Sabor. 4.Estrutura.
5.Química. I.Pezoa Garcia, Nelson Horacio. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

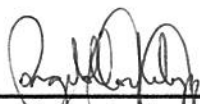
Campinas, de

de 2000.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García
(orientador)



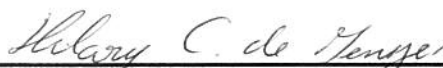
Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo
(membro)



Dra. Denise Calil Pereira Jardim
(membro)



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(membro)



Profa. Dra. Hilary Caste de Menezes
(membro)

Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira
(membro)

Profa. Dra. Marisa Nazaré Hoelz Jackyx
(membro)

***"... é saber encostar o coração da criança no seu próprio coração.
Não adianta presentes materiais, as crianças precisam sentir o
coração do pai e da mãe."***

Marcos Terena

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García pela orientação e pelo incentivo à realização dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo pela orientação nos trabalhos de estrutura.

Ao Prof Dr. Antonio Luis Pires Valente e à colega de doutorado Glauca Faleiro Pini pela colaboração nos trabalhos com cromatografia.

A Profa. Dra. Hylary Castle de Menezes pelas correções do inglês.

Ao colega Allan César Amancio pela colaboração nos estudos enzimáticos

Aos colegas de curso e técnicos que colaboraram com o trabalho.

A Bel pela ajuda nos trabalhos de microscopia e companheira de todos os momentos.

Aos padrinhos e compadres Fernando e Judite por todo o apoio e amizade.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	III
Resumo	01
Abstract	03
Introdução	05
Objetivos	11
Capítulo 1 Alterações químicas e estruturais decorrentes da fermentação, secagem e torração do cacau (revisão)	12
1. Introdução	13
2. Carboidratos	13
3. Ácidos	15
4. Metilxantinas	18
5. Compostos fenólicos e pigmentos	18
6. Proteínas e aminoácidos	20
7. Estrutura	25
8. Considerações finais	27
9. Referências bibliográficas	27
Capítulo 2 Compostos voláteis de cacau: formação e relação com o processamento e com o sabor (revisão)	40
1. Introdução	41
2. Compostos voláteis e modificações decorrentes do processamento ...	42
3. Considerações finais	49
4. Referências bibliográficas	49
Capítulo 3 Avaliação da estrutura celular de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.) por microscopia eletrônica de varredura; durante a fermentação, secagem e torração	54
1. Introdução	55
2. Material e métodos	56
3. Resultados e Discussão	56
4. Referências bibliográficas	58

Capítulo 4 Structural and chemical changes in cocoa (<i>Theobroma cacao</i> L.) during fermentation, drying and roasting	62
1. Introduction	63
2. Material and methods	64
3. Results and discussion	67
4. Conclusion	72
5. References	72
Capítulo 5 Effect of autoclaving cocoa nibs before roasting on the precursors of the Maillard reaction and pyrazines	84
1. Introduction	85
2. Material and methods	87
3. Results and discussion	88
4. Conclusions	90
5. References	91
Capítulo 6 Use of a proteolytic enzyme to improve cocoa (<i>Theobroma cacao</i> L.) flavour	98
1. Introduction	99
2. Material and methods	100
3. Results and discussion	102
4. References	104
Capítulo 7 Effect of polyphenol oxidase (PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs	111
1. Introduction	112
2. Material and methods	113
3. Results and discussion	115
4. References	116
Capítulo 8 The influence of polyphenoloxidase on the decrease in phenolic components in cocoa	121
1. Introduction	122
2. Material and methods	123

3. Results and discussion	126
4. Conclusions	127
5. References	128
CONCLUSÕES	133

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1- Produção mundial de cacau no período 97/98	6
Figura 2- Processamento mundial de amêndoas de cacau no período 97/98	6
Figura 3- Esquema do processamento do cacau e suas principais alterações	7

Capítulo 1

Figura 1- Composição percentual de aminoácidos livres nas amêndoas de cacau e de aminoácidos totais após hidrólise da proteína	39
--	----

Capítulo 3

Figuras 1-6 - Cortes de sementes de cacau fermentadas, secas ou torradas visualizados ao microscópio eletrônico de varredura	61
--	----

Capítulo 4

Figure 1- Cocoa cotyledons at different times of fermentation and processing	81
Figure 2- Score plot of the first two principal components from cocoa samples at different stages	82
Figure 3- Loading plot of the first two principal components for free amino acids and sugars from cocoa at different process stages	83

Capítulo 5

Figure 1- Temperature profile inside the roaster during the roasting of non-autoclaved and autoclaved cocoa nibs	94
Figure 2- reducing sugar and amino group concentrations expressed as glycine and glucose, respectively, for samples N, A, R and AR	94
Figure 3- Water activity (aw) of samples N, A, R and AR	95
Figure 4- Absorption at 275 nm and 280 nm for samples N, A, R and AR	95
Figure 5- Volatile acidity in samples N, A, R and AR	96
Figure 6- A typical SPME-GC chromatogram from the headspace of a roasted cocoa sample	96
Figure 7- Ratio between the tri and tetramethylpyrazine area to the internal standard area for samples N, A, R and AR	97

Capítulo 6

Figure 1- Dynamics of protein hydrolysis with time. Test was performed under fixed conditions ($[E/S]=682.5$ at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$)	107
Figure 2- response surface diagram of % DH at 6 hours as a function of $[E/S]$ and temperature	107
Figure 3- Percentage of responses for chocolate flavour (a) and bitter taste (b) for cocoa products formulated with enzyme treated cocoa and control	108

Capítulo 7

Figure 1- Tannin percentage in relation to total phenol content in cocoa nibs treated with PPO + air, PPO, H_2O + air and H_2O	120
--	-----

Capítulo 8

Figure 1- Percentage responses for PPO treated and control bitter chocolates evaluated by the difference from the control test.....	132
Figure 2- Percentage responses for PPO treated and control bitter chocolates for the acceptance test.....	132

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 4

Table 1- Effect of fermentation, drying and roasting on cocoa composition	77
Table 2- Number of peaks eluted from FPLC with peptide bonds detected by the method of Bradford and total protein concentration calculated from the sum of the peaks	77
Table 3- free amino acids and sugars ($\mu\text{M g}^{-1}$) in cocoa	78
Table 4- Principal component factor loadings for free amino acids and sugars of cocoa	79

Capítulo 6

Table 1- Variables and their levels for CCRD	108
Table 2- Conditions and results for percentage degree of protein hydrolysis (% DH) at 4 and 6 hours according to the Central Composite Rotatable Design	109
Table 3- Analysis of variance of % DH after 4 or 6 hours of treatment	109
Table 4- Degree of hydrolysis as predicted by the model and for cocoa samples treated with water and enzyme for 6 hours, before and after roasting	110

Capítulo 7

Table 1- Total phenol content (mg tannic acid g^{-1} sample) in cocoa nibs after treatment with PPO and air	119
Table 2- Tannin content (mg tannic acid g^{-1} sample) in cocoa nibs after treatment with PPO and air	119

Capítulo 8

Table 1- Total phenol concentration (mg g^{-1} sample) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase	130
Table 2- Tannin concentration (mg g^{-1} sample) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase	130
Table 3- Flavan-3-ol concentration (mg g^{-1}) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase	131
Table 4- Anthocyanidin expressed as absorbance (535 nm/462 nm, $\lambda\text{A}/\lambda\text{B}$) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase	131

RESUMO

O cacau é extremamente apreciado pelo seu sabor. O desenvolvimento desta característica envolve diferentes processamentos, que são responsáveis tanto pela formação de precursores do sabor quanto pela sua posterior transformação. No presente trabalho foram avaliadas as principais transformações químicas e estruturais durante a fermentação, secagem e torração do cacau. Foi observado que as principais mudanças químicas durante a fermentação e secagem são hidrólise de proteínas, aumentando a quantidade de aminoácidos livres de 25,7 para 32,1 mg g⁻¹ após 72 horas de fermentação e 35,3 mg g⁻¹ após secagem; inversão da sacarose com aumento dos açúcares redutores, de 50,1 para 63,0 mg g⁻¹ (72 h) com redução após secagem para 28 mg g⁻¹; e diminuição dos compostos fenólicos de 231 para 213 mg g⁻¹ (72h) e 157 mg g⁻¹ após secagem. Na torração as principais modificações observadas foram relacionadas com os aminoácidos livres e com os açúcares redutores, que estão relacionadas com a reação de Maillard. Os aminoácidos livres sofreram uma redução de cerca de 31%, com reduções superiores a 50% nos teores de histidina, cistina, metionina, tirosina, glicina, isoleucina, treonina e ácido aspártico. Nos açúcares redutores a redução foi de 48%, com a frutose sofrendo uma diminuição de cerca de 61% e o teor de glucose mantendo-se inalterado. O estudo estrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura e por Microscopia de Luz permitiu a observação, durante a fermentação, da degradação de corpos protéicos e o esvaziamento das células que continham polifenóis. Na secagem e torração destacou-se a ruptura celular e a destruição da rede citoplasmática. Com base nestas observações foram feitos alguns tratamentos com o objetivo de acentuar estas transformações e assim melhorar o sabor do cacau. A autoclavagem dos "nibs" de cacau a 121 °C por 15 min antes da torração influenciou positivamente na composição dos compostos precursores de sabor, açúcares redutores e grupos amino terminais, e reduziu a acidez volátil. Um produto formulado com "nibs" autoclavados apresentou aceitação sensorial maior do que o produto formulado com "nibs" não autoclavados. O uso de uma enzima proteolítica para aumentar a

concentração de precursores do sabor mostrou-se eficaz, inclusive sob o ponto de vista sensorial, porém o processo ainda precisa de aperfeiçoamentos. O estudo da aplicação da enzima polifenol oxidase (PPO) associada ou não a um fluxo de ar para a redução de fenóis totais e taninos em “nibs” de cacau mostrou que a redução de fenóis totais ocorre tanto pela ação da PPO quanto do ar, mas a associação destes tratamentos causou um aumento dos fenóis totais. O teor de taninos foi reduzido apenas pelo tratamento com água e ar.

ABSTRACT

Cocoa flavour is extremely appreciated. The development of such characteristic is due to different processes, which are responsible for the formation of flavour precursors and their later transformations. In this work, the main chemical and structural changes were evaluated during cocoa fermentation, drying and roasting. It was observed that the main chemical changes during fermentation and drying were protein hydrolysis, rising free amino acid content, from 25.7 to 32.1 mg g⁻¹, after 72 hours of fermentation and 35.3 mg g⁻¹ in dried cocoa; sucrose inversion followed by an increase in reducing sugars from 50.1 to 63.0 mg g⁻¹ (72 h) and a reduction after drying to 28 mg g⁻¹ and phenol reduction from 231 to 213 mg g⁻¹ (72h) and 157 mg g⁻¹ after drying. In the roasting process there was a reduction of free amino acids and reducing sugars, related to the Maillard reaction. Free amino acids were reduced by nearly 31 %, with reductions greater than 50 % for histidine, cystine, methionine, tyrosine, glycine, isoleucine, threonine and aspartic acid. Reducing sugars decreased 48 %, with a 68 % reduction in fructose, while glucose remained unchanged. A structural study by scanning electron microscopy and light microscopy allowed the observation during fermentation of protein bodies destruction and migration of polyphenols from the cells. Cell disruption and the cytoplasmatic net destruction were pronounced during drying and roasting. Based on these observations some treatments were proposed to enhance these transformations and improve cocoa flavour. Autoclaving cocoa nibs at 121 °C for 15 min before roasting positively influenced the flavour precursors, reducing sugars and amino terminal groups, and reducing volatile acidity. A product formulated with autoclaved nibs presented a better sensory acceptance than the control product. The use of a proteolytic enzyme to enhance flavour precursors was successful, but the process still needs to be improved. The use of polyphenol oxidase (PPO) associated or not with an air flow, with the aim of reducing total phenols and tannins, showed that the total phenol reduction occurred with either PPO or air action, but the association of these treatments

increased the total phenol content. The tannin content was only reduced by the treatment with water and air.

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) originário da região amazônica, hoje é produzido nas Américas, África, Ásia e Oceania. A distribuição da produção entre os países pode ser observada na Figura 1 e o processamento de amêndoas na Figura 2. O Brasil, no biênio 97/98 foi o quarto maior produtor mundial de cacau, com uma produção de 170.000 toneladas, com uma queda de 8,1% em relação a 96/97. No período de 97/98 foram processadas 188.000 toneladas, o que implicou na necessidade de importação de matéria-prima, ao contrário do que aconteceu em anos anteriores em que tínhamos superávit (International Cocoa Organization, Annual Report for 1997/98).

O cacau serve como matéria-prima para uma série de produtos bastante apreciados por suas características sensoriais sendo que seu sabor está condicionado a muitas variáveis que podem proporcionar uma não uniformidade desta matéria-prima. Fatores agrônômicos como genótipo, solo, clima e colheita, associados com as práticas de beneficiamento do cacau como a fermentação, secagem e torração, ao mesmo tempo em que são de extrema importância para as características do cacau, são de difícil controle por parte dos usuários finais desta matéria-prima. Na Figura 3 está representado um esquema do processamento do cacau com as principais alterações que ocorrem.

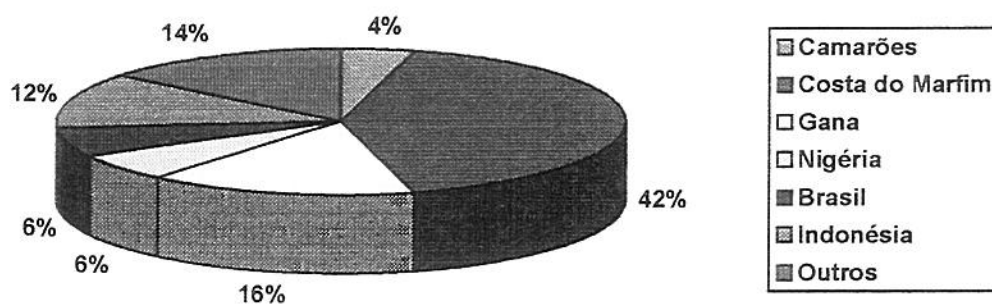


Figura 1- Produção mundial de cacau no período 97/98 (International Cocoa Organization, Annual Report for 1997/98)

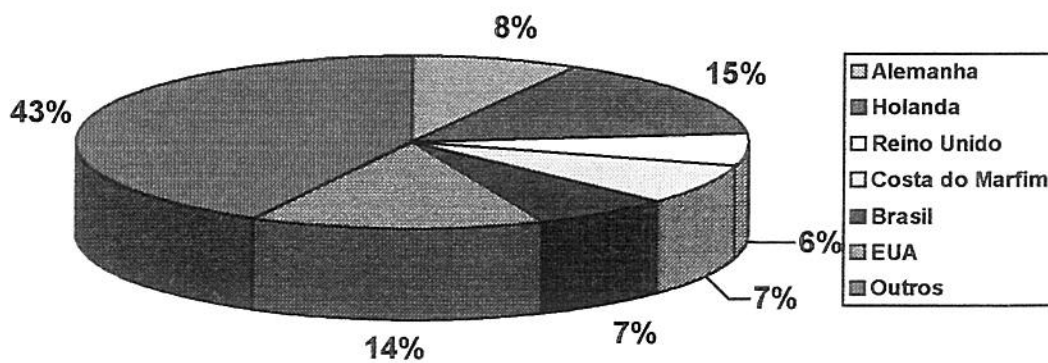


Figura 2- Processamento mundial de amêndoas de cacau no período 97/98 (International Cocoa Organization, Annual Report for 1997/98)

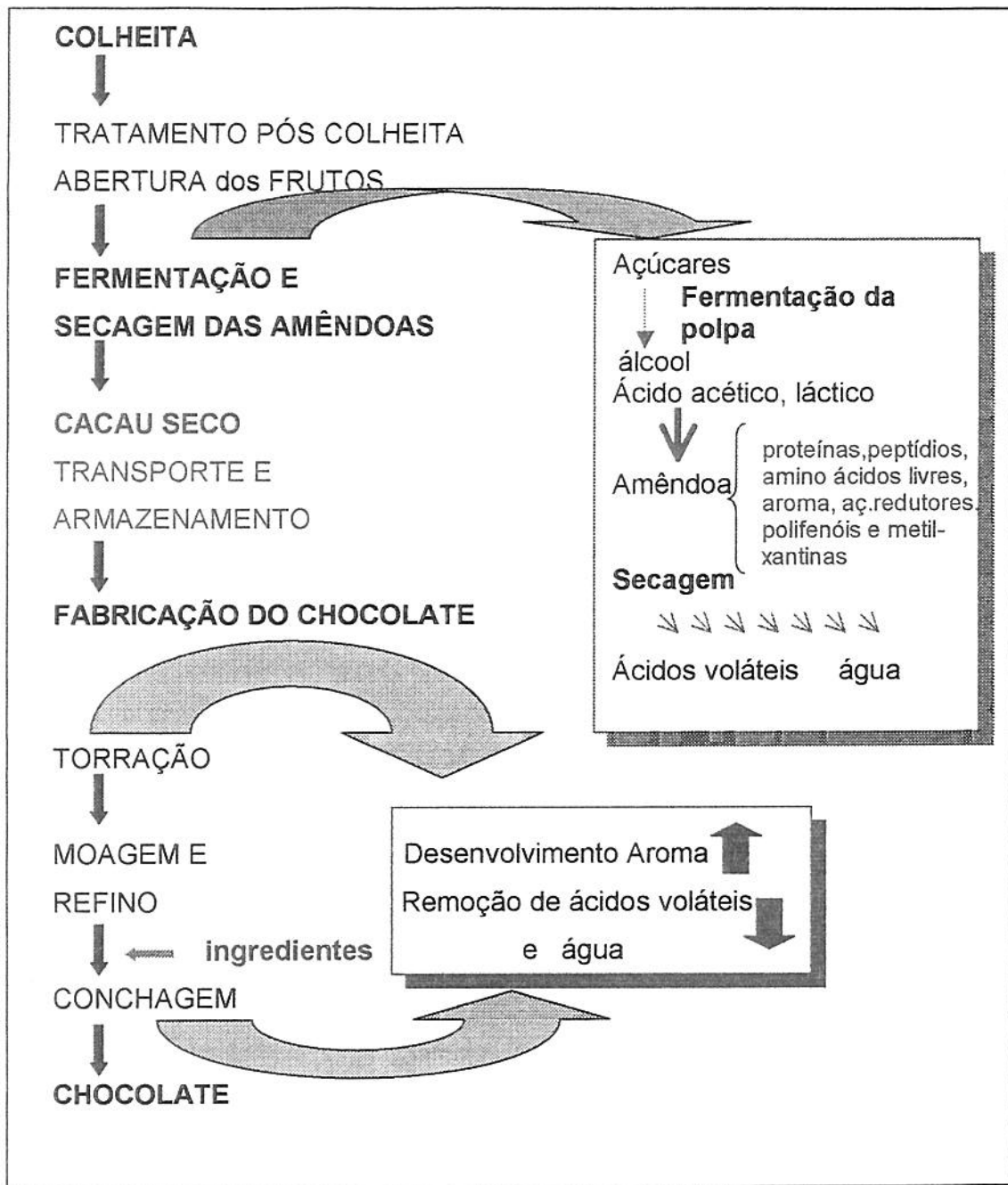


Figura 3- Esquema do processamento do cacau para a produção de chocolate e suas principais alterações.

Dentre as modificações que ocorrem durante o processamento podemos ressaltar a hidrólise específica de proteínas, especialmente da fração globulina (VOIGT *et al*, 1994). Esta hidrólise proporciona a formação de peptídios e amino ácidos, que estão envolvidos em reações de condensação formando dicetopiperazinas, responsáveis em grande parte em conjunto com a teobromina pelo sabor amargo (PICKENHAGEN *et al*, 1975), e participando da reação de Maillard durante a torração (MERMET *et al*, 1992). Também os polifenóis sofrem reações de oxidação, condensação e complexação com importância não só para a adstringência do produto, como também para as reações e consequente transformação ou disponibilidade de outros compostos (FORSYTH *et al*, 1958; CROS *et al*, 1982). Outro fator a ser levado em consideração é a presença de substâncias produzidas durante a fermentação e absorvidas pelas sementes, com destaque para o ácido acético e láctico, que participam de reações químicas como a hidrólise de proteínas e de sacarose, mas que em excesso prejudica a qualidade do produto. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos nestas etapas, como a fermentação, e como poderíamos vir a controlá-las para obtermos um produto final com características específicas. Além disso as etapas de fermentação e secagem são realizadas em fazendas e estão sujeitas a diversas variações de difícil controle, que afetam as características das amêndoas. Nos capítulos seguintes encontram-se revisões detalhadas sobre a composição, as modificações durante o processamento e suas relações com o sabor do cacau.

Hoje as indústrias de chocolate têm que operar com misturas de cacau de diferentes origens para obter o seu produto característico. Qualquer quebra no fornecimento de matéria-prima faz com que novas misturas tenham que ser testadas o que consome tempo e dinheiro, sem que necessariamente seja obtido um produto similar ao anterior. Portanto, alternativas de processamento que modifiquem certas características das amêndoas de cacau fornecendo, assim, uma maior homogeneidade para a matéria-prima podem contribuir para um melhor controle do produto final.

Devemos, ainda, salientar que a amêndoa de cacau brasileiro tem qualidade mediana, pois é muito ácido, amargo, adstringente e o desenvolvimento

do seu sabor é fraco, o que confere ao produto uma baixa cotação no mercado mundial (Lopez & McDonald, 1982; Shaughnessy, 1992; Urbanski, 1992). Portanto, processos que venham a melhorar a qualidade desta matéria-prima podem ser bastante úteis.

Pouco esforço tem sido dispensado por parte das instituições de pesquisa brasileiras, com exceção das pesquisas agrônômicas, para oferecer alternativas de processamento que pudessem minimizar características indesejáveis, ou por outro lado, aumentar as características desejáveis. Nosso esforço será no sentido de compreender melhor estas modificações, desenvolvendo mecanismos de avaliação da qualidade e processos que possam vir a ser utilizados para alterar as características do cacau no sentido desejado.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Annual Report for 1997/98. 53p. 1999.

CROS E, VILLENEUVE F, VINCENT J-C, Recherche d'un indice de fermentation du cacao I: evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. Café Cacao, Thé. **26**: 109-114. 1982.

FORSYTH WGC, QUESNEL VC, ROBERTS JB, Interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. Journal Science Food Agriculture. **9**: 181-184. 1958.

LOPEZ AS, McDONALD CR, Preliminary test of a simple and inexpensive system for the mechanical aeration of box-type cacao fermentation. Revista Theobroma. **12**:57-83. 1982.

MERMET G, CROSS E, GEORGES G, Étude préliminaire de l'optimisation des paramètres de torrefaction du cacao. Consommation des précurseurs d'aôme, development des pyrazines, qualité organoleptique. Café, Cacao, Thé, **36**:285-290. 1992.

PICKENHAGEN W, DIETRICH P, KEIL B, POLONSKY J, NOUAILLE F, LEDERER E, Identification of the bitter principle of cocoa. Helvetica Chimica Acta, **58**: 1078-1086. 1975

- SHAUGHNESSY WJ, Cocoa beans – planting through fermentation – its effect on flavor. *Manufacturing Confectioner*. **72**:51-58. 1992
- URBANSKI JJ, Chocolate flavor/origins and descriptions. The effects of process and bean source. *Manufacturing Confectioner*. **72**:69-82. 1992.
- VOIGT J, HEINRICHS H, VOIGT G, BIEHL B, Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry*. **50**:177-84. 1994

OBJETIVOS

Geral

O objetivo deste estudo é o de avaliar algumas mudanças estruturais e químicas que ocorrem em sementes de cacau brasileiro, devido aos processos de fermentação, secagem e torração e com isso auxiliar na compreensão dos mecanismos que envolvem a formação do sabor do cacau e das perdas nutricionais; e verificar a possibilidade de diferentes tratamentos atuarem nos polifenóis e proteínas, e produzirem melhorias no sabor do cacau.

Específicos

- Avaliar algumas mudanças estruturais e químicas que ocorrem durante os processos de fermentação, secagem e torração do cacau.
- Aplicar e avaliar os efeitos da autoclavagem sobre a composição e o sabor do cacau.
- Aplicar e avaliar os efeitos de enzima proteolítica sobre a composição e o sabor do cacau.
- Aplicar e avaliar os efeitos da polifenoloxidase sobre o teor de fenóis totais, taninos e sabor do cacau.

ALTERAÇÕES QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DECORRENTES DA FERMENTAÇÃO, SECAGEM E TORRAÇÃO DO CACAU¹

BRITO², Edy Sousa de & PEZOA GARCIA^{2*}, Nelson Horacio

RESUMO

A formação do sabor característico do cacau depende dos processos de fermentação, secagem e torração. Em cada um desses processos são formados não só compostos que contribuem para o sabor do cacau, como também precursores que serão utilizados nos processos subsequentes. As principais alterações decorrentes desses processamentos, bem como o impacto dos compostos formados sobre o sabor do cacau são revisados nesse trabalho.

palavras chave: *cacau, sabor, processamento, fermentação.*

SUMMARY

CHEMICAL AND STRUCTURAL ALTERATIONS RESULTING FROM FERMENTATION, DRYING AND ROASTING OF COCOA. The development of the characteristic cocoa flavor depends fundamentally on the processes of fermentation, drying and roasting. In each one of these steps (processes), some compounds are formed which contribute directly to the cocoa flavor as well as other which are precursors used in the subsequent processes. This paper review the major alterations resulting from these processes and the impact of the compounds formed on the flavor of cocoa.

key words: *cocoa, flavor, processing, fermentation.*

¹Recebido para publicação em ____/____/____

²Departamento de Tecnologia de Alimento-FEA-UNICAMP, C.P. 6121, CEP13083 970, SP, e-mail: nelson@fea.unicamp.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

1. INTRODUÇÃO

O sabor do cacau está condicionado não só a fatores genéticos, mas também a modificações que ocorrem durante o seu beneficiamento. Basicamente, após a colheita do cacau, temos a abertura dos frutos, a fermentação, a secagem e a torração. Durante essas etapas é que são formados não só os precursores de sabor mas também compostos que não mais sofrerão modificações e que contribuirão para o sabor final do cacau.

A compreensão das alterações sofridas pelos principais constituintes durante essas etapas é fundamental para implementar melhorias e/ou propor novos processos para o beneficiamento do cacau. A seguir apresenta-se uma revisão dessas alterações e das relações que podem ter com a qualidade do cacau.

2. CARBOIDRATOS

Os açúcares redutores, apesar da baixa concentração, em conjunto com os aminoácidos são responsáveis pela produção de compostos básicos para o sabor do chocolate, o que é evidenciado pela presença de pirazinas, pirróis e furanos no chocolate e também pelo estudo da contribuição desses açúcares para a formação do aroma [60, 74].

Na polpa e na semente do cacau predomina a sacarose, que durante a fermentação é hidrolisada em glicose e frutose. Apesar da hidrólise ocorrer até o quinto dia de fermentação, foi observado que a atividade da invertase após dois dias de fermentação é praticamente nula, o que poderia ser um fator limitante para o aumento desses precursores de sabor [38, 83]. Em uma fermentação comercial a concentração de açúcares redutores atinge o máximo praticamente ao

mesmo tempo em que os aminoácidos livres [83]. A constatação de que as sementes possuem quase que exclusivamente sacarose levou à indagação sobre qual seria a contribuição da polpa, que contém cerca de 15% de sólidos, para o aparecimento de diferentes açúcares na amêndoa após a fermentação. Essa contribuição poderia ser tanto pela absorção de água, uma vez que a semente incha durante a fermentação, ou pela presença de resíduos que ficariam retidos na superfície da amêndoa, dependendo do tratamento que as sementes tenham recebido, influenciando assim na fração de açúcares do cotilédone [74, 84].

Durante a torração das amêndoas de cacau, o consumo de açúcares redutores é mais acentuado do que o de aminoácidos. Dependendo da temperatura e do tempo de torração, o consumo de açúcares redutores pode ser total, e estes seriam considerados fatores limitantes na formação do aroma. No entanto, a correlação entre o consumo de açúcares redutores e formação de aroma deve ser avaliada com cuidado, pois amêndoas da Nigéria com teor menor de açúcares redutores do que amêndoas de Gana desenvolveram mais aroma quando torradas [58, 75, 83].

A relação utilizada, entre os açúcares redutores e totais das amêndoas, foi considerada um indicador útil do grau de fermentação, quando associada a outros indicadores. A exemplo do índice de nitrogênio (ver item 6), a relação de 50% entre os açúcares redutores e totais seria considerada satisfatória [83]. No entanto, outro autor não considera que os açúcares redutores se correlacionem com a fermentação, pois estes poderiam ser originados de reações enzimáticas inerentes ao cotilédone e de uma fermentação não planejada que ocorreria durante o processo de secagem [48]. Outro fator que devemos levar em consideração é que o perfil de açúcares redutores é mais importante do que a quantidade total, uma vez que as cetoses são mais importantes do que as aldoses na formação do aroma do cacau, e também que as amêndoas bem fermentadas possuem mais cetoses (62%) do que as amêndoas mal fermentadas (21%) [75].

Os átomos de carbono da tetrametilpirazina, importante composto do sabor, são originários das moléculas de açúcares. Foi mostrado por Pragg e col. (1968) que os fragmentos de açúcares formam intermediários, tais como acetoína, 2,3-butanodiol e piruvaldeído, que sofrem condensação com os aminoácidos livres e/ou amônia para formar pirazinas metil substituídas [111].

O teor de amido nas sementes de cacau aumenta com o crescimento e amadurecimento do fruto. Durante a fermentação também ocorre aumento na concentração, provavelmente devido à perda de sólidos solúveis por exsudação. O amido presente nas amêndoas de diferentes origens se mostrou idêntico, com tamanho dos grânulos variando de 1,5 a 15µm, 80% dos quais na faixa de 2 a 6µm de diâmetro. A concentração nas amêndoas de diferentes origens variou de 4,5 a 7%, sendo que a amilose corresponde a cerca de 30% do total [36, 87].

Os demais polissacarídeos, originários principalmente da parede celular, são constituídos de ácido galacturônico, galactose, glucose, arabinose, manose, xilose, ramnose e fucose. Não foram observadas mudanças drásticas nos polissacarídeos como consequência do processamento [25, 108].

3. ÁCIDOS

Os ácidos orgânicos são compostos que têm grande influência na qualidade sensorial do chocolate. Os ácidos orgânicos que aparecem em maior quantidade na polpa e no cotilédone *in natura* são o cítrico, o oxálico, o tartárico, o succínico e o málico. Nas amêndoas, além destes, são encontrados ainda os ácidos acético e láctico e, em menor proporção, os ácidos málico, fosfórico e glicólico. Esses ácidos são produzidos tanto por metabolização microbiana da polpa durante a fermentação como por respiração dos tecidos do cotilédone. Durante a fermentação existe a formação de ácido láctico, enquanto que o teor de ácido cítrico diminui. Os ácidos orgânicos não-voláteis presentes ao fim da

fermentação, com exceção do lático, são os já presentes na semente, e sua concentração mostra-se inalterada ou diminuída [22, 54, 63, 84, 107].

O ácido acético, que corresponde a aproximadamente 98% dos ácidos voláteis da amêndoa, é um dos responsáveis pela morte da semente, e em altas concentrações favorece a exsudação de aminoácidos e peptídios. O ácido acético causaria a separação dos lipídios, favorecendo o contato das proteínas com as enzimas e a absorção de água, porém a fusão dos lipídios retardaria a difusão desse ácido [18, 46]. Um gradiente de concentração é mantido durante toda a fermentação devido à lenta difusão do ácido acético. Uma curta exposição a uma concentração alta de ácido acético – procedimento típico de fermentações comerciais fortemente aeradas – causa um salto no gradiente da concentração, mas apenas na região superficial da semente, já que a difusão é lenta, o que permite uma longa exposição a baixas concentrações sem que ocorra uma acidificação excessiva. Uma exposição longa a concentrações baixas levaria a um gradiente suave sem causar acidificação excessiva do cotilédone. Como o gradiente persiste durante a fermentação, conseqüentemente, a acidez, que controla a hidrólise enzimática, seria diferente entre as partes interna e externa [16, 84, 109]. A produção de ácido acético é influenciada pelo tempo de armazenamento do fruto antes da fermentação, uma vez que durante esse armazenamento ocorre uma diminuição do volume de polpa, da quantidade de água, matéria seca e açúcares da polpa. Outro fator que afeta a produção de ácido acético é o estágio de maturação, sendo que na fermentação dos frutos maduros ocorre maior concentração do que nas amêndoas de frutos imaturos. Uma forma de obter a redução do conteúdo de ácidos e um pH mais alto na amêndoa é a secagem parcial das sementes antes da fermentação. Essa secagem pode ser feita diretamente ao sol ou em secadores. A forma e o tempo de secagem após a fermentação também têm influência na quantidade e na qualidade dos ácidos que estarão no produto final [8, 13, 14, 45, 53, 54, 59, 85, 89, 97]. O teor dos ácidos também é influenciado pelo tipo de torração, enquanto na manufatura do chocolate apenas pequenas mudanças ocorrem [64].

A única correlação dita óbvia entre o tipo ou a origem do cacau e teor de ácidos envolve as amêndoas Sanchez (República Dominicana) e Tabasco (México), pois essas sementes tradicionalmente não sofrem fermentação, apesar de passarem por uma quase fermentação durante o processo de secagem ao sol [107]. Essas amêndoas possuem pouco ácido láctico e são ricas em ácido cítrico. A acidez volátil não foi considerada um bom critério para avaliar o sabor ácido em liquor de cacau, pois não foi observada uma boa correlação entre a acidez volátil e o pH ou o escore de acidez. Na verdade, o pH e o escore de acidez são influenciados pelo efeito cumulativo de diferenças nos níveis de todos os ácidos, sendo que as diferenças entre os outros componentes do sabor também afetam a percepção da acidez ou estão ligadas a algum outro atributo específico [6].

Altas concentrações de ácido acético nas amêndoas enfraquecem o sabor típico do cacau torrado. Outro ponto que deve ser levado em consideração é que, dependendo da origem do cacau, uma mesma concentração de ácidos irá influenciar de forma diferente [47]. Tanto o valor do pH quanto da acidez titulável total mostraram uma alta correlação com os ácidos voláteis totais, mas não com os não-voláteis totais, o que indica que estes últimos têm pouco efeito no pH e na acidez titulável total, quando comparados com a fração volátil. Dentre os ácidos voláteis apenas o acético mostrou uma alta correlação com o pH e a acidez titulável total. Contudo, a degradação de um ácido forte, como o cítrico, influencia mais o pH do que a formação de um ácido fraco, como o acético [41, 85]. Durante a fermentação, o pH da polpa aumenta, enquanto o do cotilédone diminui, e ambos atingem um valor de pH similar no quinto dia [84]. Na Malásia foi observado que o pH da amêndoa de frutos que foram armazenados por sete dias antes da fermentação aumenta ao longo da fermentação, e um valor final igual a 5,0 foi considerado um indicador da boa qualidade das amêndoas, o que não corresponde ao encontrado em outros trabalhos [85, 86].

4. METILXANTINAS

O gosto amargo do cacau é atribuído, em parte, à essa classe de compostos, em particular à teobromina e à cafeína, que se associam sinergicamente com as dicetopiperazinas, originando o sabor amargo do cacau. A teobromina está localizada nas células de estocagem de polifenóis, e, com a fermentação, os teores de teobromina e de cafeína sofrem redução de cerca de 30%, devido principalmente à exsudação para a casca e para o meio externo [2, 29, 69, 96]. A concentração total de metilxantinas varia de 24 a 50 mg/g de amêndoa desengordurada. O teor de cafeína varia de 0,2 a 23,9 mg/g (de amêndoa desengordurada) e o teor de teobromina fica em torno de 6 a 41,6 mg/g (de amêndoa desengordurada), esta última com uma proporção de 52 a 99 % em relação às demais metilxantinas [26, 29, 66, 86, 96].

5. COMPOSTOS FENÓLICOS E PIGMENTOS

O teor de polifenóis totais é de cerca de 12 a 18 % do peso seco e desengordurado da amêndoa, com destaque para a (+)-catequina e para a (-)-epicatequina, e cerca de 60 % de procianidinas (metade constituída de dímeros). Os demais compostos identificados são a quercetina, a quercetrina e os ácidos p-coumárico, caféico e clorogênico [32, 44, 49, 70, 72, 76, 78, 93]. As principais antocianinas encontradas foram a 3- β -D-galactosidil-cianidina e a 3- α -L-arabinosidil-cianidina. Esses compostos seriam hidrolisados pela β -galactosidase e pela α -arabinosidase, que apresentam uma pronunciada estabilidade durante a fermentação [31, 38, 44].

Durante a fermentação, com a morte do embrião, os compostos fenólicos sofrem difusão, entrando assim em contato com as enzimas polifenoloxidase e glicosidase, presentes nas demais células [31, 32, 52]. Os polifenóis se combinam com as proteínas por complexação reversível por meio de

pontes de hidrogênio e da oxidação irreversível dos polifenóis a quinonas, que sofrem condensação covalente com os grupos reativos de aminoácidos, peptídios, proteínas e fibras. Essas reações promovem uma redução no valor biológico das amêndoas, mas são alterações desejáveis para o desenvolvimento do sabor característico [9, 62]. Ao longo da fermentação, o teor de antocianinas decresce, chegando a 7 % do valor inicial, sendo que a maior parte dessa diminuição ocorre entre o primeiro e terceiro dia [27, 28, 88]. Com a secagem, as antocianinas restantes sofrem uma redução de 13 a 44 % [67]. Durante a fermentação, o teor de fenóis totais diminui cerca de 70 %, sendo que a degradação da (-)-epicatequina, principal substrato da polifenoloxidase existente, causa uma redução de 90 % em sua concentração, com um aumento proporcional da catequina [28, 37, 44, 70, 88, 101]. A redução do teor de polifenóis durante a secagem é atribuída ao escurecimento enzimático causado pela polifenoloxidase, seguido de escurecimento não-enzimático decorrente da polimerização das quinonas resultantes e da acumulação de compostos insolúveis. De acordo com Forsyth e Quesnel (1963), a polifenoloxidase não teria condições apropriadas para atuar durante a fermentação, mas durante a secagem, com valores elevados de pH e da concentração de O₂, teria condições apropriadas para oxidar os compostos fenólicos [33]. No entanto, em trabalhos mais recentes foi constatado que a diminuição dos compostos fenólicos não pode ser interpretada devido apenas a um processo de oxidação enzimática, pois no quinto dia de fermentação a atividade residual da polifenoloxidase foi reduzida a cerca de 5-13 % da inicial [38, 73, 100]. Além disso, reações entre compostos de diferentes compartimentos, solúveis em água, podem ser impedidas pela fusão dos vacúolos de lipídio, os quais dessa forma impediriam o contato entre os diferentes compostos [19].

No cacau torrado foi isolado um pigmento escuro com um peso molecular de aproximadamente 200 kDa. Essa melanoidina apresentou uma forte capacidade de inibir a tripsina e a quimotripsina [39, 40]. Um trabalho realizado com o extrato fenólico de amêndoas cruas também revelou que esse extrato causava a inibição da tripsina e da α -amilase [71].

A tentativa de associar a concentração de pigmentos e o grau de fermentação – mesmo com sementes secas não fermentadas apresentando um teor maior de antocianidinas do que sementes fermentadas e secas – tem se mostrado útil para o acompanhamento do processo apenas quando se conhecem os valores iniciais dos pigmentos, pois a concentração desses compostos varia de acordo com diferentes fatores, ou que sejam estabelecidas relações para o cacau de diferentes origens [1, 21, 67]. No entanto, outro grupo de pesquisadores concluiu que a medição da cor é apropriada para estimar a qualidade de amêndoas de cacau, uma vez que esta tem boa correlação com outros parâmetros de qualidade como o índice de fermentação ($IF = A_{460nm}/A_{530nm}$), o pH, os açúcares redutores e os aminoácidos livres [43]. Todavia, este grupo conduziu sua própria fermentação e não obteve resultados de amostras comerciais. Além da fermentação, também a secagem influencia a coloração das amêndoas [20].

6. PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são produzidos nas sementes durante a fermentação via reação proteolítica. A taxa e a extensão dessa reação passaram a receber maior atenção a partir da década de 60, quando se comprovou que na produção dos compostos voláteis característicos do cacau havia o envolvimento dos aminoácidos, e que os teores destes variavam de acordo com a origem do cacau [77, 80, 82, 94]. Também foi constatado que a presença de peptídios é indispensável para a formação do sabor característico do cacau [60, 61]. Com a torração os teores de aminoácidos decrescem, porém a destruição não é completa, e os diferentes grupos reagem em quantidades e taxas diferentes [3, 79, 88].

O aumento da concentração de aminoácidos livres durante a fermentação é rápido, pois a quebra das proteínas ocorre a uma velocidade maior do que a da difusão dos produtos para o meio externo, atingindo o valor máximo

em 4 dias, após o que pode ou não ocorrer decréscimo, permanecendo sem grandes alterações após esse período que coincide com a morte da semente e com a diminuição da atividade proteolítica. As proteínas totais extraíveis decrescem linearmente ao longo da fermentação, com evolução específica para as diferentes frações protéicas. A diminuição do teor de proteína durante a fermentação é atribuída em menor parte à proteólise e à difusão através do tegumento e em maior parte à insolubilização das proteínas causada por reações de oxidação e de complexação com polifenóis. Proporcionalmente, as proteínas isoladas mostraram um aumento da fração albumina, presente em maior quantidade, com decréscimo das globulinas, prolaminas e glutelinas. Em estudo mais recente não foram detectadas prolaminas [7, 82, 103, 109, 110]. Apesar dessas intensas modificações, deve-se salientar que o teor de aminoácidos totais permanece praticamente inalterado durante a fermentação.

A diferença entre a composição dos aminoácidos livres liberados durante a fermentação e a composição de aminoácidos totais no hidrolisado é uma característica específica da fermentação do cacau, pois uma proteólise aleatória da proteína total da semente não levaria ao aumento característico dos aminoácidos hidrofóbicos nem a um decréscimo dos ácidos [11, 51]. A redução específica dos aminoácidos ácidos ocorre na semente viva, durante a fase pré-morte e antes da proteólise pós-morte. O domínio da leucina, da fenilalanina, da alanina e da tirosina entre os aminoácidos livres nas amêndoas é devido tanto à degradação pré-morte como à liberação específica de aminoácidos hidrofóbicos durante a proteólise subsequente [50]. As composições de aminoácidos livres e de aminoácidos totais que seriam liberados em uma hidrólise aleatória estão resumidas na Figura 1.

As proteínas que sofrem hidrólise são, basicamente, proteínas de reserva que serviriam como fonte de nitrogênio durante a germinação [19]. Foram encontradas duas proteínas de reserva, S1 (48 kDa) e S2 (28 kDa), que correspondiam a 19 e 17 %, respectivamente, do total de proteína determinado; a outra proteína em

maior quantidade, uma albumina, não é de reserva e corresponde a cerca de 20 %. A fermentação causa a perda total das frações S1 e S2, porém em algumas amêndoas comerciais foram observadas tanto a ausência quanto a presença em pequena quantidade dessas frações, estando a maior ou menor degradação relacionada com o tempo de fermentação maior ou menor, com o pH e com a inativação de enzimas [4, 68]. Outros autores encontraram pesos moleculares de 44-47 e 26-31 kDa para estas frações e proporção de 30 a 50 %, sendo que ambas possuem um precursor em comum. Na fração que não sofre alteração intensa foi determinado o peso molecular de 19-21 kDa. Essa fração, albumina, apesar de ser 38 % homóloga a outras proteínas inibidoras de protease (Kunitz e α -amilase), não apresentou atividade nesse sentido em diversos substratos, com exceção da tripsina bovina, na qual foi duas vezes mais ativa do que a inibidora de tripsina da soja. No entanto, as temperaturas desenvolvidas durante a produção de chocolate seriam suficientes para inativá-la. A função provável dessa proteína seria defender de invasores as proteínas de reserva da semente de enzimas digestivas, porém devido à sua elevada concentração (25-30 %) poderia atuar como proteína de reserva, fornecendo enxofre, uma vez que é rica em cisteína [30, 90, 91, 92, 103].

Da metade até o fim de seu desenvolvimento, a semente de cacau produz dois RNAm em abundância. O primeiro, que corresponde a um terço do RNAm, codifica o inibidor de protease, enquanto os outros dois terços codificam uma proteína de reserva da classe vicilina, que anteriormente só foi encontrada em leguminosas e algodão. Na fração globulina não foi encontrada evidência da existência de leguminas, que são consideradas as proteínas de reserva mais abundantes em plantas e que estão presentes em todas as sementes de plantas já estudadas [34, 57, 90, 103]. A avaliação dos resultados de estudos com frações protéicas do cacau deve ser cuidadosa, devido à presença de polifenóis, bem como de enzimas proteolíticas, e à existência de métodos de extração que podem causar variações entre os diferentes trabalhos [103].

O tratamento das proteínas de reserva do cacau *in vitro* em diferentes pH e na presença de diferentes enzimas revelou que o desenvolvimento do aroma característico se deu exclusivamente no pH 5,2, em que o perfil dos produtos da proteólise foi similar ao de peptídios e de aminoácidos livres encontrados em amostras comerciais. Em pH 3,5 os peptídios obtidos só desenvolveram aroma característico de cacau após tratamento com carboxipeptidase, o que promoveu a transformação dos peptídios hidrofóbicos em hidrofílicos, com a liberação de aminoácidos livres hidrofóbicos. A proteólise, portanto, fornecerá um melhor perfil de precursores quando feita a pH aproximado a 3,5 seguido de uma elevação para aproximadamente 5,5. Os precursores do aroma típico de cacau seriam gerados a partir da cooperação entre uma endoprotease aspártica e uma carboxipeptidase. A formação desses precursores não foi observada quando globulinas de coco, avelã e girassol foram tratadas com proteases da semente de cacau, o que mostra que a formação desses precursores está ligada não só à ação dessas enzimas, mas também à estrutura química particular da globulina da semente do cacau [10, 24, 68, 102, 104, 105, 106].

Em estudo da fração protéica do cacau brasileiro foi observado que, em oito diferentes grupos de proteínas, a composição de aminoácidos era significativamente diferente [95]. Esses mesmos autores estabeleceram um ranking de aminoácidos em ordem decrescente de variabilidade e observaram a seguinte seqüência: Glu, Ala, Arg, Phe, Ser, Val, Thr, Asp, Ile, Gly, Leu, Tyr, Pro. Os demais aminoácidos estavam fora do limite de aceitação, podendo portanto ter a ordem alterada: Lys, His, Cys e Met. A presença do ácido glutâmico foi ressaltada como importante para a formação do sabor do chocolate [7]. No entanto, não foi observada uma relação positiva entre a concentração de aminoácidos totais e o potencial de formação do sabor. Uma explicação proposta é, como visto anteriormente, a de que peptídios específicos, mais do que a quantidade total de peptídios, seriam importantes para a formação do sabor. Esses peptídios seriam formados a partir da vicilina pela ação cooperativa de uma endoprotease aspártica e de uma carboxipeptidase [5, 11, 38, 102, 104]. Apesar

da produção de voláteis, resultante da torração, ocorrer no mesmo dia em que a concentração máxima de aminoácidos livres, esse fato deve ser analisado com cuidado, pois amêndoas da Nigéria com teores inferiores de aminoácidos livres produziram mais aroma do que amêndoas de Gana, que possuíam teores de aminoácidos livres maiores [81].

Em simulações da fermentação, apesar da proteólise aumentar com a acidez, foi observado que o ácido acético é mais eficiente do que o ácido cítrico para a hidrólise das proteínas. Também foi notado que uma pré-incubação a 40 °C seguida de incubação a 50 °C era mais eficiente do que a incubação direta a 50 °C, sendo esse efeito diminuído em altas concentrações de ácido acético. A proteólise não estaria, portanto, ligada a microrganismos, a exsudação ou a interação de proteínas com polifenóis, uma vez que se correlaciona com mudanças estruturais nos vacúolos de proteína e com a absorção de água pelas sementes, que é um fenômeno similar à germinação [15]. A proteólise devido à uma forte acidificação não é necessária; ao contrário, um aumento lento da temperatura e uma lenta acidificação favorecem o potencial de sabor, pois as proteínas de reserva do tipo vicilina serão preferencialmente degradadas, já que a fração albumina não contribui para a formação de precursores de sabor [11, 55, 102, 104].

Foi sugerido que o grau de fermentação poderia ser avaliado pela relação entre o Nitrogênio solúvel e o Nitrogênio total, o que originou o índice de nitrogênio. A esse índice foi atribuído um valor de 50 % como sendo ótimo, mas na prática um índice de 40 % obtido com cacau comercial foi considerado satisfatório, embora algumas amostras fugissem a essa regra. O obstáculo para a adoção desse índice reside no fato de que parte dos aminoácidos é perdida durante a fermentação por difusão através do tegumento, apesar da velocidade de quebra das proteínas ser mais rápida do que a taxa de difusão [82].

A torração causa um pequeno decréscimo na concentração de proteína total das amêndoas, o que é atribuído ao escurecimento não-enzimático e à

complexação das proteínas com fenóis [109]. Durante a torração também ocorre a formação de dicetopiperazinas, compostos que, em associação com teobromina e cafeína, são responsáveis em grande parte pelo sabor amargo do cacau. Esses compostos são resultantes da degradação térmica de proteínas, sendo formados pela quebra da ligação do segundo peptídeo N-terminal pelo grupo amino livre. Em sistema modelo, o sabor amargo foi obtido, preferencialmente, com dicetopiperazinas que possuíam fenilalanina [69, 99].

7. ESTRUTURA

A polpa do cacau é mucilagínosa e é completamente degradada durante a fermentação. A degradação da pectina da polpa pela pectinase necessita da ação preliminar da pectinametilesterase, que tem maior atividade coincidente com o período em que os frutos são colhidos e as sementes e a polpa expostas [35].

Na descrição morfológica da semente de cacau foram relatados alguns pequenos feixes vasculares e a epiderme. No cotilédone são encontrados dois tipos de células: o primeiro tipo é pequeno e contém grânulos de amido, um ou mais grãos de proteína e muitas gotículas pequenas de gordura (a maior parte do tecido é formada por esse tipo de célula); o segundo tipo é encontrado espalhado entre as células do primeiro tipo, geralmente em grupos. É formado por células maiores e completamente preenchidas com polifenóis e toda a cafeína e teobromina da amêndoa [23, 98]. Na semente madura a maioria das células do cotilédone possui vacúolos de lipídios bem compactados, cobertos pelo citoplasma restante, que contém vacúolos de proteínas comprimidos entre os vacúolos de lipídios. Durante a fermentação, logo após a morte das sementes, os vacúolos de lipídios se fundem e formam uma fase lipídica contínua que envolve as inclusões citoplasmáticas remanescentes como uma fase dispersa. A compartimentação (vacúolos de proteína, núcleo, mitocôndrias) é perdida.

Portanto, reações entre compostos solúveis em água de diferentes compartimentos da célula viva podem ser reduzidas pela fusão dos vacúolos de lipídios, o que irá depender das condições durante a fermentação [17].

A absorção de água pela semente durante a germinação, nas primeiras horas da fermentação, é influenciada pela temperatura e pela presença de substâncias osmoticamente ativas. Foi observado que os vacúolos intactos do cotilédone, que contêm proteínas, são responsáveis por esse fenômeno. Não se sabe em que momento a absorção de água pré-morte ocorre nas fermentações comerciais, sendo o aumento de 3 a 5 % do peso fresco que ocorre durante a fermentação atribuído à absorção de água pela semente morta. Na presença de ácido acético o aumento do peso é pequeno, mas a perda de matéria por exsudação é maior. As principais barreiras seriam a presença de açúcares e ácidos, e o tegumento. A presença de leveduras poderia ser um fator que contribuiria para o aumento da permeabilidade durante a fermentação. Além disso podem existir condições que permitiriam a absorção de água pelos vacúolos de proteína antes que a temperatura atingisse 45 °C. Esta absorção de água necessitaria menos de 10 h e não seria uma indicação de germinação. Ao atingir 50 °C a fusão dos lipídios reduziria as trocas por difusão nas células e a absorção de água [18].

As alterações estruturais no cotilédone do cacau foram estudadas pelo grupo de B. Biehl no fim da década de 70 e no início da de 80 [12, 16, 17, 18]. Esses trabalhos acompanharam, principalmente, as mudanças subcelulares em condições que simulavam a da fermentação. Com esses estudos ficou estabelecida a importância do processo de quebra dos compartimentos citoplasmáticos, absorção de água, inchamento dos corpos protéicos, difusão de ácido acético, fusão dos lipídios e destruição dos vacúolos de polifenóis, com difusão desses compostos, para as reações químicas que ocorrem durante a fermentação e secagem. A morfologia das amêndoas de cacau cruas, fermentadas e torradas foi estudada por microscopia eletrônica de varredura, e os

resultados indicaram que essa técnica é apropriada para a avaliação da qualidade e para o controle dos efeitos causados por esses processos [42].

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos conhecimentos aqui descritos, muito ainda precisa ser esclarecido a respeito da contribuição direta desses compostos para o sabor do cacau, bem como de suas interações.

Apesar da complexidade dos compostos e das etapas envolvidas na formação do sabor do cacau, a compreensão mais aprofundada de suas alterações levará ao aperfeiçoamento dos processos de fermentação, de secagem e de torração resultando em produto final de melhor qualidade.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABEYGUNASEKERA, D.D.; JANSZ,E.R. Relationship of fermentation time to the cut test and anthocyanin content in cocoa (*Theobroma cacao*). **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka**, v.17, n.1, p. 15-22, 1989.
- [2] ABEYGUNASEKERA, D.D.; JANSZ,E.R. The effect of the maturation process on fermented cocoa beans II: acids, sugars, xanthines, pyrazines and anthocyanins. **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka**, v. 17, n.1, p. 35-42, 1989.
- [3] ABEYGUNASEKERA,D.D.;JANSZ,E.R. Effect of the maturation process on fermented cocoa beans I: Free amino acids and volatile carbonyls. **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka**, v. 17, n. 1, p. 23-33, 1989.
- [4] AMIN,I.; JINAP,S.; JAMILAH,B. Vicilin-class globulins and their degradation during cocoa fermentation. **Food Chem.**, v. 59, n. 1, p. 1-5, 1997.
- [5] AMIN,I.;JINAP,S.;JAMILAH,B. Proteolytic activity (aspartic endoproteinase and carboxypeptidase) of cocoa bean during fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 76, p. 123-128. 1998.

- [6] BAIGRIE,B.D.;RUMBELOW,S.J. Investigation of flavour defects in asian cocoa liquors. **J. Sci. Food Agric.**, v. 39, p. 357-368, 1987.
- [7] BAREL,M.;GUYOT,B.;VINCENT,J.C. Les fractions protéiques du cacao avant et après torrefaction. Influence de la fermentation. **Café, Cacao, Thé**, v. 27, n. 2, p. 127-144,1983.
- [8] BAREL,M.A. Délai d'écabossage. Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. **Café, Cacao, Thé**, v. 31, n. 2, p. 141-150, 1987.
- [9] BARTOLOMÉ,B.; JIMÉNEZ-RAMSEY,L.M.; BUTLER,L.G. Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. **Food Chem.**, v. 53, n. 4, p. 357-362, 1995.
- [10]BIEHL,B.; HEINRICHS,H.; ZIEGELER-BERGHAUSEN,H.; SRIVASTAVA,S.; XIONG,Q.; PASSERN,D.; SENYUK; HAMMOOR,M. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation Process. **Angew. Bot.**, v. 67, p. 59-65, 1993.
- [11]BIEHL, B.; BRUNNER, E.; PASSERN, D.; QUESNEL, V.C.; ADOMAKO, D. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. **J. Sci. Food Agric.**, v. 36, p. 583-598, 1985.
- [12] BIEHL,B.;HARTMANN,U. Subzellulare strukturveränderungen in fermentierenden kakaosamen. **1st International Congress on Cocoa and Chocolate Research**, p. 105-113, 1974.
- [13]BIEHL,B.;MEYER,B.;CRONE,G.;POLLMANN,L. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. **J. Sci. Food Agric.**, v. 48, p. 189-208, 1989.
- [14]BIEHL,B.;MEYER,B.;SAID,M.B.;SAMARAKODDY,R.J. Bean spreading: a method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. **J. Sci. Food and Agric.**, v. 51, p. 35-45, 1990.
- [15]BIEHL,B.;PASSERN,D. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. **J. Sci. Food Agric.**, v. 33, p. 1280-1290, 1982.

- [16]BIEHL,B.;PASSERN,D.;SAGEMANN,W. Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. **J. Sci. Food Agric.**, v. 33, p. 1101-1109, 1982.
- [17]BIEHL,B.;PASSERN,U.;PASSERN,D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 28, p. 41-42, 1977.
- [18]BIEHL,B.;QUESNEL,V.C.;PASSERN,D.;SAGEMANN,W. Water uptake by cocoa seeds during fermentation-like incubation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 33, p. 1110-1116, 1982.
- [19]BIEHL,B.;WEWETZER,C.;PASSERN,D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 33, p. 1291-1304, 1982.
- [20]BONAPARTE,A.;ALIKHANI,Z.;MADRAMOOTOO,C.A.;RAGHAVAN,V. Some quality characteristics of solar dried cocoa beans in St. Lucia. **J. Sci. Food Agric.**, v. 76, p. 553-558, 1998.
- [21]BONVEHÍ,J.S.;COLL,F.V. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. **Food Chem.**, v. 60, n. 3, p. 365-370, 1997.
- [22]BONVEHÍ,J.S.;COLL,F.V. Parameters affecting the quality of processed cocoa powder: acidity fraction. **Z. Lebensm. Unters. Forsch. A**, v. 204, n. 4, p. 287-292, 1997.
- [23]BROWN,H.B. Separation of pigmented cells of cacao. **Nature**, v. 173, n. 4402, p. 492, 1954.
- [24]BYTOF,G.;BIEHL,B.;HEINRICHS,H.;VOIGT,J. Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. **Food Chem.**, v. 54, p. 15-21, 1995.
- [25]CAMPS,G.;THIER,H.P. Nichstarke-polysaccharide des kakaos. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 197, p. 363-369, 1993.
- [26]CRAIG, W.J.; NGUYEN,T.T. Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. **J. Food Sci.**, v. 49, n. 1, p. 302-303, 305, 1984

- [27]CROS,E.; ROULY,M.; VILLENEUVE,F.; VINCENT, J.-C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao II. Estimation de la matière colorante rouge des fèves de cacao. **Café, Cacao, Thé**, v. 26, n. 2, p. 115-122, 1982.
- [28]CROS,E.; VILLENEUVE,F.; VINCENT,J.-C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao I: Evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. **Café, Cacao, Thé**, v. 26, n. 2, p. 109-114, 1982.
- [29]CROS,E.;JEANJEAN,N. Qualité du cacao. Influence de la fermentation et du séchage. **Plantations, Recherche, Développement**, p. 21-24.1996.
- [30]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. 279-284, 1992.
- [31]FORSYTH & QUESNEL, Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *J. Sci. Food Agr.* 1957. *Apud* ROELOFSEN,P.A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. **Adv. Food Res.**, v. 8, p. 225-296, 1958.
- [32]FORSYTH, Cacao polyphenolic substances III. Separation and estimation on paper chromatograms. *Biochem. J.* 60: 108, 1955. *Apud* ROELOFSEN,P.A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. **Adv. Food Res.**, v. 8, p. 225-296, 1958.
- [33]FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL,V.C. 1963. *Adv. Enzymol.* 25:457, 1963. *Apud* BIEHL,B. *et al*, Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 28, p. 41-52, 1977.
- [34]FRITZ,P.J.; FRITZ,K.A.; KAUFFMAN,J.M.; PATTERSON,G.R.; ROBERTSON,C.A.; STOESZ,D.A.; WILSON,M.R. Cocoa seeds: Changes in protein and polysomal RNA during development. **J. Food Sci.**, v. 50, p. 946-950, 1985.
- [35]GAMBLE,W. The presence of pectin methylesterase in cacao pulp. **Experientia**, v. 29, n. 4, p. 421, 1973.

- [36] GEILINGER, I.; AMADÒ, R.; NEUKOM, H. Isolation and characterization of native starch from cocoa beans. **Starke**, v. 33, n. 3, p. 76-79, 1981.
- [37] GRIFFITHS, L.A. Detection of substrate of enzyme browning in cacao by a post-chromatographic enzymatic technique. **Nature**, v. 4598, n.1373-1374, 1957.
- [38] HANSEN, C.E.; OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 77, p. 273-281, 1998.
- [39] HIRANO, M.; MIURA, M.; GOMYO, T. A tentative measurement of brown pigments in various processed foods. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 60, n. 5, p. 877-879, 1996.
- [40] HIRANO, M.; MIURA, M.; GOMYO, T. Inhibiting effect of browned processed foods on trypsin. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 60, n. 5, p. 880-882, 1996.
- [41] HOLM, C.S.; ASTON, J.W. The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. **J. Sci. Food Agric.**, v. 61, p. 65-71, 1993.
- [42] HOSKIN, J.M.; DIMICK, P.S.; DANIELS, R.R. Scanning electron microscopy of the *Theobroma cacao* seed. **J. Food Sci.**, v. 45, n. 6, p. 1538-1540, 1980.
- [43] ILANGANTILEKE, S.G.; WAHYUDI, T.; BAILON, M.G. Assessment methodology to predict quality of cocoa beans for export. **J. Food Quality**, v. 14, n. 6, p. 481-496, 1991.
- [44] JALAL, M.A.F.; COLLIN, H. Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma cacao*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1377-1380, 1977.
- [45] JINAP, S.; THIEN, J.; YAP, T.N. Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. **J. Sci. Food Agric.**, v. 65, n. 1, p. 67-75, 1994.
- [46] JINAP, S.; DIMICK, P.S. Acidic characteristics of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 2, p. 547-550, 1990.

- [47]JINAP,S.;ZESLINDA,A. Influence of organic acids on flavour perception of Malaysian and Ghanian cocoa beans. **J. Food Sci. Tech.**, v. 32, n. 2, p. 153-155, 1995.
- [48]KEENEY,P.G. Various interactions in chocolate flavor. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 49, n. 10, p. 567-572, 1972.
- [49]KIM,H.; KEENEY,P.G. (-)-epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **J. Food Sci.**, v. 49, n. 4, p. 1090-1092, 1984
- [50]KIRCHHOFF,P.M.; BIEHL,B.; ZIEGELER-BERHAUSEN,H.; HAMMOOR,M.; LIEBEREI,R. Kinetics of the formation of free amino acids in cocoa seeds during fermentation. **Food Chem.**, v. 34 p. 161-179, 1989.
- [51]KIRCHHOFF,P.M.;BIEHL,B.;CRONE,G. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. **Food Chem.**, v. 31, p. 295-311, 1989.
- [52]KNAPP, A.W. The fermentation of cacao. *J. Soc. Chem. Ind.* 43: 402. 1924. *Apud* ROELOFSEN,P.A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. **Adv. Food Res.**, v. 8, p. 225-296, 1958.
- [53]LOPEZ,A.S. Fermentation and organoleptic quality of cacao as affected by partial removal of pulp juices from the beans prior to curing. **Rev. Theobroma**, v. 9, p. 25-37, 1979.
- [54]LOPEZ,A.S.F. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. **Rev. Theobroma.**, v. 13, n. 3, p. 233-248, 1983.
- [55]MacDONALD,H.M.; MASTERS,K.E.; PETTIPHER,G.L. Partial purification of cocoa seed proteins and studies into the degradation of cocoa storage protein. **Café, Cacao, Thé**, v. 38, n. 2, p. 119-124, 1994.
- [56]MARAVALHAS,N. Aminoacids in fermented and unfermented cocoa beans. **Rev. Int. Choc.**, v. 27, p. 22-23, 1972.
- [57]McHENRY,L.;FRITZ,P.J. Comparison of the structure and nucleotide sequences of vicilin genes of cocoa and cotton raise questions about vicilin evolution. **Plant Mol. Biology**, v. 18, p. 1173-1176, 1992.

- [58]MERMET,G.;CROSS,E.;GEORGES,G. Étude préliminaire de l'optimisation des paramètres de torrefaction du cacao. Consommation des précurseurs d'arôme, development des pyrazines, qualité organoleptique. **Café, Cacao, Thé**, v. 36, n. 4, p. 285-290, 1992.
- [59]MEYER,B.;BIEHL,B.;SAID,M.B.;SAMARAKODDY,J. Post-harvest pod storage: A method to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. **J. Sci. Food Agric.**, v. 48, p. 285-304, 1989.
- [60]MOHR,W.;LANDSCHREIBER,E.;SEVERIN,T. Zur spezifität des kakaoaromas. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v. 78, n. 2, p. 88-95, 1976.
- [61]MOHR,W.;ROHRLE,M.;SEVERIN,T. Über die bildung des kakaoaromas aus seinen vorstufen. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v. 73, n. 8, p. 515-521, 1971.
- [62]MOTODA,S. Formation of aldehydes from amino acids by polyphenol oxidase. **J. Ferment. Technol.**, v. 57, n. 5, p. 395-399, 1979.
- [63]NUYKEN-HAMELMANN,C.;BIEHL,B.;MEYER,B. Gehaltsänderungen von acht sauren in den kakaosamen. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.**, v. 12, n. 2, p. 52-57, 1989.
- [64]NUYKEN-HAMELMANN,C.;MAIER,H.G. Sauren in Kakao. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 185, n. 2 p. 114-118, 1987.
- [65]OFFEM,J.O. 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.**, v. 52, p. 129-135, 1990.
- [66]PAIVA,M.; JANICK,J. Variability of alkaloid production in *Theobroma cacao* L. **Rev. Theobroma**, v. 13, n. 3, p. 249-262, 1983.
- [67]PETTIPHER, G.L. An improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 37, n. 3, p. 289-296, 1986.
- [68]PETTIPHER,G.L. The extraction and partial purification of cocoa storage proteins. **Café, Cacao, Thé**, v. 34, n. 1, p. 23-26, 1990.

- [69]PICKENHAGEN,W.; DIETRICH,P.; KEIL,B.; POLONSKY,J.; NOUAILLE,F.; LEDERER,E. Identification of the bitter principle of cocoa. **Helv. Chim. Acta**, v. 58, n. 4, p. 1078-1086, 1975.
- [70]PORTER, L.J.; MA, Z.; CHAN, B.G. Cacao procyanidins: Major flavanoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1657-1663, 1991.
- [71]QUESADA,C.; BARTOLOMÉ,B.; NIETO,O.; GÓMEZ-COROVÉS,C.; HERNÁNDEZ,T.; ESTRELLA,I. Phenolic inhibitors of α -amylase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils and cocoa. **J. Food Protection**, v. 59, n. 2, p. 185-192, 1995.
- [72]QUESNEL, V.C. Fractionation and properties of the polymeric leucocyanidin of the seeds of *Thebroma cacao*. **Phytochemistry**, v. 7, n. 9, p. 1583-1592, 1968.
- [73]REEVES,S.G.;McDOWELL,I.;BEHN,K.;DENCH,J. Biochemical studies of cocoa bean o-diphenol O₂ oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chem.**, v. 29, n. 3, p. 209-219, 1988.
- [74]REINECCIUS, G.A.; ANDERSEN, D.A.; KAVANAGH, T.E.; KEENEY, P.G. Identification and quantification of free sugars in cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 20, n. 2, p. 199-202, 1972.
- [75]REINECCIUS,G.A.;KEENEY,P.G.;WEISSBERGER,W. Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 20, n. 2, p. 202-206, 1972.
- [76]RIGAUD,J.; ESCRIBANO-BAILON,M.T.; PRIEUR,C.; SOUQUET,J.M.; CHEYNIER,V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. **J. Chromatography A**, v. 654, n. 2, p. 255-260, 1993.
- [77]ROHAN,T.A. The precursors of chocolate aroma: A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. **J. Food Sci.**, v. 29, n. 4, p. 456-459, 1964.

- [78]ROHAN,T.A.; CONNEL,M. The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. **J. Food Sci.**, v. 29, n. 4, p. 460-463, 1964.
- [79]ROHAN,T.A.; STEWART,T. The precursors of chocolate aroma: Changes in the free amino acids during the roasting of cocoa beans. **J. Food Sci.**, v. 31, n. 2, p. 202-205, 1966.
- [80]ROHAN,T.A.; STEWART,T. The precursors of chocolate aroma: The distribution of free amino acids in different commercial varieties of cocoa beans. **J. Food Sci.**, v. 30, n. 3, p. 416-419, 1965.
- [81]ROHAN,T.A.;STEWART,T. The precursors of chocolate aroma: application of gas chromatography in following formation during fermentation of cocoa beans. **J. Food Sci.**, v. 32, p. 402-404, 1967.
- [82]ROHAN,T.A.;STEWART,T. The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. **J. Food Sci.**, v. 32, p. 395-398, 1967.
- [83]ROHAN,T.A.;STEWART,T. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. **J. Food Sci.**, v. 32, p. 399-402, 1967.
- [84]SAMAH,O.A.;ALIMON,H.;KARIM,M.I.A. Effect of shortened fermentation time on acid development and sugar metabolism of cocoa beans. **Acta Alimentaria**, v. 21, n. 3/4, p. 285-291, 1992.
- [85]SAMAH,O.A.;IBRAHIM,N.;ALIMON,H.;KARIM,A. Comparative studies on fermentation products of cocoa beans. **World J. Microb. Biotech.**, v. 9, p. 381-382, 1993.
- [86]SAMAH,O.A.;IBRAHIM,N.;ALIMON,H.;KARIM,M.I.A. Fermentation studies of stored cocoa beans. **World J. Microb. Biotech.**, v. 9, p. 603-604, 1993.
- [87]SCHMIEDER,R.L.;KEENEY,P.G. Characterization and quantification of starch in cocoa beans and chocolate products. **J. Food Sci.**, v. 45, p. 555-557, 1980.
- [88]SEIKI, K. Chemical changes during cocoa bean fermentation using the tray method in Nigeria. **Rev. Int. Choc.**, v. 28, n. 2, p. 38-42, 1973.

- [89] SENANAYAKE, M.; JANSZ, E.R.; BUCKLE, K.A. Effect of variety and location on optimum fermentation requirements of cocoa beans: an aid to fermentation on a cottage scale. **J. Sci. Food Agric.**, v. 69, p. 461-465, 1995.
- [90] SPENCER, M.E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. **Planta**, v. 186, p. 567-576, 1992.
- [91] SPENCER, M.E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*. **Planta**, v. 183, p. 528-535, 1991.
- [92] TAI, H.; MCHENRY, L.; FRITZ, P.J.; FURTEK, D.B. Nucleic acid sequence of a 21kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. **Plant Mol. Biol.**, v. 16, p. 913-915, 1991.
- [93] THOMPSON, R.S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkin Transactions I**, v. 11, p. 1387-1399, 1972.
- [94] TIMBIE, D.J.; KEENEY, P.G. Comparison of several types of cocoa beans relative to fractionated protein components. **J. Agric. Food Chem.**, 28(2):472-4.1980.
- [95] TIMBIE, D.J.; KEENEY, P.G. Extraction, fractionation, and amino acid composition of brasilian comun cacao proteins. **J. Agric. Food Chem.**, 25(2):424-6.1977.
- [96] TIMBIE, D.J.; SECHRIST, L.; KEENEY, P.G. Application of high-pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. **J. Food Sci.**, 43(2):560-2.1978.
- [97] TOMLINS, K.I.; BAKER, D.M.; DAPLYN, P.; ADOMAKO, D. Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. **Food Chem.**, 46:257-63.1993.

- [98] TSCHIRCH, A. Über den anatomischen bau des cacaosamens. Arch. Pharm. 25: 605, 1887. *Apud* ROELOFSEN, P.A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. **Adv. Food Res.**, 8: 225-96. 1958.
- [99] VAN DER GREEF, J.; TAS, A.C.; NIJSSEN, L.M.; JETTEN, J. Identification and quantitation of diketopiperazines by liquid chromatography-mass spectrometry, using a moving belt interface. **J. Chromatogr. A**, 394(1):77-88. 1987.
- [100] VILLENEUVE, F.; CROS, E.; MACHEIX, J.J. Effet de la fermentation sur les activités peroxidasiques et polyphénoloxydasiques de la fève de cacao. **Café, Cacao, Thé**, 29(2):113-20. 1985.
- [101] VILLENEUVE, F.; CROS, E.; VINCENT, J.C.; MACHEIX, J.J. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. III Evolution des flavan-3-ols de la fève. **Café, Cacao, Thé**, 33(3):165-70. 1989.
- [102] VOIGT, J.; BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; KAMARUDDIN, S.; MARSONER, G.C.; HUGI, A. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxipeptidase. **Food Chem.**, 49:173-80. 1994.
- [103] VOIGT, J.; BIEHL, B.; KAMARUDDIN, S.; WAZIR, S.K.S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chem.**, 47:145-51. 1993.
- [104] VOIGT, J.; HEINRICHS, H.; VOIGT, G.; BIEHL, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. **Food Chem.**, 50:177-84. 1994.
- [105] VOIGT, J.; VOIGT, G.; HEINRICHS, H.; WRANN, D.; BIEHL, B. *In vitro* studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: the significance of endoprotease specificity. **Food Chem.**, 51:7-14. 1994.
- [106] VOIGT, J.; WRANN, D.; HEINRICHS, H.; BIEHL, B. The proteolytic formation of essential cocoa-specific aroma precursors depends on particular chemical structures of the vicilin-class globulin of the cocoa seeds

lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds. **Food Chem.**, 51:197-205.1994.

- [107] WEISSBERGER,W.;KAVANAGH,T.E.;KEENEY,P.G. Identification and quantitation of several nonvolatile organic acids of cocoa beans. **J. Food Sci.**, 36:877-9.1971.
- [108] WHISTLER,R.L.;MASAK,E.;PLUNKETT,R.A. Cacao polysacharides. **J. Am. Chem. Soc.**, 78:2851-3.1956.
- [109] ZAK,D.L.;KEENEY,P.G. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.**, 24(3):483-6.1976.
- [110] ZAK,D.L.;KEENEY,P.G. Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied to several varieties of cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.**, 24(3):479-83.1976.
- [111] ZAK,D.L.;OSTOVAR,K.;KEENEY,P.G. Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpirazine during fermentation of cocoa beans. **J. Food Sci.**, 37:967-8.1972.

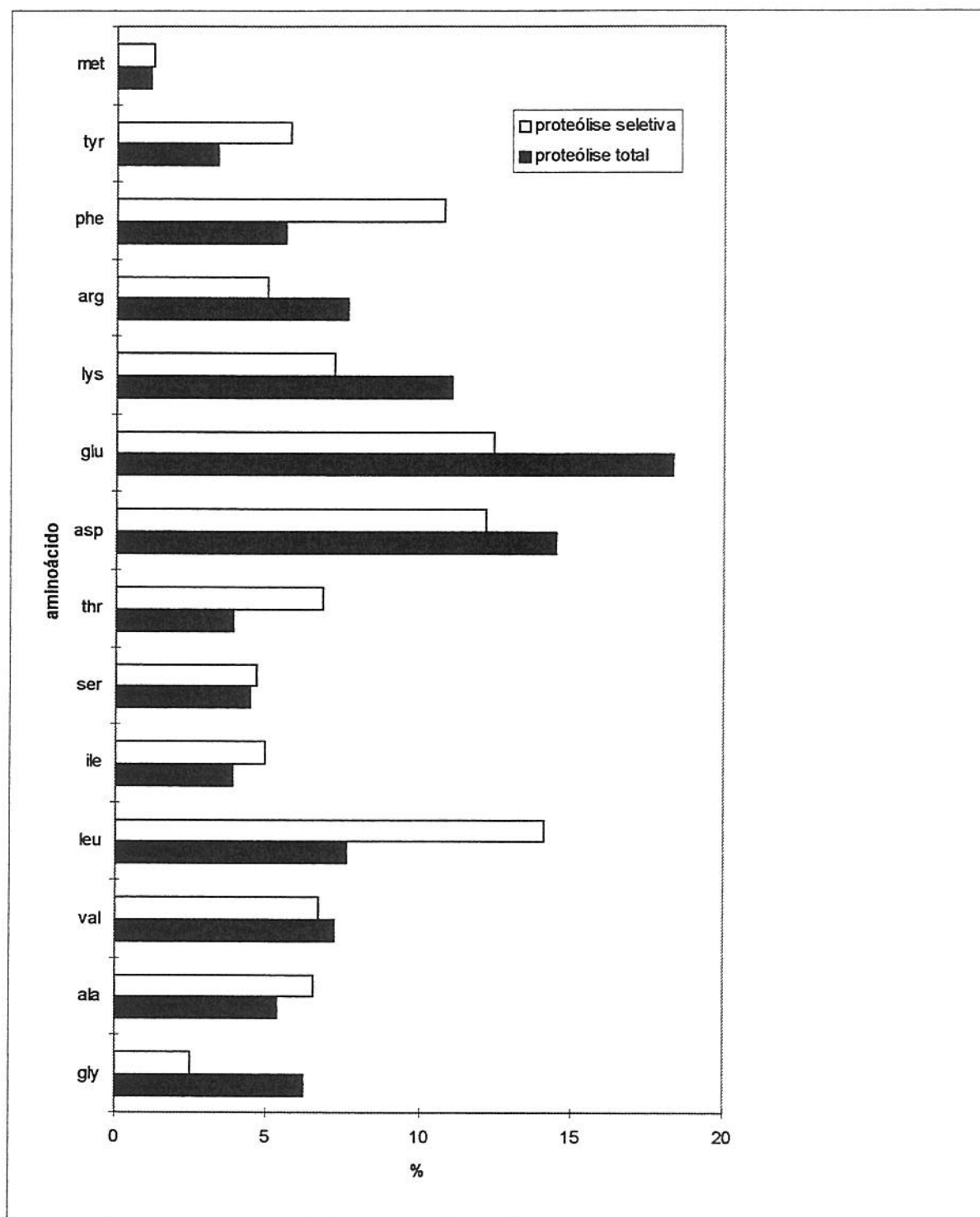


Figura 1- Composição percentual de aminoácidos livres nas amêndoas de cacau e de aminoácidos totais após hidrólise da proteína. Valores adaptados de [3,50,51,56,65,77,94,95,110].

COMPOSTOS VOLÁTEIS DE CACAU: FORMAÇÃO E RELAÇÃO COM O PROCESSAMENTO E COM O SABOR¹

BRITO², Edy Sousa de & PEZOA GARCIA^{2*}, Nelson Horacio

RESUMO

Os compostos voláteis presentes no cacau têm participação marcante nesta matéria-prima. Seu perfil está condicionado a diferentes fatores tais como origem, material genético, tratamentos culturais, processamentos de fermentação, secagem e torração. Influem na aceitação do produto e, também, estão diretamente relacionados com o tipo e intensidade do processamento empregado. Estas características permitem que as substâncias voláteis presentes no cacau possam vir a ser usadas como parâmetros indicadores da qualidade. Neste trabalho são revisadas a contribuição dos diferentes processos empregados no beneficiamento do cacau para os componentes voláteis e a relação destes compostos com as características sensoriais desta matéria-prima.

palavras chave: cacau, compostos voláteis, processamento.

SUMMARY

VOLATILE COMPOUNDS OF COCOA: FORMATION AND RELATIONSHIP WITH THE PROCESSING AND FLAVOR. *The volatile compounds present in the cocoa have a strongly participation in this commodity. Its profile is conditioned to different factors such as origin, genetic material, cultural treatments, fermentation, drying and roasting process. They influence in the acceptance of the product and, also, they are directly related with the type and intensity of the process employed. These characteristics allow that the present volatile substances in the cocoa can come to be used as indicative parameters of the quality. This paper presents a revision of the contribution of different processes employed in the cocoa preparation to volatile components and the relationship of these compounds with the sensorial characteristics of this raw material.*

key words: cocoa, volatile compounds, processing.

¹Recebido para publicação em ____/____/____

²Departamento de Tecnologia de Alimentos-FEA-UNICAMP, C.P. 6121, CEP13083 970, SP, e-mail: nelson@fea.unicamp.br

*A quem a correspondência deve ser enviada.

1. INTRODUÇÃO

O cacau é a matéria-prima para diferentes produtos. Sua principal característica é o seu sabor, que está associado não só ao cacau em si, mas também ao processamento que este sofre. A contribuição dos diferentes processos envolvidos no beneficiamento do cacau têm sido estudados ao longo dos anos, podendo ser constatado a contribuição de cada etapa para o desenvolvimento do sabor. No mercado mundial pode ser encontrado cacau de diferentes origens. Este material com composição intrínseca diferente e submetido aos mesmos processos, porém com execuções próprias levam a uma grande heterogeneidade desta matéria-prima. A compreensão de como o processamento influencia a composição e de como os constituintes do cacau se relacionam com as características sensoriais são de grande importância para a indústria do cacau, que em 96/97 moveu 2,7 milhões de quilos de amêndoas (18).

O estudo dos compostos voláteis de cacau encontra dificuldades, principalmente, na análise destas substâncias, pois as metodologias demandam um longo tempo de extração e são de difícil execução. A correlação entre a composição e as características sensoriais, também é difícil, tanto pela metodologia em si, como pela heterogeneidade da matéria-prima e das variações nos parâmetros do processamento.

Diferentes abordagens para tentar identificar os compostos responsáveis pelo sabor do cacau já foram tentadas. Uma linha é a avaliação analítica dos constituintes do cacau, outra linha é a observação das alterações dos compostos presentes no cacau antes do processamento e que sofrem alterações a medida que o processamento avança. Esses compostos seriam os precursores do sabor do cacau. Assim, o presente trabalho tem o objetivo de revisar a composição das substâncias voláteis no cacau, suas alterações devidas ao processamento e possível contribuição para o aroma do cacau e seus derivados.

2. COMPOSTOS VOLÁTEIS E MODIFICAÇÕES DECORRENTES DO PROCESSAMENTO

Apesar da grande diferença no sabor das amêndoas de diferentes origens, os constituintes voláteis encontrados diferem, normalmente, na quantidade e não no perfil de substâncias presentes. No cacau fresco predominam os álcoois e cetoálcoois, cerca de 30% do total, bem como os ácidos, cerca de 56%. A análise quantitativa dos voláteis em cacau revelou um aumento destes compostos durante a fermentação, com o predomínio de álcoois (39,8%) e esteres (31,6%). Estudo mais recente indica que em amêndoas fermentadas e cruas os compostos em maior número são os álcoois, seguidos pelos aldeídos, e que a presença de acetatos estaria relacionada com uma sobrefermentação. Acreditamos que estas diferenças possam ser devidas aos métodos analíticos e/ou a matérias-primas empregados. Os compostos encontrados em maior quantidade foram 2-feniletanol e 3-metilbutan-1-ol, seguidos dos respectivos acetatos. Se levarmos em consideração o ácido acético, composto de destaque no cacau e muitas vezes estudado separadamente, veremos que este ácido predomina entre os compostos voláteis nesta etapa. Com a torração a quantidade de compostos voláteis se mantém constante, mas o predomínio passa a ser das pirazinas (40,1 %) e aldeídos (22,8 %), sendo que os principais compostos encontrados foram 2-fenilacetaldeído e pirazinas metil substituídas. A exemplo dos compostos presentes nas amêndoas fermentadas, também existem trabalhos que identificaram os esteres como sendo a segunda classe de compostos mais abundante no cacau torrado. Da mesma forma acreditamos que isto se deve as metodologias e/ou matérias-primas utilizadas. Sabe-se que o aroma do cacau é composto por substâncias presentes nas frações naturais da semente, originadas na fermentação e, também, na torração (8,10,24,27,36,40). Portanto, uma seleção da matéria-prima e uma condução adequada do processamento são determinantes para o sabor do produto final.

A estocagem de amostras à temperatura ambiente e à -15 °C durante quatro meses não ocasionou diferenças significativas nos voláteis do "headspace"

do cacau torrado. No entanto, no armazenamento comercial por longos períodos, até três anos, foi observado um aumento na concentração de metilbunais e uma diminuição de metilbutanois. No caso de cacau torrado um armazenamento prolongado proporciona uma diminuição do aroma, o que poderia ser atribuído à uma perda de álcoois alifáticos (3,27). A torração, acompanhada da moagem para a obtenção do liquor de cacau, também leva a uma redução na concentração dos compostos voláteis do cacau (3). A conchagem de chocolate meio amargo obtido a partir de cacau torrado à diferentes temperaturas proporcionou uma diminuição dos compostos presentes no "headspace" da amostra, mas a formação de novos compostos não foi evidente. Também foi observado uma redução de 20% na intensidade do aroma do cacau durante a conchagem tradicional, enquanto que com o processo de extrusão a redução foi de 10% (22,30). O processo de alcalinização utilizado na produção de pó de cacau tem o efeito de destruir as pironas e o furaneol, e de aumentar a concentração do 1,2-benzenodiol, que é um produto da degradação da epicatequina (40).

A fermentação e a torração têm influência direta no aumento da concentração de aldeídos, principalmente do isovaleraldeído e do isobutiraldeído, nas amêndoas e no "headspace" do cacau. Os aldeídos seriam formados na fermentação a partir de aminoácidos, pela desaminação, descarboxilação e subsequente reação da cadeia de carbono, e pela oxidação degradativa de ácidos graxos. Na torração a formação se dá via degradação de Strecker (1,3,27,34). A concentração de isopentanal aumenta com o progresso da fermentação, correspondendo com o potencial de sabor, mas o aumento da concentração continua com a sobrefermentação (5). Os álcoois, a exemplo dos aldeídos, também têm sua concentração aumentada durante a fermentação. Porém, durante a torração sua concentração permanece inalterada (27).

A polpa do cacau também contribui com compostos voláteis para o aroma das amêndoas, como no caso do 3-metil-2-butanol, que é formado durante o crescimento e maturação da polpa do fruto e se infiltra nas sementes permanecendo sem alterações relacionadas com a fermentação. Este composto

está presente em concentrações mais elevadas em cacau de melhor qualidade, que são mais ricos em terpenóides em comparação com o cacau básico (27).

Dentre os diversos compostos responsáveis pelo sabor do chocolate as pirazinas têm sido a classe mais estudada. Elas foram detectadas em cacau torrado e seus derivados, no final da década de 60 (23,24). Cacau de diferentes origens, como também de diferentes lotes, apresentam as mesmas pirazinas, no entanto as proporções não são as mesmas. Isso estaria relacionado com a formação de precursores durante a fermentação e com o tipo e intensidade do processo de torração. As maiores diferenças envolvem, principalmente, a dimetil, trimetil e tetrametilpirazinas. Esta última pirazina em particular, por ser a mais facilmente formada no tratamento térmico, foi sugerida como um índice de qualidade da amêndoa (31,32, 37,38,39).

De uma maneira geral, as pirazinas são formadas rápida e linearmente durante os primeiros 30 min de torração a 150 °C, e cada metilpirazina possui uma velocidade própria de formação. Após esse tempo o aumento é lento, indicando uma falta de precursores ou o seu envolvimento em outras reações, ou ainda a volatilização das pirazinas a uma taxa próxima à da sua formação. Estando também, o número de metilpirazinas formado, relacionado com o tempo e a temperatura de torração (9,17,19). A partir de torrações à temperatura de 70 °C por 30 min foi possível observar a formação de pirazinas (31). Na sobretorrção há o predomínio de dimetilpirazinas, especialmente a 2,5-dimetilpirazina. Esse aumento associado com a avaliação sensorial do grau de torração permitiu a sugestão de índices de torração baseados na relação entre 2,5-dimetilpirazina e a tri e tetrametilpirazinas. Foi observado, também que a origem do cacau apresentava pouca influência sobre essa relação (41,42). O uso das pirazinas como indicadores também poderiam ser utilizados durante o processo de torração, via análise dos gases provenientes do torrador (9). A avaliação da intensidade do odor, por simulador olfatométrico diferencial (STOD), também permitiu uma correlação deste atributo sensorial com a intensidade de torração do cacau (30).

Estudos quantitativos demonstraram que metilpirazinas estão presentes em amêndoas bem fermentadas e não torradas (2,4,17), e a relação crescente da

tetrametilpirazina, quase linear, com o aumento da população de *B. subtilis* foi estabelecida (38). Isto se deve, provavelmente, à produção de precursores que seriam convertidos com a temperatura atingida durante a fermentação. Dentre as metilpirazinas estudadas nenhuma delas ocorreu nas amêndoas não fermentadas (17). A relação entre a produção de compostos voláteis, não só de pirazinas, e a fermentação indica a necessidade desse processo para o desenvolvimento do aroma do cacau. A relação da produção de metilpirazinas na torração com o tempo de fermentação foi estabelecida em cacau como tendo um máximo entre o sexto e o sétimo dia de fermentação, com maior proporção de tetrametilpirazina. Também foi observado uma relação linear entre os dias de fermentação e a avaliação sensorial do sabor do cacau (10,13,19,31,33).

Os ácidos graxos voláteis propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico são produzidos durante a fermentação. Durante a secagem pode, também, existir a produção de butírico e valérico. A presença desses ácidos em pequena quantidade é considerada como parte do aroma do cacau, porém em concentrações maiores são considerados como *off-flavor* (21,25). Estes autores não foram capazes de estabelecer um padrão regular de comportamento para a produção destes ácidos. Porém obtiveram as seguintes conclusões: a) a produção dos ácidos voláteis C₃-C₅ é iniciada mais cedo, nas fermentações do período seco do ano, em comparação com a safra do período úmido, b) o aumento da produção de ácidos voláteis totais está associada com a mudança da fermentação para a secagem, e c) a concentração de ácidos voláteis totais é maior nas amêndoas do período seco. A produção dos ácidos voláteis está associada à aeração e, conseqüentemente, a todos os fatores que possam influenciá-la levando a uma produção não uniforme destes ácidos em diferentes posições do monte de fermentação. A produção de ácidos voláteis C₃-C₅ pode ser considerada como a indicação do início do processo de putrefação. Estes ácidos produzidos na polpa passam por um processo de difusão para o cotilédone, mas como este processo é lento as amêndoas podem suportar alguns dias antes que a concentração possa contribuir para o *off-flavor* no chocolate (21). Este processo ressalta a importância

da transição entre a fermentação e a secagem das amêndoas, bem como o controle das condições em que ocorre.

Durante a torração ocorre uma mudança significativa na quantidade de ácidos presentes na manteiga de cacau. A manteiga do cacau não torrado contém mais do que três vezes a concentração de ácidos voláteis do que no cacau torrado. O composto que apresentou maior diferença foi o ácido pentanóico. A baixa concentração de ácidos voláteis na manteiga de cacau torrado se deve às temperaturas obtidas durante a torração e em menor parte à prensagem do líquido de cacau, que geralmente é feita a 100 °C e 7000 psi (7). Com a refinação da manteiga de cacau, principalmente durante a etapa de desodorização, ocorre uma diminuição dos compostos voláteis presentes. Com a auto-oxidação a concentração de aldeídos já presentes na manteiga de cacau, refinada ou não, aumenta (13).

Um sério defeito no aroma do cacau é a presença de compostos fenólicos voláteis, provenientes da fumaça, que são absorvidos pelas amêndoas de cacau ao serem secas de forma artificial ou durante a estocagem próxima a locais que produzem fumaça. Foi obtida uma correlação positiva entre o teor desses compostos e a avaliação sensorial do sabor de fumaça. Os compostos fenólicos sofreram uma redução significativa nas primeiras 24 h de conchagem, mas após esse tempo permaneceram em concentrações constantes até 72 h. Esses compostos, provavelmente fazem parte do aroma natural do cacau, mas o "threshold" aceitável seria de 6 mg de fenóis/Kg de amêndoas de cacau e de 9,6 mg/Kg de pó de cacau (6,11,20).

Compostos originados a partir de benzilglucosinolato foram identificados em cacau. Esses compostos seriam formados durante a fermentação pela ação de uma tioglucosidase e durante a torração não sofreriam maiores alterações (10).

A presença de furaneol, hidroximaltol, dihidrohidroximaltol e cicloteno em cacau torrado foi considerada importante para a intensidade do aroma de cacau, uma vez que esses compostos possuem características agradáveis de caramelo e têm propriedades potencializadoras do aroma. Esses compostos são formados durante o processo de secagem industrial do cacau (temperaturas entre 80 e

105 °C) e atingem uma concentração máxima nas condições de torração (130 °C por 20 min), seguido de um decréscimo na sobretorrção. O desenvolvimento de produtos originários da degradação de açúcares em uma intensa secagem pré-torrção foi, portanto, considerado como tecnologicamente importante para a obtenção de um cacau com características de sabor naturais e intensas (40).

A identificação de 2,3-dihidro-3-hidroximaltol em cacau torrado e a confirmação de sua relação linear com o tempo e com a temperatura de torração, bem como a possibilidade de extração direta em detrimento à destilação por arraste de vapor, seguida por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permitiria o uso desse composto como indicador do processamento do cacau (34). No entanto, outros trabalhos com esse composto não foram realizados.

Os compostos de Amadori formados pela reação de açúcares redutores (aldoses) e aminoácidos ocorrem tanto no cacau fermentado quanto no torrado. Esses compostos são precursores da reação de Maillard que ocorre durante a torração do cacau. Dependendo da concentração de aminoácidos livres, a concentração dos compostos de Amadori respectivos aumenta durante a secagem e pré-torrção. Durante o início da torração ocorre um aumento desses compostos, seguida de um decréscimo ao longo da torração. Na conchagem ocorre a decomposição desses compostos. Em um chocolate meio amargo foram encontrados apenas Frutose-Valina, Frutose-Leucina e Frutose-ácido γ -aminobutírico, que juntos correspondiam a 35,9 mg/100 g amostra desengordurada. A comparação entre amêndoas aromáticas (Venezuela) e amêndoas básicas (Costa do Marfim) indicou nestas últimas uma maior concentração dos compostos de Amadori (14,26). Durante a torração de um sistema modelo foi observado que a decomposição da Frutose-Alanina aumentava com o aumento da temperatura e do tempo de aquecimento, acompanhada por um aumento na taxa de formação de compostos heterocíclicos. À temperaturas mais elevadas e maiores tempos de torração os compostos heterocíclicos contendo nitrogênio foram preferencialmente formados, enquanto que à temperaturas mais baixas e tempos curtos de torração a formação de derivados do furano foi favorecida. O sistema com compostos de Amadori produziu aromas

similares ao do chocolate e colorações mais escuras do que o sistema com o aminoácido e o açúcar correspondente. Nestes sistemas também foi observado a formação de ácido acético em quantidades elevadas. A composição do aroma foi influenciada pela atividade de água (a_w). Com o aumento do valor da a_w a concentração de pirazinas, piridinas e furanos foi reduzida, enquanto que a quantidade de piróis aumentou. Um processo envolvendo alteração na umidade e pré-tratamento térmico antes da torração produziu um cacau com gosto mais harmônico e prolongado do que o cacau apenas torrado. Este processo seria indicado, principalmente, para amêndoas de qualidade intermediária (15,26).

Através da análise multivariada dos compostos voláteis presentes em manteiga de cacau (de melhor qualidade por ter maior teor de linalool) e cacau em pó foi possível estabelecer a origem das amostras (28,29). Outros autores concluíram que a análise de apenas nove compostos voláteis, incluindo 3-metilbutanal, 2-metoxi-4-metilfenol, e tetrametilpirazina, seria suficiente para diferenciar massa de cacau de acordo com sua origem, procedimento de torração e fornecedor. Com relação ao tipo de torração foi observado que torradores por ar quente produzem massas com muitos aldeídos, como o fenilacetaldéido, que seriam responsáveis por um sabor frutado. Por outro lado a torração em tambores produz massas com muito mais pirazinas, que são produtos típicos da torração (16).

O estudo olfatométrico dos voláteis de cacau revelou que 2-metil e 3-metilbutanal, acetato de 2-metilpropila, trimetilpirazina, 3-metiltiopropional, ácido acético, 3,5-dietil-2-metilpirazina, fenilacetaldéido, ácido 3-metilbutanóico, feniletanol, e mais quatro compostos não identificados presentes nas amêndoas fermentadas, teriam participação significativa no aroma do cacau. Esses compostos em conjunto com 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona, originado na torração, e mais algumas substâncias de contribuição ao descritor “torrado” seriam responsáveis pelo aroma do cacau torrado (8).

A avaliação por Análise de Diluição do Extrato Aromático (ADEA) em liquor de cacau permitiu a identificação de sete compostos considerados mais importantes para o aroma, a saber: ácido 2-metilbutanóico, ácido 3-metilbutanóico,

3-metilbutanal, hexanal, 2-metoxi-3-isopropilpirazina, (*E*)-2-octenal e 2-metil-3-(metilditio)-furano. Já a contribuição do cacau para o aroma do chocolate ao leite se daria, principalmente pelos compostos: 3-metilbutanal, (*E*)-2-octenal, 2-etil-3,5-dimetilpirazina, 2,3-dimetil-5-etilpirazina, (*E*)-nonenal, 2-metil-3-(ditio)-furano, ácido 2-metilbutanóico e ácido 3-metilbutanóico. Os compostos que contribuem para o aroma do chocolate ao leite e que não tiveram importância para o cacau foram: vanilina, *R*- δ -decalactona, 5-metil-(*E*)-2-hepten-4-ona, 1-octen-3-ona, (*E,E*)-2,4-nonadienal, dimetil trissulfeto, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, (*E,E*)-2,4-decadienal, (*Z*)-2-decenal e um composto desconhecido com aroma similar a gerânio (35).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância da qualidade da matéria-prima e do processamento para o sabor do cacau e de seus produtos está clara. No entanto, a identificação e a relação dos compostos voláteis com as características sensoriais do cacau ainda requerem muitos estudos. Devemos destacar a necessidade de métodos padronizados e de fácil execução, bem como a necessidade do estabelecimento de padrões de matéria-prima que possam ser usados como referência. Este último ponto só será possível em colaboração com a indústria beneficiadora do cacau. O conhecimento das modificações que ocorrem durante o processamento e dos compostos envolvidos poderão auxiliar na melhoria dos processos empregados e já estão sendo feitos esforços neste sentido.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEYGUNASEKERA,D.D.;JANSZ,E.R. Effect of the maturation process on fermented cocoa bean I: Free aminoacids and volatile carbonyls. **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka.** v. 17, n. 1, p. 23-33, 1989.

2. ABEYGUNASEKERA,D.D.;MUBARAK,A.M.;JANSZ,E.R. The volatiles of cocoa by GC/MS analysis and sensory evaluation with special emphasis on the effect of fermentation time and maturation. **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka.** v. 17, n. 2, p. 229-235, 1989.
3. BAILEY,S.D.;MITCHELL,D.G.;BAZINET,M.L.;WEURMAN,C. Studies on the volatile components of different varieties of cocoa beans. **J. Food Sci.** v. 27, p. 165-170, 1962.
4. BAREL,M.;LEON,D.;VINCENT,J.C. Influence du temps de fermentation du cacao sur la production des pyrazines du chocolat. **Café, Cacao, Thé.** v. 29, n. 4, p. 277-286. 1985.
5. BIEHL,B.;BRUNNER,E.;PASSERN,D.;QUESNEL,V.C.;ADOMAKO,D. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. **J. Sci. Food Agric.** v. 36, n. 3, p. 583-598. 1985.
6. BONVEHÍ,J.S.;COLL,F.V. Evaluation of smoky taste in cocoa powder. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, n. 2, p. 620-624. 1998.
7. CARLIN, J.T.; LEE, K.N.; HSIEH, D.A.L.; HWANG, L.S.; HO, C.T.; CHANG, S.S. Comparison of acidic and basic volatile compounds of cocoa butters from roasted and unroasted cocoa beans. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 63, n. 8, p. 1031-1036. 1986.
8. CHANLIAU,S.;CROS,E. Influence du traitement post-recolte et de la torrefaction sur le development de l'arome cacao. Premiers essais de caracterisation des composes odorants. **12th International Cocoa Research Conference.** 1996.
9. CHAVERON,H.;GUYOT,B.;HASHIM,L.;PEZOA,H.;PONTILLON,J. Formation and evolution of methylpyrazines during cocoa roasting (study of methylpirazines extraction methods). **Proccedings of the 6th International Flavor Conference,** Greece, p. 305-319. 1989.
10. GILL,M.S.;MAcLEOD,A.J.;MOREAU,M. Volatile components of cocoa with particular reference to glucosinolate products. **Phytochem.** v. 23, n. 9, p. 1937-1942, 1984.

11. GUYOT,B.;GUEULE,D.;MORCLETTE,I.;VINCENT,J.C. Caractérisation chimique de fèves de cacao à goût de "fumé". **Café, Cacao, Thé.** v. 30, n. 2, p. 113-120. 1986.
12. HASHIM,L.;CHAVERON,H. Extraction and determination of methylpyrazines in cocoa beans using coupled steam distillation-microdistillator. **Food Res. Int.** v. 27, p. 537-544. 1994.
13. HASHIM,L.;HUDIYONO,S.;CHAVERON,H. Volatile compounds of oxidized cocoa butter. **Food Res. Int.** v. 30, n. 3/4, p. 163-169. 1997.
14. HEINZLER,M.;EICHNER,K. Verhalten von Amadori-Verbindungen während der Kakaoverarbeitung. 1, Bildung und Abbau von Amadori-Verbindungen. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v. 192, p. 24-29. 1991.
15. HEINZLER,M.;EICHNER,K. Verhalten von Amadori-Verbindungen während der Kakaoverarbeitung. 2, Bildung von aromastoffen unter Rostbedingungen. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v. 192, p. 445-450. 1991.
16. HERNÁNDEZ,C.V.;RUTLEDGE,D.N. Multivariate statistical analysis of gas chromatograms to differentiate cocoa masses by geographical origin and roasting conditions. **The Analyst.** v. 119, n. 6, p. 1171-1176. 1994.
17. HUMBERT,B.;SANDRA,P. Determination of pyrazines in thermally treated food products: Practical experiments with cocoa beans. **LC-GC Intern.** v. 1, n.1, p.58-60, 1987.
18. ICCO, **Annual Report 1996/97.** International Cocoa Organization, 1998, 45p.
19. JINAP,S.WAN ROSLI,W.I.;RUSSLY,A.R.;NORDIN,L.M. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). **J. Sci. Food Agric.** v. 77, p. 441-448. 1998.
20. LEHRIAN,D.W.;KEENEY,P.G.;LOPEZ,A.S. Method for the measurement of phenols associated with the smoky/hammy flavor defect of cocoa beans and chocolate liquor. **J. Food Sci.** v. 43, p. 743-745. 1978.

21. LOPEZ,A.S.;QUESNEL,V.C. Volatile acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. **J. Sci. Food Agric.** v. 24, p. 319-326. 1973.
22. MANIÈRE,F.Y.;DIMICK,P.S. Effects of conching on the flavor and volatile components of dark semi-sweet chocolate. **Lebensm.-Wiss. u. – Technol.** v. 12, n. 2, p. 102-107. 1979.
23. MARION,J.P.; MUGGLER-CHAVAN,F.; VIANI,R.; BRICOUT,J.; REYMOND,D.; EGLI,R.H. Sur la composition de l'arôme de cacao. **Helv. Chim. Acta.** v. 50, n. 6., p. 1509-1516, 1967.
24. MUGGLER-CHAVAN,F.;REYMOND,D. constituants aromatiques de cacaos de divers provenances. **Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.** v. 58, p. 466-472, 1967.
25. NEY,K.H. Cocoa off-flavors. **Off Flavors in Foods and Beverages.** Ed. G. Charalambous, Elsevier. p. 419-432. 1992.
26. OBERPARLAITER,S.;ZIEGLEDER,G. Amadori-Verbindungen als aromavorstufen in Kakao. **Nahrung.** v. 41, n. 3, p. 142-145. 1997.
27. OBERPARLAITER,S.;ZIEGLEDER,G. Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality. **Z. Lebensm. Unters. Fors. A.** v. 204, n. 2, p. 156-160. 1997.
28. PINO,J.;RONCAL,E. Linalool content in roasted cocoa butter as a characteristic of several flavour grade cocoas. **Nahrung.** v. 36, n. 3, p. 299-301. 1992.
29. PINO,J.;VILLAVICENCIO,M.N.;RONCAL,E. Pattern recognition of GC profiles for classification of cocoa powder of Ghanaian and Cuban varieties. **Nahrung.** v. 36, n. 3, p. 302-306. 1992.
30. PLUMAS,B.;HASHIM,L.;CHAVERON,H. Measurement of the olfactive intensity of chocolates by differential olfactometry. **Food Control.** v. 7, n. 3, p. 117-120, 1996.
31. REINECCIUS,G.A.;KEENEY,P.G.;WEISBERGER,W. Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.** v. 20, n. 2, p. 202-206, 1972.

32. RIZZI,G.P. The occurrence of simple alkylpyrazines in cocoa butter. **J. Agric. Food Chem.** v. 15, n. 3, p. 549-551, 1967.
33. ROHAN,T.A. The precursors of chocolat aroma: Application of gas chromatography in following formation during fermentation of cocoa beans. **J. Food Sci.** v. 32, p. 402-404. 1967.
34. SCHNEE,R.;EICHNER,K. Analytische bestimmung des rostgrades von Kakao. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v. 185, n. 3, p. 188-194, 1987.
35. SCHNERMANN,P.;SCHIEBERLE,P. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, n. 3, p. 867-72.1997.
36. SILWAR,R. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of cocoa aroma. Quantitative determination of steam-volatile aroma constituents. **Café, Cacao, Thé.** V. 32, n. 3. p. 243-249. 1988.
37. van der WAL,B.; KETTENES,D.K.; STOFFELSMA,J.; SIPMA,G.; SEMPER, A.T.J. New volatile components of roasted cocoa. **J. Agric. Food Chem.** v. 19, n.2, p. 276-280, 1971.
38. ZAK,D.L.;OSTOVAR,K.;KEENEY,P.G. Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpirazine during fermentation of cocoa beans. **J. Food Sci.** v. 37, p. 967-968. 1972.
39. ZAMALLOA,W.A.;PEZOA GARCIA,N.H.;MEIRELES,M.A.A. Extração de componentes voláteis de cacau por micro-extrator e por CO₂ subcrítico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.15, n. 1, p. 163-169, 1995.
40. ZIEGLEDER,G. Composition of flavor extracts of raw and roasted cocoas. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v. 192, n. 6, p. 521-525, 1991.
41. ZIEGLEDER,G. Gaschromatographische rostgradbestimmung von Kakao uber methylierte pyrazine. **Deut. Lebensm.-Rundsc.** v. 78, n. 3, p. 77-81, 1982.
42. ZIEGLEDER,G.;SANDMEIER,D. Rostgradbestimmung von Kakao mittels Hochdruckflussigkeitschromatographie. **Deut. Lebensm.-Rundsc.** v. 79, n. 10, p. 343-347. 1983.

**AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA CELULAR DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)
POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA; DURANTE A
FERMENTAÇÃO, SECAGEM E TORRAÇÃO**

Publicado "Anais XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pp 1656-1659. 1998."

BRITO, E.S.¹; PEZOA GARCIA, N.H.¹; GALLÃO, M.I.²; CORTELAZZO, A. L.²

RESUMO

Frutos de cacau foram abertos e suas sementes submetidas à fermentação por 144 h, seguida de secagem natural. O tegumento foi removido e as amêndoas quebradas em nibs, que foram torrados durante 30 min a 150°C. Materiais com 0, 24, 48 e 72 h de fermentação, sementes secas e torradas foram fixadas, incluídas em parafina e cortadas com cerca de 30 mm de espessura. Após desparafinização, os materiais foram levados a aparelho de ponto crítico e receberam cobertura com ouro vaporizado para a sua observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Parte do material foi processado normalmente para a microscopia de luz. Os resultados de MEV revelaram um conteúdo citoplasmático globular nas células cotiledonares. Foram ainda observadas inúmeras células, de tamanho muito maior do que aquelas de reserva, totalmente preenchidas por material fenólico. Durante a fermentação, esse material foi sendo gradativamente consumido e, após 72 horas de fermentação não pode ser mais observada a sua presença. Do mesmo modo, o material citoplasmático foi ligeiramente consumido. Sementes secas apresentaram algumas paredes celulares rompidas, e após a torração, a rede de filamentos citoplasmático bastante evidente nas etapas anteriores, desapareceu. Isso fez com que os grãos de amido fossem melhor visualizados.

Palavras-chave: cacau, processamento, estrutura

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos - FEA - Unicamp

² Departamento de Biologia Celular - IB - Unicamp

1.INTRODUÇÃO

O sabor característico do cacau está condicionado além dos fatores agronômicos, à necessidade de processamento. A fermentação, secagem e torração são etapas imprescindíveis para o desenvolvimento pleno de seu sabor. As mudanças que ocorrem durante estes processos têm sido bastante estudadas sob o ponto de vista químico e bioquímico, mas pouco tem sido feito com relação às mudanças estruturais.

Na descrição morfológica da semente de cacau foram relatados alguns pequenos feixes vasculares e a epiderme. No cotilédone são encontrados dois tipos de células: o primeiro tipo é pequeno e contém grânulos de amido, um ou mais grãos de aleurona e muitas gotículas pequenas de gordura; a maior parte do tecido é formado por este tipo de célula. O segundo tipo, é encontrado espalhado entre as células do primeiro, geralmente em grupos. É formado por células maiores e completamente preenchidas com polifenóis e toda a cafeína e teobromina da amêndoa (9). Na semente madura a maioria das células do cotilédone possuem vacúolos de lipídios bem compactados, cobertos pelo citoplasma restante que contém vacúolos de proteínas comprimidos entre os vacúolos de lipídios. Durante a fermentação, logo após a morte das sementes, os vacúolos de lipídios se fundem e formam uma fase continua que envolve as inclusões citoplasmáticas remanescentes como uma fase dispersa. A compartimentação (vacúolos de proteína, núcleo, mitocôndrias, etc.) é perdida. Portanto, reações dependentes de um meio aquoso são prejudicadas por essa fusão dos vacúolos de lipídios, o que irá depender das condições durante a fermentação (3). Estudos demonstraram a importância da quebra das organelas citoplasmáticas, absorção de água, inchamento dos corpos protéicos, difusão de ácido acético, fusão dos lipídios e destruição dos vacúolos de polifenóis, com difusão desses compostos, para as reações químicas que ocorrem durante a fermentação e secagem (2,3,4,5). A morfologia das amêndoas de cacau cruas, fermentadas e torradas foi estudada por microscopia eletrônica de varredura e os

resultados indicaram que esta técnica é apropriada para a avaliação da qualidade e controle dos efeitos causados por estes processos (7).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as mudanças estruturais que ocorrem em sementes de cacau brasileiro, causadas pelos processos de fermentação, secagem e torração e com isso auxiliar na compreensão dos mecanismos que envolvem a formação do sabor do cacau.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de cacau da variedade Forastero foram colhidos na Fazenda Experimental do Instituto Agrônomo em Parquera-Açú, SP. Os frutos foram abertos e as sementes, submetidas à fermentação. Após 144 h de fermentação, as amêndoas foram secas naturalmente por 72 h. O tegumento foi removido e as amêndoas foram quebradas em nibs, torradas em forno elétrico rotatório a 150°C por 30 min. Os materiais colhidos antes (t_0) e durante a fermentação a cada 24h (t_{24} , t_{48} e t_{72}), após secagem (t_S) e após torração (t_T) foram fixados em solução de ácido crômico/formol por 14 dias, desidratados e incluídos em parafina. A seguir, foram cortados com cerca de 30 μ m de espessura, desparafinizados, levados a aparelho de ponto crítico para o término da desidratação e finalmente, metalização com ouro.

Após o processamento, os materiais foram observados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) CSM Zeiss, do Núcleo de Apoio de Pesquisa da ESALQ-USP, em Piracicaba, SP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados em MEV para os cortes de sementes recém colhidas evidenciaram um conteúdo heterogêneo para as células cotiledonares, com material globular em grande quantidade, material disperso e uma rede de filamentos citoplasmáticos bem estruturada. Além disso, foram observadas células

de elevado tamanho espalhadas entre as de reserva e totalmente preenchidas com material de aspecto homogêneo (Fig.1).

Sabe-se que em cacau a principal reserva é lipídica (mais de 50% da matéria seca), proteínas (cerca de 12%) e entre 4,5 a 7% de amido (10). Assim, pode-se afirmar que o material globular representa os corpos protéicos e grãos de amido, não muito evidentes nesse estágio. O material lipídico se espalha por todo o citoplasma das células. Essas afirmações ganham suporte nos resultados obtidos para essa espécie através de diversos métodos citoquímicos de análise (resultados não apresentados).

Nos cotilédones de cacau, a presença de células maiores e ricas em polifenóis foi descrita no século passado (9), o que está de acordo com os resultados encontrados para esta variedade.

Após 24h de fermentação, poucas alterações foram notadas com relação ao material t0. Os polifenóis continuaram a apresentar-se como grandes massas de aspecto mais homogêneo de grande tamanho com relação às demais células (Fig.2).

À medida que o tempo de fermentação aumentou, uma série de alterações passaram a ser notadas, a princípio nas células de estocagem dos polifenóis, que começaram a ser difundidos através de todo o cotilédone (2,3,4,5). Essas alterações foram evidentes a partir de 48 h (Fig.3) e, após 72h não foi mais notada a presença de material fenólico no interior dessas células.

O material protéico também sofre alterações durante o desenvolvimento da fermentação, com formação de peptídeos menores (1,6,11,13). Possivelmente devido a isso, a malha de filamentos do citoesqueleto se torna evidente no t72, uma vez que esses peptídios são solúveis e perdidos durante a preparação do material para a MEV. As paredes celulares no t72 permanecem íntegras (Fig.4).

Com a secagem, notou-se uma deformação das estruturas presentes no estágio anterior. As paredes celulares tornaram-se mais irregulares e com aspecto mais compacto devido à perda de água. Aparentemente, sua espessura foi aumentada e puderam ser notados rompimentos da mesma em diversas regiões das células (Fig.5).

A torração durante 30 min a alta temperatura, provoca escurecimento não enzimático na semente. Em termos ultraestruturais, ela atuou de forma a deixar os grãos de amido muito mais evidentes, com uma quantidade menor de material circundante (Fig.6). Do mesmo modo, pode-se observar uma maior quantidade de células com paredes rompidas e o desaparecimento de uma malha de filamentos citoplasmáticos nítida, devido possivelmente à desnaturação de seu material protéico formador. Fenômenos similares foram observados para amendoim e amêndoas (8,12).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-BAREL,M.;GUYOT,B.;VINCENT,J.C. Les fractions protéiques du cacao avant et après torrefaction. Influence de la fermentation. **Café, Cacao, Thé**, 27(2):127-44.1983.
- 2-BIEHL,B.;PASSERN,D. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 33:1280-90.1982.
- 3-BIEHL,B.;PASSERN,D.;SAGEMANN,W. Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 33:1101-9.1982.
- 4-BIEHL,B.;PASSERN,U.;PASSERN,D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 28:41-42, 1977.
- 5-BIEHL,B.;QUESNEL,V.C.;PASSERN,D.;SAGEMANN,W. Water uptake by cocoa seeds during fermentation-like incubation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 33:1110-6.1982.
- 6-BIEHL,B.;WEWETZER,C.;PASSERN,D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 33:1291-304.1982.

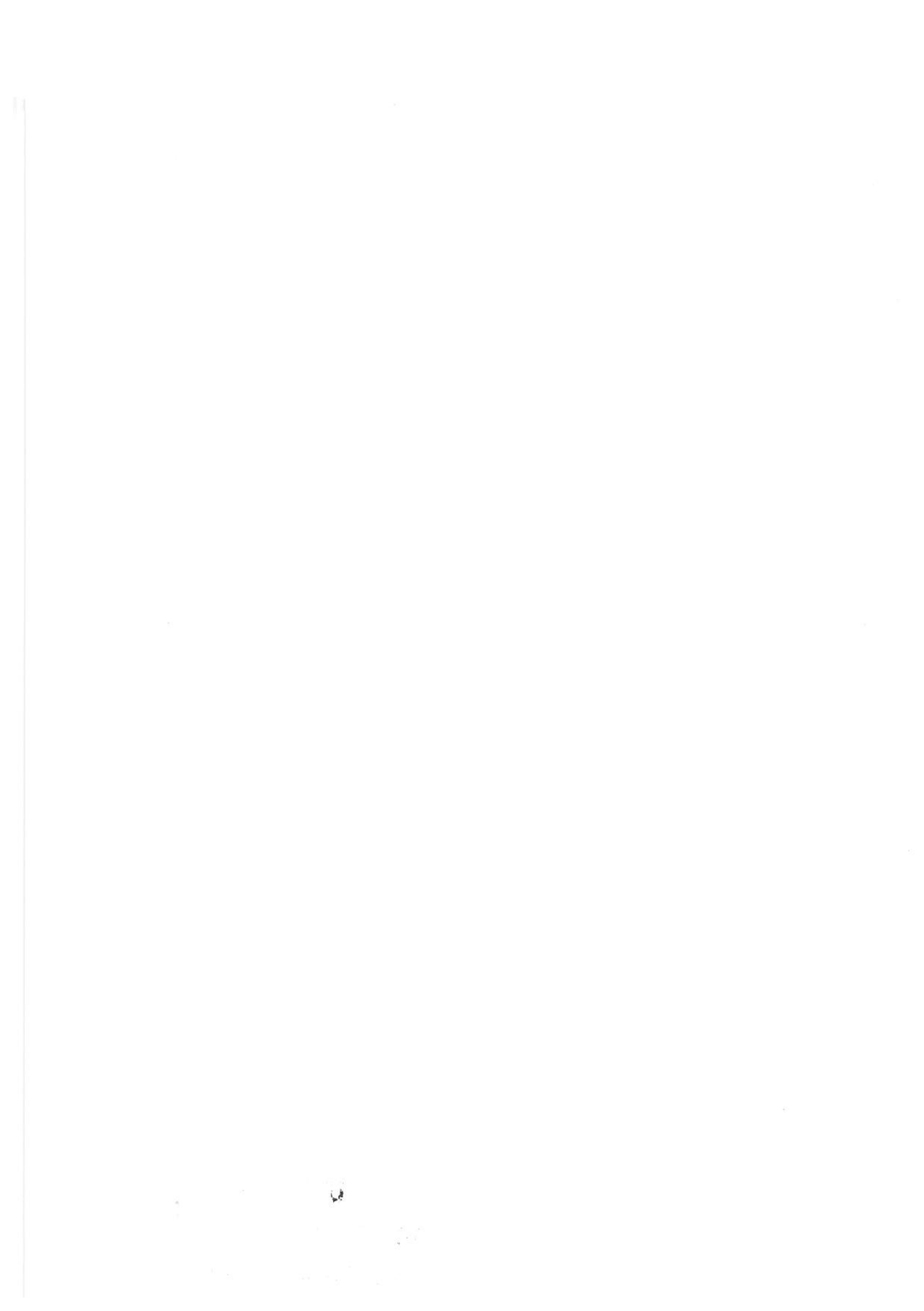
- 7-HOSKIN, J.M.; DIMICK, P.S. DANIELS, R.R. Scanning electron microscopy of the *Theobroma cacao* seed. **Journal of Food Science**, 45(6): 1538-40, 1980.
- 8-PERREN, R.; ESCHER, F.E. Investigations on the hot air roasting of nuts. **The Manufacturing Confectioner**, June: 123-127, 1997.
- 9-TSCHIRCH, A. Über den anatomischen bau des cacaosamens. **Arch. Pharm.** 25:605, 1887. *Apud* ROELOFSEN, P.A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. **Advances in Food Research**, 8: 225-96. 1958.
- 10-URBANSKI, J.J. Chocolate flavor/origins and description. The effects of process and bean source. **The Manufacturing Confectioner**, November: 69-82. 1992.
- 11-VOIGT, J.; BIEHL, B.; WAZIR, S.K.S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, 47: 145-51. 1993.
- 12-YOUNG, C.T.; SCHADEL, W.E. Light and scanning electron microscopy of the peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. Florunner) cotyledon after roasting. **Food Structure**, 9: 69-73. 1990.
- 13-ZAK, D.L.; KEENEY, P.G. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation and further processing of cocoa beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 24(3): 483-6. 1976.

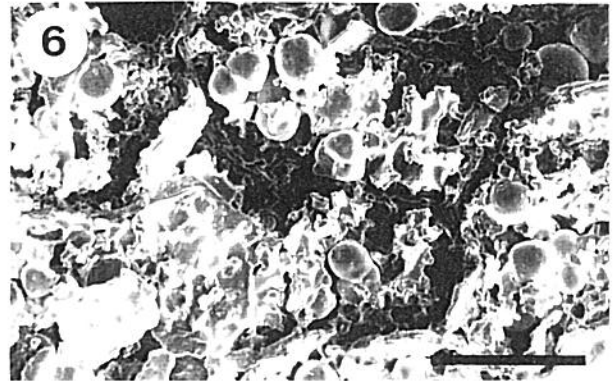
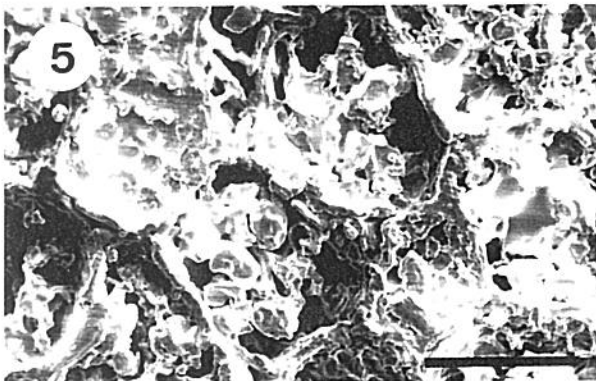
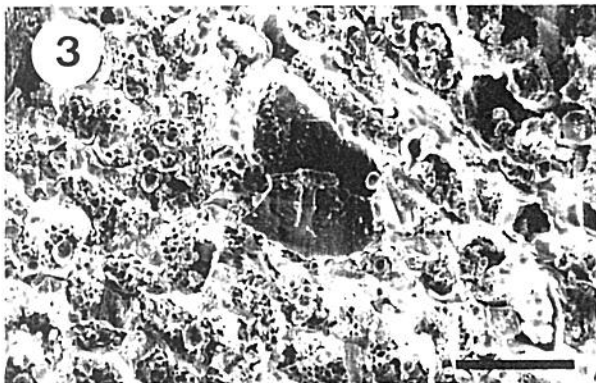
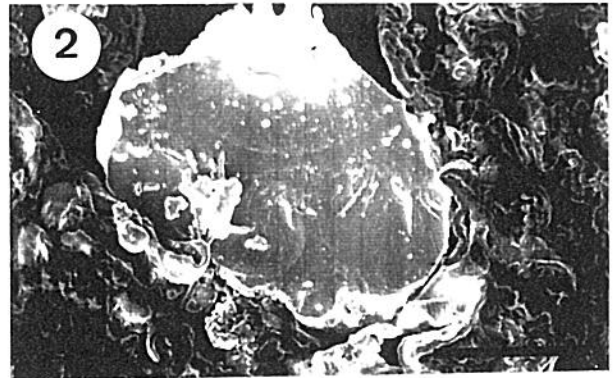
AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Mary Anne Heidy Dolder e ao Prof. José Lino Neto, do Departamento de Biologia Celular/Unicamp, pelo auxílio no processamento e análise do material para Varredura. Prof. Dr. Elliot Kitajima, coordenador do Núcleo de Apoio de Pesquisa/ESALQ/Piracicaba.

Apoio financeiro: CNPq e PICD-CAPEs.

FIGURA 1-6: Cortes de sementes de cacau fermentadas, secas ou torradas visualizados ao microscópio eletrônico de varredura. Fig.1: Semente recém-colhida. Nota-se o material citoplasmático das células do cotilédone, com glóbulos presentes. Nota-se ainda a presença de material fenólico ocupando células maiores do que as demais. Fig.2: 24 horas de fermentação. O material fenólico continua íntegro. Sua degradação é notada parcialmente após 48 h de fermentação (Fig.3). Fig.4: 72h de fermentação. Não pode ser mais visualizado o material fenólico, totalmente consumido. A rede de filamentos citoplasmáticos presente desde o início do processo, continua evidente e as células se mantêm íntegras. Fig.5: Semente seca. As paredes celulares se apresentam mais irregulares e em alguns casos, rompidas. Fig.6: Semente torrada. Nota-se o rompimento generalizado das paredes celulares e uma drástica diminuição dos materiais lipídicos e protéicos, tornando mais evidentes os grãos de amido. A rede de filamentos citoplasmáticos não pode ser mais notada. Barras: figs. 1 e 3 (23 μm); figs. 2, 5 e 6 (11 μm); fig 4 (9 μm).





UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.)
during fermentation, drying and roasting**

Structural and chemical changes in cocoa

Edy S de Brito,¹ Nelson H Pezoa García,^{1*} M I Gallão^{2†}, Angelo L Cortelazzo²
Pedro S Fevereiro³ and Márcia R Braga⁴

¹ *Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil*

² *Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil*

³ *Instituto de Tecnologia Química e Biologia, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal*

⁴ *Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil*

*Correspondence to: NH Pezoa García, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UNICAMP, CP 6121, CEP 13083 970, Campinas, SP, Brasil

E-mail: nelson@fea.unicamp.br

† present address: Departamento de Biologia Molecular, CCEN, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

Abstract: Cocoa seeds and pulp were fermented for 144 h, followed by natural drying. The tegument was removed and the cotyledons broken into nibs which were roasted at 150 °C for 30 min. Non-fermented material, fermented for 24, 48 and 72 h, material fermented for 144 h and then dried and also the roasted nibs, were all prepared for chemical and microscopy analyses. Light microscopy revealed the presence of anionic and cationic residues and of neutral sugars. During fermentation, there was a reduction in the cytoplasmic content of phenolic compounds and in the number of protein bodies. The cell wall showed a reduction in anionic residues and a loss of crystallinity. These alterations were maximum after 72 h. Drying and roasting increased the number of damaged cells and reduced the amount of cytoplasmic material. The chemical analyses generally confirmed the microscopy results. The concentration of amino-terminal groups and total free amino acids increased during fermentation (up to 72 h), but returned to the initial values after roasting. The principal chemical changes were related to reducing sugars, free amino acids, proteins and phenols. A microscopical analysis revealed the degradation of protein and phenolic bodies and cellular damage during roasting.

Keywords: cocoa; processing; structure; composition

INTRODUCTION

Genotype, soil, climate and harvest conditions, as well as processes such as fermentation, drying and roasting have important effects on the characteristics of cocoa. The latter processes in particular are continuously being altered to improve the homogeneity and acceptability of the final product (Urbanski, 1992).

Studies of the structural alterations that occur in cocoa cotyledons during fermentation have shown that numerous subcellular changes are important in the chemical reactions that occur during fermentation and drying (Biehl *et al*, 1982; 1982a). Scanning electron microscopy is a useful method for monitoring the effects of fermentation, drying and roasting on the final quality of the product (Hoskin *et al*, 1980; Brito *et al*, 1998)

During processing, proteolysis, especially that of the globulin fraction, produces peptides and amino acids that contribute directly to the flavour of cocoa (Voigt *et al*, 1994) and to the Maillard reaction during roasting, the profile and the process conditions being more responsible for a good flavour than the total amounts of these components (Rohan, 1966; Mermet *et al*, 1992). The oxidation, condensation and complexation of polyphenolics contribute to the astringency of the cocoa product, and these substances are involved in reactions leading to the formation of other compounds (Forsyth & Quesnel, 1958; Cros *et al*, 1982). Additional substances, produced during fermentation and absorbed by the seeds (Biehl *et al*, 1982), include acetic acid which, in great amounts, may be detrimental to the quality of the cocoa product (Jinap & Zeslinda, 1995).

In this study, we evaluated some of the structural and chemical changes that occur in cocoa seeds during fermentation, drying and roasting, with emphasis on the free amino acids and sugars and the importance of these to the mechanisms of flavour formation in cocoa.

MATERIAL AND METHODS

Cocoa samples

Cocoa pods of the Forastero variety were harvested on the experimental station of the Instituto Agronômico in Pariquera-Açú, São Paulo, Brazil. Two hundred and fifty kilograms of seeds and placenta-free pulp were fermented in wooden box. The beans were turned every 24 h and after 144 h of fermentation, they were dried naturally in the sun for 72 h. The tegument and germ tissue were removed and the cotyledons broken into nibs. The material which passed through a 3.5 mesh screen but was retained by an 8 mesh screen was roasted (250 g nibs/roasting) in a PRE 1Z rotating electric oven (Probat-Werke, Germany) at 150 °C for 30 min. Samples were taken before fermentation (t₀), every 24 h during fermentation (t₂₄, t₄₈ and t₇₂), after drying (t_D) and after roasting (t_R). They were immediately fixed for microscopic analysis. The remaining material was stored at -18 °C for subsequent chemical analysis. Part of the samples were dried in an

oven at 45 °C to constant weight and defatted with petroleum ether in a Soxhlet extractor. The above procedure was performed three times.

Preparation of samples for microscopy

The samples were fixed in a solution of chromic acid-formaldehyde (1:1, v/v) for 14 days, dehydrated in an ethanol series, cleared in xylol for 30 min, soaked in paraffin and cut longitudinally and obliquely into 7 µm thick sections. After deparaffinization and hydration, part of the material was stained with 0.1% xylydine ponceau in 3% acetic acid, pH 2.5 (XP), to detect cationic residues (Cortelazzo & Vidal, 1991). Anionic residues were detected by staining with 0.025% toluidine blue (TB) in McIlvaine buffer, pH 4.0 (Silva *et al*, 1997). Carbohydrates were visualised by oxidation with 0.5% periodic acid for 10 min, followed by staining with Schiff reagent for 8 min (PAS). Control samples were immersed in the Schiff reagent without prior oxidation (Cortelazzo, 1992). The stained sections were examined by light microscopy, using polarized light in some cases.

Chemical analysis

The phenolic compounds were extracted with acetone-water (70:30, v/v) as described by Bartolomé *et al* (1995) and the total phenol content was determined using the Prussian blue method (Price & Butler, 1977) and expressed in mg tannic acid g⁻¹ sample. Amino-terminal groups were determined after extraction with a mixture of trichloroacetic acid-sodium acetate-acetic acid (0.11 M : 0.22 M : 0.33 M) (Murthy *et al*, 1997) and reaction with o-phthaldehyde (Church *et al*, 1985). The results were expressed in mg glycine g⁻¹ sample. The residue obtained after extraction of the phenolic compounds was digested with 0.1 M NaOH at room temperature and the protein concentration measured by the method of Bradford using BSA as a standard (Bradford, 1976). Reducing sugars were extracted with a mixture of methanol-chloroform-water (MCW) (12:5:3, v/v), after which soluble polysaccharides were extracted with ethanol-water (10:90, v/v). The residue was treated with 30% perchloric acid to extract the starch. The reducing sugars were quantified using a dinitrosalicylic acid (DNSA) procedure (Chaplin, 1986) and

expressed in mg glucose g⁻¹ sample. Soluble polysaccharides and starch were quantified by the anthrone method using glucose as the standard (Scott & Melvin, 1953).

Sugar analysis

Defatted cocoa powder (1 g) was extracted three times with ethanol-water (80:20, v/v) for 6h at 37 °C. The extracts were combined and the ethanol was evaporated under reduced pressure. Samples were deionized through cation (Dowex-50W, Na⁺ form) and anion (Dowex-1, Cl⁻ form) columns and eluted with deionized water. The eluted material was evaporated to dryness and resuspended in 1 mL of deionized water. For the sugar analysis, 25 µL were injected on to a high performance anion exchange chromatography with a pulse amperometric detector (HPAEC-PAD) in a Dionex, DX300 system (USA) with a CarboPac PA-100 column (4 mm i.d. and 250 mm length) and an isocratic programme using 16 mM NaOH as eluent at 1 mL min⁻¹ for 30 min. The applied PAD potentials for E1 (300 ms), E2 (120 ms) and E3 (60 ms) were 0.04, 0.60 and -0.80 V, respectively, and the output range was 1000 nA. 0.89 mM glucose, 0.89 mM fructose and 0.93 mM sucrose standards (Sigma) were employed to calculate the proportion of each sugar (Braga *et al*, 1998). Total sugars were determined by the phenol-H₂SO₄ method (Dubois *et al*, 1956) and reducing sugars by the DNSA method (Chaplin, 1986).

Free amino acids analysis

Two grams of the fat free cocoa powder was extracted with 30 mL of sodium citrate (20 g L⁻¹, pH adjusted to 2.2 with HCl) for 3 hours. The extract was centrifuged (4100 g), filtered and the volume completed to 100 mL with the sodium citrate solution (Mermet *et al*, 1992). Before analysis, the samples were filtered through Millipore membranes (0.22 µm) and 2 µL aliquots injected. An automatic amino acid analyser (Thermo Separation Products, Riviera Beach, Florida, USA) with a PCX3100 reactor (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA) was employed. A Na⁺ column (3 mm i.d.; 250 mm length) was used at 55 °C. The detector temperature was 130 °C. The eluents were sodium citrate buffers at pH

3.15 and 7.4 and ninhydrin with a flow rate of 0.3 mL min⁻¹. The total analysis time including column regeneration was 72 min.

Polypeptides analysis

Polypeptides were extracted from 0.2 g of cocoa powder with 20 mL of trichloroacetic acid-sodium acetate-acetic acid (0.11 M : 0.22 M : 0.33 M) solution (TCA mixture) (Murthy *et al*, 1997). The extract was centrifuged (4100 g), filtered (0.45 µm) and freeze dried. The material was suspended in phosphate buffer pH 7.2 and 100 µL applied to a FPLC apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) with an anionic column (Mono Q). The elution was done with phosphate buffer in a linear gradient from 0 to 1 M NaCl in 20 min. The flow rate was 1 mL min⁻¹ and detection was effected using a UV detector with $\lambda = 280$ nm. Aliquots corresponding to the peaks were collected manually and analysed for peptides by the method of Bradford (1976), using BSA as the standard.

Statistics

The results were compared by the analysis of variance using the software package Statistica (Tulsa, OK, USA). Significant differences amongst means were confirmed using the Tukey test for multiple comparisons at $P < 0.05$. The principal component analysis (PCA) was carried out to study the variation in sugars and free amino acids due to different processes. Computations were performed using the SAS statistical program (SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.)

RESULTS AND DISCUSSION

Microscopic analysis

Anionic residues, mainly in pectin-like substances from the cell walls, were abundant at t_0 (Fig 1(a)), but decreased after 72 h of fermentation, perhaps because of complexation with Ca²⁺ ions (Nakajima *et al*, 1981), association with polyphenols, or degradation during processing. Dried and roasted material still

contained a large number of ruptured cells as compared to the material at the start of fermentation (Fig 1(a) and (b)).

The presence of polyphenol-rich cells in cocoa cotyledons was first described in the 19th century (Roelofsen, 1958). In the present study, the non-fermented material had a high number of phenolic bodies (Fig 1(a)), which were present even after 24 h of fermentation. As the fermentation progressed, polyphenols diffused throughout the whole cotyledon up to 48 h. After 72 h, no phenolic material could be detected (Fig 1(b)). These results, based on natural fermentation, agree with those of laboratory fermentation and other cocoa types (Biehl *et al*, 1982; Biehl *et al*, 1982a).

Prior fermentation, the proteinaceous material showed to be quite dispersed in the seed cytoplasm (Fig 1(c)). As fermentation progressed, this material diffused, similarly to that observed following germination, when degradation and mobilisation of proteins take place (Silva *et al*, 1997). After 72 h of fermentation, almost no protein material was detected (Fig 1(d)), the same being observed for dried and roasted seeds. The decrease in staining intensity was probably related to the formation of smaller, more soluble peptides, not detectable by the assay. Similar results were reported in a previous electron transmission microscopy study of cocoa (Biehl *et al*, 1982).

Seeds stained positive for neutral sugars by the PAS method (Fig 1(e)). Besides cellulose, grains of starch and glycoproteins were seen in the cytoplasm (Fig 1e), indicating the presence of protein reserves in cocoa seeds as reported to other seeds by Cortelazzo & Vidal (1991) and Silva *et al* (1997).

Drying and roasting increased the number of damaged and disrupted cells (Fig 1(f)). PAS staining and polarised light microscopy showed the presence of starch at the beginning of fermentation. With the loss of protein material and cell disruption, the starch grains became increasingly evident, particularly after roasting. Similar phenomena have been observed for almonds and peanuts (Perren & Escher, 1997; Young & Schapel, 1990).

Chemical analysis

Although cytochemical results had shown that phenols diffused during fermentation, the phenol content at t0 was not different from the value obtained after 72 h of fermentation (Table 1). Nevertheless, after drying and roasting the level of phenolic compounds decreased markedly to approximately 131 mg g⁻¹ (Table 1). According to Forsyth (1952; 1955; Forsyth & Quesnel, 1957), who extensively studied phenol transformations in cocoa, losses of total phenol are due to diffusion out of the cotyledons and can be calculated as 24 % after 60 hours of fermentation, reaching 58 % after 8 days. Phenolic compounds also complex with cocoa proteins and polysaccharides (Forsyth & Quesnel, 1958; Zak & Keeney, 1976; Bartolomé *et al*, 1995).

In agreement with the Xylidine Ponceau staining, it was observed a gradual decrease in protein content up to 72h of fermentation (Table 1). Concomitantly, the amount of amino-terminal groups increased with time as well as that of total free amino acids (Table 1) indicating proteolysis and the formation of smaller peptides and free amino acids. The rate of production of free amino acids during fermentation has been related to the rate of flavour and aroma development as established by Rohan and Stewart (1967, 1967a). Similar findings have been reported to cocoa from Malaysia and Ecuador (Hashim *et al*, 1998; Lerceteau *et al*, 1999). In one of these studies, the nitrogen content at the end of fermentation accounted to approximately 57 % of that at the beginning of the process (Lerceteau *et al*, 1999). A similar value was observed here for the protein content in dried samples (54 %). According to Voigt *et al* (1994), fermentation provides the conditions for the action of endoproteases that produce specific peptides and amino acids, which are of extreme importance to cocoa flavour.

As shown in Table 1, the protein levels remained constant during drying and roasting, whereas the concentration of amino-terminal groups decreased during roasting. The same was observed for total free amino acids (Table 1), which represents nearly a 32 % reduction. This reduction can be attributed mainly to the Maillard reaction that led to a consumption of amino acids during cocoa roasting (Rohan 1967; Memmet *et al*, 1992). This depends, among other factors, on the

variety, the roasting time and the temperature and can vary from 24.1 to 71.8 % (Pinto & Chichester, 1966; Reineccius *et al*, 1972; Memmet *et al*, 1992).

Table 2 shows the results of the fractionation of the polypeptides obtained by the TCA mixture. It was observed that the number of peaks markedly decreased during drying and roasting. On the other hand, the total peptide bonds detected, increased after 72 h of fermentation and reduced in the dried beans and roasted nibs. These results indicated that polypeptide changes are related to fermentation and drying, being the decrease related not only to proteolysis, but also to polyphenol complexation.

The free amino acid profile is presented in Table 3. After 72 hours of fermentation there was an increase of almost all the free amino acids, excepting tyrosine and lysine. In dried beans, higher values were detected when compared to those of the unfermented seeds, except for glutamic acid and proline. Seiki (1973) also reported a reduction in glutamic acid for cocoa fermented in trays (similar to the method used here), but not in heap fermentation. A different pattern was observed by other authors, especially for aspartic and glutamic acids (Rohan, 1964; Rohan & Stewart 1967; Kirchhoff *et al*, 1989; Hashim *et al*, 1998). Since accumulation of free amino acids is dependent of the action of endogenous proteases, and the activity of these enzymes are dependent on the conditions of fermentation (Kirchhoff *et al*, 1989), the differences detected in free amino acids content could be explained based on this basis. As mentioned before, roasting promoted a decrease of the most of free amino acids excepting glutamic acid. The smallest decrease was in the lysine content and the greatest in histidine (Table 3). A different pattern was observed by other authors who demonstrated a selective but incomplete destruction of amino acids during cocoa roasting, the rates of destruction varying among them (Pinto & Chichester, 1966; Rohan and Stewart, 1966; Mohr *et al*, 1971; Reineccius *et al* 1972; Seiki, 1973).

In agreement with the PAS results, the levels of starch did not change significantly during cocoa processing. However, it was observed a significant increase in content of reducing sugars during fermentation, followed by a significant decrease during drying and roasting (Table 1). These findings are in

agreement with those shown in Table 3 for sucrose, glucose and fructose. There was a continuous decreasing in sucrose content and an initial increasing in fructose and glucose at t72, followed by a decreasing in tD and fructose reduction in tR. The increase of reducing sugars during fermentation is due to sucrose inversion (Rohan 1964; 1967; Hashim *et al*, 1998). The difference between fructose and glucose content can be attributed to the preferential metabolism or polymerisation of glucose followed sucrose hydrolysis, that is known to occur during fermentation (Reineccius *et al*, 1972a). The high decrease in reducing sugars content, specially fructose, during roasting is attributed to the Maillard reaction (Mermet *et al*, 1992). This reduction can reach 100 % and as mentioned for free amino acids is related to the time and temperature of roasting (Mohr *et al*, 1971; Mermet *et al*, 1992). Nevertheless, fructose presented the greatest reduction after roasting, probably due to their higher content and the high reactivity of ketoses in the Maillard reaction. Complete glucose consumption or even no change in glucose content have already been reported (Mohr *et al*, 1971; Reineccius *et al* 1972b). The differences in composition and processing conditions, could explain the distinctive results here obtained. Other characteristics such as pH, water activity and polyphenol content can also not be discarded. We also observed high sucrose reduction during roasting, that was not reported by Reineccius *et al* (1972b).

PCA analysis

PCA was used to visualise the variation in the samples and to find correlation between the different variables. PCA generated two significant principal components (PCs) explaining 62.6 and 29.1 of the variation respectively (Table 4). The factors loading are shown in Table 4. Loadings with an absolute value greater than 0.70 (shown in bold type) represented a strong influence. It can be seen that PC1 is heavily influenced by free amino acids, except glutamic acid, tyrosine, proline and lysine. On the other side, PC2 is mainly influenced by glucose, fructose and sucrose. The loading plot (Figure 2) permits a better visualization of the distribution. Free amino acids are positioned at the right side with similar values on

PC1 and the sugars are positioned at the top with similar values on PC2. A score plot of PC1 and PC2 (Figure 3) showed that cocoa samples could be separated into four groups, each one in a different quadrant, but with similarities in one of the PCs. Unfermented and t72 samples differ in PC1 (free amino acids), but have similarities in PC2 (sugars). On the other side, t72 and tD have similarities in PC1 and differ in PC2. The roasted sample differs from all the others with negative values in PC1 and PC2, which represents a low content of free amino acids and sugars.

CONCLUSION

From a chemical point of view, the main changes during cocoa processing were the reduction in the total phenol content, the rise in reducing sugar content during fermentation and the subsequent reduction, especially in the fructose content, during drying and roasting. The protein content was reduced during fermentation with an increase in amino-terminal groups and free amino acids, which were consumed during roasting. The results presented in the literature are not in agreement with each other. So, we think that additional work with amino acids and reducing sugar supplementation prior to roasting, as well as sample characteristics, such as pH and water activity, are needed to fully understand flavour formation in cocoa. The microscopic evaluation was useful to follow the degradation of protein and phenolic bodies. Cellular disruption, especially during roasting, was quite a common event.

ACKNOWLEDGEMENTS

ESB is supported by CNPq and MIG is supported by CAPES-PICDT.

REFERENCES

1. Bartolomé B, Jiménez-Ramsey LM, Butler LG, Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. *Food Chemistry* **53**: 357-362 (1995).

2. Biehl B, Passem D, Sagemann W, Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. *Journal Science Food Agriculture* **33**: 1101-1109 (1982).
3. Biehl B, Quesnel VC, Passem D, Sagemann W, Water uptake by cocoa seeds during fermentation-like incubation. *Journal Science Food Agriculture* **33**: 1110-1116 (1982a).
4. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254 (1976).
5. Braga MR, Pessoni RAB, Dietrich SMC, Cell wall polysaccharide composition of leaves of tropical rubiaceae differing in phytoalexin response. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal* **10**: 71-78 (1998).
6. Brito ES, Pezoa Garcia NH, Gallão MI, Cortelazzo AL, Avaliação da estrutura celular de cacau (*Theobroma cacao* L.) por microscopia eletrônica de varredura durante a fermentação, secagem e torração, in *Anais XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, pp 1656-1659 (1998).
7. Chaplin MF, Monosaccharides. In: *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, pp 228 (1986).
8. Church FC, Porter DH, Catignani GL, Swaisgood HE, An o-phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry* **146**: 343-348 (1985).
9. Cortelazzo AL, Vidal BC, Soybean seed proteins: detection *in situ* and mobilization during germination. *Revista Brasileira Botânica* **14**: 27-33 (1991).
10. Cortelazzo AL, Starch detection and quantification in *Canavalia ensiformis* and *C. gladiata* cotyledons during the initial plant development. *Revista Brasileira Botânica* **15**: 157-162 (1992).
11. Cros E, Villeneuve F, Vincent J-C, Recherche d'un indice de fermentation du cacao I: evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. *Café, Cacao, Thé* **26**: 109-114 (1982).

12. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-355 (1956).
13. Forsyth WGC, Cacao polyphenolic substances. II. Changes during fermentation. *Biochemical Journal* **51**: 516-520 (1952).
14. Forsyth WGC, Cacao polyphenolic substances. III. Separation and estimation by paper chromatography. *Biochemical Journal* **60**: 108-111 (1955).
15. Forsyth WGC, Quesnel VC, Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *Journal Science food Agriculture* **8**: 505-509 (1957).
16. Forsyth WGC, Quesnel VC, Roberts JB, Interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. *Journal Science food Agriculture* **9**: 181-184 (1958).
17. Hashim P, Selamat J, Muhammad SKS, Ali A, Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *Journal Science Food Agriculture* **78**: 535-542 (1998).
18. Hoskin JM, Dimick PS, Daniels RR, Scanning electron microscopy of the *Theobroma cacao* seed. *Journal Food Science* **45**: 1538-1540 (1980).
19. Jinap S, Zeslinda A, Influence of organic acids on flavour perception of Malaysian and Ghanian cocoa beans. *Journal Food Science Technology* **32**: 153-155 (1995).
20. Kirchhoff PM, Biehl B, Ziegeler-Berhausen H, Hammor M, Lieberei R, Kinetics of the formation of free amino acids in cocoa seeds during fermentation. *Food Chemistry*, **34**: 161-179 (1989).
21. Lerceteau E, Rogers J, Pétiard V, Crouzillat D, Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. *Journal Science Food Agriculture* **79**: 619-625 (1999)
22. Mermet G, Cros E, Georges G, Étude préliminaire de l'optimisation des paramètres de torréfaction du cacao. Consommation des précurseurs d'arôme, développement des pyrazines, qualité organoleptique. *Café, Cacao, Thé* **36**: 285-290 (1992).

23. Mohr W, Rohrlé M, Severin Th, Über die Bildung des Kakaoaromas aus seinen Vorstufen. *Fett Seifen Anstrichmittel* **73**: 515-521 (1971).
24. Murthy MVR, Padmanabhan S, Ramakrishna M, Lonsane BK, Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method. *Food Biotechnology* **11**: 1-23 (1997).
25. Nakajima N, Morikawa H, Igarashi S, Senda M, Differential effect of calcium and magnesium on mechanical properties of pea stem cell walls. *Plant Cell Physiology* **22**: 1305-1315 (1981).
26. Perren R, Escher FE, Investigation on the hot air roasting of nuts. *Manufacturing Confectioner* **77**: 123-127 (1997).
27. Pinto A, Chichester CO, Changes in the content of free amino acids during roasting of cocoa beans. *Journal Food Science* **31**: 726-732 (1966).
28. Price ML, Butler LG, Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal Agriculture Food Chemistry* **25**: 1268-1273 (1977).
29. Reineccius GA, Keeney PG, Weissberger W, Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans. *Journal Agriculture Food Chemistry* **20**: 202-206 (1972).
30. Reineccius GA, Andersen DA, Kavanagh TE, Keeney PG, Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. *Journal Agriculture Food Chemistry* **20**: 199-202 (1972a).
31. Roelofsen PA, Fermentation, drying, and storage of cacao beans. *Advances Food Research* **8**: 225-96 (1958).
32. Rohan TA, the precursors of chocolate aroma: A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *Journal Food Science* **29**: 456-459 (1964).
33. Rohan TA, The precursors of chocolate aroma: The distribution of free amino acids in different commercial varieties of cocoa beans. *Journal Food Science* **30**: 416-419 (1965).

34. Rohan TA, The precursors of chocolate aroma: Application of gas chromatography in following formation during fermentation of cocoa beans. *Journal Food Science* **32**: 402-404 (1967).
35. Rohan TA, Stewart T, The precursors of chocolate aroma: Changes in free amino acids during the roasting of cocoa beans. *Journal Food Science* **31**: 202-205 (1966).
36. Rohan TA, Stewart T, The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. *Journal Food Science* **32**: 395-398 (1967).
37. Rohan TA, Stewart T, The precursors of chocolate aroma: Production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. *Journal Food Science* **32**: 399-402 (1967a).
38. Scott TA, Melvin EH, Determination of dextran with anthrone. *Analytical Chemistry* **25**: 1656-1661 (1953).
39. Seiki K, Chemical changes during cocoa bean fermentation using the tray method in Nigeria. *International Chocolate Review* **28**: 38-42 (1973).
40. Silva TRG, Cortelazzo AL, Dietrich SM, Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. *Ciência Cultura* **43**: 219-222 (1997).
41. Urbanski JJ, Chocolate flavor/origins and descriptions. The effects of process and bean source. *Manufacturing Confectioner* **72**: 69-82 (1992).
42. Voigt J, Heinrichs H, Voigt G, Biehl B, Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry* **50**: 177-184 (1994).
43. Young CT, Schapel WE, Light and scanning electron microscopy of the peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. Florunner) cotyledon after roasting. *Food Structure* **9**: 69-73 (1990).
44. Zak DL, Keeney PG, Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. *Journal Agriculture Food Chemistry* **24**: 483-6 (1976).

Table 1 - Effect of fermentation, drying and roasting on cocoa composition.

	<i>Fermented</i>		<i>Dried</i>	<i>Roasted</i>
	<i>0 h</i>	<i>72 h</i>		
Total phenol (mg tannic acid g ⁻¹)	231±5a	213±5a	157±6b	131±6c
Protein (mg g ⁻¹)	220±8a	157±9b	118±8b	138±7b
Amino-Terminal groups (mg glycine g ⁻¹)	21.6±0.2b	35.6±1.2a	32.6±1.9a	22.1±1.1b
Free amino acids (mg g ⁻¹)	25.7±0.7a	32.1±1.8b	35.3±1.3b	24.1±2.1a
Reducing sugar (mg glucose g ⁻¹)	50.1±0.3b	63.0±0.5a	28.0±0.5c	14.6±0.1d
Oligosaccharide (mg glucose g ⁻¹)	7.9±1.4a	6.7±1.9a	7.9±0.7a	7.7±1.1a
Starch (mg glucose g ⁻¹)	140±5a	127±5a	136±9a	162±4a

The values are the means ± SD.

Means with different letters within a row are significantly different ($P<0.05$).

All values are expressed on a defatted and dry weight basis.

Table 2 - Number of peaks eluted from FPLC with peptide bonds detected by the method of Bradford (1976) and total protein concentration calculated from the sum of the peaks.

Sample	Number of peaks	µg protein mL ⁻¹
Unfermented	7	46.4
Fermented 72 h	6	64.5
Dried	3	14.1
Roasted	2	13.2

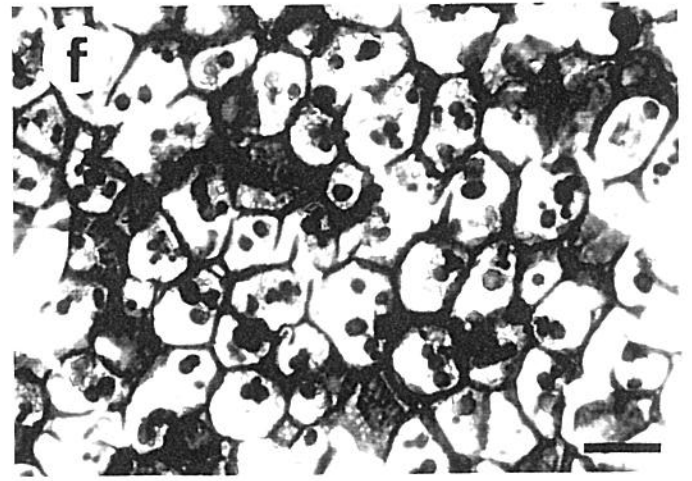
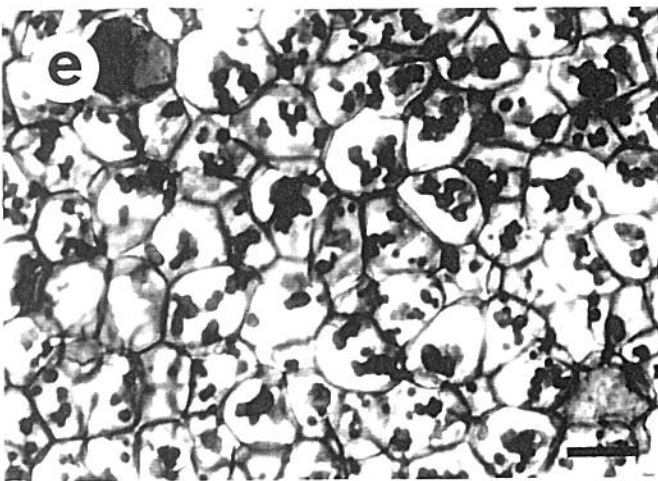
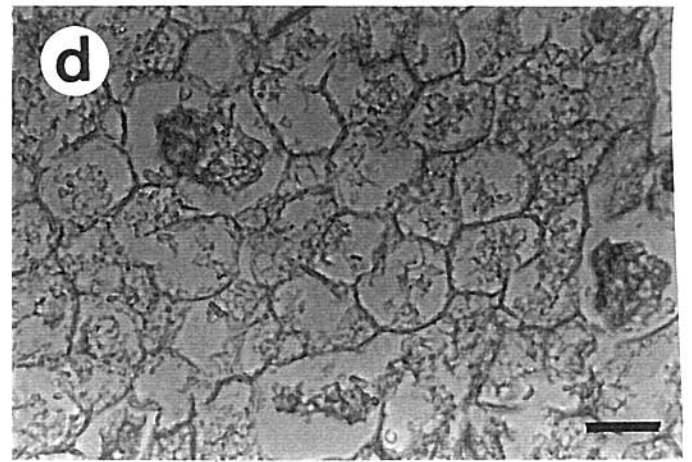
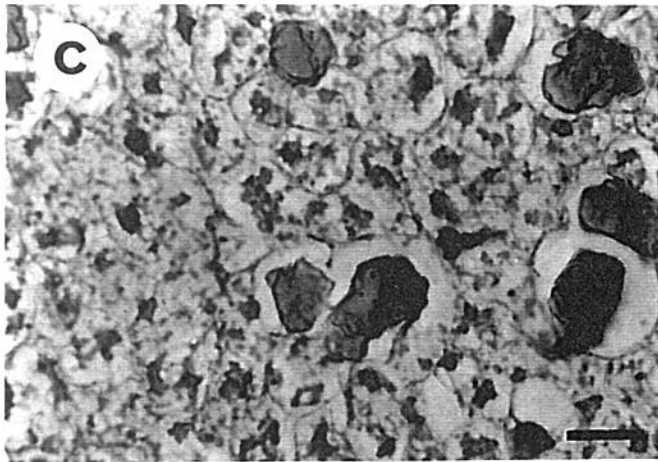
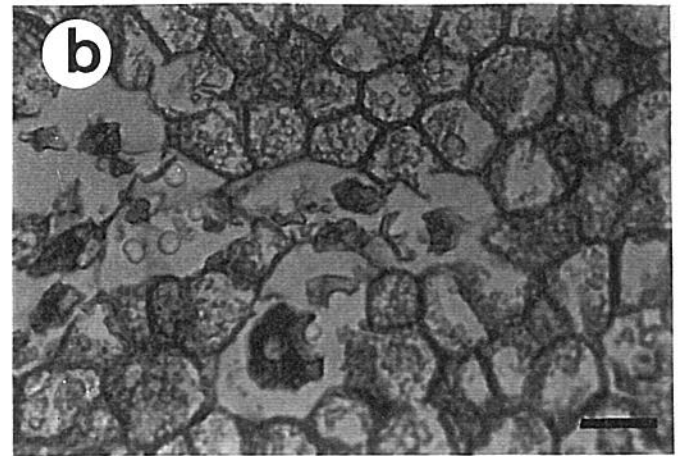
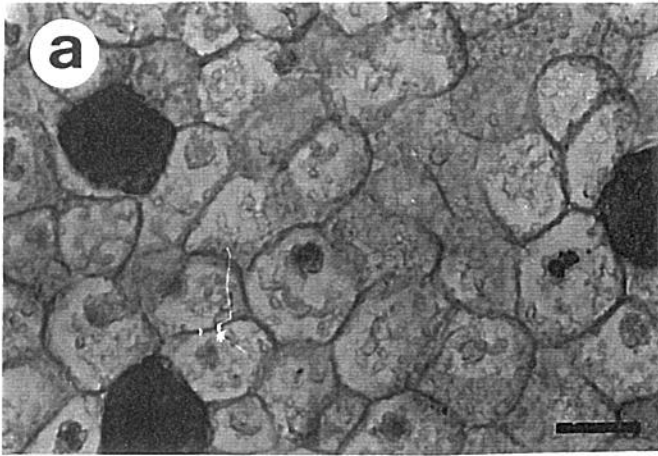
Table 3 - Free amino acids and sugars ($\mu\text{M g}^{-1}$) in cocoa with the percentage change related to the previous column in parenthesis.

	<i>Fermented</i>		<i>Dried</i>	<i>Roasted</i>
	<i>0</i>	<i>72 h</i>		
Amino acids				
Aspartic acid	9.8	13.0 (32.7) ^a	15.7 (20.8)	6.5 (-58.6)
Glutamic acid	7.4	11.7 (58.1)	4.3 (-63.2)	5.8 (34.9)
Leucine	7.4	14.8 (100.0)	17.6 (18.9)	12.3 (-30.1)
Alanine	9.7	18.1 (86.6)	21.2 (17.1)	12.0 (-43.4)
Phenylalanine	3.3	11.7 (254.5)	10.8 (-7.7)	5.9 (-45.4)
Tyrosine	3.6	1.8 (-50.0)	11.0 (511.1)	3.0 (-73.0)
Valine	5.6	11.0 (96.4)	12.5 (13.6)	6.4 (-48.8)
Isoleucine	4.1	9.0 (119.5)	8.8 (-2.2)	3.3 (-62.5)
Lysine	72.6	49.4 (-32.0)	73.0 (47.8)	69.7 (-4.5)
Arginine	18.0	23.5 (30.6)	23.5 (—)	19.1 (-18.7)
Histidine	2.0	4.9 (145.0)	5.4 (10.2)	0.7 (-87.0)
Threonine	4.6	11.8 (156.5)	8.8 (-25.4)	3.6 (-59.1)
Serine	15.8	27.8 (75.9)	18.8 (-32.4)	14.5 (-22.9)
Glycine	4.3	8.6 (100.0)	8.4 (-2.3)	2.9 (-65.5)
Methionine	2.9	7.2 (148.3)	5.6 (-22.2)	1.4 (-75.0)
Proline	11.3	14.0 (23.9)	6.4 (-54.3)	5.6 (-12.5)
Cystine	1.3	2.7 (107.7)	2.6 (-3.7)	0.4 (-84.6)
Sugars				
Glucose	89.6	90.5 (1.0)	28.3 (-68.7)	27.4 (-3.2)
Fructose	188.7	259.5 (37.5)	127.2 (-51.0)	49.7 (-60.9)
Sucrose	184.2	146.5 (-20.5)	81.9 (-44.1)	42.7 (-47.9)

Table 4 - Principal component factor loadings for free amino acids and sugars of cocoa.

Compound	PC1	PC2	PC3
Aspartic acid	0.875	-0.226	0.428
Glutamic acid	0.401	0.860	-0.317
Leucine	0.754	-0.591	-0.287
Alanine	0.893	-0.446	-0.053
Phenylalanine	0.935	-0.204	-0.289
Tyrosine	0.300	-0.811	0.502
Valine	0.930	-0.367	-0.004
Isoleucine	0.993	-0.088	0.078
Lysine	-0.609	-0.591	0.529
Arginine	0.961	-0.230	-0.152
Histidine	0.960	-0.124	0.251
Threonine	0.983	0.162	-0.087
Serine	0.867	0.438	-0.238
Glycine	0.990	-0.035	0.130
Methionine	0.985	0.160	0.063
Proline	0.409	0.907	0.102
Cystine	0.966	0.025	0.258
Sugars			
Glucose	0.161	0.958	0.236
Fructose	0.616	0.751	0.240
Sucrose	-0.159	0.826	0.540
Eigenvalue	12.5	5.8	1.6
Proportion of total variance (%)	62.6	91.7	99.9

Figure 1 - Cocoa cotyledons at different times of fermentation and processing. (a) t0 stained with 0.025% toluidine blue. Note the presence of phenolic bodies. (b) Roasted cocoa stained with 0.025% toluidine blue. Note the presence of damaged cells and the absence of phenolic bodies. (c) t0 stained with xyldine ponceau. Note the proteinaceous material dispersed in the cytoplasm. (d) t72 stained with xyldine ponceau. Note the general lack of proteinaceous material. (e) t0 PAS-positive staining of cytoplasmatic material (starch and glycoproteins) and cell walls (cellulose). (f) dried cocoa PAS-positive staining for starch grains. Bar - 20µm



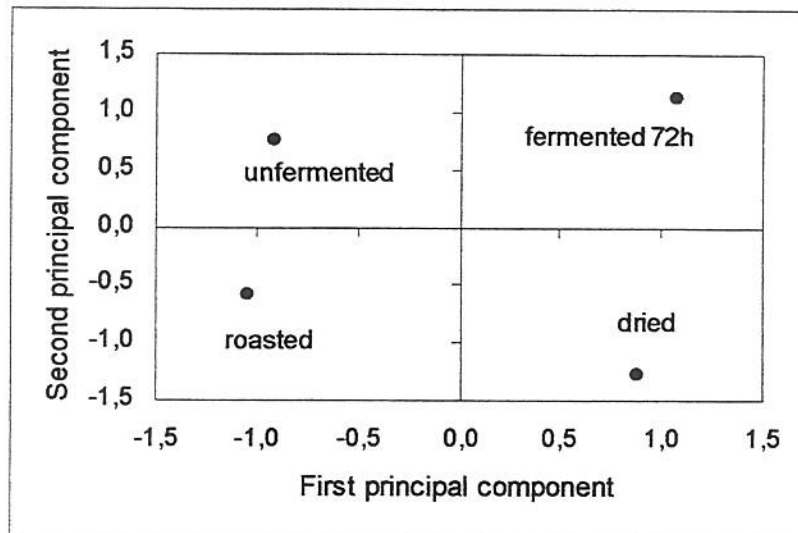


Figure 2 – Score plot of the first two principal components from cocoa samples at different process stages.

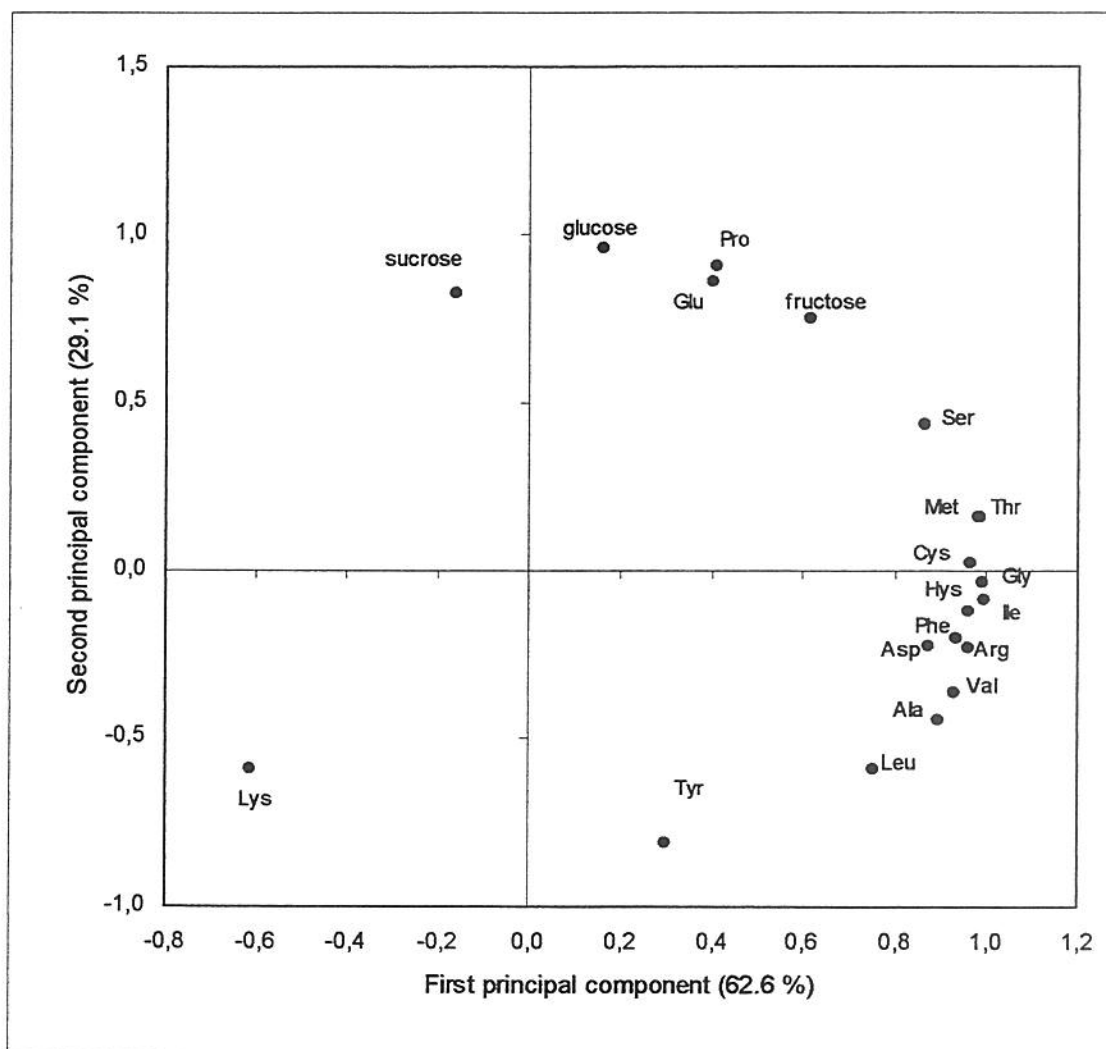


Figure 3 – Loading plot of the first two principal components for free amino acids and sugars from cocoa at different process stages.

Effect of autoclaving cocoa nibs before roasting on the precursors of the Maillard reaction and pyrazines

Autoclaving cocoa before roasting

Edy Sousa de Brito¹, Nelson Horacio Pezoa García^{1*}, Antonio Luis Pires Valente², Gláucia Faleiro Pini² & Fabio Augusto², Allan Cesar Amancio¹

¹ Department of Food Technology, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

² Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

*Correspondent: Fax 55 019 289 3617 ;

e-mail: nelson@fea.unicamp.br

Abstract: Nibs of raw cocoa (N) were roasted (R) at 150 °C for 38 min. Samples were autoclaved at 121°C for 15 min (A) and roasted (AR) at 150 °C for 38 min. The samples were then analysed for moisture content, water activity (a_w), reducing sugar and amino group (α -N) levels and absorption at 275 nm (A_{275}) and at 280 nm (A_{280}). Tri- and tetramethylpyrazines were quantified by SPME-GC. There was a reduction of α -N, in the order N>A>R>AR. The same sequence was observed for reducing sugars. The tetramethylpyrazine content had an A/A_{is} of N<R<A<AR and for trimethylpyrazine the order was N<A<R<AR. After autoclaving, the A_{tetra}/A_{tri} decreased from 31.30 (N) to 11.06 (A). With roasting, this ratio was 2.18 (R) and 2.58 (AR). Autoclaving nibs before roasting significantly affected the levels of compounds which contribute to cocoa flavour formation and increased the concentration of tri- and tetramethylpyrazines in the headspace of cocoa samples. Autoclaving prior to roasting also affected the sensory properties of the samples.

Keywords: cocoa processing, Maillard reaction precursors, pyrazines.

INTRODUCTION

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is used as a raw material in many products and is highly appreciated for its flavour. Agronomic factors such as genotype, soil, climate and harvesting procedures associated with the processing conditions (fermentation, drying and roasting), are of great importance in determining the characteristics of cocoa, although the final users have little control over these factors. Cocos from different origins (Africa, Asia, Central and South America) have distinct intrinsic compositions; even after passing through the same processes. This distinctiveness contributes to the heterogeneity of the raw material. A better understanding of how processing influences the composition of cocoa and how the constituents of cocoa are related to its sensory characteristics, is important for the cocoa industry.

Flavour formation in cocoa is related partly to the thermal treatment (roasting), during which several modifications occur including the Maillard reaction, which is responsible for the accentuated decrease in the concentration of reducing

sugars and amino acids during roasting (Mermet *et al*, 1992). The modifications associated with roasting are generally limited by factors inherent to the process itself.

Cocoa samples from different origins show the same pyrazinic compounds but in different amounts. This may be related to the formation of flavour precursors during fermentation and to the type of roasting process and its intensity, as well as to agronomic factors. Major differences involve mainly the dimethyl, trimethyl and tetramethylpyrazines. The latter, together with 2,5-dimethylpyrazine, have been suggested as indicators of the quality of roasted cocoa beans (Muggler-Chavan & Reymond, 1967; van der Wal *et al*, 1971; Zamalloa *et al*, 1995).

Pyrazines are usually formed rapidly in proportion to the duration of treatment during the first 20 to 30 min of roasting at 150 °C, with each methylpyrazine having its own rate of development. After this the tetramethylpyrazine concentration begins to decrease and the increase of tri- is slow, indicating their involvement in other reactions or even the volatilisation of pyrazines at a rate near or higher to their formation. Other methylpyrazines such as the 2,3; 2,5 and 2,6-dimethylpyrazines show a constant increase up to the beginning of over roasting (Chaveron *et al*, 1989). Pezoa García (1989) reported significant concentrations of methylpyrazines in the gases released during roasting.

Pyrazine formation is observed with roasting at 70 °C for 30 min (Reineccius *et al*, 1972). Dimethylpyrazines, especially 2,5-dimethylpyrazine, predominate in overroasting. This increase, associated with the correlation between the degree of roasting and taste, made it possible to develop a roasting index based on the ratio between 2,5-dimethylpyrazine and the tri- and tetramethylpyrazines. The origin of the cocoa had little influence on this ratio (Ziegler & Sandmeier, 1983; Pezoa García, 1989; Chaveron *et al*, 1989; Plumas *et al*, 1996; Jinap *et al*, 1998).

In this work, we studied the changes in compounds that participate in the Maillard reaction as well as the formation of pyrazines during the autoclaving of cocoa nibs, and the association of this process with roasting.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Fermented cocoa beans of the Forastero variety collected from the Experimental Station of the IAC at Pariquera Açú, São Paulo, Brazil were used. The fermented material was broken into nibs (3 - 6 mm) prior to treatment. A raw sample was used as the control (N). A fraction of the material was roasted at 150 °C for 38 min (R). The rest of the material was autoclaved at 121 °C for 15 min (sample A), then roasted at 150 °C for 38 min (sample AR). A PRE 1Z sample roaster (Probat-Werke, Germany) with a high accuracy digital temperature controller MIC 1160 (Partlow Co, NY, New Hartford, USA) was used for roasting the cocoa. This procedure was performed three times.

Analyses

After processing, the samples were ground in an analytical mill (IKA A10, Janke & Kunkel, Germany) and analysed for moisture at 100 °C (AOAC, 1997). The reducing sugars were determined by the DNSA method and the values expressed as glucose content (mg g^{-1}) (Chaplin, 1986). The amino groups ($\alpha\text{-N}$) were extracted with a mixture of trichloroacetic/sodium acetate/acetic acid (0.11 M : 0.22 M : 0.33 M) (Murthy *et al*, 1997) and determined spectrophotometrically, after reacting with *o*-phthaldialdehyde (Church *et al*, 1985). The values were expressed as glycine content (mg g^{-1}). The absorbance of the resulting extract was also read at A_{275} to determine the levels of amino acids and peptides with aromatic groups (Murthy *et al*, 1997). The volatile acid content was determined as described by Lopez (1983). The absorbance at 280 nm (A_{280}) was determined in distillates resulting from the samples. Distillation was also done as described by Lopez (1983). Water activity (a_w) was determined using a CX-2 (Decagon Devices, WA, Pullman, USA).

All analyses were performed three times and the results were compared by ANOVA, the Tukey-HSD test being used to check for significant differences amongst samples ($p < 0.05$).

SPME-GC of the pyrazines

One gram (1.0 ± 0.05) of sample was placed in a 15 mL V-vial flask with a magnetic stirrer and a silicone septum, and 10 mL of a saturated solution of NaCl was added. After allowing 15 min for equilibration, a 65 μ m Carbowax-PDMS (Supelco, PA, Bellefonte, USA) fiber was placed in the sample headspace. Extraction was done at 60 °C for 45 min. Peak identification was achieved by spiking with standards (Aldrich, WI, Milwaukee, USA). The tri- and tetramethylpyrazine area was reported relative to the area of the internal standard (pyrazine).

A gas chromatograph (AutoSystem XL, Perkin Elmer Co, Norwalk, CT) was used for the chromatographic analysis. Desorption of the compounds present in the fiber occurred in the injector in the splitless mode, at 240 °C for 4 min. Helium (25 mL min⁻¹) was used as the stripping gas. The chromatographic column (PE-WAX, 30 m length, 0.53 mm i.d. and 0.5 μ m film thickness) was maintained at 45 °C for 10 min and then heated at a rate of 10 °C min⁻¹ up to 210 °C and held at this temperature for 5 min. The detector temperature (FID) was 240 °C.

Sensory evaluation

The roasted nibs were milled in a cooled drum mill. The mass obtained was mixed with sugar and dairy cream (35% fat) in a proportion of 48.8:26.2:25 (w/w), respectively. The resulting product was cooled and cut into pieces (10 g weight) for sensory evaluation. The difference from the control test was assessed using sample R as the standard. Samples R and AR were presented to judges (N=30) who were asked to indicate, on a 9-point scale (0 = no difference, up to 8 = extremely different), the extent to which the samples flavour differed from the standard control. The results were compared by the *t* test (Meilgaard *et al*, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

The temperature profile inside the roaster during the roasting process of samples N and A is shown in Figure 1. The roasting behaviour of previously autoclaved samples and of the standard control samples was similar.

After roasting the α -N value increased in the order AR<R<A<N (Fig. 2). The same order was observed for reducing sugars (Fig. 2). There was a high correlation between the α -N value and the levels of reducing sugars from sets c→t set and a→at ($R^2= 0.991$ and 0.965 , respectively), with a significant difference, $p<0.05$, between them.

The lower values for sugars and α -N in the group AR as compared to the R group, could indicate that autoclaving favours the Maillard reaction. In an experimental model system, with an increase in a_w , the concentration of pyrroles increased, whereas the concentration of pyrazines, pyridines and furans decreased (Heinzler & Eichner, 1991). A process involving humidity changes and pre-thermal treatment prior to roasting resulted in cocoa with a better, more agreeable and longer lasting flavour than that of cocoa which was only roasted. This process would be indicated mainly for middle quality nibs (Oberparlaiter & Ziegleder, 1997). In the present work, the a_w content of the autoclaved sample was higher than that of the standard control sample (Fig. 3). This could explain the greater consumption of reducing sugars and α -N in the autoclaved sample.

The A_{275} , which indicates the presence of amino acids and/or peptides with aromatic groups, decreased significantly in AR as compared to the rest of the samples (Fig. 4). As with the reduction in α -N, this decrease could be related to a higher a_w value of A as compared to N, and this would favour the Maillard reaction.

Volatile acidity was reduced in the group AR (Fig. 5). This may be explained by a higher loss of water and volatile acids (vaporisation) during roasting since the autoclaved samples had a higher moisture content (7.57 ± 0.17 g 100 g⁻¹) than raw nibs (4.44 ± 0.33 g 100 g⁻¹). Another possible explanation could be a higher permeability of nib tissues as a result of autoclaving. During roasting, there is a significant change in the acid content of cocoa butter, with unroasted cocoa butter containing a three fold higher concentration of volatile acids than that of roasted cocoa (Carlin *et al*, 1986).

Figure 6 shows a SPME-GC chromatogram of the cocoa headspace. This procedure allows for a fast and easy evaluation of the compounds present in the

headspace of the samples when compared to the steam and/or solvent based extractions normally used.

Tetramethylpyrazine production in the treatments followed the order $N < R < A < AR$ (Fig. 7), indicating that autoclaving produces tetramethylpyrazine in quantities similar to the direct roasting of nibs, which in turn showed a 9% increase relative to the raw material. In samples in which autoclaving preceded roasting, the tetramethylpyrazine content increased nearly 42%.

For trimethylpyrazine, the order of production was $N < A < R < AR$ (Fig. 7). The values obtained represent an increase of about 1471% and 1623% for R and AR, respectively. However, although sample AR showed higher values than R, the A_{tetra}/A_{tri} ratio did not differ significantly (2.60 and 2.16, respectively). A tetra/tri ratio equal or close to 1 indicates normal roasting, higher values indicate weak roasting and lower values reflect overroasting (Hashim & Chaveron, 1994). So far, a ratio of 1 has only been achieved by methods using steam stripping. In the present work, the tetra/tri ratio was determined in the sample headspace.

Figure 4 shows the A_{280} values for the determination of volatile acidity. These values reflect the presence of pyrazines (Ziegler, 1991). Figures 4 and 7 show a direct relationship between the A_{280} and pyrazine formation, especially trimethylpyrazine. This simple measurement could be useful for the inexpensive evaluation of changes caused by thermal processing of cocoa.

The sensory test applied to evaluate the flavour of the products formulated with R and AR indicated that the samples differed significantly from one another ($F_{calculated} = 22.53$; $F_{tabulated(1,29)} = 4.20$, $p < 0.05$). This finding indicated that chemical changes during processing do influence cocoa flavour.

CONCLUSIONS

Autoclaving cocoa nibs prior to roasting increased the amount of compounds involved in flavour formation. The significant decrease in reducing sugars and α -N in autoclaved samples suggested that this treatment favoured the Maillard reaction. Cocoa nib autoclaving influenced the pyrazine concentration in the sample headspace both before and after roasting. Autoclaving the cocoa nibs before

roasting increased the levels of tetramethylpyrazine, the principal pyrazine of cocoa, by 42.3% whereas in roasted cocoa the increase was 9.3%. For trimethylpyrazine these values were 1623% and 1471%, respectively. These results suggest that the use of SPME-GC to determine pyrazine levels in the headspace of cocoa by SPME-GC, could provide a suitable chemical test for evaluating the roasting process. Most chemical changes during autoclaving contribute to a product with a distinct flavour, as confirmed in a sensory evaluation.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by CNPq and FAPESP.

REFERENCES

1. AOAC. Cacao bean and its products. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. Pp. 1. Maryland (1997).
2. Carlin, J.T., Lee, K.N., Hsieh, D.A.L., Hwang, L.S., Ho, C.T. & Chang, S.S.. Comparison of acidic and basic volatile compounds of cocoa butters from roasted and unroasted cocoa beans. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **63**, 1031-1036 (1986)
3. Chaplin, M.F. Monosaccharides. In: *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach* (edited by M.F. Chaplin & J.F. Kennedy). Pp. 3. Oxford: IRL Press. (1986).
4. Chaveron, H., Guyot, B., Hashim, L., Pezoa, H. & Pontillon, J. Formation and evolution of methylpyrazines during cocoa roasting (study of methylpyrazines extraction methods). *Proceedings of the 6th International Flavor Conference*. Pp. 305-319. Greece (1989).
5. Church, F. C., Porter, D. H., Catignani, G. L. & Swaisgood, H. E. An o-phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry*, **146**, 343-348 (1985).
6. Hashim, L. & Chaveron, H. Extraction and determination of methylpyrazines in cocoa beans using coupled steam distillation-microdistillator. *Food Research International*, **27**, 537-544 (1994).

7. Heinzler, M. & Eichner, K. Verhalten von Amadori-Verbindungen während der Kakaoverarbeitung. 2, Bildung von aromastoffen unter Rostbedingungen. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **192**, 445-450 (1991).
8. Jinap, S., Wan Rosli, W. I., Russly, A. R. & Nordin, L. M. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**, 441-448 (1998).
9. Lopez, A. S. F. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. *Revista Theobroma*, **13**, 233-248 (1983).
10. Meilgaard, M., Civille, G. V. & Carr, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. Pp. 67-74. Boca Raton: CRC Press. (1987).
11. Mermet, G., Cros, E. & Georges, G. Étude préliminaire de l'optimisation des paramètres de torréfaction du cacao. Consommation des précurseurs d'arôme, développement des pyrazines, qualité organoleptique. *Café, Cacao, Thé*, **36**, 285-290 (1992).
12. Muggler-Chavan, F. & Reymond, D. Constituants aromatiques de cacaos de divers provenances. *Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène*, **58**, 466-472 (1967).
13. Murthy, M. V. R., Padmanabhan, S., Ramakrishna, M. & Lonsane, B. K. Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method. *Food Biotechnology*, **11**, 1-23 (1997).
14. Oberparlatter, S. & Ziegler, G. Amadori-Verbindungen als Aromavorstufen in Kakao. *Nahrung*, **41**, 142-145 (1997).
15. Pezoa García, N. H. Contribution a l'étude d'un capteur pour contrôler en continu le procédé de torréfaction. These Docteur. Université de Technologie de Compiègne, France. (1989).
16. Plumas, B., Hashim, L. & Chaveron, H. Measurement of the olfactive intensity of chocolates by differential olfactometry. *Food Control*, **7**, 117-120. (1996).

17. Reineccius, G. A., Keeney, P. G. & Weisberger, W. Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **20**, 202-206 (1972).
18. van der Wal, B., Kettenes, D. K., Stoffelsma, J., Sipma, G. & Semper, A. T. J. New volatile components of roasted cocoa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **19**, 276-280 (1971).
19. Zamalloa, W. A., Pezoa Garcia, N. H. & Meireles, M. A. A. Extração de componentes voláteis de cacau por micro-extrator e por CO₂ subcrítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **15**, 163-169 (1995).
20. Ziegler, G. Composition of flavor extracts of raw and roasted cocoas. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **192**, 521-525 (1991).
21. Ziegler, G. & Sandmeier, D. Rostgradbestimmung von Kakao mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **79**, 343-347 (1983)

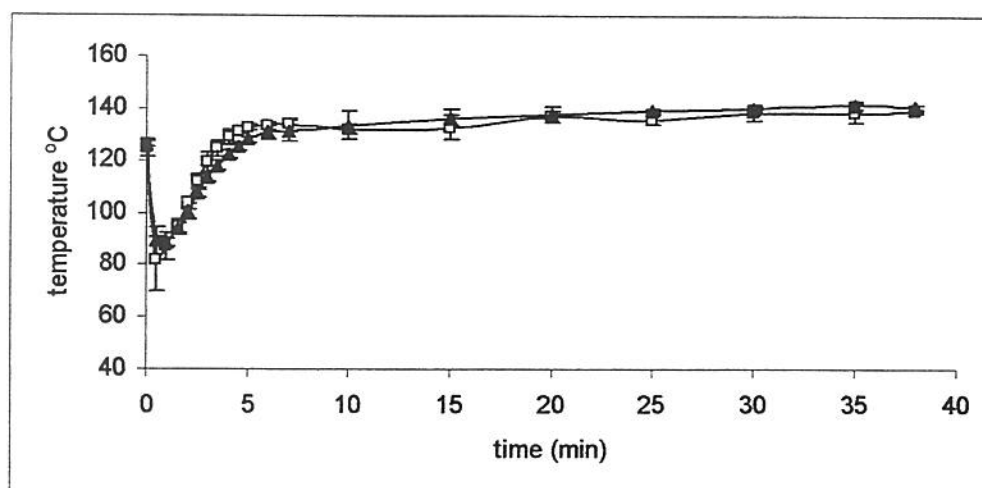


Figure 1 - Temperature profile inside the roaster during the roasting of non-autoclaved cocoa (□) and autoclaved (▲) nibs (average $\pm$ SD).

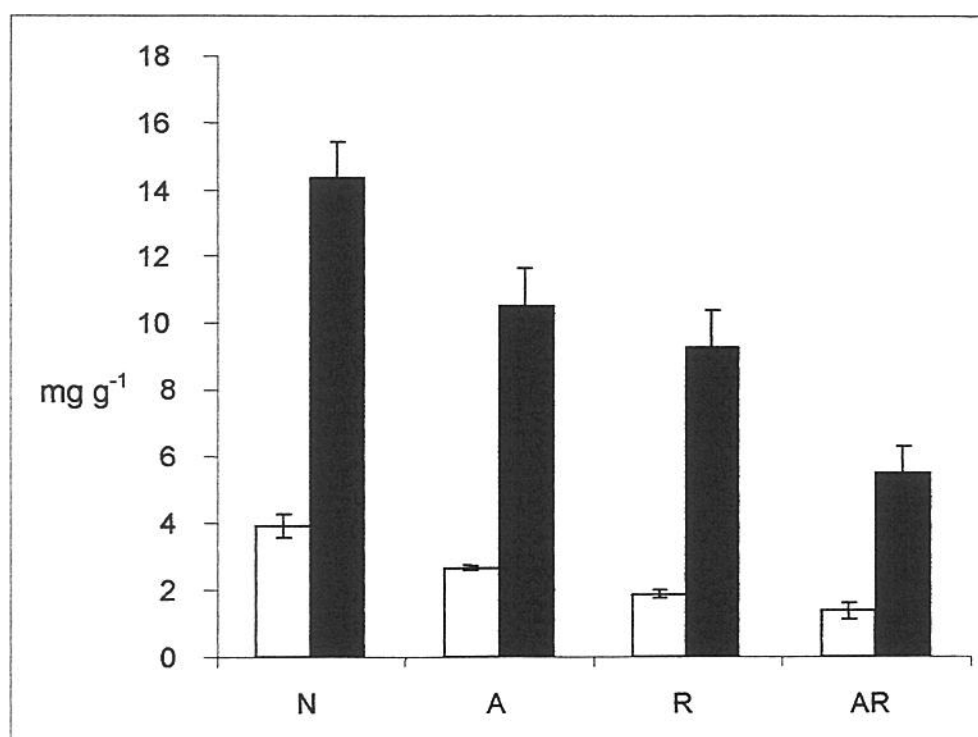


Figure 2. Reducing sugar (□) and amino group (■) concentrations expressed as mg g^{-1} of glucose or glycine, respectively, for samples N, A, R and AR.

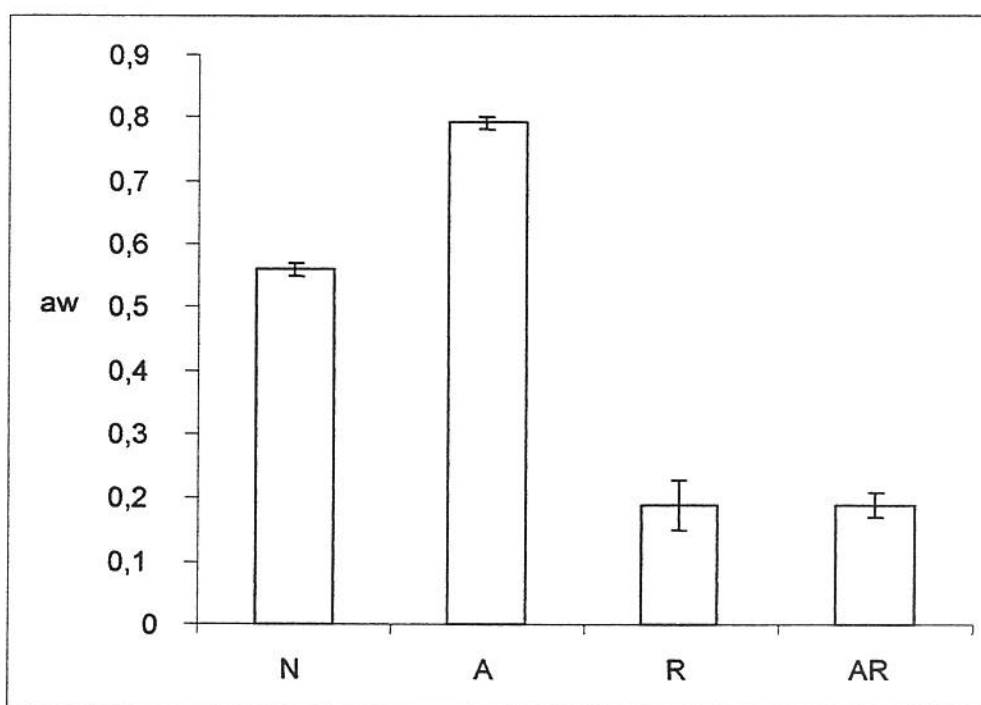


Figure 3. Water activity (aw) of samples N, A, R and AR.

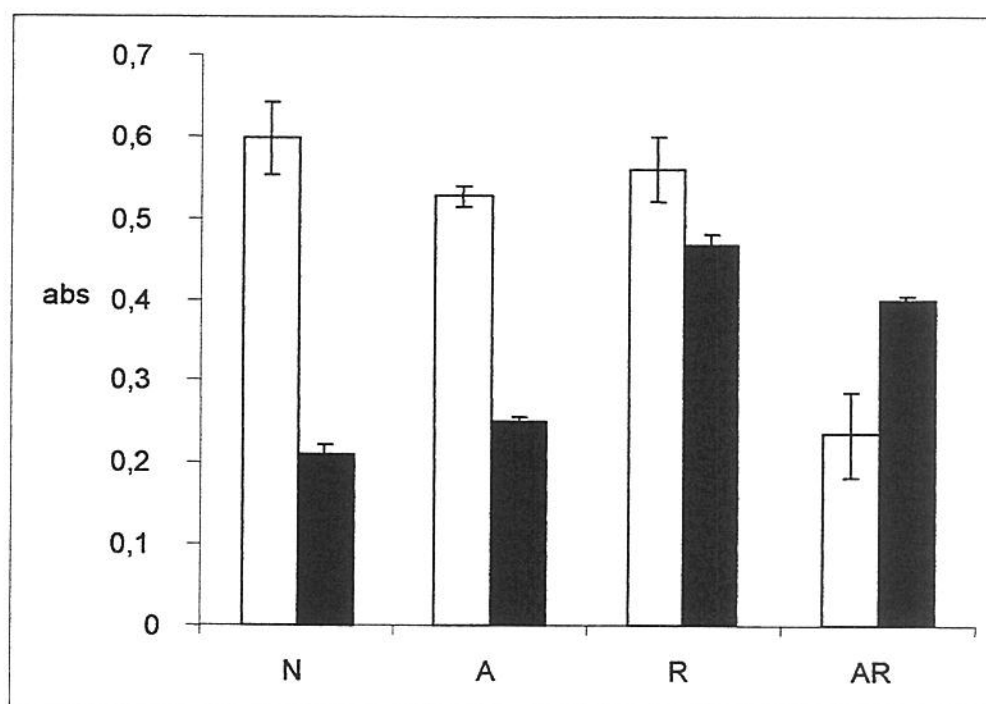


Figure 4. Absorption at 275 nm (□) and 280 nm (■) for samples N, A, R and AR.

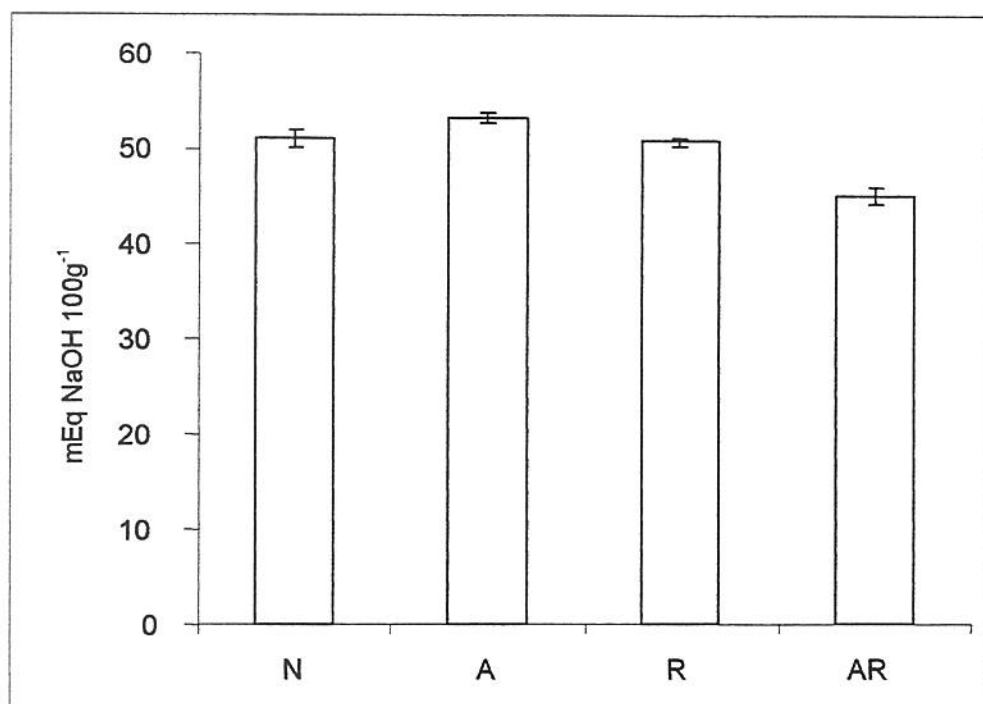


Figure 5. Volatile acidity in samples N, A, R and AR.

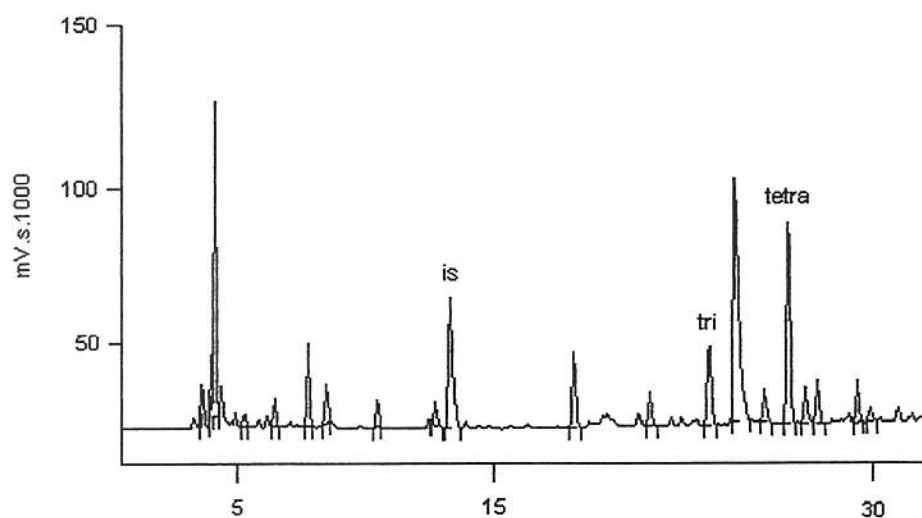


Figure 6. A typical SPME-GC chromatogram of a sample from the headspace of a roasted cocoa sample.

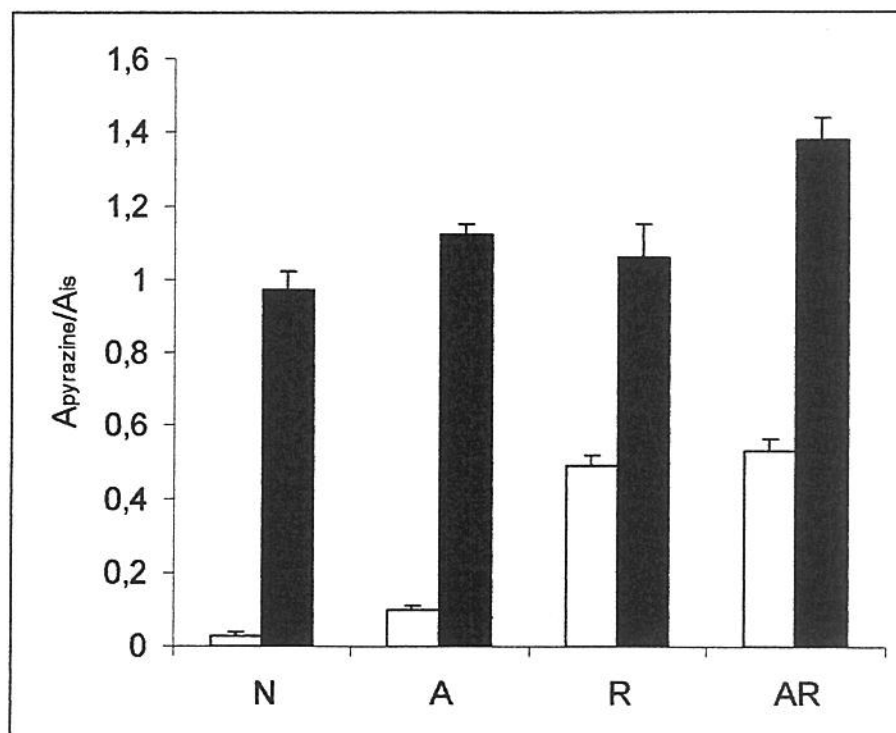


Figure 7. Ratio between the tri (□) and tetramethylpyrazine (■) area to the internal standard area for samples N, A, R and AR.

**Use of a proteolytic enzyme to improve
cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour**

Edy Sousa de Brito, Nelson Horacio Pezoa García* and Allan César Amancio

Department of Food Technology, Faculty of Food Engineering, State University of
Campinas (UNICAMP), PO Box 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

*correspondent author: e-mail nelson@fea.unicamp.br

ABSTRACT: Protein hydrolysis occurring during fermentation is partially responsible for the formation of the flavour precursors, which will participate in the Maillard reaction during the roasting of cocoa. An additional protein hydrolysis, using an exogenous protease, was performed on cocoa nibs to verify the formation of precursors and the effect on cocoa flavour. An experimental design was used to check the influence of temperature (30 to 70 °C) and enzyme : substrate ratio [E/S] (97.5 to 1267.5 U g⁻¹ of protein). The % Degree of Hydrolysis (% DH) was affected mainly by [E/S] leading to a 4-fold increase (from 5 to 20 %) after 6 hours of treatment. During cocoa nib roasting, there was a greater consumption of hydrolysis compounds in the protease treated sample as compared to the control, indicating their participation in the Maillard reaction. An increased perception of the chocolate flavour as well as the bitter taste was observed in the product formulated with protease treated cocoa. The use of an exogenous proteolytic enzyme is useful to improve cocoa flavour.

Key words: cocoa flavour, protein hydrolysis, processing

INTRODUCTION

Fermented and dried cocoa beans constitute the raw material used by the chocolate industry to produce different products, which are largely appreciated for their characteristic flavour. During fermentation the pulp surrounding the seeds is metabolized by the microorganisms resulting in a rise in temperature and a drop in pH, which will be responsible for the death of the cotyledon. There is also a production of several substances such as ethanol, acetic and lactic acids and the formation of flavour precursors, basically, peptides, free amino acids and reducing sugars (Reinnecius *et al*, 1972; Mohr *et al*, 1976). These precursors will participate in the Maillard reaction during cocoa roasting and lead to the characteristic chocolate flavour.

It was confirmed that proteolysis is very important for cocoa flavour development. Amino acids and peptides are produced during fermentation by the cooperative action of an aspartic endoprotease and a carboxipeptidase. The main

substrate for these enzymes is globulin described as cocoa vicilin. A specific cacao aroma was obtained when this globulin was degraded by exogenous proteases and the resulting products were roasted in the presence of reducing sugars (Voigt *et al*, 1994; 1994a). However, other cocoa proteins should be considered in flavour precursor formation (Lerceteau *et al*, 1999). During subsequent roasting, the free amino acid levels were reduced, but this reduction was not complete and there were different rates of reaction for the different amino acid groups (Seiki, 1973; Abeygunasekera & Jansz, 1989).

The use of enzymes in cocoa nibs proved to be successful to reduce polyphenol contents by near 25 % (Yoshiyama & Ito, 1996; Fernández Barbery, 1999). These authors found a greater polyphenol reduction in autoclaved nibs, which facilitates enzyme penetration into tissues and subsequent action. Fernández Barbery (1999), also demonstrated that the bitter taste and the adstringency were reduced by polyphenoloxidase action, which contributed to a better acceptance of the cocoa products.

The purpose of this work was to study the effect of enzyme concentration and temperature on the enzymatic proteolysis of fermented and dried cocoa nibs and their effect on flavour.

MATERIAL AND METHODS

Sample

Fermented cocoa beans of the Forastero variety collected from an experimental station of the IAC at Pariquera Açu, São Paulo, Brazil were used. The tegument and germ tissue were removed and the cotyledons broken into nibs. The material which passed through a 3.5 mesh screen but was retained by an 8 mesh screen, was autoclaved at 121 °C for 15 min prior to enzyme treatment.

Enzymatic Treatment

A proteolytic enzyme (Flavourzyme MG, type A), with an activity of 1,000 LAPU g⁻¹, was provided by Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark). The enzyme was dissolved in 90 mL of distilled water and placed in a beaker containing 150 g of cocoa nibs. The samples were then submitted to a pressure of 200 mmHg atmospheres for 1 min. During the experiments samples were maintained in a water bath at the pre-determined temperature, and mixed at 15 min intervals. At appropriate times, the reaction was stopped by drying samples at 65 °C for 30 min and then keeping them at -18 °C until analysis.

An experiment with an enzyme / substrate ratio [E/S] of 682.5 at 50 °C (central point) was carried out and samples collected after 1, 2, 4 and 6 hours of reaction. Reaction times of 4 and 6 hours were chosen for further studies.

A central composite rotatable design (CCRD) (Barros Neto *et al*, 1996) with two variables was used to study the response pattern and establish a model for cocoa protein hydrolysis. The variables studied were temperature and enzyme-to-substrate ratio, each at five levels. Table 1 shows the symbols and levels.

The results were evaluated by response surface methodology (RSM) and the adequacy of the model was assessed by the analysis of variance ($P < 0.10$) using the software package STATISTICA (Statsoft, v. 5.0, Tulsa, OK, USA).

To verify the model and to carry out a sensory evaluation, cocoa nibs were treated with both enzyme and with water (control) under fixed conditions, and roasted at 150 °C for 38 min (PRE 1Z sample roaster, Probat-Werke, Germany).

Analyses

The amino groups (α -N) were extracted with a mixture of trichloroacetic/sodium acetate/acetic acid (0.11 M:0.22 M:0.33 M) (Murthy *et al*, 1997) and determined spectrophotometrically, after reacting with α -phthaldialdehyde (Church *et al*, 1985). The values were expressed as glycine

content (mg g^{-1}). The absorbance of the resulting extract was also read at A_{275} to determine levels of amino acids and peptides with aromatic groups (Murthy *et al*, 1997). Total nitrogen was estimated by a semi-micro Kjeldal procedure (AOAC, 1997).

The degree of protein hydrolysis (DH) was established as the ratio between amino-terminal groups and total nitrogen and expressed on a percentage base (equation 1).

$$\% \text{ DH} = (\alpha\text{-N} / \text{total-N}) \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Sensory Evaluation

The roasted nibs were milled in a cooled three roll mill. The mass obtained was mixed with sugar and dairy cream (35% fat) in a proportion of 48.8:26.2:25 (w/w), respectively. The resulting product was cooled and cut into pieces (10 g weight) for the sensory evaluation. A just right scale was used to evaluate the intensity of chocolate and bitter taste. The samples were presented to judges (N=30) who were asked to indicate the extent to which the taste was much too weak, just right or much too strong on a 9-point structured scale (Meilgaard *et al*, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the dynamics of the protein hydrolysis under fixed conditions (central point). At the beginning of the process a DH near 5 % was found. This value is explained by the natural hydrolysis that occurs during fermentation. After 6 hours of treatment the DH suffered a 4-fold increase. The curve tendency indicates that the DH for this system tends to stabilize at near 20 %. This is a common behaviour in the hydrolysis of many protein systems and can be attributed to one or more of the following phenomena acting together: substrate exhaustion, enzyme deactivation and product inhibition (Adler-Nissen, 1986; Bombara *et al*, 1992). Based on this result we decided to study the effect of temperature and [E/S] rate on the hydrolysis of cocoa proteins after 4 and 6 hours, using a CCRD.

Table 2 shows the conditions and % DH after enzyme treatment for 4 and 6 hours. The data were analysed for their main effects and interactions. The models expressed by equations 2 and 3, were generated, representing the % DH after 4 and 6 hours, respectively, as a function of the more significant variables ($P < 0.10$).

$$\% \text{ DH 4 hours} = 15.64 + 1.12X_2 - 1.45X_1X_2 \quad (\text{eq. 2})$$

$$\% \text{ DH 6 hours} = 19 + 1.04X_2 - 2.4X_2^2 \quad (\text{eq. 3})$$

The F -test shows that the model for A_{275} was not reliable, since the calculated F values were lower than the listed F values (data not shown). These results indicate that aromatic amino acids were not released during proteolysis or that the A_{275} estimation was not a useful procedure to follow proteolysis in cocoa. Table 3 shows the analysis of variance for the % DH after 4 and 6 hours of treatment. The F value calculated for % DH 4 hours was lower than the F value listed and for the % DH 6 hours it was greater, but not 3-5 times greater, which would indicate a statistical significance (Barros Neto *et al*, 1996). Despite this, we decided to evaluate the model after 6 hours of treatment and its effect on % DH and on the sensory properties. To determine the most adequate conditions and to analyze the process, the response surface was plotted using Eq. (3) (Figure 2). The lack of effect of temperature could be explained by a non-uniform heat distribution and/or to the narrow range of temperatures studied. As the temperature had no influence on % DH, it was decided to use the lower temperature condition of 30 °C. For [E/S] it was decided to use the central point value, since near this point a higher % DH was obtained.

An experiment was performed under the fixed condition ($T=30$, $[E/S]=682.5$) and a control sample with water. The results are shown in Table 4. The % DH obtained in this latter experiment was lower than the values observed previously and predicted by the model, but it was higher than the control. An increase in % DH in the control could be explained by the action of endogenous enzymes (Hansen *et al*, 1998) which found more suitable conditions during the experiment. After roasting, the enzyme treated sample presented a greater consumption of hydrolysis products as compared to the control. These results indicate that the

products formed during enzymatic hydrolysis were consumed to a greater extent during roasting, probably due to their participation in the Maillard reaction.

In Figure 3 (a and b), the results obtained in a sensory evaluation of the products formulated with the enzyme treated cocoa and with the control can be observed. For chocolate flavour and bitter taste, the treated sample presented a distribution more dislocated to the right than the control, which indicates a stronger perception of the attributes. It has been found that exogenous enzymes acting on cocoa globulin in-vitro will produce cocoa flavour after roasting the proteolysis products with reducing sugars (Voigt *et al*, 1994; 1994a). The results in this work indicated that the chocolate flavour was intensified by protein hydrolysis in cocoa nibs and also emphasizes the need for good fermentation, since during this process a natural proteolysis occurs.

The use of a proteolytic enzyme is useful to improve cocoa flavour precursors and positively affects product acceptance. The difficulty to establish a model could be suppressed by changing the process in such a way as to enhance the access of enzyme to the substrate and by a better heat transfer.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by CNPq and FAPESP.

REFERENCES

1. Abeygunasekera, D.D.; Jansz, E.R. Effect of the maturation process on fermented cocoa beans I: Free amino acids and volatile carbonyls. *Journal National Science Council Sri Lanka*. **17**: 23-33 (1989).
2. Adler-Nissen, J. Enzyme Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London. (1986).
3. AOAC. Cacao bean and its products. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International* (edited by P. Cunniff). 16th ed. (1997).

4. Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 2ª ed. Editora da Unicamp. Campinas. 299p. (1996).
5. Bombara, N., Pilosof, A. M. R., Anón, M. C. Kinetics of wheat proteins solubilization with a fungal protease. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*. **25**: 527-531. (1992).
6. Church, F. C., Porter, D. H., Catignani, G. L. & Swaisgood, H. E. An o-phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry*. **146**: 343-348. (1985).
7. Fernández Barbery, S.D. Estudo do melhoramento do sabor de cacau (theobroma cacao L.) utilizando polifenoloxidase extraída da pinha (Annona squamosa L.) e tratamento térmico não convencional. Dissertação Mestrado. UNICAMP, Campinas, Brasil. 76p. (1999).
8. Hansen, C. E.; Olmo, M.; Burri, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal Science Food Agriculture*. **77**: 273-281. (1998).
9. Lerceteau E, Rogers J, Pétiard V and Crouzillat D, Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. *Journal Science Food Agriculture* **79**: 619-625 (1999)
10. Meilgaard, M., Civille, G. V. & Carr, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press, Boca Raton. (1987).
11. Mohr, W.; Landschreiber, E.; Severin, T. Zur spezifität des kakaoaromas. *Fette Seifen Anstrichmittel*. **78**: 88-95. (1976).
12. Murthy, M. V. R., Padmanabhan, S., Ramakrishna, M. & Lonsane, B. K. Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method. *Food Biotechnology*. **11**: 1-23. (1997).
13. Reineccius, G.A.; Andersen, D.A.; Kavanagh, T.E.; Keeney, P.G. Identification and quantification of free sugars in cocoa beans. *Journal Agriculture Food Chemistry*. **20**: 199-202. (1972).
14. Seiki, K. Chemical changes during cocoa bean fermentation using the tray method in Nigeria. *International Chocolate Review*. **28**: 38-42. (1973).

15. Voigt, J.; Biehl, B.; Heinrichs, H.; Kamaruddin, S.; Marsoner, G.C.; Hugi, A. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxipeptidase. *Food Chemistry*. **49**: 173-80. (1994).
16. Voigt, J.; Heinrichs, H.; Voigt, G.; Biehl, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry*. **50**:177-84. (1994a).
17. Yoshiyama, M.; Ito, Y. Decrease of astringency of cacao beans by an enzymatic treatment. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*. **43**: 124-129. (1996).

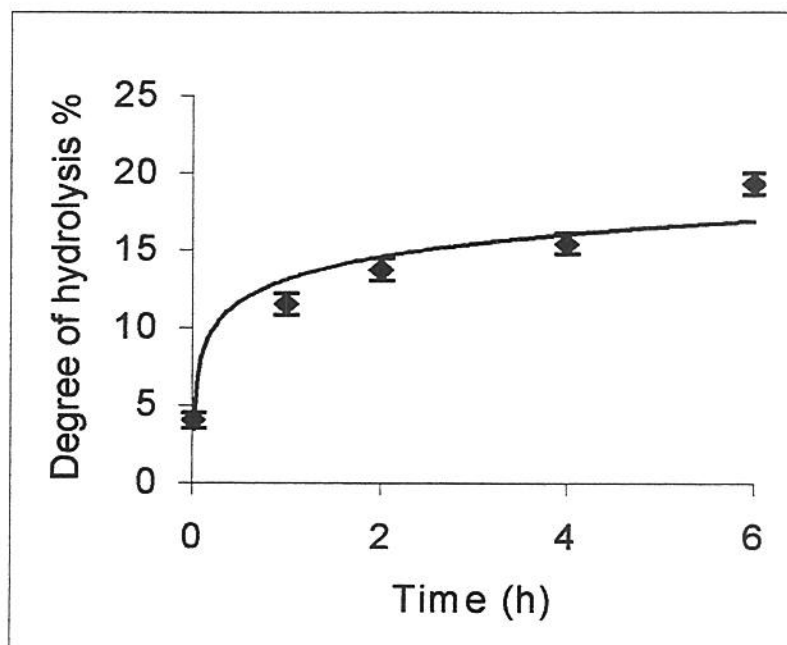


Figure 1- Dynamics of protein hydrolysis with time. Test was performed under fixed conditions ($[E/S]=682.5$ at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Values are means of three replicates $\pm$ SD.

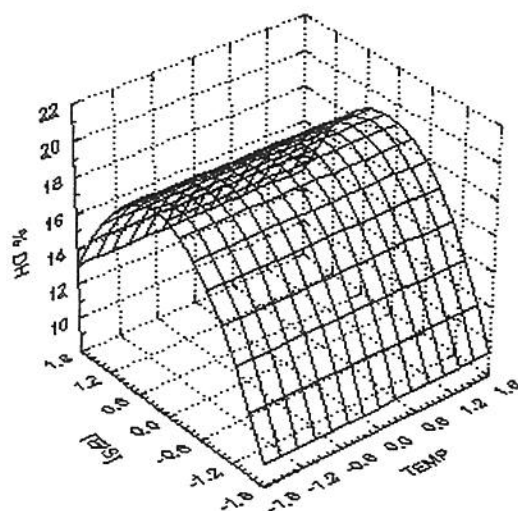


Figure 2 – Response surface diagram of % DH at 6 hours as a function of $[E/S]$ and temperature.

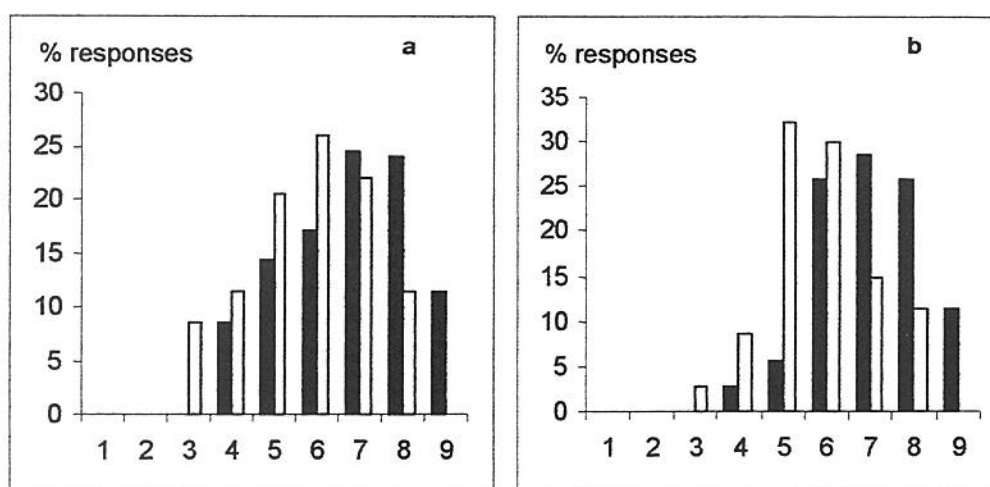


Figure 3 - Percentage of responses for chocolate flavour (a) and bitter taste (b) for cocoa products formulated with enzyme treated cocoa (■) and control (□) (1=much too weak, 5=just right, 9=much too strong).

Table 1 - Variables and their levels for CCRD.

Variables	Symbol	Levels				
		- α	-1	0	+1	+ α
Temperature (°C)	X_1	30.0	35.9	50.0	64.1	70.0
[E/S] (U g ⁻¹)	X_2	97.5	269.1	682.5	1095.9	1267.5

Table 2 - Conditions and results for percentage degree of protein hydrolysis (% DH) at 4 and 6 hours according to the central composite rotatable design.

Treatment N°	X_1	X_2	Responses (% DH)	
			4 h	6 h
1	+1	+1	16.29	18.61
2	-1	+1	18.06	18.65
3	+1	-1	16.02	16.84
4	-1	-1	11.97	15.04
5	$+\alpha$	0	14.74	15.92
6	$-\alpha$	0	14.49	20.04
7	0	$+\alpha$	18.00	14.56
8	0	$-\alpha$	16.17	12.44
9	0	0	15.88	18.65
10	0	0	15.82	19.36
11	0	0	14.65	19.66

Table 3 - Analysis of variance of % DH after 4 or 6 hours of treatment ^a.

Source of variation	Sum of squares		Mean square		Degree of freedom		F-value	
	4 h	6 h	4 h	6 h	4 h	6 h	4 h	6 h
Regression	18.84	44.57	9.24	22.29	2	2	7.1	10.9
Residual	10.47	16.44	1.3	2.05	8	8		
Total	28.95	61.01			10	10		
Correlation coefficient	0.638	0.730						

^a $F_{0.90;2;8} = 9.37$

Table 4 - Degree of hydrolysis as predicted by the model and for cocoa samples treated with water and enzyme for 6 hours, before and after roasting.

Sample	Degree of hydrolysis (%)
Observed ^a	20.0
Predicted by the model	19.0
Control ^b	17.4
Control roasted	13.7
Enzyme treated	18.1
Enzyme treated roasted	12.2

a – experiment 6, Table 2

b – treated with water

Effect of polyphenol oxidase (PPO) and air treatments on the total phenol and tannin contents of cocoa nibs

Phenol and tannin reduction in cocoa

Edy Sousa de Brito, Nelson Horacio Pezoa García* and Allan César Amâncio

Department of Food Technology, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

correspondent author: Fax: 55 19 289-3617

e-mail: nelson@fea.unicamp.br

Abstract: Cocoa flavour is greatly influenced by polyphenols, which contribute to the bitter taste and astringency and also complex with amino acids, peptides and proteins. These compounds suffer a series of transformations during cocoa processing, such as oxidation and polymerization, leading to the characteristic cocoa flavour. The use of exogenous Polyphenol Oxidase (PPO) has been proved to be useful in the reduction of the polyphenol content in cocoa nibs. In this work the effect of PPO, associated or not with air, on the total phenol and tannin contents, was evaluated. Cocoa nibs were autoclaved and treated with PPO or water in the presence or not of an air flow for 0.5, 1, 2 and 3 hours. The total phenol content in the PPO and water treated samples decreased after 0.5 h, but returned to the initial values at the end of the process for the water treated sample, although remaining unchanged for the PPO treated sample. For the air treated samples, there was an increase after 0.5 h and a reduction to initial values after 3 h. The tannin content was only reduced by the treatment with water and air. These findings could be useful in reducing cocoa astringency.

Keywords: cocoa, processing, PPO, enzyme, air

Introduction

During cocoa fermentation the phenolic compounds, originally compacted into vacuoles of specific cells, are released and diffuse throughout the cotyledon (Knapp, 1924). The phenols are oxidized and the resulting compounds complex reversibly, with proteins by hydrogen bonds or irreversibly, by condensation with reactive groups of amino acids, peptides, proteins and polysaccharides. These reactions are important in the development of cocoa flavour (Bartolomé *et al* 1995; Motoda, 1979). The total phenols in cocoa are reduced during fermentation to 30 % of the initial value and (-)-epicatechin, the principal substrate of cocoa polyphenol oxidase (PPO), is reduced by 90 %, with a proportional increase in the catechin content (Cros *et al*, 1982; Porter *et al*, 1991; Villeneuve *et al* 1989). Polyphenol reduction during drying was attributed to

enzymatic browning followed by non-enzymatic browning from quinone polymerization. The PPO would not have appropriate conditions to act during fermentation, but during drying, with higher pH and O₂ values, the conditions become appropriate for phenolic oxidation (Forsyth & Quesnel, 1963). However, the reduction of the phenolic compounds could not be explained only by enzymatic oxidation, since on the fifth day of fermentation, the PPO activity was reduced from 5 to 13 % of the initial value with complete or strong inactivation (Villeneuve *et al*, 1985; Reeves *et al*, 1988; Hansen *et al*, 1998).

The total phenolic content of cocoa is from 12 to 18 % of the defatted, dry weight. The principal compounds are (+)-catechin, (-)-epicatechin and 60% of proanthocyanidins, of which half are dimers. Other compounds identified are quercetin, quercetrin and *p*-coumaric, caffeic and chlorogenic acids (Porter *et al*, 1991; Rigaud *et al*, 1993).

Polyphenol reduction in cocoa nibs by enzymic treatment has been successfully applied, obtaining a reduction in the polyphenol content of nearly 25 % (Yoshiyama & Ito, 1996; Fernández Barbery, 1999). These authors found a greater polyphenol reduction when the nibs were autoclaved, which facilitates enzyme penetration into the tissues and enzyme action. Fernández Barbery (1999), also demonstrated that the bitter taste and astringency were reduced by the action of polyphenol oxidase, which contributed to a better acceptance of the cocoa products. The use of polyphenol oxidase in cocoa processing was also suggested, since these enzymes were involved in aldehyde formation from amino acids (Motoda, 1979).

In this work we studied the effect of polyphenol oxidase and air treatments on the total phenol and tannin contents of cocoa nibs.

Material and Methods

Fermented and dried "Forastero" cocoa beans were supplied by INDECA S.A. (Embú-SP, Brasil). A cut-test was performed to assay the bean characteristics after which they were broken into nibs (3 - 6 mm) prior to treatment.

Polyphenol oxidase (E.C. 1.14.18.1) from mushroom (Sigma, St Louis, MI) with 5,350 U mg⁻¹ was used at a final concentration of 200 U mL⁻¹. Forty millilitres of the aqueous enzyme solution were added to 80 g of autoclaved cocoa nibs (121 °C for 15 min). The sample was submitted to vacuum (200 mmHg) in a desiccator for 1 min to facilitate the penetration of the enzyme solution.

To evaluate the effect of air on the enzyme action, the sample was placed in a glass column. The height of the packed sample was 10 cm and the internal diameter was 3 cm. An air flow of 250 L h⁻¹ was passed through the column. To verify the effect of air by itself, an experiment was done with water instead of the enzyme solution. Control experiments were conducted without air by placing the samples with enzyme or water in beakers.

The experiments were conducted at room temperature and aliquots were taken after 0, 0.5, 1, 2 and 3 hours of treatment. The samples were dried at 65 °C, defatted with petroleum ether and stored at -18 °C until analysis.

Analysis

Total Phenols

Total phenols were determined by the Prussian Blue assay as follows: 50 mg of defatted sample were extracted twice with 5 mL of acetone : water (7:3, v/v) at 4 °C, centrifuged for 10 min at 4100 g and the supernatants combined. An aliquot of 0.1 mL was added to 50 mL of distilled water followed by the addition of 3.0 mL of 0.10 M FeNH₄(SO₄)₂ in 0.10M HCl. After, exactly, 20 min 0.008M K₃Fe(CN)₆ was added. After 20 min the absorbancy was read at 720 nm (Price & Butler, 1977). A standard curve was prepared with tannic acid and the results expressed as mg phenols g⁻¹ sample.

Tannins

Fifty milligrams of defatted sample were extracted three times (3, 3 and 4 mL) with methanol : water (1:1, v/v) and centrifuged for 5 min at 4100 g and the supernatants combined. To an aliquot of 1 mL, 2 mL of BSA (bovine serum albumin, Type 5; 1mg mL⁻¹ in 0.20 M CH₃COOH : 0.17M NaCl buffer, pH 4,9) were

added. The sample was immediately mixed and maintained at 4 °C for 24 hours to precipitate tannins. After centrifugation at 4100 g for 15 min, the supernatant was discarded and the precipitate dissolved in 4 mL SDS : TEA (10 g L⁻¹ SDS and 50 mL L⁻¹ triethanolamine). 1 mL of 0.01 M FeCl₃ in 0.01 M HCl was then added and mixed well, and the absorbancy read at 510nm after 15 min (Hagerman & Butler, 1978). A standard curve was prepared with tannic acid and the results expressed as mg tannic acid g⁻¹ sample.

Statistics

The treatments were performed three times and each sample analysed three times. The results were compared by an analysis of variance using the software package Statistica (Tulsa, OK, USA). Significant differences amongst means were confirmed, using the Tukey test for multiple comparisons at $P < 0.05$.

Results and Discussion

The cut test revealed a great proportion (25/100) of violet beans, which indicated under fermentation. The total phenol content was 7.9 ± 0.4 mg g⁻¹ and the tannin content was 2.6 ± 0.6 mg g⁻¹. The results for total phenols and tannin are shown in Table 1 and 2, respectively. The total phenol content in the sample treated with water and air showed no significant change during the process, but the tannin content presented a significant decrease. In the sample treated with water the total phenol content was reduced after 0.5 h and returned gradually to the initial values, but the tannin content after an initial increase up to 1 hour, remained unchanged. For the sample treated with enzyme and air, there was a great increase in total phenols at the beginning of the process up to 0.5 h, followed by a decrease to the initial values. The same could be observed for the tannin content. On the other hand, the enzyme treated sample without air, showed a small decrease in total phenol content at the beginning of the process and this value remained unchanged for 3 hours. The tannin content was the same as the sample treated with enzyme and air. Figure 1 shows the percentage contribution of tannin

to the total phenol. The samples treated with air had a lower tannin percentage, which indicates that air had a positive effect on the reduction of tannin, especially in the sample treated with water and air.

A simple explanation of these transformations is difficult, since PPO promotes *o*-hydroxylation of monophenols and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinones. The *o*-quinones also take part in secondary reactions with compounds like anthocyanins and many other phenolic compounds, which reduce *o*-quinones to diphenol, or can condense with phenolic compounds (Wong, 1989).

The polyphenol oxidase from mushroom reduced the total phenol content in cocoa nibs by 20 %, which was lower than that obtained by the PPO of *Coriolus versicolor* for the same treatment time (Yoshiyama & Yto, 1996) and of *Anona squamosa* after 6 hours of treatment (Fernández Barbery, 1999), both presenting a 25 % reduction. The tannin content was not reduced by mushroom PPO, whereas it was reduced by PPO from other sources (Yoshiyama & Yto, 1996; Fernández Barbery, 1999). This could be explained by different experimental conditions and / or different specificity of the enzyme studied.

Despite the use of PPO, the tannin content was significantly reduced by air application. These findings could help in cocoa flavour improvement by reducing astringency of insufficiently fermented beans. Further studies will be needed to understand the specific transformations of phenolic compounds during the air processing of cocoa.

References

1. Bartolomé B, Jiménez-Ramsey LM, & Butler LG. Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. *Food Chemistry*, **53**: 357-362. (1995).
2. Cros, E., Villeneuve, F., & Vincent, J.-C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao I: Evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. *Café, Cacao, Thé*, **26**: 109-114. (1982).

3. Fernández Barbery, S.D. Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) utilizando polifenoloxidase extraída da pinha (*Annona squamosa* L.) e tratamento térmico não convencional. Dissertação Mestrado. UNICAMP, Campinas, Brasil. (1999).
4. Forsyth, W.G.C., & Quesnel, V.C. *Advances Enzymology*, **25**, 457 (1963).
Apud Biehl, B. *et al*, Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. *Journal Science Food Agriculture*, **28**: 41-52 (1977).
5. Hagerman, A.E., & Butler, L.G. Protein Precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal Agriculture Food Chemistry*. **26**: 809-812. (1978).
6. Hansen, C. E., Olmo, M., & Burri, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal Science Food Agriculture*, **77**: 273-281. (1998).
7. Knapp, A.W. The fermentation of cacao. *J. Soc. Chem. Ind.* **43**: 402. (1924).
Apud Roelofsen, P.A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. *Advances Food Research*, **8**: 225-296. (1958).
8. Motoda, S. Formation of Aldehydes from amino acids by polyphenol oxidase. *Journal Fermentation Technology*, **57**: 395-399. (1979).
9. Porter, L.J., Ma, Z., & Chan, B.G. Cacao procyanidins: Major flavanoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, **30**: 1657-1663. (1991).
10. Price, M.L., & Butler, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal Agriculture Food Chemistry*, **25**: 1268-1273. (1977).
11. Reeves, S.G., McDowell, I., Behn, K., & Dench, J. Biochemical studies of cocoa bean o-diphenol O₂ oxidoreductase (catechol oxidase). *Food Chemistry*, **29**: 209-219. (1988).
12. Rigaud, J., Escribano-Bailon, M.T., Prieur, C., Souquet, J.M., & Cheynier, V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *Journal Chromatography A*, **654**: 255-260. (1993).

13. Villeneuve, F., Cros, E., Macheix, J.J. Effet de la fermentation sur les activités peroxidasiques et polyphénoloxidasiques de la fève de cacao. *Café, Cacao, Thé*, **29**: 113-20. (1985).
14. Villeneuve, F., Cros, E., Vincent, J.C., & Macheix, J.J. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. III Evolution des flavan-3-ols de la fève. *Café, Cacao, Thé*, **33**: 165-70. (1989).
15. Wong, D.W.S. *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. New York: AVI. (1989).
16. Yoshiyama, M., & Ito, Y. Decrease of astringency of cacao beans by an enzymatic treatment. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, **43**: 124-129. (1996).

Table 1 - Total Phenol content (mg tannic acid g⁻¹ sample) in cocoa nibs after treatment with PPO and air.

Time (h)	Sample			
	PPO + Air	PPO	H ₂ O + Air	H ₂ O
0.5	10.4 ± 0.7 a, A	6.8 ± 0.2 a, B	8.4 ± 0.6 a, C	5.9 ± 0.1 a, D
1	8.6 ± 0.4 b, A	6.4 ± 0.5 a, B	8.5 ± 0.9 a, A	6.4 ± 0.8 a, B
2	8.2 ± 0.1 b, A	6.3 ± 0.5 a, B	8.8 ± 0.9 a, A	6.4 ± 0.1 a, B
3	7.9 ± 0.2 b, A	6.5 ± 0.6 a, B	7.9 ± 0.6 a, A	7.3 ± 0.1 b, A

Values are means ± S.D. Means within the same treatment followed by the same lower case letters are not significantly different at $p < 0.05$. Means for the same time followed by the same upper case capital letters are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 2 - Tannin content (mg tannic acid g⁻¹ sample) in cocoa nibs after treatment with PPO and air.

Time (h)	Sample			
	PPO + Air	PPO	H ₂ O + Air	H ₂ O
0.5	3.5 ± 0.6 a, A	3.6 ± 0.4 a, A	2.9 ± 0.6 a, A	2.9 ± 0.5 a, A
1	3.1 ± 0.6 a, A	3.1 ± 0.2 a,b, A	3.1 ± 0.2 a, A	3.3 ± 0.2 a, A
2	2.7 ± 0.1 a, A	2.7 ± 0.1 b, A	2.1 ± 0.1 b, B	3.3 ± 0.2 a, C
3	2.2 ± 0.3 b, A	2.5 ± 0.3 b, A	1.7 ± 0.1 c, B	3.3 ± 0.1 a, C

Values are means ± S.D. Means within the same treatment followed by the same lower case letters are not significantly different at $p < 0.05$. Means for the same time followed by the same upper case capital letters are not significantly different at $p < 0.05$.

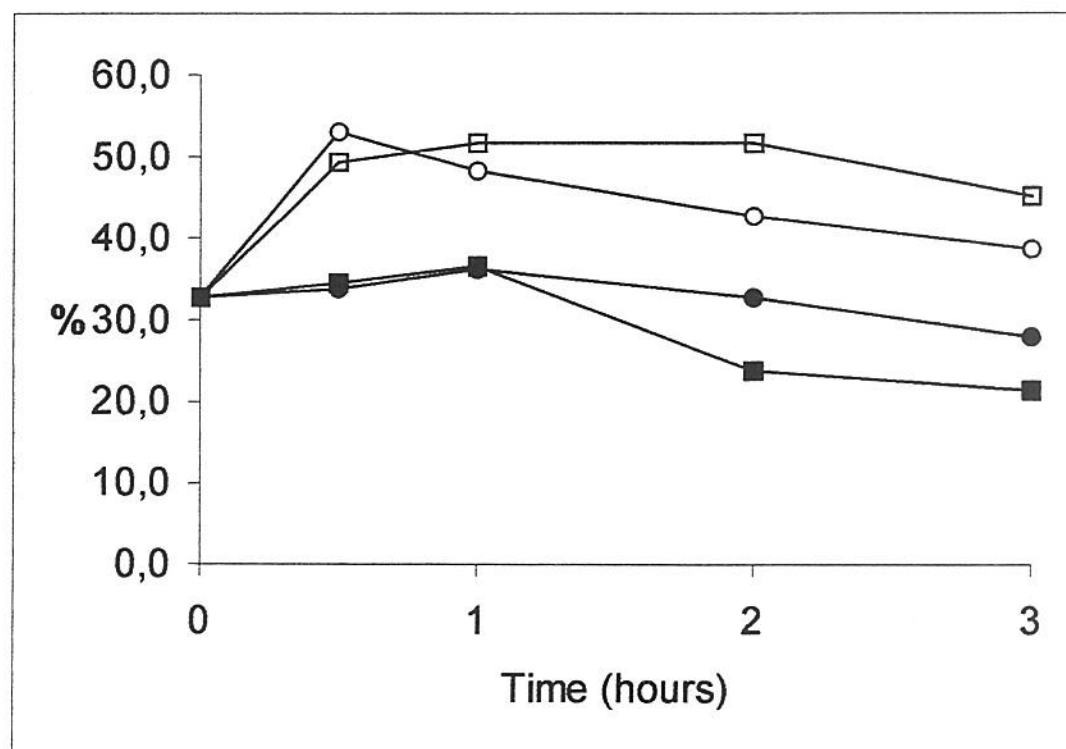


Figure 1 - Tannin percentage in relation to total phenol content in cocoa nibs treated with PPO + air (●), PPO (○), H₂O + air (■) and H₂O (□).

The Influence of Polyphenoloxidase on the Decrease in Phenolic Components in Cocoa.

S.D. Fernandez Barbery, N.H. Pezoa García, E.S. de Brito, E.D.A. Lima, and G.M. Pastore

S.D. Fernandez Barbery, N.H. Pezoa García, E.S. de Brito are affiliated with:
Department of Food Technology, Faculty of Food Engineering, State University of
Campinas (UNICAMP), PO Box 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

E.D.A. Lima, and G.M. Pastore are affiliated with:
Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of
Campinas (UNICAMP)

Corresponding author:

Nelson Horacio Pezoa García

Department of Food Technology, Faculty of Food Engineering, State University of
Campinas (UNICAMP), PO Box 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Email: nelson@fea.unicamp.br

Fax 55 019 289 3617

Decrease of phenolics in cocoa by PPO

Abstract: Mildly fermented cocoa beans show a higher polyphenolic substance content than that of well fermented beans. Therefore the reduction of polyphenolic substances was studied using polyphenoloxidase (PPO). Autoclaved (121 °C for 15 min) and non-autoclaved nibs of mildly fermented and dried cocoa beans were soaked in a solution of the enzyme containing 200 U/min/mL for 30-360 min at 23 °C. After the enzymatic treatment the total phenol, tannin, anthocyanidin and flavan-3-ols content in non-autoclaved nibs dropped 15, 15, 18 and 10%, respectively. For autoclaved nibs the reduction was of 24, 26, 51 and 23%. PPO treatment had a positive effect on sensory acceptance of a bitter-sweet chocolate.

Key words: cocoa, flavor, polyphenoloxidase, processing, enzyme

INTRODUCTION

Fresh cocoa seeds have a high anthocyanidin concentration, these being purple pigments, which were hydrolyzed during the fermentation process, due to the action of glycosidases, resulting in the loss of the purple color of the cotyledon (Forsyth and Quesnel 1957). Throughout the whole fermentation process, the free anthocyanidins are oxidized by the action of polyphenoloxidase (PPO) producing quinones. These quinones can complex with proteins and amino acids and later polymerize with other flavonoids forming tannin compounds. A consequence of cocoa polyphenols oxidation and quinone polymerization is the decrease in astringency (Cros and Jeanjean 1995). According to Cros and others (1982) there is a decrease of about 70% in the polyphenolic content in beans fermented in boxes for 8 days, as compared to unfermented seeds and tannins exhibited a decrease beginning after the third day of fermentation.

In well fermented cocoa beans high-molecular-weight tannins complex with proteins through hydrogen bonding resulting in water insoluble brown-colored pigments, owning the characteristic chocolate color (Hansen and others 1988). A

purple color is characteristic of a mildly fermented product with high polyphenolic compounds content, which is related to a weak chocolate flavor (Rohan 1958; Lopez and McDonald 1981). Flavor is also influenced by the drying process since biochemical reactions continue through this phase due to phenol oxidation and polymerization (Martin 1987).

The PPO action during cocoa bean fermentation and drying is one of the factors responsible for the development of flavor, but their role and importance is still not completely understood. Low enzymatic activity or suitable conditions which lead to a reduction in PPO activity have been mentioned as the factors affecting cocoa flavor especially in astringency reduction (Reeves and others 1988).

Polyphenol reduction in cocoa nibs by PPO treatment was successfully applied. It was obtained a reduction in polyphenol contents by nearly 25 % (Yoshiyama and Ito 1996). These authors found a greater polyphenol reduction when nibs were autoclaved and treated with microbial PPO. The use of PPO in cocoa processing was also suggested, since these enzymes were involved in aldehydes formation from amino acids (Motoda 1979). Our objective was to study the phenolics reduction in cocoa beans by a partially purified PPO from custard apple. We also evaluated the effect of PPO treatment on bitter taste and astringency, which can contribute to a better acceptance of the cocoa products.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

Fermented and dried cocoa bean samples from Bahia, Brazil, Forastero variety, were used as the raw material. The beans were broken into nibs (3 - 6 mm) prior to treatment. Partially purified custard apple (*Annona squamosa* L) PPO obtained as described by Lima and Pastore (1997) was used. The PPO treatment was performed on nibs autoclaved at 121 °C for 15 min and also on non-autoclaved nibs. For this purpose, 50 g of nibs were soaked in an aqueous enzyme solution containing 200 U/ml/min, for 30, 60, 90, 150, 210 and 360 min, at

23 °C. Treatments were performed three times. For sensory studies a control was prepared with water instead of an enzyme solution.

Total phenol determination

Total phenols were determined by the Prussian Blue assay as follows. 50 mg of defatted sample was extracted twice with 5 mL of acetone : water (7:3, v/v) at 4 °C, centrifuged for 10 min at 4100 g and the supernatants combined. An aliquot of 0.1 mL was added to 50 mL of distilled water followed by the addition of 3.0 mL of 0.10 M $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ in 0.10M HCl. After exactly 20 min, 0.008M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ was added and after 20 min the absorbance was read at 720 nm (Price and Butler 1977). A standard curve was prepared using tannic acid and the results expressed as mg phenols/g sample.

Tannin determination

50 mg of defatted sample were extracted three times (3, 3 and 4 mL) with methanol : water (1:1, v/v), centrifuged for 5 min at 4100 g and the supernatants combined. An aliquot of 1 mL was added to 2 mL of BSA solution (bovine serum albumin, Type 5; 1mg/mL in 0.20 M CH_3COOH : 0.17M NaCl buffer, pH 4.9). The sample was immediately mixed and maintained at 4 °C for 24 hours to precipitate the tannins. After centrifugation at 4100 g for 15 min, the supernatant was discarded and the precipitate dissolved in 4 mL SDS : TEA (10 g/L SDS and 50 mL/L triethanolamine) 1 mL of 0.01 M FeCl_3 in 0.01 M HCl was then added and mixed well, and the absorbance read at 510nm after 15 min (Hagerman and Butler 1978). A standard curve was prepared using tannic acid and the results expressed as mg tannic acid/g sample.

Flavan-3-ols determination

This determination was conducted following the methodology described by Maillard and others (1996), with some modifications. The sample (0.025 g) were extracted four times with 10 mL of MeOH for 10 min. The extracts were combined

and filtered. The filtrate was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 5 mL water and 5 mL ammonium sulfate (400g/L), this mixture being acidified to pH 3 with metaphosphoric acid (200 g/mL). It was then extracted with ethyl acetate, the solvent evaporated off and the residue dissolved in 15 mL of MeOH. The absorbancy was read at 280 nm. Quantification was effected using a standard curve prepared with different concentrations of (+)-catechin.

Anthocyanidin determination

This determination was carried out following the methodology of Oszmianski and Sapis (1988), with modifications. 0.05 g of dried defatted powder was extracted four times with 2.5 mL of 1.5 N HCl-absolute ethanol (85:15, v/v) for 3 min and centrifuged for 5 min at 3400 g. The total supernatants (10 mL) were collected in a flask and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 5 mL ethanol and the absorbancy read at 535 and 460 nm. The results were expressed in absorbancy units.

Sensory evaluation.

The autoclaved and PPO treated sample and a control prepared with water were roasted for 35 min at 150 °C. The roasted nibs were milled in a cooled drum mill. The mass obtained was mixed with sugar (65:35, w/w), conched and tempered. The bitter chocolate was cooled and cut into pieces (10 g weight) for sensory evaluation. A difference from the control test was carried out using a non-treated sample as the control. Enzymatically treated and non-treated samples were presented to the judges (N=15) familiarized with cocoa flavor, who were asked to indicate, on a 9-point scale (0 = no difference, up to 8 = extremely different), the extent to which the samples differed from the control (Meilgaard and others 1987). After that a preference test was performed. The judges (N=35) were asked to indicate, on a 9-point scale (0= dislike very much, up to 8 = like very much), how they felt about the samples (Meilgaard and others 1987).

Statistical analysis

The treatments were performed three times and each sample was analysed three times. The results were compared by an analysis of variance using the software package Statistica (Tulsa, OK, USA). Significant differences amongst the means were confirmed using the Tukey test for multiple comparisons at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

It can be roughly observed that total phenol, tannin, flavan-3-ols and anthocyanidin concentrations were significantly reduced by PPO action. However, no significant difference was shown in the results up to 210 min treatment of the autoclaved nibs.

Table 1 shows the results of the total phenol determination of both autoclaved and non-autoclaved cocoa nibs. Total phenol reduction as a result of the enzymatic treatment of non-autoclaved (ENA) nibs reached 15 % after 210 min, whereas with autoclaved nibs (EA) this loss reached 24 %. These results are in agreement with Yoshiyama and Ito (1996) who obtained a 25 % reduction with a fungal PPO.

Table 2 shows the results of the tannin determination of the enzymatically treated autoclaved and non-autoclaved nibs. It can be observed that the tannin reduction after 210 min treatment reached 15 % in the ENA and 26 % in EA.

In Table 3 the results of the flavan-3-ol determination of the enzymatically treated autoclaved and non-autoclaved nibs, show that the loss after 210min of treatment reached 10% in the ENA and 23% in the EA. In this case, autoclaving, as for all other phenolics, had a positive influence with respect to the enzyme action, significantly reducing phenolic compounds. The results in Table 3 differ from those presented by Yoshiyama and Ito (1996), the differences being attributable to the process conditions and even to the origin of the PPO used.

In Table 4 the results of the anthocyanidin determination from enzymatically treated autoclaved and non-autoclaved nibs can be observed. Once more the polyphenolic compound reduction in EA was higher as compared with the

reduction in ENA. Nevertheless, the reduction of polyphenolic compounds was significant in both treatments. Anthocyanidin reduction after 210 min reached 18 % in ENA and 51 % in EA. Yoshiyama and Ito (1996) also observed a similar behavior.

Besides polyphenolic compound reduction, it was observed that after the enzymatic treatment, cocoa nibs underwent a notorious color change (browning) throughout the whole reaction process.

A difference from the control test was used to verify a possible influence of the enzymatic treatment on the sensory properties of the samples. In Figure 1 we can see the distribution of the responses. Analysis of variance of the sensory evaluation indicated a significant difference ($P < 0.05$) between samples, so an acceptance test was performed. In the acceptance test the enzymatically treated sample presented better flavor as compared to the non-treated sample, with means of 6.97 and 5.11, respectively, which were statistically different at the 5% level. The distribution of the responses are shown in Figure 2. This indicates that the enzymatic treatment influenced cocoa flavor.

Figure 2 shows the responses related to cocoa taste. The enzymatically treated sample received a greater number of scores from 6 to 9, which indicates a very good acceptance by the judges. Observations made by panelists indicated that the enzymatically treated cocoa had a prominent and characteristic chocolate flavor, with a less aggressive taste.

CONCLUSIONS

A significant reduction of the phenolic compounds present in mildly fermented cocoa can be achieved by the use of the enzyme PPO, being the action more effective in autoclaved nibs. A significant reduction of the anthocyanidin content in autoclaved, enzymatically treated nibs was observed, and consequently the characteristic purple color diminished resulting in the brown color of a well fermented cocoa. The enzymatic treatment also had a positive effect on cocoa flavor.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the financial support of FAPESP, CNPq, FAEP.

REFERENCES

1. Cros E, Jeanjean CE. 1995. Qualité du cacao, influence de la fermentation et du séchage. *Plantations, Recherche, Developpement*. 2(3): 21-25.
2. Cros E, Villeneuve F, Vincent JC. 1982. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. *Café Cacao Thé* 16: 109-113.
3. Forsyth WGC, Quesnel VC. 1957. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *J Sci Food Agric* 8: 505-509.
4. Hagerman AE, Butler LG. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J Agric Food Chem* 26: 809-813.
5. Hansen CE, Del Olmo M, Burri C. 1988. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. *J Sci Food Agric* 77: 273-281.
6. Lima EDPA, Pastore GM. 1997. Purificação parcial e caracterização bioquímica da enzima polifenoloxidase (PPO) em fruto da família anonácea-pinha (*Annona squamosa* L). II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Campinas, SP.
7. Lopez AS, McDonald CR. 1981. A definition of descriptors to be used for the qualification of chocolate flavors in organoleptic testing. *Rev Theobroma* 11: 209-217.
8. Maillard MN, Soum MH, Boivin P, Berset C. 1996. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *Lebensm Wis Technol* 29: 238-244.
9. Martin RA. 1987. *Chocolate*. *Adv Food Res* 31:211-342.
10. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. 1987. *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton: CRC Press.

11. Motoda S. 1979. Formation of aldehydes from amino acids by polyphenol oxidase. J Ferment Tech 57(5):395-399.
12. Oszmianski J, Sapis JC. 1988. Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry). J Food Sci 53(4):1241-1242.
13. Price ML, Butler LG. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. J Agric Food Chem 25:1268-1273.
14. Reeves SG, McDowell I, Behn K, Dench J. 1988. Biochemical Studies of Cocoa Bean o-diphenol O₂ Oxidoreductase (catechol oxidase). Food Chem 29: 209-219.
15. Rohan TA. 1958. Processing of raw cocoa. I small-scale fermentation. J Sci Food Agric 9:104-111.
16. Wong MK, Dimick OS, Hammerstedt RH. 1990. Extraction and high performance liquid chromatographic enrichment of polyphenol oxidase from *Theobroma cacao* seeds. J Food Sci 55(4):1108-1111.
17. Yoshiyama M, Ito Y. 1996. Decrease of astringency of cacao beans by an enzymatic treatment. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 43(2): 124-129.

Table 1 - Total phenol concentration (mg g⁻¹) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase

Enzymatic Treatment (min)	Non-autoclaved	Autoclaved
0	264.5±0.5 ^a	252.8±0.5 ^a
30	257.5±0.4 ^a	249.4±0.4 ^a
60	245.4±0.3 ^b	241.7±0.4 ^a
90	232.1±0.5 ^c	236.6±0.3 ^{ab}
150	225.8±0.3 ^c	210.7±0.4 ^{bc}
210	223.4±0.3 ^c	198.7±0.4 ^c
360	208.0±0.4 ^d	202.4±0.3 ^c

^{a-d} Values within a column with no common superscript differ (p<0.05).

Table 2 - Tannin concentration (mg g⁻¹) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase

Enzymatic treatment (min)	Non-autoclaved	Autoclaved
No enzyme	78.1±0.2 ^a	72.6±0.1 ^a
30	78.5±0.2 ^a	70.8±0.2 ^a
60	78.3±0.1 ^a	64.7±0.2 ^{ab}
90	74.7±0.2 ^{ab}	62.3±0.1 ^{bc}
150	66.4±0.2 ^{bc}	60.8±0.1 ^{bcd}
210	65.9±0.1 ^{bc}	57.1±0.2 ^{cd}
360	62.3±0.2 ^c	53.9±0.1 ^d

^{a-d} Values within a column with no common superscript differ (p<0.05).

Table 3 - Flavan-3-ols concentration (mg g^{-1}) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase.

Enzymatic Treatment (min)	Non-autoclaved	Autoclaved
No enzyme	231.6 $\pm$ 0.3 ^a	232.8 $\pm$ 0.4 ^a
30	231.0 $\pm$ 0.3 ^a	197.1 $\pm$ 0.3 ^a
150	224.7 $\pm$ 0.3 ^a	205.9 $\pm$ 0.3 ^a
210	208.0 $\pm$ 0.4 ^a	177.5 $\pm$ 0.4 ^a
360	183.9 $\pm$ 0.2 ^a	160.2 $\pm$ 0.2 ^a

^a Values within a column with no common superscript differ ($p < 0.05$).

Table 4 - Anthocyanidin expressed as absorbance (535nm/462nm, $\lambda A/\lambda B$) in cocoa powder treated with polyphenoloxidase.

Enzymatic Treatment (min)	Non-autoclaved	Autoclaved
No enzyme	2.120 $\pm$ 0.1 ^a	1.830 $\pm$ 0.1 ^a
30	1.884 $\pm$ 0.1 ^a	1.619 $\pm$ 0.2 ^a
60	1.874 $\pm$ 0.1 ^a	1.481 $\pm$ 0.1 ^{ab}
90	1.734 $\pm$ 0.2 ^b	1.407 $\pm$ 0.1 ^{ab}
150	1.720 $\pm$ 0.1 ^b	1.218 $\pm$ 0.2 ^{bc}
210	1.733 $\pm$ 0.2 ^b	1.029 $\pm$ 0.1 ^c
360	1.634 $\pm$ 0.2 ^c	1.033 $\pm$ 0.1 ^c

^{a-c} Values within a column with no common superscript differ ($p < 0.05$).

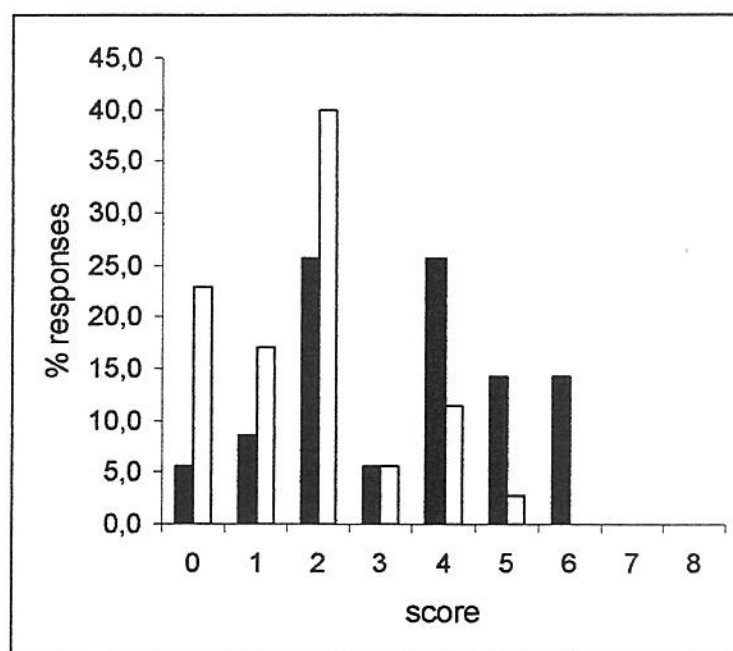


Figure 1 - Percentage responses for PPO treated (□) and control (■) bitter chocolates evaluated by the difference from the control test.

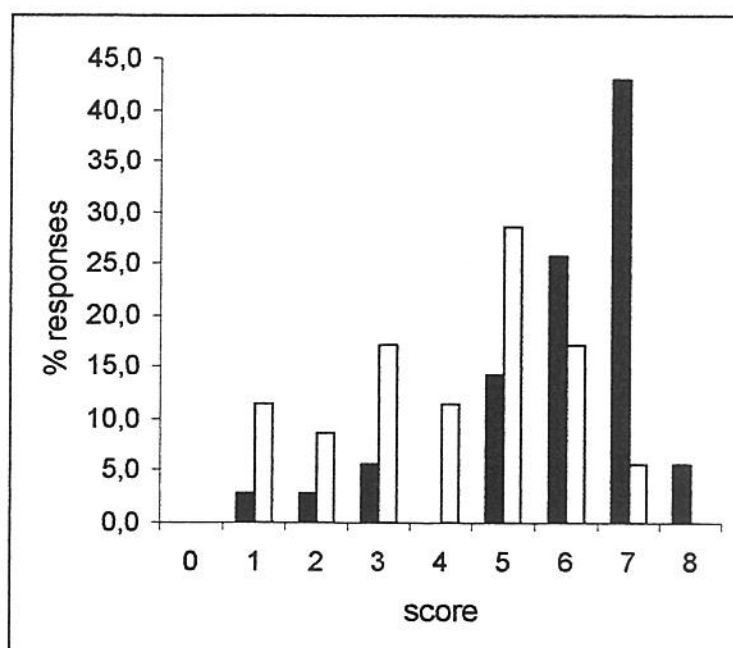


Figure 2 - Percentage responses for PPO treated (□) and control (■) bitter chocolates for the acceptance test.

CONCLUSÕES

-O uso da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) proporcionou uma boa observação do conteúdo citoplasmático globular nas células cotiledonares e de inúmeras células, de tamanho muito maior do que aquelas de reserva, totalmente preenchidas por material fenólico.

-Também foi possível verificar a ruptura da parede celular com a secagem das sementes, e após torração, a rede de filamentos citoplasmático bastante evidente nas etapas anteriores, desapareceu. Isso fez com que os grãos de amido fossem melhor visualizados.

-Tanto com a MEV quanto com a microscopia de luz foi possível observar que durante a fermentação, os compostos fenólicos foram gradativamente sendo dispersos e, após 72 horas de fermentação não pode ser mais observada a sua presença. O mesmo foi observado com os corpos protéicos.

-Durante a fermentação, secagem e torração as principais mudanças químicas observadas estão ligadas aos açúcares, proteínas e fenóis.

-A autoclavagem dos “nibs” de cacau antes da torração influencia significativamente os compostos que contribuem para a formação do sabor do cacau e aumentando a concentração de tri- e tetrametilpirazinas no headspace das amostras.

-A autoclavagem dos “nibs” de cacau antes da torração influencia as características sensoriais das amostras.

-O tratamento dos “nibs” de cacau com uma enzima proteolítica aumentou a quantidade de grupos amino terminais nas amostras. Com a torração houve maior consumo destes compostos em relação a uma amostra controle e consequentemente melhora do sabor.

-A percepção do sabor de chocolate e do gosto amargo foi maior em um produto formulado com “nibs” de cacau tratados com enzima proteolítica quando comparada com um controle.

- O teor de fenóis totais foi reduzido em “nibs” de cacau tratados com polifenoloxidase ou água por 3 horas, mas a associação destes tratamentos com ar causou um aumento dos fenóis totais. O teor de taninos foi reduzido apenas pelo tratamento com água e ar.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE