



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS
Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE
CONSTITUINTES FENÓLICOS DE NIBS E CHOCOLATE DE VARIEDADES
CLONAIS DE CACAUEIRO**

Autor: Alexandre Araújo Pimentel
Orientadora: Prof^ª. DSc. Andréa Gomes da Silva

ITAPETINGA – BAHIA – BRASIL
Maio de 2016

ALEXANDRE ARAÚJO PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE
CONSTITUINTES FENÓLICOS DE *NIBS* E CHOCOLATE DE VARIEDADES
CLONAIS DE CACAUEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof^a. DSc. Andréa Gomes da Silva

Coorientadora: Prof^a. DSc. Simone Andrade Gualberto

Área de concentração: Ciência de Alimentos

ITAPETINGA – BAHIA – BRASIL
Maio de 2016



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES FENÓLICOS DE *NIBS* E CHOCOLATE DE VARIEDADES CLONAIIS DE CACAUEIRO."

Autor (a): ALEXANDRE ARAÚJO PIMENTEL

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Andréa Gomes da Silva

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Simone Andrade Gualberto

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.


Prof.^a Dr.^a Andréa Gomes da Silva (UESB)


Prof.º Dr. Marcondes Viana da Silva (UESB)


Prof.º Dr.º Raúl René Meléndez Valle (UESC/CEPLAC)

Itapetinga-BA, 31 de maio de 2016.

*À minha família por todo o incentivo,
em especial aos meus pais,
fonte de amor e
incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade de realizar este estudo, e poder ampliar meus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Prof^a. DSc. Andréa Gomes pela orientação, paciência, dedicação, amizade e, sobretudo, o profissionalismo, o qual me espelharei.

À minha Coorientadora, Prof^a. DSc. Simone Andrade Gualberto pelos esclarecimentos, ensinamentos, bem como, pela dedicação e disponibilidade, os quais foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Carlyle Brito Matos pesquisador CEPEC/CEPLAC e Cilene Souza, coordenador e pesquisadora FAPESB/CEPLAC, respectivamente, do projeto “Caracterização, avaliação e customização da qualidade de amêndoas de cacau de variedades clonais para produção de chocolate”, pela disponibilização do material biológico, bem como, a troca de informações que foram primordiais para a execução deste estudo.

Ao meu amigo Ícaro Silva, pelos conselhos, companheirismo, por sua amizade e a mão amiga nos momentos em que mais precisei.

À Prof^a. Carminha e ao técnico Alex Aguiar pela orientação e pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Nutrição Animal.

Aos orientados da Prof^a. Andréa, em especial, Júnior Gonçalves, Arthur Pompílio e Daniel Muniz, pela ajuda na condução de alguns experimentos, sobretudo, a amizade e o carinho demonstrados.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON), em especial, Érica Porto, Laís Viana, Rafael Lemos, Marcel Marck, pelos momentos de descontração e na condução dos experimentos.

Ao Prof. DSc. Marcondes Viana e ao Prof. DSc. Raúl René Melendéz Valle, pelas sugestões que ajudaram a aprimorar o presente trabalho.

Aos amigos Geanderson Paiva, Edilson Viana e Lucas Oliveira pelos meses de convívio, companheirismo e momentos de lazer.

Aos meus pais, Roberto Pimentel e Alba Araújo pelos seus ensinamentos, amizade, conselhos, amor, carinho, enfim, os melhores pais do mundo.

A meu irmão, Roberto Júnior, pelos momentos de alegria, carinho e amor a mim prestados.

A minha namorada Diana Nogueira, por todo o amor, incentivo, carinho e companheirismo.

A todos aqueles que porventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Cacau – <i>Theobroma cacao</i> L.....	18
3.2 Amêndoa de cacau	20
3.3 Desenvolvimento de variedades clonais de cacaueiro	22
3.4 Beneficiamento da amêndoa de cacau	24
3.4.1 Fermentação.....	24
3.4.2 Secagem.....	27
3.5 Processamento da amêndoa de cacau fermentada e seca	28
3.5.1 Torrefação.....	29
3.5.2 Conchagem	31
3.5.3 Temperagem.....	32
3.6 Compostos fenólicos em amêndoas de cacau.....	33
3.6.1 Flavonoides em sementes de cacau	35
3.6.1.1 Flavanóis	38
3.6.1.2 Procianidinas	41
3.6.1.3 Antocianidinas	44
3.7 Métodos de determinação da capacidade antioxidante	50
3.7.1 Método do radical livre DPPH [•] (2,2–difetil–1–picrilhidrazil).....	52
3.7.2 Método do ensaio FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	57

4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Material	59
4.1.1 Matéria prima	59
4.1.2 Reagentes e equipamentos	59
4.2 Métodos	61
4.2.1 Obtenção de <i>nibs</i> e chocolate	61
4.2.2 Amostragem	61
4.2.3 Composição centesimal de <i>nibs</i> e chocolate	62
4.2.3.1 Umidade	62
4.2.3.2 Cinzas.....	62
4.2.3.3 Proteína bruta (nitrogênio total).....	62
4.2.3.4 Lipídios (extrato etéreo).....	62
4.2.3.5 Carboidratos totais.....	62
4.2.4 Obtenção de extrato hidroetanólico liofilizado	63
4.2.5 Determinação de compostos fenólicos totais.....	63
4.2.6 Determinação de flavonoides totais.....	64
4.2.7 Método do sequestro do radical livre DPPH [•] (2,2-difenil-1-picrilhidazil).....	64
4.2.8 Método do ensaio FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	66
4.2.9 Análise estatística	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 Composição centesimal dos <i>nibs</i>	68
5.2 Composição centesimal dos chocolates	69
5.3 Quantificação de constituintes fenólicos totais.....	70
5.4 Quantificação de flavonoides totais	73
5.5 Avaliação da capacidade antioxidante	75
5.5.1 Capacidade antioxidante método do sequestro do radical livre DPPH [•] (2,2-difenil-1-picrilhidazil) de <i>nibs</i> e chocolate	75

5.5.2 Capacidade antioxidante de *nibs* e chocolate pelo método FRAP 78

CONCLUSÃO 81

REFERÊNCIAS..... 82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais países produtores de cacau em amêndoas (mil toneladas)....	19
Figura 2 – Composição da química da amêndoa de cacau fermentada e seca.	22
Figura 3 – Visão geral sobre o processamento da amêndoa de cacau.....	29
Figura 4 – Polifenóis presentes na amêndoa de cacau.....	34
Figura 5 – Estrutura básica dos flavonoides.....	36
Figura 6 – Estrutura dos flavanóis e seus grupos de substituição.....	39
Figura 7 – Estrutura química das procianidinas B1 (A), B2 (B), B5 (C), procianidina tetramérica A2 (D), e procianidina trimérica C1 (E).....	43
Figura 8 – Estruturas químicas de algumas antocianidinas.	46
Figura 9 – Estrutura química de uma antocianina acilada (malvinidina–3–glicosídeo)	48
Figura 10 – Esquema da conversão estrutural das antocianinas dependente do pH.....	49
Figura 11 – Mecanismos de reação entre o radical DPPH• (2,2–difetil–1–picrilhidrazil) e um antioxidante por meio da transferência de um átomo de hidrogênio.	53
Figura 12 – Mecanismo de redução do composto férrico $[\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ para $[\text{Fe}^{(\text{II})}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da amêndoa de cacau não fermentada, expressa em matéria seca e desengordurada.....	21
Tabela 2 – Composição centesimal da polpa integral de cacau.	21
Tabela 3 – Efeitos da origem, variedade do cacau, e duração de processo fermentativo nas características sensoriais de amêndoas de cacau	26
Tabela 4 – Estrutura dos flavonoides.....	36
Tabela 5 – Níveis de polifenóis em licor de cacau provenientes de diferentes países, expressos em porcentagem (%).....	40
Tabela 6 – Diferenças na estrutura química, coloração e absorbância das antocianidinas mais comumente encontradas na natureza.....	47
Tabela 7 – Ensaio de capacidade antioxidante in vitro e seu mecanismo de reação	52
Tabela 8 – Modificações do ensaio radical DPPH utilizadas por diversos autores e em diferentes materiais biológicos	55
Tabela 9 – Lista de reagentes.....	60
Tabela 10 – Equipamentos utilizados	60
Tabela 11 – Composição centesimal de <i>nibs</i> de três variedades clonais de cacauero e do Catongo.....	68
Tabela 12 – Composição centesimal de chocolates de três variedades clonais de cacauero e do Catongo	69
Tabela 13 – Teores de constituintes fenólicos totais dos extratos hidroetanólicos liofilizados de <i>nibs</i> e chocolates de três variedades clonais de cacauero e do Catongo	71
Tabela 14 – Teores de flavonoides totais dos extratos hidroetanólicos liofilizados de <i>nibs</i> e de chocolates de três variedades clonais de cacauero e do Catongo	73
Tabela 15 – Resultados dos ensaios de avaliação da capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos liofilizados de <i>nibs</i> e de chocolates de variedades clonais de cacauero e do Catongo pelo método do ensaio radical DPPH•	75

Tabela 16 – Resultados dos testes de capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos liofilizados de <i>nibs</i> e de chocolates das variedades clonais de cacauero e do Catongo pelo método do ensaio FRAP.....	78
--	----

RESUMO

PIMENTEL, Alexandre Araújo. **Avaliação da capacidade antioxidante e quantificação de constituintes fenólicos de *nibs* e chocolate de variedades clonais de cacauero**. 2016. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação de Engenharia e Ciência de Alimentos, Itapetinga, 2016.*

O cacauero (*Theobroma cacao* L.), originário das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, é uma cultura de grande importância econômica, nutricional e sensorial, principalmente por suas propriedades funcionais, sobretudo, a capacidade antioxidante e estimulante do sistema nervoso central. Muitos estudos têm se voltado para o melhoramento genético do cacauero, com foco no aumento da produtividade e da resistência às pragas e doenças, bem como na melhoria da composição química das amêndoas, fator de grande influência na qualidade do produto final. Nesse contexto objetivou-se com o presente estudo quantificar os constituintes fenólicos e a capacidade antioxidante de *nibs* e chocolates procedentes de três clones de cacauero resistentes à vassoura de bruxa (CCN 51, PSH 1319 e BN 34) e a variedade Catongo, cedidas pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. As amostras foram analisadas quanto à composição centesimal, teores de constituintes fenólicos totais e flavonoides totais. Também foi avaliada a sua capacidade antioxidante pelo método do radical livre DPPH e pelo ensaio FRAP. O *nibs* do clone BN 34 apresentou teores superiores de fenólicos totais (168,8 mg EAG.g⁻¹) e flavonoides (22,2 EC mg.g⁻¹ e 42,53 EQ mg.g⁻¹), quando comparado aos *nibs* das outras variedades clonais. Os chocolates das três variedades clonais e o Catongo apresentaram teores semelhantes de flavonoides totais, não sendo observadas diferenças significativas a 5% de significância. A capacidade antioxidante de *nibs* e chocolate procedentes do clone BN 34, foi maior que aquela observada para os *nibs* e chocolates dos demais clones, entretanto, não diferiram do Catongo (p<0,05). Verifica-se que o BN 34, apresenta maior capacidade antioxidante, bem como maiores teores de constituintes fenólicos e flavonoides totais.

Palavras chave: Cacau. Constituintes bioativos. Vassoura de bruxa. Flavonoides

*Orientadora: Andréa Gomes da Silva, DSc., UESB e Coorientadora: Simone Andrade Gualberto, DSc., UESB.

ABSTRACT

PIMENTEL, Alexandre Araújo. **Evaluation of the antioxidant capacity and quantification of phenolic constituents of *nibs* and chocolate from cocoa clonal varieties**. 2016. 99 p. Dissertation (Master Degree) - University of Southwest Bahia, Post-Graduate Program of Engineering and Food Science, Itapetinga, 2016.*

The cacao tree (*Theobroma cacao* L.), originating in the basins of the Amazon and Orinoco rivers, is a crop of great economic, nutritional and sensory significance, primarily for its functional properties, especially the antioxidant capacity and stimulating the central nervous system. Many studies have focused on the genetic improvement of cacao, with focus on increased productivity and resistance to pests and diseases as well as in improving the chemical composition of beans, very influential factor in the quality of the final product. In this context, the aim this study was quantify the phenolic constituents and the antioxidant capacity of *nibs* and chocolate for three cocoa clones resistant to witches' broom (CCN 51, PSH 1319 and BN 34) and Catongo variety, assigned by Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. The samples were analyzed for their centesimal composition, total phenolics and total flavonoids concentrations. Also it was evaluated their antioxidant capacity by the free radical method DPPH and the FRAP assay. The *nibs* from BN 34 shows higher levels of phenolics constituents (168,8 mg EAG.g⁻¹) and total flavonoid (22,2 EC mg.g⁻¹ and 42,5 EQ mg.g⁻¹) when compared with the *nibs* from the other varieties. Chocolate from the three varieties and the Catongo variety show similar levels of these compounds, there were no statistically significant differences at the 5% level of significance among them. The antioxidant capacity of *nibs* and chocolate coming BN 34 was higher than that observed for the *nibs* and chocolate of the other clones, however, did not differ from Catongo (p <0.05). It was found that BN 34, showed higher antioxidant capacity, as well as the levels of phenolics constituents and total flavonoid.

Keywords: Cacao. Bioactive constituents. Witches' broom. Flavonoids.

*Advisor: Andréa Gomes da Silva, DSc., UESB and Co-advisor: Simone Andrade Gualberto, DSc., UESB

1 INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), uma importante cultura nacional, também cultivado em diversos países da África, Ásia, América do Sul e Central, assim como na Oceania. O Brasil está entre os maiores produtores de cacau do mundo, ocupando atualmente a sexta posição. Isso tem motivado a busca, através de melhoramento genético de variedades mais produtivas, com qualidades sensoriais superiores e resistência a pragas e doenças, a exemplo da vassoura de bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*.

Desde a década de 1980, o setor cacauieiro do Brasil, especialmente no Estado da Bahia, tem sofrido uma grave crise ocasionada pela vassoura de bruxa, fato que levou a uma redução expressiva na produção nacional (EFRAIM, 2009). Diante deste cenário, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, tem se empenhado na seleção e reprodução de variedades clonais de cacau resistentes ao ataque do fungo causador da doença, como os clones CCN 51, PSH 1319 e BN 34.

Além de sua importância econômica, nutricional e sensorial, o cacau e seus produtos, também são conhecidos por suas propriedades funcionais, sobretudo, a capacidade antioxidante de *nibs* e chocolates obtidos da amêndoa, mesmo após submetida a várias etapas de beneficiamento e processamento. A capacidade antioxidante do cacau deve-se aos diversos compostos presentes em sua matriz, com características sequestrantes de radicais livres, como flavanóis, antocianidinas e proantocianidinas.

Diversos métodos têm sido utilizados na avaliação da capacidade antioxidante dos produtos do cacau, dentre eles, podemos citar o método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), do ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Estes dois métodos baseiam-se em mecanismos de transferência de elétrons dos compostos antioxidantes presentes no extrato para o radical alvo, possibilitando a

mensuração da capacidade antioxidante das amostras analisadas com boa reprodutibilidade e replicabilidade.

O estudo da composição química de novas variedades clonais de cacauero torna-se relevante no desenvolvimento de novos conceitos para a produção de chocolates e produtos relacionados com qualidade diferenciada, uma vez que, as características do produto elaborado estão intimamente ligadas aos constituintes da matéria prima, bem como, da tecnologia empregado no fabrico.

Visando a importância de estudar e caracterizar a composição química de novos clones de cacauero, propôs com este estudo avaliar os constituintes fenólicos e a capacidade antioxidante de *nibs* e chocolates obtidos de variedades clonais de cacauero resistentes à doença vassoura de bruxa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a composição centesimal, capacidade antioxidante e quantificação de constituintes fenólicos de *nibs* e chocolate de variedades clonais de cacaueteiro, resistentes à vassoura de bruxa.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a composição centesimal de *nibs* de diferentes variedades clonais de cacaueteiro;

Quantificar os teores de fenólicos e flavonoides totais em amostras de *nibs* e chocolates oriundos de diferentes variedades clonais de cacaueteiro;

Verificar a capacidade antioxidante de *nibs* e chocolate das variedades clonais de cacaueteiro pelos métodos do radical livre DPPH e FRAP.

3 REVISÃO DE LITERATURA

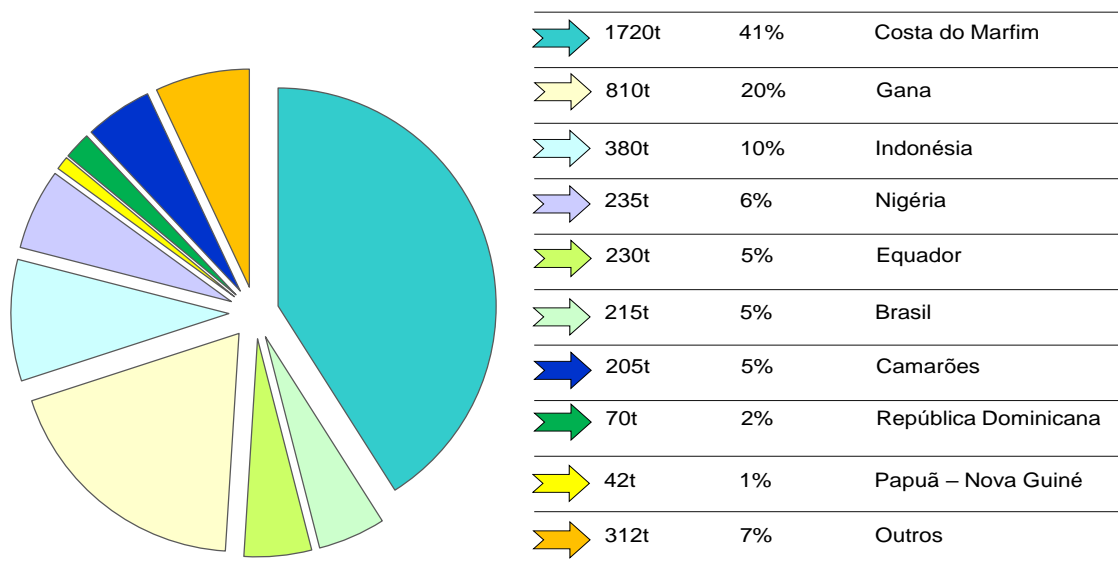
3.1 Cacau – *Theobroma cacao* L.

O gênero *Theobroma* (Malvaceae) é de origem neotropical, possivelmente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco. A principal espécie do gênero, o *Theobroma cacao*, teve seu cultivo implantado na Colômbia, Venezuela e América Central, estendendo-se para países da África como Gana, Nigéria, Costa do Marfim, Camarões e Malásia (OTHMAN et al., 2007; MARTINI e TAVARES, 2005). As plantações concentram-se, atualmente, em três principais regiões do mundo: oeste da África, sudoeste da Ásia e América do Sul (PIASENTIN e SAITO, 2014).

A produção mundial de cacau em 2015 foi de aproximadamente 4,232 milhões de toneladas (ICCO, 2015). Desta produção, 72,3% estava localizada no continente africano, 16,7% no continente americano e 11% nos continentes Ásia e Oceania. A Costa do Marfim deteve 41% da produção mundial, seguida de Gana (19%), Indonésia (9%), Nigéria (6%) e Equador (5%), como apresentado na Figura 1. O Brasil é o sexto maior produtor, responsável por 5% do total mundial (ICCO, 2015).

Como uma típica planta tropical, o cacauero é muito sensível a baixas temperaturas, razão pela qual, a maior parte das plantações comerciais encontram-se no trópico, entre as latitudes 20° N e 20° S (ZUGAIB, BARRETO e SANTOS, 2014). O Sul do Estado da Bahia possui uma extensa área ocupada pelo cultivo de cacau, 70% dos quais, utilizam um sistema agroflorestal denominado localmente de 'cabruca' (OLIVEIRA et al., 2011; SAMBUICHI, 2006). Neste sistema, o cacauero é cultivado sob a sombra das árvores da mata nativa, assim como no sudeste de Camarões, sudoeste da Nigéria e leste de Gana (PIASENTIN e SAITO, 2014; SCHROTH et al., 2004).

Figura 1 – Principais países produtores de cacau em amêndoas (mil toneladas).



Fonte: Adaptado de ICCO (2015).

As variedades de cacau estão divididas em três grupos: Criollos, Forasteros e Trinitários (ESATBEYOGLU, WRAY e WINTERHALTER, 2015). As variedades do grupo Criollo corresponde à subespécie “cacao” cultivada anteriormente pelos povos pré-colombianos e atualmente encontrada no México, Colômbia e Venezuela. É considerado um cacau de excelente qualidade, com sabor e aroma de pouca adstringência e amargor, características que lhe conferem a classificação de cacau fino (LIMA et al., 2011). Tais características podem estar relacionadas aos baixos níveis de procianidinas (COUNET et al., 2004), sendo mais utilizado para melhorar características sensoriais de formulações com variedades de baixa qualidade sensorial. Corresponde a apenas 5% da produção mundial, devido a susceptibilidade a doenças, dificultando o cultivo (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013).

O cacau Forastero corresponde à subespécie “*sphaerocarpum*” nativo da região entre os rios Amazonas e Orinoco e disseminado pela Amazônia e Guianas (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013). O cultivo adaptou-se bem aos padrões climáticos da África, sendo largamente cultivado em países como Gana, Costa do Marfim, Camarões e Nigéria, se tornando os maiores produtores desta variedade (MICHELI, 2010). Devido a sua resistência a pragas e doenças, variedades de cacau do grupo Forastero são as mais cultivadas, representando 85% da

produção mundial (ICCO, 2015). As amêndoas são consideradas de baixa qualidade, de sabor mais ácido, amargo e adstringente que o cacau Criollo (LIMA et al., 2011), além de menores teores de procianidinas que, possivelmente, podem levar à formação de menores níveis de compostos aromáticos (COUNET et al., 2004). Mutações desta variedade, resultaram no cacau Catongo, que se caracteriza pelas sementes brancas (VALLE, 2007).

A hibridização natural entre as variedades do grupo Criollo da Venezuela e o do grupo Forastero das Guianas deu origem a um terceiro grupo de variedades de cacau, chamado de Trinitário. Especificar as características desta variedade é relativamente difícil, pois apresentam características típicas do Criollo, bem como do Forastero. Variedades deste grupo são resistentes a pragas e doenças (LIMA et al., 2011), além de apresentar níveis de procianidinas equivalentes ao de variedades do grupo Forastero (COUNET et al., 2004). Geralmente, são cultivadas na América Central, principalmente em Trinidad e na Costa Rica (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013).

3.2 Amêndoa de cacau

As sementes de espécies do gênero *Theobroma* permanecem como única matéria prima do produto que se padroniza como chocolate (MARTINI e TAVARES, 2005), representando um importante papel na vida social e econômica em todo o mundo, sendo cultivado em 7 milhões de hectares (RAMOS et al., 2015). Visto que, o cultivo do cacau realiza-se, em grande parte, em áreas de pequenos produtores (HARTEMINK, 2005).

Para o mercado de cacau, a amêndoa se constitui a parte de maior importância econômica (PRABHAKARAN, 2010), no entanto, os demais componentes podem ser utilizados no aumento da renda do produtor. A polpa, por exemplo, pode ser empregada na produção de diversos produtos como suco, néctar, sorvete, doce e iogurte (PINA, 2001).

A amêndoa de cacau in natura é constituída pelo gérmen (0,77%) e o cotilédone (89,6%), que é revestido por um tegumento (9,63%), que por sua vez, está envolto por uma polpa mucilaginosa (OFOAKWA et al., 2008). Esta polpa possui de 10 a 15% de açúcares, que são essenciais durante o processo fermentativo, sendo utilizados

como substrato por microrganismos (SCHWAN e WHEALS, 2010; PRABHAKARAN, 2010). As Tabelas 1 e 2 mostram os valores da composição da amêndoa não fermentada e da polpa integral de cacau, respectivamente.

Tabela 1 – Composição da amêndoa de cacau não fermentada, expressa em matéria seca e desengordurada.

Constituintes	Matéria seca (%)	Desengordurada (%)
Lipídios	53,00	–
Carboidratos	14,08	32,48
Proteínas	2,28	5,27
Minerais	1,10	–
Umidade	6,00	–
Cinzas	2,63	6,07
Teobromina	1,71	3,95
Cafeína	0,085	0,20
Polifenóis	7,54	17,43
Ácidos		
Acético	0,014	0,03
Oxálico	0,29	0,67

Fonte: Adaptado de Prabhakaran, 2010; Ofoakwa et al., 2008.

Tabela 2 – Composição centesimal da polpa integral de cacau.

Componente	Concentração (%)
Carboidratos	13,4
Proteínas	0,6
Ácidos orgânicos	0,7
Ácidos inorgânicos	0,8
Umidade	84,5

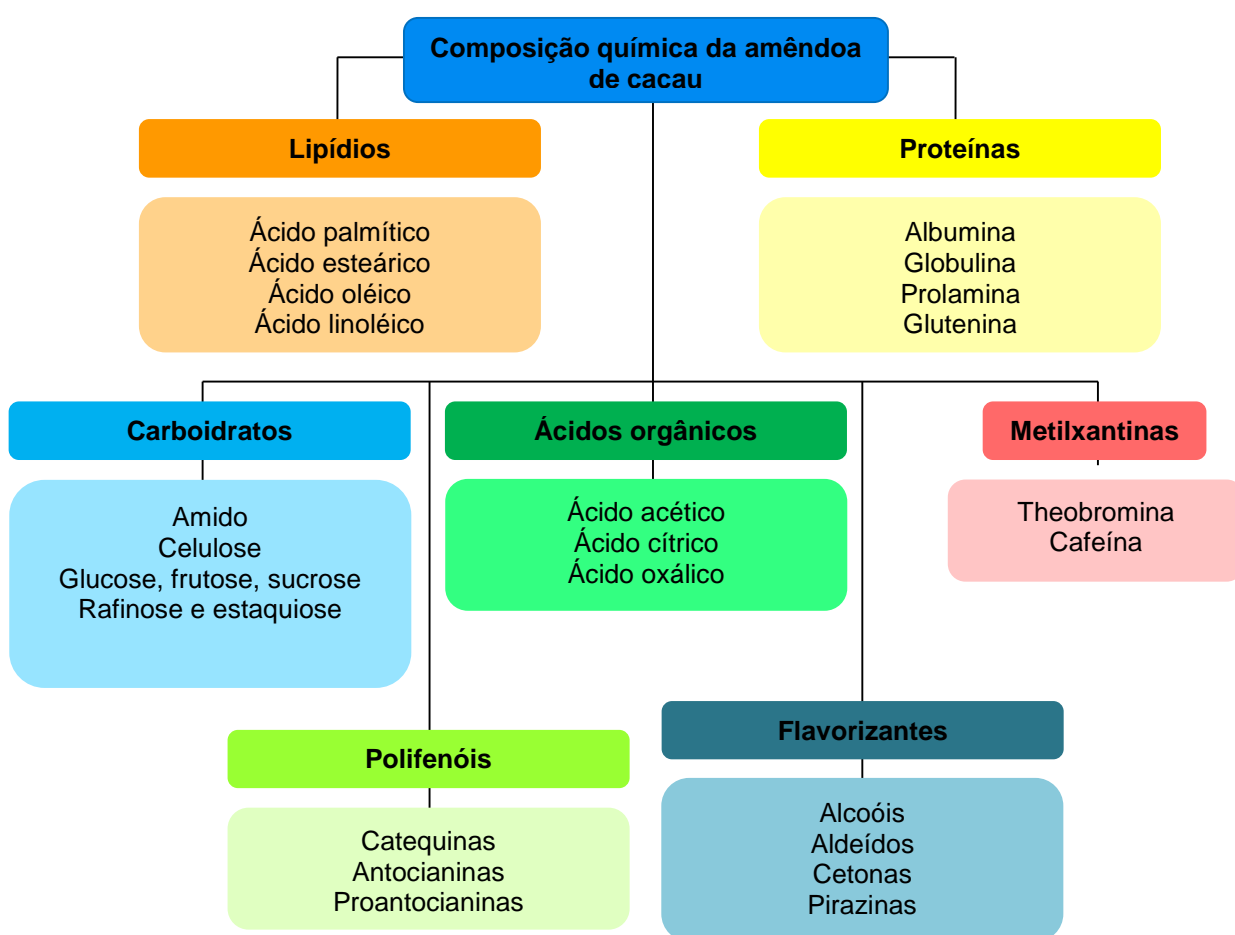
Fonte: Hardy (1960, *apud* Prabhakaran, 2010).

As etapas primárias do beneficiamento das amêndoas promovem significativas modificações em sua composição químicas, devido a diversas reações. Dentre estas modificações, podemos citar a formação de ácidos orgânicos durante a fermentação (ex., ácido acético) e a formação de compostos flavorizantes (LIMA et al., 2011;

SCHWAN e WHEALS, 2010). A Figura 2 mostra com detalhes a composição química da amêndoa de cacau após as etapas de beneficiamento.

Variações locais ou regionais, genótipo, condições da colheita, técnicas de fermentação e secagem atuam diretamente na composição final da amêndoa (SALTINI, AKKERMAN e FROSCHE, 2013; BRITO et al., 2000). Portanto, a composição da semente de cacau seca e fermentada (amêndoa), um dos fatores mais importantes que influenciam o sabor e aroma dos produtos do cacau, depende não somente da variedade, mas também da origem geográfica.

Figura 2 – Composição da química da amêndoa de cacau fermentada e seca.



Fonte: Adaptado de Caligiani, Marseglia e Palla, 2016.

3.3 Desenvolvimento de variedades clonais de cacauero

A propagação do cacauero no Brasil, principalmente no estado da Bahia, tem se realizado por via vegetativa usando a estaquia ou mudas clonais, resultando em

mudas de qualidade. A utilização de clones resistentes ao ataque do fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura de bruxa do cacauero, é prática usual no estado em substituição a plantas seminais, suscetíveis ao ataque do fungo (RAMOS et al., 2015).

Desde a década de 1960, o Centro de Pesquisas de Cacau – CEPEC da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, vem trabalhando no desenvolvimento de variedades clonais com resistência à doença, bem como, com qualidade e produtividade superiores. No programa de melhoramento são utilizadas variedades descendentes de combinações híbridas desenvolvidas em programas de melhoramento genético de países vizinhos, a exemplo da Scavina 6. Os esforços da CEPEC, resultaram no desenvolvimento da variedade seminal Theobahia 1, a partir do cruzamento entre a Scavina 6 (Equador) e ICS 1 (Trinidad), sendo distribuídas no ano de 1995 (MONTEIRO et al., 2007; PINTO e PIRES, 1998).

A renovação das áreas de produção com a variedade Theobahia, resistente à vassoura de bruxa, claramente se expandiu após o ano de 1995 no estado, diminuindo consideravelmente a severidade da doença (MONTEIRO et al., 2007). No entanto, o combate ao fungo *M. perniciosa*, deve ser uma tarefa continuada, visto que, o fungo apresenta elevada variabilidade genética, justificando o desenvolvimento de novas variedades resistentes e novas formas de manejo que tragam maior estabilidade à cultura frente ao ataque do fungo e outras doenças (PIRES, 2003).

Segundo Arévalo et al. (2007), a CEPLAC desenvolve clones que apresentam alto grau de tolerância não somente à vassoura de bruxa, como também, à monília (*M. roreni*) e podridão-parda (*Phytophthora* spp). Além disso, grande produtividade e amêndoas com características sensoriais apreciadas pela indústria, a exemplo dos clones das classes TSA, TSH e CEPEC, que são estudados e recomendados pela CEPLAC desde o ano de 1997.

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na resistência do cacauero às pragas e doenças, sendo influenciados pela expressão genica de produtos químicos, como apontado por Nojosa et al. (2003) ao avaliarem a influência dos níveis de compostos fenólicos sob a resistência de variedades clonais de cacauero. No referido estudo, os autores verificaram que compostos fenólicos e enzimas, como a polifenoloxidase, podem atuar como parte de um conjunto de mecanismos que determinam a resistência da variedade frente ao ataque de pragas e doenças. A

pigmentação, também foi um dos aspectos importantes observados em muitos clones resistentes, principalmente, nos descendentes de Scavina 6.

Atualmente, a CEPLAC lidera um projeto, apoiado pela FAPESB, de customização da qualidade das amêndoas procedentes de variedades clonais de cacau, a exemplo da CCN 51, PSH 1319 e BN 34. O projeto visa a identificação de variedades clonais de cacau com características superiores e o aprimoramento de tecnologia para o aproveitamento de seus frutos, bem como, estabelecer a padronização da qualidade das amêndoas de cacau para obtenção de chocolates de qualidade superior.

3.4 Beneficiamento da amêndoa de cacau

As etapas que compreendem a obtenção da amêndoa se iniciam com a colheita dos frutos, quebra, retirada das sementes e a transferência para cochos de fermentação, fermentação, secagem, acondicionamento e armazenamento, preservando a qualidade da amêndoa até que sejam processadas e transformadas em chocolate e produtos relacionados.

3.4.1 Fermentação

A fermentação pode ser considerada a principal etapa do beneficiamento da amêndoa de cacau para a produção de chocolate. Neste processo, diversas reações bioquímicas ocorrem nas amêndoas, induzindo a síntese de aromas ou de seus precursores (CALIGIANI, MARSEGLIA e PALLA, 2016; SCHWAN e WHEALS, 2010; MISNAWI, BAKAR e SAARI, 2002), como a metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, trimetilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina.

Geralmente, a fermentação é realizada em caixas de madeira, em formato retangular, chamadas de “cochos”. A fermentação conduzida neste tipo de caixa promove baixa uniformidade, consequência do uso incompleto do açúcar por parte dos microrganismos (GIACOMETTI, JOLIC e JOSIC, 2015), possibilitando a formação de sementes de baixa qualidade (GUEHI et al., 2010).

Em um estudo realizado por Pereira et al. (2012), foi observado que a população de *Saccharomyces cerevisiae* alcançou a contagem de 10^7 UFC/g em 24 horas de fermentação conduzida em cochos, após ser eclipsada por uma variedade

de outras espécies, tais como *Candida ethanolica*, *C. humilis*, *C. inconspicua*, *C. intermedia*, *C. xylopsoci*, *Debaryomyces etchellsii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Wickerhamomyces* sp. e *Yarrowia lipolytica* (PEREIRA et al., 2012)

A polpa se caracteriza como o principal substrato para a fermentação, consequência da presença de açúcares (Tabela 2) que permitem o desenvolvimento de uma gama de microrganismos. Um recente estudo mostrou que espécies de leveduras (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* e *S. cerevisiae*), bactérias lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* e *L. fermentum*) e bactérias acéticas (*Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter frateurii*) são responsáveis pela fermentação das amêndoas de cacau (HO, ZHAO e FLEET, 2015), determinando a formação de álcool, ácido láctico e ácido acético (CAMU et al., 2008b).

São distintos métodos utilizados nesta operação, que variam de acordo com o produtor ou país de origem (CAMU et al., 2008a). A fermentação é adaptada para cada tipo de variedade (SCHWAN e WHEALS, 2010), visto que o método empregado irá influenciar na qualidade da amêndoa, interferindo diretamente nas características sensoriais (NAZARUDDIN et al., 2006). Por exemplo, o cacau proveniente do grupo Criollo possui uma fermentação relativamente curta de 2 – 3 dias, cacau do grupo Forastero requer 5 – 7 dias (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013). A Tabela 3 mostra as características sensoriais de amêndoas de variedades clonais de cacau de diferentes países e o tempo de fermentação requerido.

O início da fermentação promove a perda de grande parte da polpa que envolve a semente, consumida pela ação microbiana (LIMA et al., 2011; RUSCONI e CONTI, 2010). No entanto, mais importantes são as mudanças bioquímicas no interior da amêndoa que contribuem na redução do amargor e da adstringência, melhorando sua cor e aroma (HO, ZHAO e FLEET, 2015).

Devido à atividade microbiana, enzimas são liberadas para o ambiente de fermentação, desencadeando uma série de reações enzimáticas. As enzimas possuem um pico de atividade no início da fermentação (pH 3,5), que logo é reduzida durante os primeiros dias da fermentação (VOIGT et al., 1994). No entanto, estão envolvidas na formação de precursores de aroma do chocolate (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013) a partir da oxidação, condensação e complexação de

polifenóis (RUSCONI e CONTI, 2010; VOIGT et al., 1994; ROHAN, 1963), e da proteólise de globulinas (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013; COUNET et al., 2004).

Tabela 3 – Efeitos da origem, variedade do cacau, e duração de processo fermentativo nas características sensoriais de amêndoas de cacau.

Origem	Variedade do cacau	Duração (dias)	Características sensoriais do aroma
Equador	Nacional (Arriba)	2	Aromático, floral
Equador	Criollo	2	Ácido, pouco aromático
Brasil	Catongo	5 – 8	Aroma forte, frutado
Venezuela	Trinitário	2	Pouco aromático, ácido
Venezuela	Criollo	2	Frutado, sabor de nozes
Zanzibar	Criollo	6	Floral, aromático
Venezuela	Forastero	5	Frutado, caramelado
Gana	Forastero	5	Aroma forte, frutado
Malásia	Trinitario	6	Ácido, aromático
Trinidad	Trinitário	7 – 8	Caramelado, adocicado
Granada	Trinitário	8 – 10	Ácido, frutado
Congo	Criollo/Forastero	7 – 10	Ácido, aromático
Nova Guiné	Trinitário	7 – 8	Frutado, ácido

Fonte: Ofoakwa et al., 2008.

Desta forma, as características da polpa é um fator chave para a fermentação, onde o pH na faixa da acidez, causada pela presença de ácido cítrico, em conjunto com o baixo nível de oxigênio e o alto teor de açúcares favorece a colonização de leveduras (SCHWAN e WHEALS, 2010). As alterações do pH são importantes para a atividade microbiana (GIACOMETTI, JOLIC e JOSIC, 2015), que conduz à produção de etanol e de enzimas pectinolíticas dentro das primeiras 24 horas, diminuindo gradativamente ao longo do tempo (CAMU et al., 2008b).

Ainda em condições ácidas, leveduras convertem açúcar em álcool. Em seguida, ocorre o desenvolvimento de bactérias lácticas que contribuem para a decomposição do açúcar para ácido láctico. Assim que a polpa é esgotada, o ambiente se torna aeróbio, permitindo o desenvolvimento de bactérias acéticas, promovendo a formação de ácido acético e a consequente redução do pH interno da amêndoa pela maior concentração de ácido (SCHWAN e WHEALS, 2010).

A presença de ácido acético promove a decomposição de polifenóis e da membrana lipídica dos vacúolos da célula, permitindo várias reações enzimáticas. As mais importantes consequências são a oxidação dos polifenóis e sua conversão para a forma insolúvel, devido à reação com proteínas. Estas reações são responsáveis pela diminuição do sabor amargo, na mudança da coloração e na redução do teor de polifenóis totais, afetando as propriedades antioxidantes do cacau (CAMU et al., 2008b; COUNET et al., 2004; WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

A oxidação de polifenóis em amêndoas de cacau frescas e parcialmente fermentadas foi avaliada, sendo observada a oxidação significativa dos polifenóis durante a primeira fermentação. O estudo mostrou que houve uma degradação maior que 50% do teor original após 8 h de fermentação para as (-)-epicatequinas, (-)-catequinas e fenólicos totais. Para as antocianinas este tempo foi ainda menor, cerca de 4 h (MISNAWI, BAKAR e SAARI, 2002).

Todavia, o grau de fermentação das amêndoas é um dos maiores critérios de qualidade. Quando bem fermentadas, a coloração da amêndoa passa do violeta para marrom, devido à oxidação e polimerização de polifenóis (LIMA et al., 2011; RUSCONI e CONTI, 2010; NAZARUDDIN et al., 2006; ROHAN, 1963). Neste processo, enzimas como a polifenoloxidase, convertem os polifenóis para quinonas. Os polifenóis e as quinonas formam complexos com peptídeos, promovendo a mudança da coloração e a redução da adstringência da amêndoa (CAMU et al., 2008b; COUNET et al., 2004; WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

3.4.2 Secagem

A etapa final do beneficiamento da amêndoa de cacau é a secagem. Ao término da fermentação, as amêndoas possuem um teor de umidade na faixa de 55%, dificultando a estocagem (CAMU et al., 2008a). Desta forma, a secagem é utilizada

com o objetivo de reduzir o teor de umidade das amêndoas, previamente fermentadas, para a faixa de 5 – 7% (KEALEY et al., 2001; KIM e KEENEY, 1984).

O processo de secagem das amêndoas de cacau é realizado por dois métodos: natural ou artificial. Dependendo das condições climáticas, as sementes são expostas ao sol por 12 – 20 dias, permitindo a obtenção de amêndoas com boa qualidade em regiões de clima suficientemente ensolarado, como no Sul da Bahia e no Oeste da África. Em áreas onde o clima não se adequa à secagem natural, métodos de secagem artificial devem ser empregados, como a aplicação de ar quente.

Quaisquer que sejam os métodos de secagem utilizados em amêndoas de cacau, a utilização de altas temperaturas ou longos tempos de processo, reduzem o teor de polifenóis nas sementes de cacau (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013). Foi constatada a redução de 50% de epicatequinas em amêndoas fermentadas após dois dias de secagem natural, além da redução da atividade enzimática da polifenoloxidase em 2% (WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

Por outro lado, a secagem muito rápida propicia a produção excessiva de ácidos (SCHWAN e WHEALS, 2010), incluindo ácido acético, que é prejudicial ao sabor, enquanto que uma secagem muito lenta resulta em menores valores de pH, a ausência da cor ideal e um aumento do crescimento de bolores na amêndoa de cacau (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012; ZAHOULI et al., 2010).

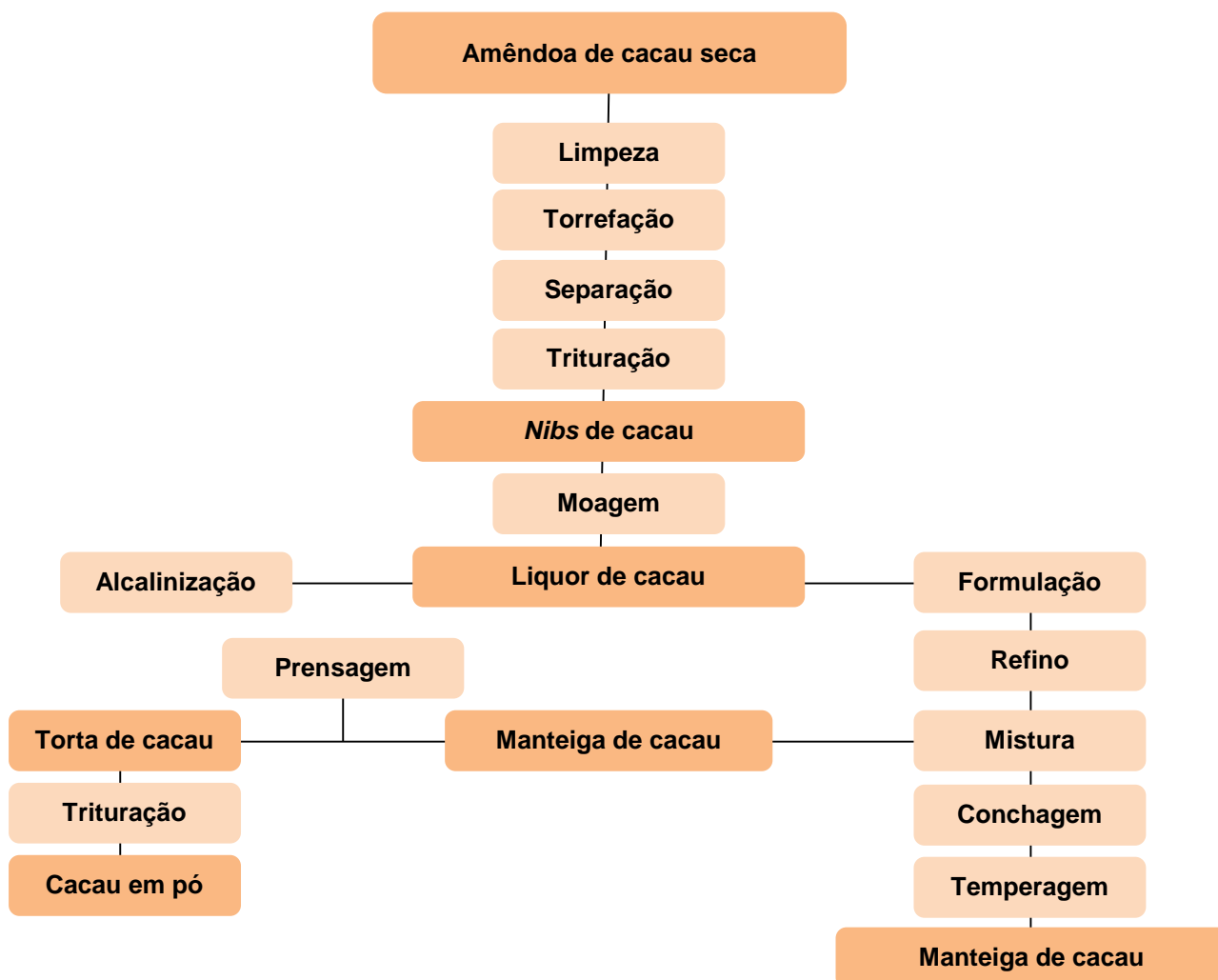
Percebe-se a importância da temperatura como um importante parâmetro durante a etapa de secagem, uma vez que, enzimas presentes atuam no interior da amêndoa e promovem reações químicas. A temperatura ótima da atividade enzimática está entre 35 – 40°C, o que justifica os melhores resultados obtidos pela secagem natural. O uso de temperaturas reduzidas ou acima desta faixa promovem perdas na qualidade das amêndoas, consequência da diminuição da atividade enzimática (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013). Dessa forma, os parâmetros de secagem utilizados devem ser avaliados cuidadosamente, uma vez que, a utilização de um método inadequado poderá acarretar em perdas de qualidade do produto.

3.5 Processamento da amêndoa de cacau fermentada e seca

A etapa de processamento consiste na conversão das amêndoas fermentadas para diferentes produtos, tendo o chocolate como o principal produto. Nesta fase do processo ocorrem o desenvolvimento do aroma característico de cacau a partir da

torrefação e a obtenção dos produtos de cacau a partir do *nibs*. A Figura 3 mostra as principais etapas envolvidas no processamento da amêndoa de cacau.

Figura 3 – Visão geral sobre o processamento da amêndoa de cacau.



Fonte: Adaptado de Caligiani, Marseglia e Palla, 2016.

3.5.1 Torrefação

A chave para a produção de chocolate é a torrefação, uma vez que, durante esta etapa ocorre o desenvolvimento do sabor e aroma característicos do produto a partir dos precursores desenvolvidos nas etapas de fermentação e secagem (peptídeos e aminoácidos), que são transformados em compostos aromáticos, como aldeídos e pirazinas (SALTINI, AKKERMAN e FROSCH, 2013; OFOAKWA et al., 2008).

Muitas enzimas estão envolvidas no processo da quebra de proteínas durante a fermentação da semente, como endoproteínases, carboxipeptidases, aminopeptidases, invertase, polifenoloxidasas ou glicosidasas, aumentando a concentração de aminoácidos, possibilitando a síntese de precursores de sabor (CAMU et al., 2008b). Ademais, no processo de torrefação, ocorre uma reação química que resulta nos compostos aromáticos característicos do cacau, a reação de Maillard. Essa reação ocorre em meio aquoso, pH na faixa de 3,0, e na presença de açúcar, aminoácidos e a aplicação de calor (OFOAKWA et al., 2008).

O tempo e a temperatura utilizada no processo de torrefação dependem de muitos fatores, como a composição do cacau, do produto final a se obter e o tipo de cacau (KOTHE, ZIMMERMANN e GALENSA, 2013). O grau de torrefação é uma relação dependente do tempo *versus* temperatura, onde o tempo pode variar de 5 a 120 min e a temperatura de 120 a 150°C (KRYSIK, 2011). Temperaturas altas contribuem em mudanças significativas nas propriedades físicas e químicas das amêndoas (KRYSIK, 2011). A aplicação de alta temperatura em curto período de tempo na torrefação consegue preservar melhor o teor de polifenóis do que a aplicação de uma baixa temperatura por um tempo longo.

Diferentes condições de processos aplicados à torrefação podem causar variações nos teores de flavonóis, proantocianidinas e atividade antioxidante (IOANNONE et al., 2015). A torrefação por convecção do cacau tem sido mais utilizada, no entanto, este tipo de processo possui diversas desvantagens a respeito das mudanças sensoriais proporcionadas pela aplicação deste método. Tais mudanças são a perda do aroma, aumento do amargor e o surgimento de odores indesejáveis pela formação de alguns compostos, consequência da degradação de lipídios (KRYSIK, 2011).

Outra desvantagem da torrefação convectiva se deve às altas temperaturas empregadas e as diferenças de temperaturas entre o centro e a parte mais externa da amêndoa, que podem contribuir para um processo desigual na matéria prima e o surgimento do aroma de “queimado” (KRYSIK, 2011). Kealey et al. (2001), mencionaram que o aumento da temperatura de 127°C para 181°C resultou na diminuição do teor de polifenóis em 52% e, para o teor de procianidina, a perda foi equivalente a 22%.

Em um estudo, com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes métodos de torrefação nas propriedades físico-químicas de amêndoas de cacau, foi observado que a aplicação de micro-ondas a 135°C, mostrou-se mais eficiente na obtenção de amêndoas com propriedades físico-químicas favoráveis, isto é, valores mais baixos de acidez volátil e total, bem como, maiores valores de lipídios (KRYSIK, 2011). Observações semelhantes foram feitas por Kothe, Zimmermann e Galensa (2013), ao investigarem o efeito da torrefação sobre a epimerização de polifenóis em amêndoas de cacau. Eles afirmaram que a temperatura de torrefação deve ser mantida abaixo de 140°C a fim de preservar o perfil de compostos fenólicos (KOTHE, ZIMMERMANN E GALENSA, 2013).

Ao término da torrefação, as amêndoas inteiras são dessecadas, promovendo a remoção das cascas por peneiragem, ventilação ou sucção, e a fragmentação da amêndoa, obtendo-se o *nibs*. Os *nibs* são submetidos à moagem em moinho de facas, obtendo a massa de cacau ou liquor, que seque para a operação de prensagem, gerando a manteiga e a torta de cacau. A partir da torta de cacau, origina-se o cacau em pó, que poderá ainda ser alcalinizado. O liquor, a manteiga e o cacau em pó são os principais produtos utilizados na fabricação de chocolates e alimentos derivados de cacau (EFRAIM, ALVES e JARDIM, 2011).

3.5.2 Conchagem

A conchagem pode ser caracterizada como o último processo de importância no âmbito sensorial do chocolate, visto que a conchagem proporciona mudanças positivas na textura e aroma do produto final (WOLLGAST e ANKLAM, 2000). A conchagem promove a diminuição da umidade e de compostos voláteis indesejáveis formados durante a fermentação, homogeneização dos ingredientes, bem como, a emulsificação e a formação de aromas (OFOAKWA et al., 2008). Nesta fase, o chocolate é aquecido para a temperatura de 50°C a 60°C, por um período de até 5 dias, podendo ser influenciado de acordo com o tipo de chocolate o qual se destina a produção (SCHWAN e WHEALS, 2010; WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

De acordo com o tipo de equipamento, a conchagem pode ser realizada em três etapas consecutivas. Na primeira fase, ocorre a evaporação da água e o carreamento de compostos voláteis de baixo ponto de ebulição, formados durante a

fermentação, que podem influenciar negativamente as características sensoriais do produto final. Na segunda fase é adicionada uma fração de manteiga de cacau, proporcionando a emulsificação da massa. Nesta fase se inicia a reação de Maillard, indispensável no desenvolvimento das características sensoriais do chocolate. A última fase compreende a adição de emulsificantes (lecitina) com a finalidade de melhorar as etapas subsequentes à conchagem (PRABHAKARAN, 2010; SCHWAN e WHEALS, 2010).

Alterações nos teores de polifenóis presentes em amêndoas de cacau durante o processamento de chocolate podem ser observadas, particularmente, durante a torrefação, moagem, refino e conchagem. Ao avaliarem os efeitos da alcalinização e a temperatura de conchagem na capacidade antioxidante e propriedades físicas em chocolate, Sulistyowati e Misnawi (2008), observaram que a concentração de polifenóis, bem como, a capacidade antioxidante diminuíram significativamente com a aplicação de temperaturas acima de 48°C durante um tempo de 22 horas.

3.5.3 Temperagem

A temperagem é uma técnica de pré-cristalização controlada, empregada para induzir a forma sólida mais estável da manteiga de cacau, uma gordura polimórfica, em chocolates acabados. O processo consiste do cisalhamento da massa de chocolate a uma temperatura controlada, como forma de promover a cristalização dos triacilgliceróis presentes na massa. A temperagem influencia as características de qualidade, como dureza à temperatura ambiente, ponto de fusão, brilho, e o desprendimento do sabor na degustação (EFRAIM, 2009; OFOAKWA et al., 2008).

A manteiga de cacau é sólida à temperatura ambiente (21°C a 24°C), portanto, a maioria dos chocolates é firme e sólido a essa temperatura. Acima da temperatura ambiente, a fração lipídica derrete progressivamente até que esteja completamente fundida a cerca de 36°C (KEALEY et al., 2001). Dessa forma, o chocolate é aquecido a 42°C de forma a obter cristais estáveis da manteiga de cacau (LEITE et al., 2013), visto que, a cristalização da gordura define a estrutura, propriedades reológicas, texturais e aparência do chocolate (OFOAKWA et al., 2008).

Após a temperagem, o chocolate é transferido para moldes de tamanhos variados, que são continuamente agitados de forma a distribuir a massa

uniformemente, evitando a formação de bolhas de ar. Posteriormente, os moldes são resfriados a 7°C, e, finalmente, os chocolates são removidos dos moldes (LEITE et al., 2013; PRABHAKARAN, 2010).

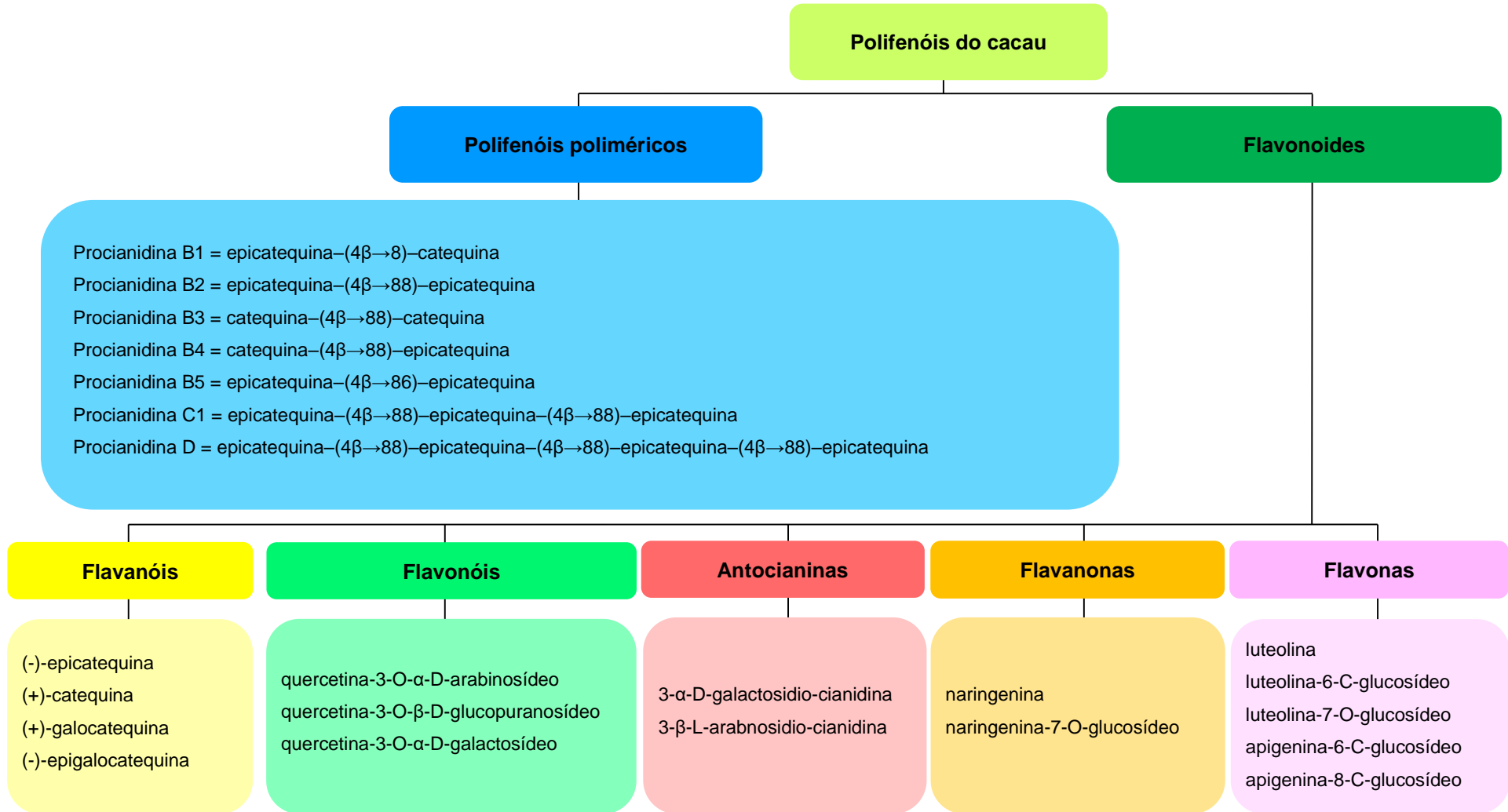
3.6 Compostos fenólicos em amêndoas de cacau

A importância de compostos naturais com capacidade antioxidante para a medicina preventiva vem sendo amplamente reconhecida nos últimos anos. Uma grande variedade de produtos vegetais possui moléculas orgânicas e fitoquímicas, chamadas de polifenóis ou compostos fenólicos. Tais moléculas têm sido foco de interesse em diversas pesquisas, devido as suas propriedades biológicas e farmacológicas (PAYNE et al., 2010; STALIKAS, 2007; NAZARUDDIN et al., 2006; WOLLGAST e ANKLAM, 2000), além de garantir características sensoriais próprias de muitos alimentos (LESSCHAEVE e NOBLE, 2005).

Os compostos fenólicos estão presentes em uma grande variedade de alimentos inseridos na dieta, como frutas, vegetais, cereais, óleo de oliva, legumes desidratados, vinho, café, chá e nas amêndoas de cacau e seus produtos (IOANNONE et al., 2015; D'ARCHIVIO et al., 2007; SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2000). O consumo de alimentos ricos nestes compostos está ligado à diminuição dos riscos de algumas doenças crônicas degenerativa como o câncer, doenças cardiovasculares e inflamações (TSAO, 2010; LESSCHAEVE e NOBLE, 2005) associadas ao stress oxidativo (D'ARCHIVIO et al., 2007). Recentes estudos mostraram que os fenólicos presentes em cacau possuem efeitos benéficos à saúde como antidepressivo (SMITH, 2013), efeito neuroprotetor (NEHLIG, 2013), cardioprotetor (ARRANZ et al., 2013), anticancerígeno (MARTIN, GOYA e RAMOS, 2013; LEE et al., 2010) e anti-inflamatório (VÁZQUEZ-AGELL et al., 2013).

A amêndoa do cacau e seus derivados possuem três principais grupos de compostos fenólicos, que incluem flavanóis (catequinas e epicatequinas), antocianinas, e proantocianidinas oligoméricas e poliméricas que contribuem para a formação do aroma característico dos produtos de cacau, além da grande capacidade antioxidante, como mostrado na Figura 4 (OLIVEIRA, ROGERO e JENOVESE, 2015; PAYNE et al., 2010; RUSCONI e CONTI, 2010).

Figura 4 – Polifenóis presentes na amêndoa de cacau.



Fonte: Adaptado de Caligiani, Marseglia e Palla, 2016; Wollgast e Anklam, 2000.

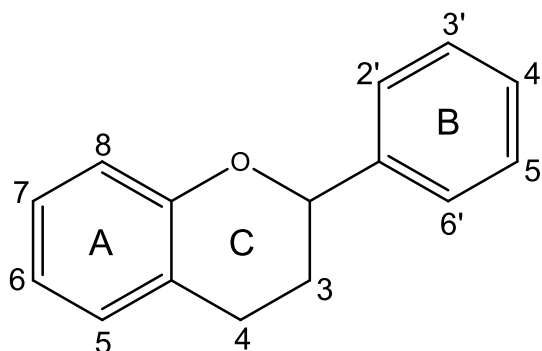
Do total de compostos fenólicos presentes na semente de cacau os flavanóis compreendem 37%, antocianinas 4% e proantocianidinas 58% (RAWEL e KULLING, 2007; NAZARUDDIN et al., 2006). Os níveis destes compostos são influenciados pela variedade, origem e, em especial, os processos de fabricação (KOTHE, ZIMMERMANN e GALENSA, 2013).

O efeito biológico dos fenólicos depende da biodisponibilidade (absorção, distribuição, metabolismo, e eliminação) destes compostos (MARTIN, GOYA e RAMOS, 2013; RAMIRO-PUIG e CASTEL, 2009). Diversos fatores podem influenciar na disponibilidade destes compostos no cacau, como por exemplo, a variedade da semente, manuseio pós-colheita e as condições de processamento (fermentação, secagem, alcalinização) (TALLON, 2015). Além da biodisponibilidade, a absorção é um fator importante em relação aos benefícios à saúde. Estudos em seres humanos sugerem que fenólicos presentes no cacau são em média absorvidos 5% da dose total ingerida (RICHELLE et al., 1999).

3.6.1 Flavonoides em sementes de cacau

Os flavonoides representam um grande grupo de compostos fenólicos classificados de acordo com o nível de oxidações verificadas em sua estrutura química (GOUVÊA, 2010; EFRAIM, ALVES e JARDIM, 2011). Estruturalmente, consistem de um esqueleto de 15 carbonos, representados por uma estrutura comum, $C_6-C_3-C_6$ (STALIKAS, 2007; STRINGHETA e BOBBIO, 2000), composta por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio formando um anel heterocíclico oxigenado, denominado anel C, conforme ilustrado pela Figura 5 (GOUVÊA, 2010).

A classe dos flavonoides possui uma grande diversidade de moléculas, que se diferem no grau de oxidação e do padrão de substituição no anel C, enquanto que os compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B (STALIKAS, 2007). Dentre estas e outras modificações, podemos citar a hidroxilação, metilação, glicosilação, acilação, polimerização (TERRIER, LEGRAND-PONCET e CHEYNIER, 2009) e a estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel heterocíclico (SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2000).

Figura 5 – Estrutura básica dos flavonoides.

Fonte: Valls et al., 2009.

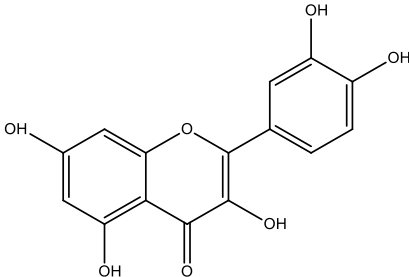
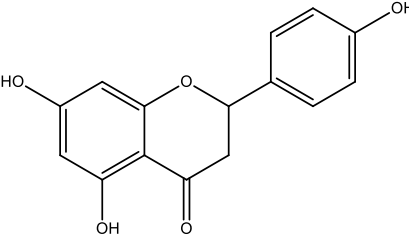
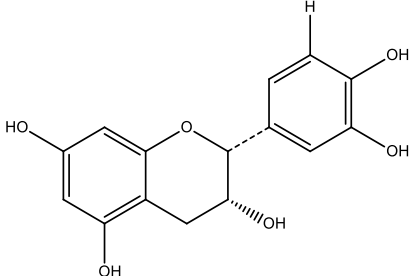
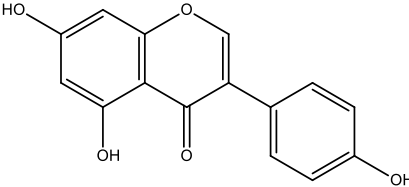
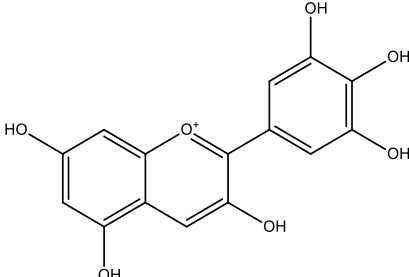
As principais classes de flavonoides incluem as flavanas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianidinas e antocianinas (XAVIER, 2004; COOK e SAMMAN, 1996), sendo que, todas são variações de uma mesma estrutura ao redor do anel heterocíclico, como demonstrado na Tabela 4 (PETERSON e DWYER, 1998).

Tabela 4 – Estruturas de alguns flavonoides.

Classe	Estrutura básica	Exemplos
Ácidos fenólicos		Ácido gálico
Estilbenos		Resveratrol
Flavonas		Apigenina

Continua

Conclusão

Flavonóis		Quercetina
Flavanonas		Naringenina
Flavanóis e Procianidinas		Epicatequina
Isoflavonoides		Genisteína
Antocianidinas		Delfinidina

Fonte: Adaptado de Valls et al., 2009.

A semente de cacau é uma rica fonte de flavonoides, particularmente flavanóis, como (-)-epicatequina e (+)-catequina, pequenas quantidades de (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, procianidinas e antocianinas (RAMIRO-PUIG e CASTEL, 2009;

WOLLGAST e ANKLAM, 2000; HAMMERSTONE et al., 1999). As etapas de processamento, tais como fermentação, secagem e tratamento alcalino influenciam no nível de flavonoides presentes no cacau (PAYNE et al., 2010; KIM e KEENEY, 1984).

Em um estudo realizado por Vinson et al. (1999), foram analisados os teores de flavonoides em cacau e seus produtos, por HPLC, usando uma coluna C8. Eles concluíram que tanto o cacau quanto os seus produtos contêm elevados níveis desses compostos, entretanto, níveis superiores foram encontrados para o *nibs* (VINSON ET AL., 1999). Diferenças nos teores de polifenóis entre o cacau e seus produtos podem ser devido às alterações ocorridas durante as etapas de beneficiamento e processamento anteriormente citadas, tais como a fermentação, secagem, torrefação, alcalinização, conchagem e temperagem que influenciam nos níveis de flavonoides presentes no cacau.

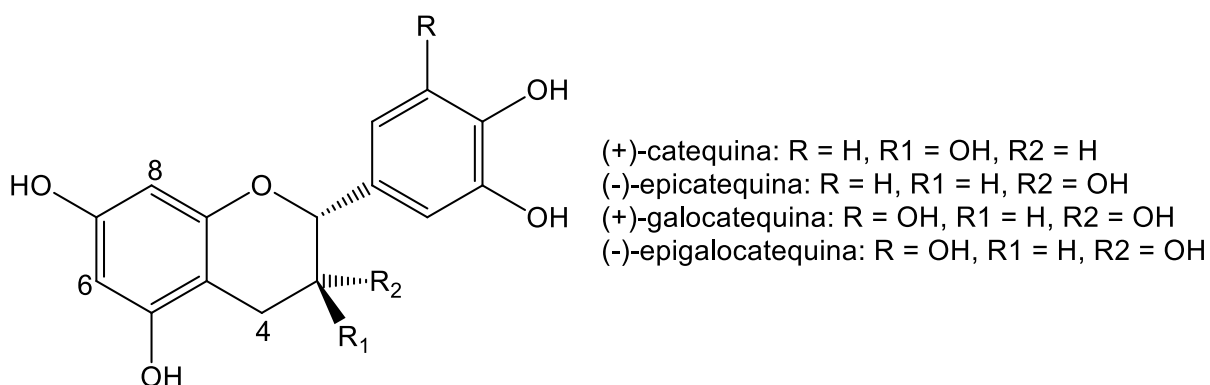
3.6.1.1 Flavanóis

As catequinas e epicatequinas (flavanóis) são compostos fenólicos que podem ser encontrados em uma grande variedade de produtos naturais como cacau, chás e pêssego (GADKARI e BALARAMA, 2013). São produtos da via de biossíntese de antocianinas (XIE e DIXON, 2005) e diferentemente de outros flavonoides, não há ligações duplas entre C₂ e C₃, e nenhuma carbonila no C₄. Também possuem dois centros quirais, localizados nas posições C₂ e C₃ do anel C da molécula (Figura 7) (KOTHE, ZIMMERMANN e GALENSA, 2013; TSAO, 2010; GROTWOLD, 2006). Catequinas e epicatequinas são reconhecidas por sua capacidade sequestrante sobre radicais livres como hidroxil, peroxil, superóxido e 2,2-difenil-2-picrilidazil (DPPH) (YILMAZ, 2006).

Catequinas e epicatequinas possuem dois estereoisômeros distintos, sendo que as catequinas possuem uma isomeria geométrica *trans*, enquanto que as epicatequinas, uma isomeria do tipo *cis* (TSAO, 2010). A partir da Figura 6 é possível notar a isomeria 2,3-*cis* da epicatequina e a isomeria 2,3-*trans* da catequina. Estas diferenças são de grande importância para a biossíntese de proantocianidinas (GADKARI e BALARAMA, 2013), uma vez que, todos os intermediários quirais na via dos flavonoides são aparentemente de isomeria 2,3-*trans* e, no entanto, a unidade

mais comum em procianidinas é a isomeria 2,3-*cis* da (-)-epicatequina (DIXON, XIE e SHARMA, 2005).

Figura 6 – Estrutura dos flavanóis e seus grupos de substituição.



Fonte: Valls et al., 2009.

Alguns constituintes funcionais de cacau com efeitos benéficos à saúde humana foram relacionados com os teores de flavanóis monoméricos como as catequinas e epicatequinas (RUSCONI e CONTI, 2010). Foi demonstrado que a (-)-epicatequina, principal flavanol do cacau, diminuiu a resistência à insulina em células hepáticas (CORDERO-HERRERA et al., 2014), na diminuição dos sintomas de hiperlipidemia, hepatite (CORDERO-HERRERA et al., 2015), beneficiando o sistema de defesa em células hepáticas (HepG2) (GRANADO-SERRANO et al., 2007) e na redução dos riscos cardiovasculares (GRASSI, DESIDERI e FERRI, 2010).

Em um estudo foi observado que a concentração de compostos fenólicos por grama de amostra estava na faixa de 45 – 52 mg em licor de cacau, 34 – 60 mg na amêndoa e 20 – 62 mg em cacau em pó. Para a (-)-epicatequina, em média, 3,81 mg em cacau em pó, 2,53 mg em licor de cacau e 4,61 mg na amêndoa de cacau (NAZARUDDIN et al., 2001). Foi realizado um outro estudo de polifenóis em licor de cacau provenientes de diferentes países, utilizando três técnicas cromatográficas (fase normal, reversa e reversa com espectrometria de massa). Os resultados para este experimento estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Níveis de polifenóis em licor de cacau provenientes de diferentes países, expressos em porcentagem (%).

Licor de cacau	Origem					
	Equador	Venezuela	Gana	Colômbia	Costa Rica	Brasil
Polifenóis totais	4,11	1,55	2,93	1,20	3,13	6,04
FN ^I						
Monômeros	0,366	0,106	0,249	0,113	0,230	1,132
Dímeros	0,295	0,087	0,185	0,076	0,178	0,788
Trímeros	0,344	0,125	0,215	0,098	0,233	0,787
Tetrâmeros	0,260	0,101	0,184	0,043	0,241	0,576
FR ^{II}						
Catequina	0,040	0,014	0,027	0,020	0,017	0,063
Epicatequina	0,227	0,074	0,137	0,059	0,125	0,577
RE ^{III}						
Procianidina B2	0,124	0,034	0,058	0,024	0,061	0,197
Procianidina C1	0,080	0,026	0,041	0,012	0,053	0,151

^IFase normal; ^{II}Fase reversa; ^{III}Fase reversa com espectrometria de massa.

Fonte: Natsume et al., 2000.

A partir deste estudo é possível observar que houve variação substancial dos compostos fenólicos entre as amostras avaliadas, com destaque para a amostra advinda do Brasil, obtendo valores mais elevados quanto aos teores de polifenóis em relação aos valores obtidos pelas amostras dos outros países incluídos na pesquisa. Esta diferença pode ser influenciada pelas condições edafoclimáticas, bem como, pelas diferentes técnicas utilizadas no processo fermentativo (NATSUME et al., 2000).

É evidente que os flavanóis funcionam como antioxidantes potentes e podem apresentar diversas propriedades benéficas à saúde. Produtos ricos em flavanóis têm sido amplamente explorados no campo dos nutracêuticos e suplementos dietéticos, enquanto extratos de cacau estão se tornando extremamente populares para a produção de alimentos funcionais. Além disso, os flavanóis determinam a adstringência e amargor de diversos produtos, como em vinho e chocolate. Dessa forma, o desenvolvimento de novas técnicas de isolamento e identificação destes compostos pode contribuir para uma melhor compreensão destes efeitos.

3.6.1.2 Procianidinas

As procianidinas são compostos fenólicos responsáveis por diversas propriedades e características em diversos alimentos presentes em nossa alimentação. Dentre as propriedades das procianidinas em alimentos podemos citar, o desenvolvimento da adstringência em vinhos, o sabor amargo do chocolate, se constitui um substrato para as reações de escurecimento em frutas (GONZÁLEZ-GALEGO et al., 2010), além das propriedades antioxidantes (HAN et al., 2015; COUNET e COLLIN, 2003), anticarcinogênicas (WANG et al., 2006), imunológicas (LIN et al., 2002), anti-inflamatórias (DIOUF, STEVANOVIC e CLOUTIER, 2009), antimutagênica e anti-herpética (CAON et al., 2014).

Procianidinas são polímeros de flavanóis, como catequinas e epicatequinas, formados a partir de uma clivagem catalisada por ácidos das cadeias poliméricas, das quais as unidades são unidas por ligações C→C, e ocasionalmente, por ligações C→O→C no anel heterocíclico, tendo como flavanóis mais comuns na formação das procianidinas as catequinas e epicatequinas (TSAO, 2010; RAWEL e KULLING, 2007; GU et al., 2006; DIXON, XIE e SHARMA, 2005; CHEYNER, LABARBE e MOUTOUNET, 2001; SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2000)

As procianidinas são classificadas como A, B e C, sendo diferenciadas de acordo com a posição da ligação e o número de unidades de flavanóis em sua estrutura (TSAO, 2010). Procianidinas formadas pela união de dois flavanóis, ligados pelos C₄-C₈ ou pelos C₄-C₆ são chamadas de procianidinas tipo B. A mesma configuração é observada para procianidinas tipo C, no entanto, este tipo de procianidinas é formada pela união de três unidades de flavanóis. Procianidinas tipo A podem ser formadas pela ligação de três ou mais unidades de flavanóis, contudo, possuem uma ligação éter (C₂-O-C₇ ou C₂-O-C₅) entre duas unidades de flavanóis (ESATBEYOGLU, WRAY e WINTERHALTER, 2015; GU et al., 2004; GU et al., 2002).

As duas principais formas de procianidinas presentes em amêndoas de cacau, segundo a literatura, são as do tipo B, sendo as procianidinas B1, B2 e B5 majoritárias, que se diferem somente quanto ao arranjo das unidades de catequina e epicatequina em sua estrutura (RAMIRO-PUIG e CASTEL, 2009; RAWEL e KULLING, 2007; XIE e DIXON, 2005). Além disso, a ocorrência das procianidinas C1 e a procianidinas A2 também é descrita na literatura (RUSCONI e CONTI, 2010; WOLLGAST e ANKLAM,

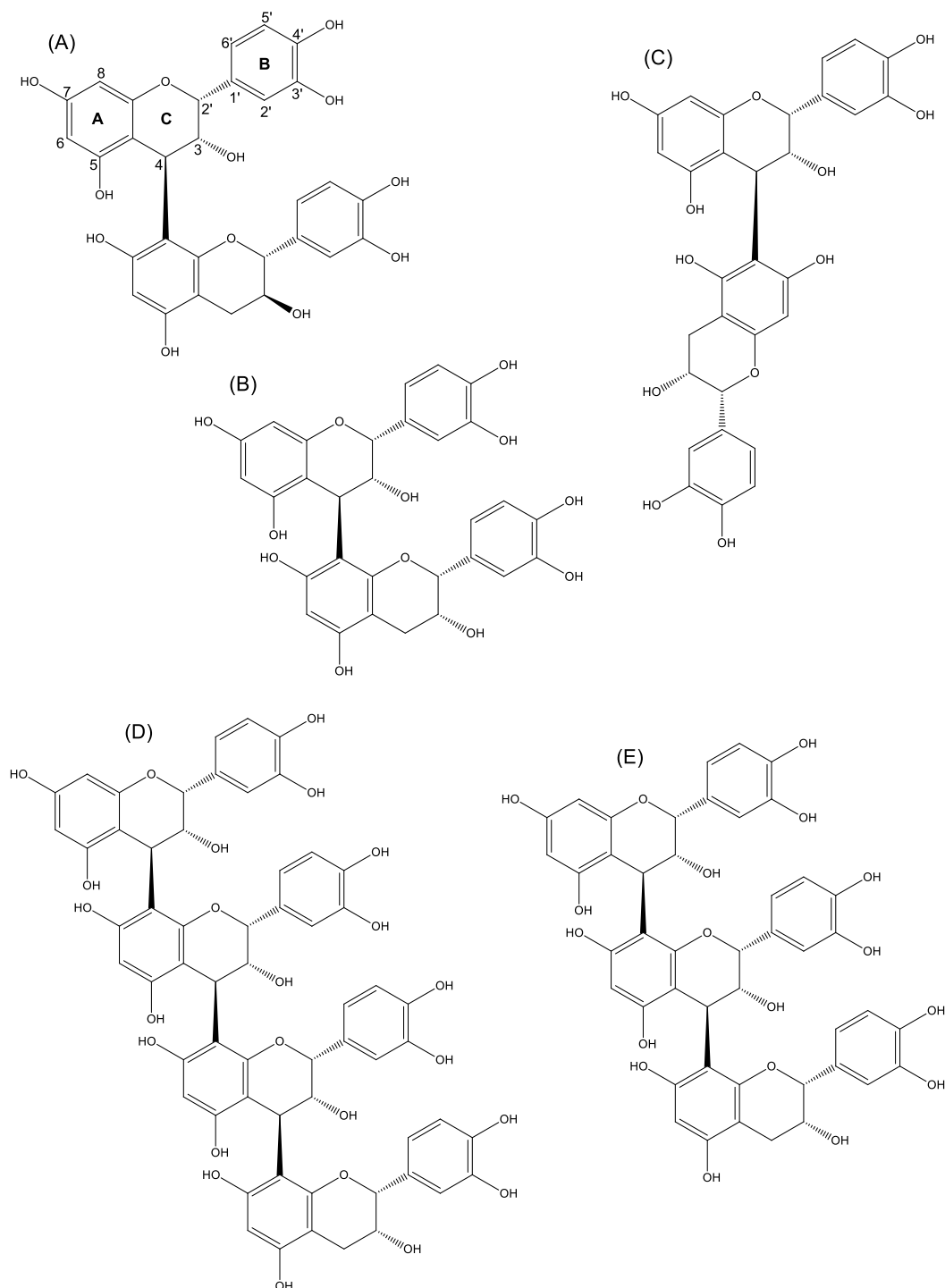
2000). A Figura 7 mostra as estruturas químicas das procianidinas presentes em amêndoas de cacau.

Estudos demonstram que o grau de polimerização das procianidinas variam largamente de acordo com a espécie, tecido e o método de extração (MATTHEWS et al., 1997), visto que o número de unidades de monômeros têm influência significativa na capacidade antioxidante da molécula (COUNET e COLLIN, 2003). O grau de polimerização pode descrever o peso e o tamanho da molécula das procianidinas (GU et al, 2004; GU et al., 2006). Estas podem ser definidas como monômeros constituídos apenas por uma unidade de flavanol; oligoméricas constituídas por 2 a 10 unidades de flavanóis e poliméricas, constituídas por mais de 10 unidades de flavanóis (HAMMERSTONE et al., 1999; GU et al., 2002).

Em um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do número de unidades de flavanóis sobre a atividade antioxidante das procianidinas em amêndoas de cacau, os resultados claramente confirmaram que procianidinas de longas cadeias possuem melhores índices de capacidade antioxidante (COUNET e COLLIN, 2003). Oligômeros de procianidinas foram quantificados em cacau, usando CLAE em fase normal de acordo com seu grau de polimerização. Este estudo demonstrou que a amêndoa de cacau e seus produtos contém uma quantidade substancial de procianidinas e é uma excelente fonte de compostos antioxidantes (GU et al., 2006).

Diversos estudos têm focado na avaliação de compostos fenólicos como as procianidinas, no entanto, estes compostos possuem uma fraca solubilidade devido a reações químicas secundárias com matrizes insolúveis como açúcares e proteínas, garantindo várias dissolubilidades tornando a extração difícil. Além disso, estes compostos são susceptíveis à oxidação pela luz, temperatura e condições alcalinas, dificultando ainda mais a extração (GADKARI e BALARAMAN, 2013).

Figura 7 – Estrutura química das procianidinas B1 (A), B2 (B), B5 (C), procianidina tetramérica A2 (D), e procianidina trimérica C1 (E).



Fonte: Esatbeyoglu, Wray e Winterhalter, 2015.

As procianidinas de baixo peso molecular são compostos solúveis em frações polares, como solventes orgânicos e alcóolicos, sendo os mais utilizados o metanol, etanol e água destilada. Entretanto, estes mesmos solventes não conseguem extrair

eficientemente procianidinas de alto peso molecular (GU et al, 2004). Isto pode ser um fator significativo para erros experimentais durante ensaios com intuito de avaliar a capacidade antioxidante ou teores de compostos fenólicos totais em frações utilizando estes solventes.

Apesar da dificuldade observada na extração convencional de compostos fenólicos, métodos sensíveis e específicos estão sendo utilizados para o fracionamento e identificação de procianidinas com precisão da concentração e o grau de polimerização destes compostos. Uma cromatografia líquida de alta eficiência com espectrofotometria de massa (CLAE/MS) foi capaz de separar e identificar procianidinas presentes em cacau e chocolate com base no grau de polimerização (HAMMERSTONE et al., 1999). Mais recentemente, procianidinas de diversos graus de polimerização (B1, B2, B5, B7 e C1) foram isoladas por várias técnicas de cromatografia, em amêndoas de cacau fermentadas, sendo elucidadas as estruturas utilizando uma espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) (ESATBEYOGLU, WRAY e WINTERHALTER, 2015).

3.6.1.3 Antocianidinas

As antocianidinas compreendem um grupo de flavonoides que possuem absorvância específica na região do visível. A estrutura das antocianidinas consistem de um anel aromático ligado a um anel heterocíclico condensado por um oxigênio, o qual está ligado a outro anel aromático por meio de uma ligação C→C. Estas características configuram a estrutura fundamental dos flavonoides, o cátion flavílico ou 2-fenilbenzopirilium (STRINGHETA e BOBBIO, 2000; FRANCIS, 1989; GUISTI e WROLSTAD, 2004; TERRIER, LEGRAND-PONCET e CHEYNIER, 2009).

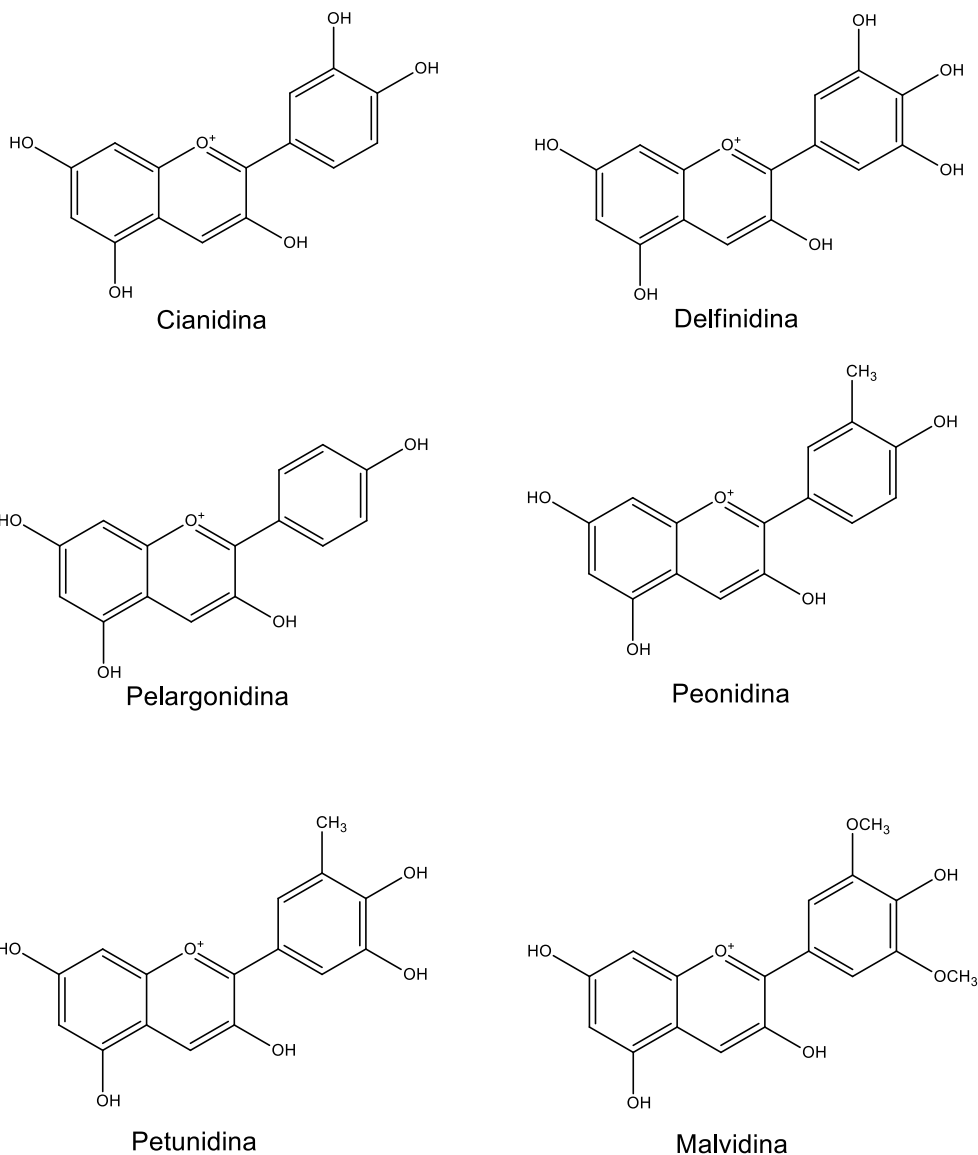
Naturalmente, as antocianidinas estão ligadas a moléculas de açúcares, se constituindo uma antocianina (ALBARICI, PESSOA e FORIM, 2006). As antocianinas compõem mais um subgrupo dos flavonoides, representando um largo grupo de pigmentos naturais hidrossolúveis (BRIDLE e TIMBERLAKE, 1997; CONSTANT, 2003; TANWAR e MODGIL, 2012) e são responsáveis por uma variedade de cores em tecidos vegetais (TEIXEIRA, STRINGHETA e OLIVEIRA, 2008; ALBARICI, PESSOA e FORIM, 2006; KIRCA, OZKAN e CEMEROGLU, 2006; CONSTANT, 2003; COOK e SAMMAN, 1996;).

As antocianinas, diferentemente de outros flavonoides, são capazes de absorver fortemente luz na região visível do espectro (STRINGHETA e BOBBIO, 2000), conferindo uma infinidade de cores entre laranja, vermelho, púrpura e azul, dependendo do meio em que se encontrem (TANWAR e MODGIL, 2012; BROUILLARD, 1982).

Diferindo de acordo ao grau de hidroxilação e metilação, em diferentes posições dos anéis, há cerca de 25 tipos de antocianidinas identificadas na natureza. Entretanto, somente seis destas são comumente encontradas em alimentos, e aproximadamente 95% de todas as antocianinas são derivadas destas antocianidinas, são elas: cianidina, peonidina, pelargonidina, malvinidina, delphinidina e petunidina (TANWAR e MODGIL, 2012; LIMA et al., 2011; TSAO, 2010; HE e GIUSTI, 2010), como ilustrado na Figura 8.

A indústria de alimentos tem utilizado largamente as antocianinas como corantes alimentícios, devido ao amplo espectro de cores, bem como sua grande capacidade colorante (WALLACE e GIUSTI, 2011) graças aos seus grupos cromóforos, compostos por 8 ligações duplas conjugadas. Em condições ácidas, a molécula da antocianina se torna eletricamente positiva (HE e GIUSTI, 2010), possibilitando a absorção da luz na região do visível entre 450 e 550 nm (WROLSTAD, 1993).

Devido aos grupos polares presentes nos anéis aromáticos de sua estrutura química, como hidroxilas, carboxilas e metoxilas, as antocianinas tendem a ser mais solúveis em solventes polares (TSAO, 2010; WOLLGAST e ANKLAM, 2000). A presença de hidroxilas na estrutura química da antocianidina poderá ser substituída por glicosídeos, que podem se ligar a outras unidades de glicosídeos a partir de ligações glicosídicas ou com ácidos orgânicos acilados através de ligações éster (MONAGA e BARTOLOMÉ, 2009). No entanto, as glicosilações afetam as características químicas e físicas das antocianinas, podendo modificar o tamanho molecular e, conseqüentemente, a polaridade da molécula. A glicosilação tende a aumentar a solubilidade em água, ao passo que acilações decrescem esta solubilidade (TSAO, 2010; HE e GIUSTI, 2010; WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

Figura 8 – Estruturas químicas de algumas antocianidinas.

Fonte: Adaptado de He e Giusti, 2010; Valls et al., 2009.

A estrutura das antocianinas influencia suas propriedades químicas, sua solubilidade, cor, efeitos de copigmentação, reatividade e suas propriedades antioxidantes (VALLS et al., 2009). A Tabela 6 mostra as diferentes substituições na estrutura química das antocianinas mais comuns na natureza, que influenciam diretamente na cor e na faixa de absorvância.

O núcleo flavílico das antocianinas é caracterizado por uma estrutura de ressonância responsável pela forte reatividade e os seus grupos funcionais adjacentes, influencia diretamente na sua estabilidade (ALBARICI, PESSOA e FORIM, 2006). Além de estar relacionada à polaridade da antocianina, as

glicosilações melhoram a estabilidade molecular pela formação de uma rede de ligações de átomos de hidrogênio no interior da antocianidina (HE e GUISTI, 2010). Por este fato, a forma estrutural da antocianidina, ou aglicona, é raramente encontrada na natureza, devido a sua baixa estabilidade pela ausência de glicosilações.

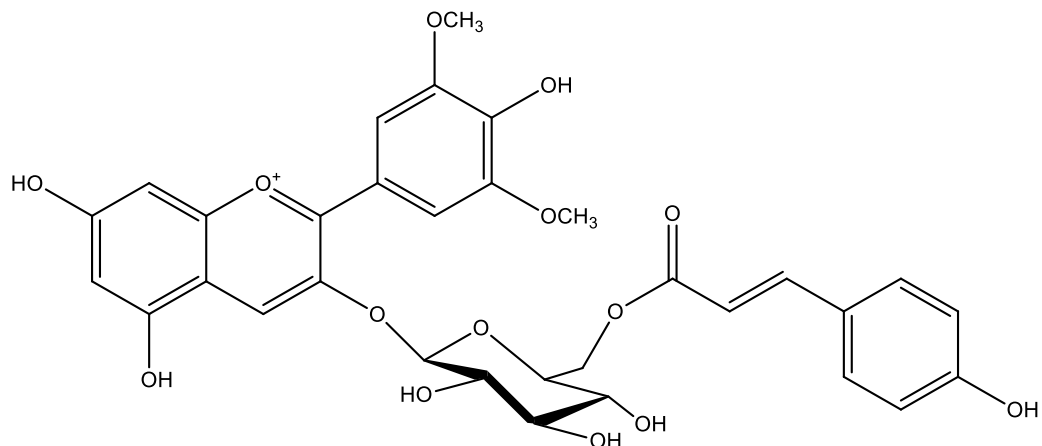
Tabela 6 – Diferenças na estrutura química, coloração e absorbância das antocianidinas mais comumente encontradas na natureza.

Antocianidina	Grupos de substituição		Cor	Absorbância (nm)
	R ₁	R ₂		
Cianidina	OH	H	Magenta	535
Peonidina	OCH ₃	H	Magenta	532
Pelargonidina	H	H	Vermelha	520
Malvinidina	OCH ₃	OCH ₃	Roxa	542
Delfinidina	OH	OH	Roxa	546
Petunidina	OCH ₃	OH	Roxa	543

Fonte: Adaptado de He e Guisti, 2010.

Os açúcares mais comumente encontrados ligados às procianidinas são a glicose e a ramnose (GONZALEZ-GALLEGO et al., 2010). No entanto, outros açúcares também podem estar ligados à estrutura química das antocianidinas, como por exemplo, a galactose, arabinose, xilose e rutinose. Assim, diversos tipos de glicosídeos podem se ligar à molécula de antocianidina, como também um grande número de substituições nos anéis aromáticos pode ocorrer, garantindo uma larga variabilidade de estruturas químicas de antocianinas (SHAO e BAO, 2015; VALLS et al., 2009; HE e GUISTI, 2010; WOLLGAST e ANKLAM, 2000). A Figura 9 apresenta a estrutura química de uma malvinidina-3-glicosídeo.

Figura 9 – Estrutura química de uma antocianina acilada (malvinidina–3–glicosídeo).

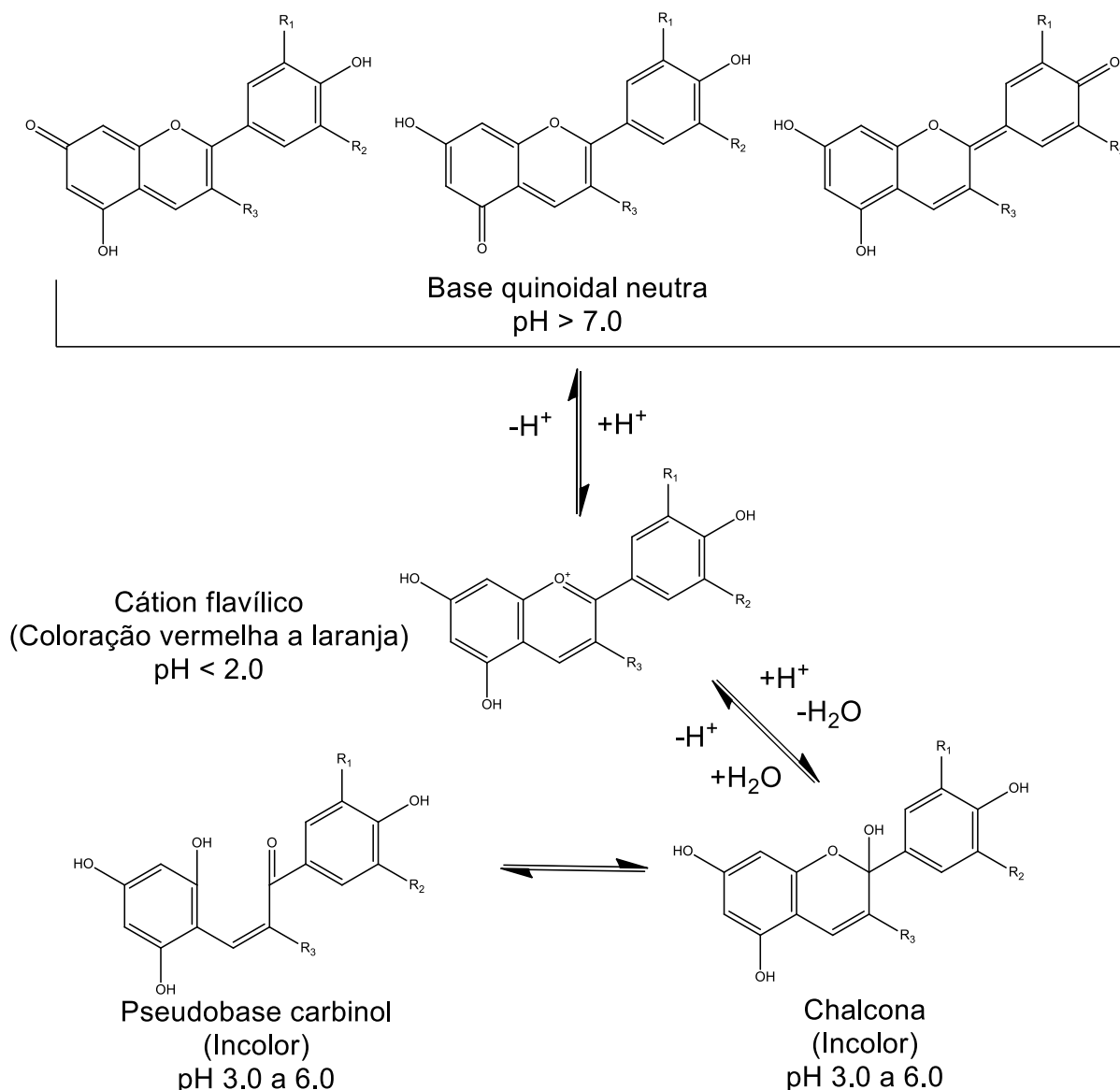


Fonte: He e Guisti, 2010; Valls et al., 2009.

Além da influência sobre a cor, o número de substituições na cadeia das antocianinas reflete nas propriedades antioxidantes deste composto (JANEIRO e BRETT, 2007; KIRKA, OZKAN e CEMEROGLU, 2006; JANEIRO e BRETT, 2007; KIRKA, OZKAN e CEMEROGLU, 2006; WOLLGAST e ANKLAM, 2000). Esta característica tem sido de grande interesse para a indústria, se tornando uma alternativa viável para a substituição de corantes sintéticos. Uma desvantagem importante da aplicação de corantes de naturais está em sua instabilidade a diversos parâmetros como luz, calor e pH (SILVA, 2001).

De acordo com o pH, em meio aquoso, as antocianinas podem assumir diferentes conformações em sua estrutura (STALIKAS, 2007). Em valores de pH inferiores a 2,0, antocianinas mantêm-se na forma de cátion flavílico, de coloração prevalentemente vermelha (WOLLGAST e ANKLAM, 2000). Com o aumento do pH, ocorre uma rápida hidratação no C₂ do cátion flavílico, propiciando a formação da base carbinol, de característica incolor (SHAO e BAO, 2015; HE e GUISTI, 2010). É uma transformação reversível, no entanto, a reconversão da base carbinol para a forma de cátion flavílico é um processo vagaroso e gradual (FRANCIS, 1989). O esquema da conversão estrutural das antocianinas está ilustrado na Figura 10.

Figura 11 – Esquema da conversão estrutural das antocianinas dependente do pH.



Fonte: He e Guisti, 2010.

Dessa forma, a instabilidade à luz, calor e pH é um fator determinante para a susceptibilidade às reações químicas de degradação, limitando a aplicação efetiva dos corantes antociânicos (STALIKAS, 2007; WROLSTAD, 2004). Entretanto, antocianinas têm sido estudadas a muito tempo visando detectar os limites de susceptibilidades a esses parâmetros, que certamente contribuirão para a de sua aplicação na indústria de alimentos graças ao seu alto poder tintorial, garantindo um amplo espectro de cores (WALLACE e GIUSTI, 2011; SILVA, 2001).

Guo e Xia (2014) e Meyer et al. (1997) demonstram que houve um aumento constante no desenvolvimento de corantes alimentares naturais e fontes de alimentos funcionais no decorrer dos anos. Este aumento não só foi devido às preferências dos consumidores por pigmentos naturais, mas também para seus benefícios a saúde e suas propriedades nutracêuticas, como por exemplo, na redução do risco de diabetes tipo 2 (LIU et al., 2014), doença cardíacas (XAVIER, 2004), câncer e derrames (WROLSTAD, 2004). Amêndoas de cacau são fontes de antocianidinas, como 3- β -galactosil-cianidina e 3- α -L-arabinosil-cianidina. Durante a fermentação, estes pigmentos são hidrolisados por glicosidases resultando em um branqueamento dos cotilédones (FORSYTH e QUESNEL, 1957).

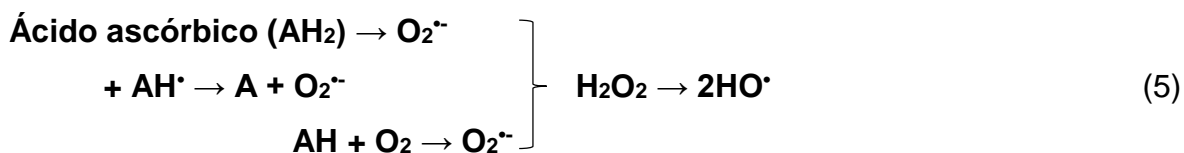
Uma das primeiras investigações relacionadas à descoberta de qual pigmento estaria presente na semente de cacau foi realizada por Lawrence et al. (1938). Eles afirmaram que o pigmento presente na semente de cacau se tratava de uma cianidina-3-monosídeo. Mais investigações foram feitas por Forsyth (1952), quem separou dois glicosídeos e traços de uma cianidina-3-diglicosídeo em cotilédones da variedade do grupo Forastero. Em seu outro estudo, Forsyth e Quesnel (1957) identificaram, conclusivamente, os pigmentos da semente do cacau como uma cianidina-3-galactosídeo (majoritária) e uma cianidina-3-arabnosídeo em menores teores (LIMA et al., 2011; TIMBERLAKE e BRIDLE, 1982).

3.7 Métodos de determinação da capacidade antioxidante

Diversos métodos são utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante de materiais biológicos. Os mais comumente empregados graças à facilidade, rapidez e sensibilidade são aqueles que envolvem compostos cromógenos de natureza radical como forma de simular espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ARNAO, 2001). Entre os diversos compostos cromógenos que são utilizados para determinar a capacidade antioxidante de compostos fenólicos estão o radical DPPH^{*} (2,2– difenil–1–picrilhidrazil) e o ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

Tais ensaios são baseados em mecanismo de reação de transferência de átomos conhecidos como Transferência de um Elétron (*Single Electron Transfer – SET*) e Transferência de Átomo de Hidrogênio (*Hydrogen Atom Transfer – HAT*) (Tabela 7) (HUANG, OU e PRIOR, 2005). Os esquemas 1 e 2 mostram o mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio para o radical (HAT), enquanto que os

esquemas 3, 4 e 5 mostram o mecanismo de transferência de um ou mais elétrons para os radicais alvo (SET). Alguns compostos que autoxidam, como o ácido cítrico (esquema 5) e outros fenóis, podem reduzir o oxigênio para $O_2^{\cdot-}$, que entram na composição do meio reacional (XIE e SCHAICH, 2014).



Onde: ROO^{\cdot} – radical peroxil; $ROOH$ – radical peroxil inativado; AH^{\cdot} – antioxidante doador de H; A^{\cdot} – produto não-radical; $FenOH$ – composto fenólico (SCHAICH, TIAN e XIE, 2015).

Em ambos os mecanismos citados o intuito é determinar a capacidade antioxidante da amostra frente aos radicais livres, no entanto, se diferem quando à cinética de reação, o radical iniciador e os sítios de reação (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005). Dessa forma, é necessária a utilização de mais de um protocolo para a determinação da capacidade antioxidante, uma vez que polifenóis podem desempenhar múltiplas atividades dependendo do meio de reação (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

A maioria das reações antioxidantes não enzimáticas (sequestro de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica) são mediadas por reações redox (APAK et al., 2016). Os ensaios baseados na transferência de elétrons envolvem uma reação redox com o oxidante como indicador do ponto final da reação. Para ensaios baseados na transferência de hidrogênio é monitorada a cinética de reação, e a quantificação é obtida a partir de curvas cinéticas (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Tabela 7 – Ensaio de capacidade antioxidante *in vitro* e seu mecanismo de reação.

<i>Ensaio envolvendo reações de transferência de átomos de hidrogênio (HAT)</i>	$(1) \text{ROO}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}^\bullet$	ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>); TRAP (<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>); Inhibition of Linoleic Acid Oxidation Inhibition of LDL Oxidation.
<i>Ensaio envolvendo reações de transferência de elétrons</i>	$(2) \text{M}_{(n)} + \text{e}^- \rightarrow \text{AH}^\bullet + \text{M}_{(n-1)}$	FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>); DPPH [•] (2,2–difeníl–1–picrilhidrazil); Fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu; TEAC (<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>).

⁽¹⁾ ROO[•]: radical peróxido; AH: antioxidante; ROOH: radical inibido; A[•]: produto não radical.

⁽²⁾ M_(n): oxidante; e⁻: elétron derivado do antioxidante; AH[•]: sonda oxidada; M_(n-1): antioxidante oxidado.

Fonte: Adaptado de Huang, Ou e Prior, 2005.

Com uma rápida pesquisa na literatura é possível perceber que os ensaios envolvendo reações de transferência de elétrons são mais comumente utilizados, possivelmente, devido à facilidade de execução do método. Nestes métodos, o meio reacional é basicamente constituído por dois componentes: antioxidante e oxidante; onde o oxidante induz um elétron do antioxidante, fomentando alterações da cor do oxidante. Dessa forma, o grau de alteração da cor é proporcional à concentração de antioxidantes no meio reacional.

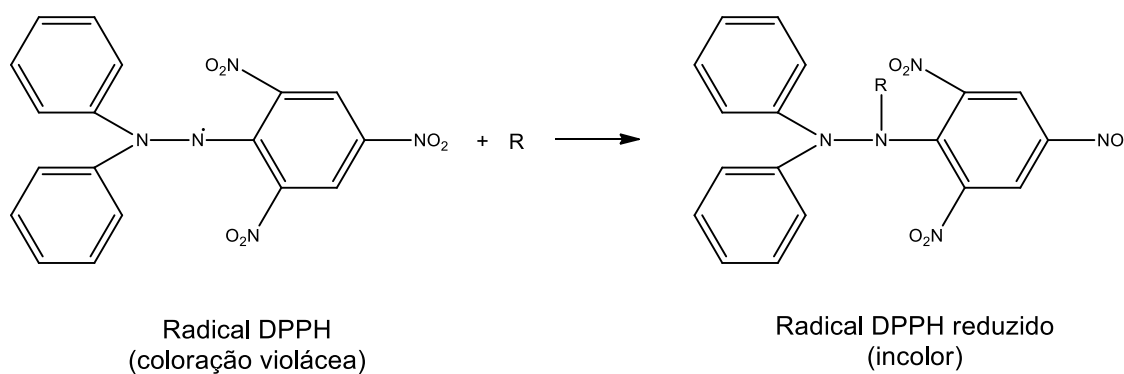
3.7.1 Método do radical livre DPPH[•] (2,2–difeníl–1–picrilhidrazil)

O DPPH[•] é um radical estável, caracterizado por uma coloração púrpura intensa e absorvância de 515 – 520 nm (ARNAO, 2001). O método do radical DPPH[•] foi

primeiramente mencionado por Blois (1958), quem observou que o radical foi reduzido por um tiol de cisteína e outros compostos bioativos. Depois, Brand–Williams, Cuvelier e Berset (1995), revisaram a metodologia e o ensaio de sequestro do radical DPPH• se tornou uma referência para a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*.

Entre os inúmeros ensaios adotados para determinar a capacidade antioxidante, o ensaio DPPH• tornou-se um método muito popular (PEDAN, FISCHER e ROHN, 2015), uma vez que o ensaio DPPH• é tecnicamente simples e necessita somente de um espectrofotômetro, com leitura na região do visível, para sua realização (SÁNCHEZ–MORENO, LARRAURI e SAURA–CALIXTO, 1998). A Figura 11 ilustra o mecanismo do ensaio radical DPPH•, onde, na presença de um antioxidante, a absorvância é reduzida, promovendo a descoloração da solução contendo o radical DPPH•, sendo que quanto maior a concentração de antioxidante, mais rápida e mais perceptível será a descoloração, bem como, a redução da absorvância.

Figura 11 – Mecanismos de reação entre o radical DPPH• (2,2–difênil–1–picrilhidrazil) e um antioxidante por meio da transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: Brand–Williams, Cuvelier e Berset, 1995.

O ensaio radical DPPH é muito parecido com o ensaio do radical ABTS^{•+} (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), no qual são conhecidos dois mecanismos de reação que ocorrem na determinação da capacidade antioxidante por estes ensaios (SCHAICH, TIAN e XIE, 2015). Um dos mecanismos se caracteriza pela transferência de um átomo de hidrogênio e o outro pela transferência de elétrons (HUANG, OU e PRIOR, 2005), ambos resultam da redução do radical em estudo (OLIVEIRA, ROGERO e GENOVESE, 2015). Os esquemas 6 e 7 mostram os

mecanismos citados, sendo que, o principal mecanismo de reação do ensaio radical DPPH[•] ocorre pela transferência de elétrons, uma vez que, a transferência de átomos de hidrogênio é reversível (HUANG, OU e PRIOR, 2005; BRAND–WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).



Onde: DPPH[•] – radical livre 2,2–difênil–1–picrilhidrazil; DPPH-H – radical livre 2,2–difênil–1–picrilhidrazil inativado; AH[•] – antioxidante doador de H; A[•] – produto não radical (BRAND–WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

Diversos fatores podem influenciar o método e a interpretação dos dados experimentais, tais como o solvente de reação, pH, luz, tempo de reação, concentração do radical e composição química da amostra (SHARMA e BHAT, 2009). Por exemplo, o radical DPPH[•] só pode ser dissolvido em solventes orgânicos, sendo o metanol e o etanol mais utilizados, permitindo uma reação rápida com a maior parte dos compostos fenólicos (PEDAN, FISCHER e ROHN, 2015). No entanto, esta limitação tem levado a muitas discussões em relação à utilização do ensaio radical DPPH[•] para a determinação da capacidade antioxidante de frações hidrofílicas (ARNAO, 2001).

Diante disso, é possível observar diversas modificações ou adaptações do método radical DPPH na literatura, sendo evidente a utilização de diferentes solventes, concentrações, tempo de reação, absorvâncias e material estudado por diversos pesquisadores. A Tabela 8 mostra as modificações realizadas por diversos autores em diferentes materiais biológicos.

Tabela 8 – Modificações do ensaio radical DPPH utilizadas por diversos autores e em diferentes materiais biológicos.

Concentração de DPPH (mM)	Tempo (minutos)	Quantidade de DPPH (mL)	Solvente	Absorbância (nm)	Autores
0,06	120	3,0	Metanol	515	Catillano et al. (2012)
0,09	60	1,9	Metanol	517	Belscak et al. (2009)
0,06	10	3,0	Metanol	515	Chomnawag et al. (2007)
0,10	20	0,7	Metanol	515	Arlorio et al. (2008)
0,06	60	3,5	Metanol/água	515	Gallegos-Infante et al. (2013)
0,01	60	3,9	Metanol	517	Moreira et al.(2012)
0,50	60	0,1	Etanol	517	Itoh et al. (2008)
0,06	16	2,0	Metanol	517	Katalinic et al. (2004)
0,12	30	7,8	Metanol	517	Zyzelewicz et al. (2016)
0,09	30	3,9	Acetona/água	515	Ribeiro et al. (2014)
0,01	30	1,0	Metanol	516	Folashade et al. (2013)
0,06	15	3,9	Metanol	515	Oliveira e Genovese (2013)
0,06	60	3,9	Clorofórmio/metanol	517	Corcuera et al. (2012)
0,01	30	1,0	Metanol	517	Yu et al. (2007)
0,06	60	2,8	Metanol	515	Martinez et al. (2012)
0,06	30	2,9	Metanol	517	León-Zapata et al. (2015)
0,06	60	2,8	Metanol	525	Todorovic et al. (2015)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tempo de reação e tipo de solvente utilizados são parâmetros determinantes para a precisão do ensaio do radical livre DPPH[•], visto que, a intensidade de inibição é influenciada pela solubilidade do radical ao solvente utilizado no meio reacional (SHARMA e BHAT, 2009). A intensidade de inibição do radical DPPH[•] foi avaliada por Sanchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998), e classificaram o comportamento da cinética de inibição do composto antioxidante de acordo o tempo de reação, como rápida (<5 minutos), intermediária (5 – 30 minutos) e lenta (>30 minutos).

O termo mais utilizado para expressar os resultados está na forma de “porcentagem de inibição do radical DPPH[•]”, (I%) calculado segundo a fórmula: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100$, onde Abs₀ representa a absorvância do controle e Abs₁ a absorvância na presença do composto antioxidante (MIRANDA et al., 2015). No entanto, um parâmetro denominado IC₅₀ tem sido mais apropriado, sendo definido como a concentração de substrato necessária para a redução de 50% do total do radical livre DPPH[•]. Este parâmetro é amplamente utilizado para comparar amostras exibindo diferentes propriedades antioxidantes, independente da diferença da concentração entre os substratos (LOCATELLI et al., 2009).

Ainda que o ensaio do radical DPPH[•] seja largamente adotado, a dificuldade da padronização dos resultados faz com que seja difícil a comparação da capacidade antioxidante entre diferentes amostras. Diante disso, Scherer e Godoy (2009), propuseram uma forma de expressar a capacidade antioxidante, considerando a massa do DPPH[•] (µg.ml⁻¹) e a massa do composto testado, resultando em uma constante para cada composto, independente da concentração da amostra ou do radical DPPH[•] utilizado. O resultado é expresso como o índice de atividade antioxidante (IAA) e pode ser calculado a partir da Equação 1:

$$IAA = \frac{[DPPH^{\bullet}]}{EC_{50}} \quad (1)$$

Onde: IAA – índice de atividade antioxidante; [DPPH[•]] – concentração da solução de DPPH[•] em µg.ml⁻¹; EC₅₀ – concentração µg.ml⁻¹ de substrato necessária para reduzir 50% do radical DPPH[•].

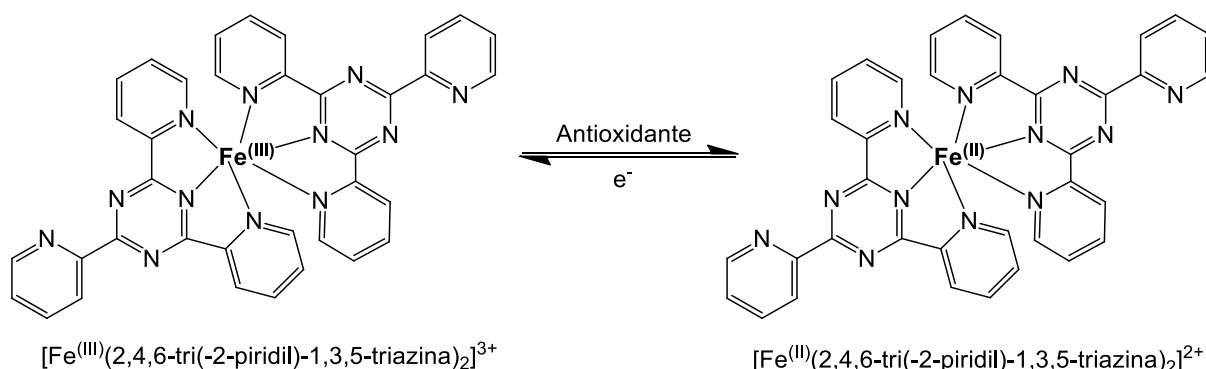
Considera-se uma capacidade antioxidante baixa quando IAA < 0,5, moderada quando IAA está entre 0,5 – 1,0, forte capacidade antioxidante quando IAA está entre 1,0 – 2,0 e capacidade antioxidante muito forte quando IAA > 2,0. Segundo os autores,

este índice tem se mostrado apropriado para a comparação da capacidade antioxidante entre diferentes extratos de plantas e óleos essenciais, uma vez que diferenças não significativas no índice de atividade antioxidante foram observadas quando diferentes soluções de DPPH[•] e diferentes concentrações do composto testado foram utilizadas.

3.7.2 Método do ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

O ensaio FRAP, foi primeiramente introduzido por Benzie e Strain (1996) como método de avaliação da capacidade antioxidante de plasma, e mais tarde modificado para a aplicação em outras matrizes como chá e vinho. Assim como no ensaio do radical DPPH[•], o método do ensaio FRAP baseia-se em reações de transferências de elétrons. O método FRAP consiste na redução de um sal férrico denominado $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{2,4,6-tri}(-2\text{-piridil})\text{-1,3,5-triazina})_2]^{3+}$, constituindo-se como o oxidante do meio reacional, formando um complexo colorido $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{2,4,6-tri}(-2\text{-piridil})\text{-1,3,5-triazina})_2]^{2+}$, como o demonstrado na Figura 12, e absorvência máxima situando no comprimento de onda de 593 nm, em pH 3.6 (APAK et al., 2016; BENZIE e STRAIN, 1996).

Figura 12 – Mecanismo de redução do composto férrico $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ para $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$.



Fonte: Huang, Ou e Prior, 2005.

Como observado, o ensaio FRAP é baseado no mecanismo de transferência de elétrons, desencadeando reações de redução do complexo férrico tripiridiltriazina ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}$) ao complexo ferroso tripiridiltriazina ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-TPTZ}$) com a consequente formação de um composto de coloração azul. O complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}$ possui

potenciais redox comparáveis com radical ABTS^{•+}, tendo em média 0,70 V e 0,68 V, respectivamente (CASTELO-BRANCO e TORRES, 2011). Diante disso, os compostos com capacidade antioxidante que apresentam atividade no ensaio FRAP, geralmente, reagem de forma similar no ensaio do radical ABTS^{•+}.

Em um estudo, ao comparar a eficiência dos ensaios DPPH, ORAC, ABTS e FRAP como métodos para a determinação da capacidade antioxidante e suas correlações com teor de ácido ascórbico, fenólicos totais e carotenoides totais em extratos de goiaba, foi observado que a técnica do ensaio FRAP apresentou alta reprodutibilidade, simples e rápida execução, além de maior correlação com o teor de ácido ascórbico e de fenólicos totais (THAIPONG et al., 2006).

No que se refere às suas limitações, qualquer composto com potencial redox inferior ao dos compostos Fe^(III) e/ou Fe^(II), pode levar à reação de redução, que contribui para a superestimação dos resultados obtidos pelo ensaio FRAP (APAK et al., 2016). Da mesma forma, nem todos os compostos com capacidade antioxidante podem reduzir o Fe^(III) a uma taxa suficientemente rápida (MAGALHÃES et al., 2010), tornando o controle do tempo de reação do ensaio um parâmetro importante para a confiabilidade dos dados.

Seguindo este raciocínio, com o intuito de verificar a eficiência do ensaio FRAP como método para a avaliação da capacidade antioxidante de compostos fenólicos presentes em vegetais, com fundamento na comparação de soluções de padrões diluídos em metanol e água, Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) observaram que os valores da absorbância, lidos no comprimento de máxima absorção de 593 nm, aumentaram lentamente para diversos padrões de polifenóis, mesmo após horas de reação.

Outra limitação observada no ensaio FRAP é a necessidade da realização do ensaio na faixa de pH 3.6, isto é, em condições não fisiológicas. Por outro lado, quando utilizado para avaliar a capacidade antioxidante em estado *in vivo*, o composto reduzido Fe^(II) pode interagir com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), favorecendo a emergência de radicais HO[•] (OU, HAMPSCH-WOODILL e PRIOR, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é parte do projeto de pesquisa coordenado pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), intitulado: “Caracterização, avaliação e customização da qualidade de amêndoas de cacau de variedades clonais para produção de chocolate”. Este projeto conta com o Edital Universal da FAPESB 19/2013, contando com a parceria de pesquisadores da UESB, UESC e UNIRIO, para a melhoria da qualidade do cacau produzido no estado da Bahia, usando diferentes clones de cacau resistente ao ataque do fungo *Moniliophthora perniciosa*, recomendados pela CEPLAC.

4.1 Material

4.1.1 Matéria prima

Nibs e chocolate fino, derivados de diferentes variedades clonais de cacau resistente à vassoura de bruxa (safra 2014/2015), foram cedidos pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, localizado na cidade de Ilhéus (latitude 14° 47' S e longitude 39° 2' W, 50 metros acima do nível do mar), onde já existe uma infraestrutura necessária e métodos definidos para o processamento e obtenção destes produtos.

4.1.2 Reagentes e equipamentos

São apresentados nas Tabelas 9 e 10 os reagentes e equipamentos utilizados na realização dos trabalhos, respectivamente.

Tabela 9 – Lista de reagentes.

Reagentes	
Acetato de sódio trihidratado	Cloreto de alumínio P.A
Ácido acético glacial P.A	Cloreto férrico hexahidratado
Ácido bórico P.A	Éter de petróleo P.A
Ácido cafeico	Hidróxido de sódio em pérolas
Ácido clorídrico P.A	Nitrito de sódio P.A
Ácido gálico Anidro P.A	Quercetina
Ácido sulfúrico P.A	Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil)
Álcool etílico P.A	Reagente Folin-Ciocalteu
Álcool metílico P.A	Rutina
Carbonato de sódio	Sulfato ferroso heptahidratado
Catequina	TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 – Equipamentos utilizados.

Equipamentos	Marca/Modelo
Aparelho de Soxhlet	Tecnal, TE sebeline 188
Balança analítica	Marte, AY20
Espectrofotômetro UV/Vis	Shimadzu, UV-1800
Concentrador rotativo a vácuo	Christ, RVC 2-18 CDplus
Estufa de secagem	Marconi, NA-033
Mufla	Marconi, NA-385/3
Banho ultrassônico	Eco-Sonics, 40 kHz
Ultrafreezer	Panasonic
Liofilizador de bancada	Christ, ALPHA 1-2 LDplus
Agitador de tubos	Nortecientífica, NA 3600
Destilador (Kjeldahl)	Tecnal, TE-0363

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção de *nibs* e chocolate

Para este estudo foram empregadas amostras de *nibs* e chocolate de três variedades clonais de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa (1 = CCN 51, 2 = PSH 1319, 3 = BN 34) e de cacau Catongo (controle), provenientes da safra de 2014/2015.

Para a obtenção de *nibs*, amêndoas de cacau foram submetidas à fermentação natural por 7 dias, com temperaturas variando de 25 a 42°C. Para cada uma das variedades foram realizadas fermentações em caixas de madeira (cochos) separados, em três lotes. Ao término da fermentação, foi realizada a secagem das amêndoas em secadores tipo barcaça, com uso do calor solar, por um período de 15 dias ou até que o percentual máximo de umidade atingisse 10%. Posteriormente, as amêndoas foram submetidas ao processo de torrefação, utilizando-se a temperatura de 80°C por 20 min, com subsequente esfriamento até atingir 40°C. As amêndoas torradas foram transferidas para dessecadores, com o objetivo de realizar a quebra e a eliminação das cascas, obtendo-se o *nibs*. O *nibs* adquirido foi triturado em moinho de facas, obtendo-se a massa de cacau (liquor), matéria prima necessária para a elaboração dos chocolates. Os chocolates foram produzidos seguindo a formulação padrão da CEPLAC, com adição de 60% de massa de cacau.

4.2.2 Amostragem

A amostragem de *nibs* e chocolates foi realizada ao acaso, coletando cerca de 200 gramas de cada lote (3 repetições). As amostras de *nibs* e chocolates foram enviadas ao Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal (LTPOV) e ao Laboratório de Nutrição Animal, em embalagens de poliestireno devidamente etiquetadas, e então realizadas as análises da composição centesimal do *nibs*. Parte das amostras foi enviada ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON), para a preparação dos extratos e realização das demais análises.

4.2.3 Composição centesimal de *nibs* e chocolate

4.2.3.1 Umidade

A umidade foi mensurada pela remoção da água livre das amostras em estufa de secagem a 105°C, até peso constante, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). Os resultados foram expressos em g água livre por 100 g de amostra.

4.2.3.2 Cinzas

O teor de cinzas nas amostras foi determinado por gravimetria, conforme o procedimento descrito pelo Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). Foram calcinadas 5 g da amostra anteriormente desidratada, em mufla a 550°C, até peso constante. Os resultados foram expressos em g de cinzas totais por 100 g de amostra.

4.2.3.3 Proteína bruta (nitrogênio total)

O teor de nitrogênio total foi determinado através do método micro-Kjeldahl (AOAC, 2010). O conteúdo de nitrogênio encontrado foi multiplicado pelo fator de conversão 5,75 e forneceu o percentual de proteína bruta das amostras (ANVISA, 2003). Os resultados foram expressos em g de proteína bruta por 100 g de amostra.

4.2.3.4 Lipídios (extrato etéreo)

A concentração de extrato etéreo foi determinada por gravimetria usando éter de petróleo como solvente extrator em aparelho de Soxhlet (IAL, 2008). Os resultados foram expressos em g de lipídios totais por 100 g de amostra.

4.2.3.5 Carboidratos totais

Os teores de carboidratos totais foram determinados pelo cálculo da diferença entre o total da amostra (100 gramas) e os teores de umidade, cinzas, proteína bruta e lipídios totais.

4.2.4 Obtenção de extrato hidroetanólico liofilizado

Os extratos das amostras de *nibs* e chocolate, foram obtidos pelo método proposto por Wollgast (2004), com modificações. Foram pesadas 10 g de cada uma das amostras em becker de 100 mL, e posteriormente, adicionado 40 mL de solução extratora hidroetanólica (70% de álcool etílico P.A. e 30% de água deionizada) acidificada até pH 2,0, em triplicata. Os beckeres foram submersos em banho ultrassônico por 30 min, à temperatura de 30°C, e mantida sob extração durante 24 h, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao término da extração, o sobrenadante foi coletado, filtrado e transferido para um frasco âmbar e armazenado a 7°C, enquanto o resíduo remanescente foi submetido a uma nova extração. Os extratos obtidos foram unidos e concentrados até a eliminação do solvente, em concentrador rotacional, sob vácuo (7,0 mbar, 1300 rpm), à temperatura de 38°C. Os extratos concentrados foram congelados em ultrafreezer, durante 72 h, à -81°C. Posteriormente, os extratos foram liofilizados em equipamento liofilizador a -38°C, e pressão de vácuo a 0,12 mbar. Os extratos liofilizados foram transferidos para frascos âmbar até o momento das análises.

4.2.5 Determinação de compostos fenólicos totais

As determinações dos compostos fenólicos totais foram realizadas segundo os métodos descritos no protocolo da ISO 14502-1 (2005), para a determinação dos teores de polifenóis totais pelo método colorimétrico com o reagente Folin-Ciocalteu.

Previamente, foram preparadas soluções dos extratos hidroetanólico liofilizados, em diferentes concentrações (100, 200, 300, 400 e 500 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)), diluídas em álcool etílico. Adicionalmente, foram preparadas soluções em diferentes concentrações de ácido gálico (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)) diluídas em água deionizada.

Para a construção da curva padrão foram colocados, em tubos de ensaio, 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v), 4 mL de solução saturada de carbonato de sódio a 7,5% (NaHCO_3), ambos diluídos em água deionizada e adicionados 1000 μL de cada uma das diferentes concentrações de ácido gálico (7, 14, 21, 28, 35, 42,

49, 56, 63 e 70 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)), constituindo o meio reacional. Os tubos foram agitados em vórtex, por 5 segundos e mantidos em repouso à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 60 minutos. Da mesma forma, para avaliação do teor de fenólicos do extrato hidroetanólico liofilizado, foi utilizado o mesmo meio reacional substituindo o ácido gálico pelas diferentes concentrações dos extratos (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

As leituras foram realizadas no comprimento de máxima absorção a 773 nm, em espectrofotômetro. O branco foi elaborado nas mesmas condições do meio reacional descrito, substituindo a amostra por água deionizada. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra ($\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$), obtidos por meio da equação gerada a partir da curva analítica do ácido gálico.

4.2.6 Determinação de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados pelo ensaio colorimétrico utilizando cloreto de alumínio, como descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). Previamente, foram preparadas soluções em diferentes concentrações dos extratos hidroetanólicos liofilizados (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), além da elaboração de curvas analíticas de catequina e rutina, nas concentrações de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O meio reacional foi constituído por uma alíquota de 1000 μL nas diferentes concentrações, 4 mL de água deionizada, 0,3 mL de nitrito de sódio (NaNO_2) a 5% e 0,3 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10%. Após 60 minutos, 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M foram adicionados, e o volume completado para 10 ml, e, posteriormente, agitado em vórtex, por 5 segundos.

As leituras foram realizadas no comprimento de onda 510 nm, em espectrofotômetro. O branco foi elaborado nas mesmas condições do meio reacional descrito, substituindo a amostra por água deionizada. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina/rutina por g de amostra, obtidos por meio da equação gerada a partir da curva analítica elaborada.

4.2.7 Método do sequestro do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidazil)

A capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos liofilizados foi avaliada de acordo com o método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Bersert (1995). Este método fundamenta-se na redução do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidazil) na presença de antioxidantes da amostra, promovendo a redução da absorvância medida a 515 nm, bem como da coloração do meio reacional.

Previamente, foi preparada uma curva padrão de DPPH, a partir da preparação de soluções metanólicas em diferentes concentrações (0 a 60 μM). O meio reacional foi constituído por 100 μL das diferentes concentrações dos extratos hidroetanólicos liofilizados (0,07 a 1,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), e 3,9 mL de uma solução do radical DPPH 0,06 mM. Com o objetivo de reduzir alterações na absorvância inicial da solução de DPPH 0,06 mM, utilizou-se o banho ultrassônico com gelo, para a preparação da referida solução. O tempo de reação foi determinado a partir da realização de testes preliminares, com o mesmo meio reacional, sendo observado o tempo de 50 minutos.

As leituras foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção a 515 nm, em espectrofotômetro, utilizando o metanol como o branco. Os resultados foram expressos em EC_{50} (concentração mínima da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH), calculados a partir da regressão linear ($y = -ax + b$) gerada na elaboração da curva padrão do DPPH* (2), onde o eixo das abscissas (x) representa a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas (y) a atividade antioxidante total.

$$Y_{/2} = -A \cdot \text{EC}_{50} + B \quad (2)$$

Onde:

$Y_{/2}$ = absorvância da amostra, dividido por 2;

A = coeficiente angular da reta;

B = coeficiente linear da reta;

EC_{50} = concentração do extrato, necessária para reduzir 50% da concentração inicial do radical DPPH.

Além disso, os resultados também foram expressos na forma de índice de atividade antioxidante (IAA), segundo os métodos descritos por Scherer e Godoy (2009). Para isso, foi utilizada a Equação 3 que considera a massa do DPPH* ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

¹⁾ e a massa do composto testado. Considera-se uma capacidade antioxidante baixa quando IAA < 0,5, moderada quando IAA está entre 0,5 – 1,0, forte capacidade antioxidante quando IAA está entre 1,0 – 2,0 e capacidade antioxidante muito forte quando IAA > 2,0.

$$IAA = \frac{[DPPH^{\bullet}]}{EC_{50}} \quad (3)$$

Onde:

IAA = índice de atividade antioxidante;

[DPPH[•]] = concentração da solução de DPPH[•] em µg.mL⁻¹;

EC₅₀ = concentração µg.mL⁻¹ de substrato necessária para reduzir 50% do radical DPPH.

4.2.8 Método do ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

O poder redutor dos extratos hidroetanólicos foram avaliados de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996), com modificações. Este método fundamenta-se na redução de um sal férrico denominado [Fe^(III)(2,4,6-tri(-2-piridil)-1,3,5-triazina)₂]³⁺, constituindo-se como o oxidante do meio reacional, formando um complexo colorido [Fe^(II)(2,4,6-tri(-2-piridil)-1,3,5-triazina)₂]²⁺, e absorvância máxima situando no comprimento de onda de 593 nm, em pH 3.6.

Previamente, foi preparada uma curva analítica de sulfato ferroso em diferentes concentrações (500 a 2000 (µM)). O meio reacional foi constituído por 90 µL das diferentes concentrações dos extratos hidroetanólicos liofilizados (0,07 a 1,25 mg/ml), 270 µL de água deionizada, e 2,7 mL do reagente FRAP. O reagente FRAP é obtido a partir a combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ 10 mM e 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM. Após preparado o meio reacional, a mistura foi agitada em vortex a 700 rpm, por 5 segundos. O tempo de reação foi verificado a partir da realização de testes preliminares, sendo determinado o tempo de 30 min.

As leituras foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro, utilizando o reagente FRAP como o branco. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de Fe²⁺ por g de amostra, calculados a partir da equação de regressão

linear (4) da reta gerada na elaboração da curva analítica de sulfato ferroso, onde o eixo das abscissas (x) representa a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas (y) a absorvância das amostras. Posteriormente, foi realizado um cálculo de conversão, possibilitando expressar os resultados em miligramas de equivalentes de Fe²⁺ por grama de amostra (mg FE.g⁻¹).

$$Y = A \cdot [\text{FeSO}_4] + B \quad (4)$$

Onde: Y, corresponde à absorvância da amostra; A, ao coeficiente angular da reta; B, ao coeficiente linear da reta e [FeSO₄], a concentração de sulfato ferroso encontrada.

4.2.9 Análise estatística

Para a análise dos dados, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e três repetições. Os resultados obtidos foram analisados no software Estatística versão 8.0, onde foi realizada a estimativa do efeito da variável “variedade clonal” sobre as respostas analisadas, considerando o nível de significância de 5%. Diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal dos *nibs*

A composição centesimal das amostras de *nibs* estudadas está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Composição centesimal de *nibs* de três variedades clonais de cacaueteiro e do Catongo

Constituintes	CCN 51	PSH 1319	BN 34	Catongo
	g.100g ⁻¹ *			
Carboidratos	56,4±0,5 ^a	61,6±0,5 ^a	60,4±0,6 ^a	60,1±0,3 ^a
Lipídios	33,7±0,4 ^a	28,5±1,9 ^b	30,5±2,2 ^{ab}	31,3±0,8 ^{ab}
Proteínas	3,3±0,0 ^b	3,5±0,0 ^a	3,5±0,0 ^a	3,2±0,1 ^b
Cinzas	2,7±0,1 ^{ab}	3,1±0,1 ^a	2,8±0,1 ^a	2,3±0,3 ^b
Umidade	3,9±1,4 ^a	3,4±0,0 ^a	2,7±0,0 ^a	3,0±0,0 ^a

Os valores correspondem à média das repetições em triplicata; Valores de uma mesma linha, seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

*g.100g⁻¹: Gramas por 100 gramas de amostra.

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao analisar os resultados da composição centesimal para os *nibs* das variedades clonais estudadas, observam-se diferenças estatísticas entre as médias obtidas de lipídios e proteínas. O clone CCN 51 apresentou maior valor de lipídio, diferindo-se estatisticamente do clone PSH 1319, que apresentou menor valor desse constituinte. Entretanto, nenhum *nibs* das variedades clonais apresentaram diferenças significativas em relação aos encontrados para o Catongo. Quanto aos teores de proteína, os clones BN 34 e PSH 1319 apresentaram valores maiores, diferindo-se estatisticamente do clone CCN 51 e do Catongo.

Resultados semelhantes de proteínas ($2,3 \text{ g.100 g}^{-1}$) foram citados por Ofoakwa et al. (2008), ao avaliarem a composição de amêndoas de cacau de variedades do grupo Forastero, produzidas no oeste da África. Quanto aos teores de lipídios Efraim et al. (2010) e Brito et al. (2000) encontraram valores superiores em amêndoas de cacau secas por secagem natural ($55,1 \text{ g.100 g}^{-1}$) e submetidas à torrefação ($51,2 \text{ g.100 g}^{-1}$), respectivamente. Efraim (2009) relatou que, devido às complexas reações bioquímicas que ocorrem durante as etapas de beneficiamento da amêndoa, os níveis de vários compostos, como lipídios, proteínas, compostos fenólicos, entre outros, sofrem alterações (EFRAIM, 2009).

Os teores de cinzas e umidade encontrados no presente trabalho são semelhantes aos de diversos estudos disponíveis na literatura (PRABHAKARAN, 2010; EFRAIM et al., 2010; CALIGIANI, MARSEGLIA e PALLA, 2016; OFOAKWA et al., 2008; HU, KIM e BAIK, 2016), sendo apresentados valores de umidade variando de 3,6 a 6,0 g.100 g^{-1} e de cinzas variando de 2,7 a 3,1 g.100 g^{-1} em amostras de *nibs* de cacau torrado.

5.2 Composição centesimal dos chocolates

A composição centesimal das amostras de chocolate estudadas está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 – Composição centesimal de chocolates de três variedades clonais de cacau e do Catongo

Constituintes	CCN 51	PSH 1319	BN 34	Catongo
	$\text{g.100g}^{-1} *$			
Carboidratos	47,0±3,6 ^a	49,1±0,4 ^a	47,4±0,8 ^a	50,9±5,2 ^a
Lipídios	39,9±0,5 ^a	38,6±0,4 ^a	40,2±0,30 ^a	38,5±5,0 ^a
Proteínas	7,6±0,5 ^b	8,7±0,3 ^a	8,8±0,60 ^a	7,3±0,6 ^b
Cinzas	3,7±4,0 ^a	1,9±0,1 ^a	1,8±0,19 ^a	1,6±0,1 ^a
Umidade	1,8±0,1 ^a	1,6±0,1 ^a	1,7±0,14 ^a	1,6±0,1 ^a

Os valores correspondem à média das repetições em triplicata; Valores de uma mesma linha, seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

* g.100g^{-1} : Gramas por 100 gramas de amostra.

Fonte: Dados da pesquisa.

Verifica-se que a composição centesimal dos chocolates das variedades clonais estudadas não apresentaram diferenças significativas entre os valores dos constituintes analisados para a maioria das determinações, exceto para os menores teores de proteína dos chocolates do clone CCN 51 e do Catongo. Valores semelhantes de proteínas ($8,1 \text{ g.100g}^{-1}$), lipídios ($37,7 \text{ g.100g}^{-1}$) e carboidratos ($47,2 \text{ g.100g}^{-1}$) foram encontrados por Lattieri-Barbato et al. (2012), em chocolate elaborado com 60% de massa de cacau, enquanto que menores valores de proteínas ($5,5 \text{ g.100g}^{-1}$) e lipídios ($35,0 \text{ g.100g}^{-1}$) foram observados em chocolates elaborados com menores teores de massa cacau.

Diferenças não significativas na composição centesimal dos chocolates podem estar relacionadas à formulação semelhante entre os chocolates analisados, visto que, a concentração de massa de cacau irá influenciar na composição do produto final. Todorovic et al. (2015), ao avaliarem o teor de lipídios em chocolates formulados com diferentes proporções de massa de cacau, observaram que chocolates com menores concentrações de massa de cacau apresentaram menores teores de lipídios. Neste estudo, os chocolates com 30% de massa de cacau apresentaram $31,0 \text{ g.100g}^{-1}$ de lipídios, enquanto que chocolates com 60% de cacau obtiveram valores de $36,0 \text{ g.100g}^{-1}$ de lipídios.

Os valores de umidade e proteína observados assemelham-se aos encontrados por Efraim (2009), ao avaliar a composição destes constituintes em chocolates produzidos de diferentes variedades de cacauero susceptíveis e resistentes à vassoura-de-bruxa. Neste estudo, foram observados valores variando de 0,9 a $1,2 \text{ g.100g}^{-1}$, e de proteínas variando de 6,3 a $9,9 \text{ g.100g}^{-1}$. Segundo a autora, os valores de umidade nesta faixa podem influenciar positivamente a estabilidade química e física no produto durante o armazenamento.

5.3 Quantificação de constituintes fenólicos totais

Os teores de constituintes fenólicos nos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates das variedades clonais de cacauero foram avaliados e estão apresentados na Tabela 13, sendo expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra (mg EAG g^{-1}).

Tabela 13 – Teores de constituintes fenólicos totais dos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates de três variedades clonais de cacau e do Catongo

Variedade	<i>Nibs</i>		Chocolate	
	EAG*	DP**	EAG*	DP**
CCN 51	125,6 ^b	21,0	34,7 ^b	0,8
PSH 1319	130,5 ^b	26,6	34,5 ^b	1,3
BN 34	168,8 ^a	15,0	43,0 ^a	4,2
Catongo	157,1 ^a	20,5	41,9 ^a	1,8

Os valores correspondem à média das repetições em triplicata; Valores de uma mesma coluna, seguidos por mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

*EAG: Valor expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

**DP: Desvio padrão.

Fonte: Dados da pesquisa.

O *nibs* do clone BN 34 apresentou teor superior de fenólicos ($168,8 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$), diferenciando significativamente dos demais clones, ao passo que, não foram observadas diferenças significativas quando comparado ao Catongo ($157,1 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$).

Valores inferiores de fenólicos foram mencionados por Bubonja-Sonje et al. (2011), ao avaliarem extratos aquosos de *nibs* de cacau produzidos em Madagascar, na faixa de $32,5 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$. Valores menores também foram encontrados em *nibs* de cacau do grupo Forastero produzidos em Gana ($30,9 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) (HU, KIM e BAIK, 2016), em amêndoas de cacau da variedade Criollo produzidas na Colômbia ($48,2 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) (CARRILLO, LONDOÑO e GIL, 2013) e na Malásia ($60,0 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) (NAZARUDDIN et al., 2001).

Resultados semelhantes aos observados no presente trabalho foram encontrados por Niemenak et al. (2006), em extratos aquosos de amêndoas de cacau secas ($101,3$ a $143,6 \text{ EAG}\cdot\text{g}^{-1}$), de uma variedade não definida, produzidas em Camarões.

Observa-se que diversos fatores podem influenciar na composição de constituintes fenólicos, dentre eles o método de extração, genótipo, a origem do cacau e os métodos de beneficiamento da amêndoa. Estes fatores foram comprovados por Othman et al. (2007) em seus estudos com amêndoas de cacau oriundos de diferentes

países (Malásia, Gana e Costa Rica), onde constataram diferenças significativas entre as médias dos teores de constituintes fenólicos dos diferentes extratos analisados, evidenciando melhores resultados para os extratos hidroetanólicos, utilizando 70% de álcool etílico.

Tais resultados corroboram com a afirmação de Wollgast e Anklam (2010), ao mencionarem que, apesar das diferentes metodologias, os constituintes fenólicos de cacau tendem a ser extraídos com mais eficiência utilizando solventes como etanol e metanol (WOLLGAST e ANKLAM, 2010). Além disso, o genótipo também foi apontado em diversos estudos como um fator importante, capaz de produzir diferenças significativas nos teores de fenólicos em variedades de cacau (CARIILLO, LONDOÑO e GIL, 2013; BRITO, 2000; HU, KIM e BAIK, 2016).

O chocolate proveniente do clone BN 34 se destacou pelo teor superior de fenólicos ($43,0 \text{ mg EAG.g}^{-1}$), os quais diferiram significativamente dos resultados encontrados para os demais clones ($p < 0,05$), conforme mostrado na Tabela 13 (pág. 71). Miller et al. (2006) e Todorovic et al. (2015), encontraram valores equivalentes em extratos aquosos de chocolate amargo ($12,8 \pm 0,2 \text{ mg EAG.g}^{-1}$) e ao leite ($3,7 \pm 0,9 \text{ mg EAG.g}^{-1}$), respectivamente. Entretanto, teores de fenólicos em extratos metanólicos de chocolates de diferentes variedades clonais de cacau do grupo Forasteiro (SR 162 e PH 16) encontrados por Leite et al. (2013), foram inferiores (15,3 a $19,3 \text{ mg EAG.g}^{-1}$).

Teores relativamente baixos de constituintes fenólicos em chocolates podem estar ligados à presença de leite em pó e açúcar na formulação destes produtos (KOMES et al., 2013). Uma vez que, produtos à base de leite constituem uma matriz complexa, capaz de promover uma forte interação entre catequinas e proteínas (SIEBERT, TROUKHANOVER e LYNN, 1996), interferindo na determinação precisa dos constituintes fenólicos presentes na amostra. Em contrapartida, outra limitação que pode superestimar os níveis de fenólicos é a baixa seletividade do reagente Folin-Ciocalteu, que reage não somente com os fenóis, mas também com outros compostos redutores, como carotenoides, aminoácidos, açúcares, cobre e ácido ascórbico (VINSON et al., 2001).

Apesar dos esforços dos pesquisadores na busca de parâmetros de processamento que promovam uma menor degradação de constituintes fenólicos em cacau e seus produtos, melhores características sensoriais só podem ser obtidas em

faixas de temperatura acima de 68°C durante a conchagem (SULISTYOWATI e MISNAWI, 2008). No entanto, a aplicação de temperaturas acima de 121°C foram suficientes para a redução do teor de fenólicos de 183,4 mg EAG.g⁻¹ para 181,7 mg EAG.g⁻¹ após 60 segundos durante a etapa de torrefação (SCHINELLA et al., 2010).

5.4 Quantificação de flavonoides totais

Os teores de flavonoides encontrados nos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates obtidos de variedades clonais de cacauero estão apresentados na Tabela 14. Os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de catequina (mg EC.g⁻¹) e quercetina (mg EQ.g⁻¹) por grama de amostra.

Tabela 14 – Teores de flavonoides totais dos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates de três variedades clonais de cacauero e do Catongo

Variedade	<i>Nibs</i>		Chocolate	
	EC*	EQ**	EC	EQ
CCN 51	11,6±5,6 ^{ab}	26,3±8,5 ^{ab}	2,6±0,1 ^a	7,9±0,1 ^a
PSH 1319	10,2±4,8 ^b	24,2±7,3 ^b	2,3±0,2 ^a	7,1±0,4 ^a
BN 34	22,2±16,0 ^a	42,5±24,4 ^a	3,1±0,3 ^a	9,3±0,6 ^a
Catongo	15,5±9,1 ^{ab}	32,2±13,8 ^{ab}	2,9±0,2 ^a	8,5±0,3 ^a

Os valores correspondem à média das repetições em triplicata; Os valores correspondem à média das repetições; Valores de uma mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

*Miligramas equivalentes de catequina por grama de amostra (mg EC.g⁻¹).

**Miligramas equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg EQ.g⁻¹).

Fonte: Dados da pesquisa.

Como observado na Tabela 14, os teores de flavonoides calculados para o *nibs*, usando catequina ou quercetina como padrão, diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Os resultados apontam valores superiores para o *nibs* do clone BN 34, nos testes realizados com os dois padrões, embora não tenha diferido estatisticamente do clone CCN 51 e do Catongo.

Em um recente estudo realizado por Hu, Kim e Baik (2016), foi encontrada uma média de 23,87 mg EC.g⁻¹ em amostras de extratos hidrometanólicos de *nibs* de cacau de cacauero do grupo Forastero, produzidos em Gana. Resultados semelhantes foram mencionados por Schinella et al. (2010) em seu trabalho de avaliação dos níveis

de flavonoides em extratos de *nibs* de cacau (25,06 mg EC.g⁻¹). Neste mesmo estudo foi verificado o teor de flavonoides em cacau em pó, obtido a partir da amostra de *nibs* anteriormente analisada, sendo observada uma média de 4,87 mg EC.g⁻¹, verificando-se a importante influência das etapas de processamento nos níveis de flavonoides presentes no cacau.

A alteração nos níveis de flavonoides em amêndoas de cacau submetidas à torrefação foi estudada por Kothe, Zimmerman e Galensa (2013), que observaram uma redução de 57% na concentração inicial de flavonoides após a torrefação (4,06 para 2,33 mg EC.g⁻¹). Resultados semelhantes aos relatados por Payne et al. (2010), ao avaliarem os efeitos da torrefação sob os teores de catequinas em amêndoas de cacau. Dessa forma, variações nos métodos de torrefação devem ser avaliadas, como forma de definir o melhor tratamento para a matéria prima, uma vez que, temperaturas acima de 140°C tendem a reduzir significativamente o teor de constituintes fenólicos (KRYASIAK, 2011; KOTHE, ZIMMERMAN e GALENSA, 2013).

Quanto aos teores de flavonoides totais de extratos hidroetanólicos de chocolate das três variedades clonais e do Catongo, não foram verificadas diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), conforme mostrado na Tabela 14 (pág. 73). Entretanto, os resultados observados apresentam-se superiores aos encontrados por Leite et al. (2013), ao avaliarem a composição de flavonoides totais em extratos metanólicos de chocolates contendo 70% de cacau, produzidos com cacau Forastero (Pará, Brasil) resistentes à vassoura de bruxa, foi encontrada uma média igual a 0,9 mg EC.g⁻¹.

Os teores de flavonoides totais em extratos aquosos de diferentes tipos de chocolates produzidos na Sérvia, analisados por Tudorovic et al. (2015), foram superiores aos encontrados nesse estudo, sendo de 4,6 mg EC.g⁻¹ em chocolate ao leite e de 13,8 mg EC.g⁻¹ em chocolate amargo. No entanto, Andres-Lacueva et al. (2008), encontraram valores próximos ao desse trabalho no extrato metanólico de cacau em pó (2,19 a 3,03 mg EC.g⁻¹).

Os teores de polifenóis são influenciados pelos métodos de processamento, como conchagem e temperagem, reduzindo gradualmente a concentração de polifenóis (GULTEKIN-OZGUVEN et al., 2015; SULISTYOWATI e MISNAWI, 2008). Andres-Lacueva et al. (2008), observaram que o processamento da amêndoa resulta na perda de 60% dos teores de flavonoides totais. Em estudo realizado por Jolic et al.

(2011), também foi demonstrado que os processos de torrefação e alcalinização do *nibs* influenciam nos teores de constituintes fenólicos e na capacidade antioxidante, havendo uma redução desses valores.

5.5 Avaliação da capacidade antioxidante

5.5.1 Capacidade antioxidante método do sequestro do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de *nibs* e chocolates

A capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates das variedades clonais de cacauero avaliadas pelo ensaio do radical DPPH[•] estão apresentados na Tabela 15. Os resultados estão expressos como EC₅₀ (mg.L⁻¹) e índice de atividade antioxidante (IAA). O termo EC₅₀ representa a concentração do extrato necessária para a redução de 50% da concentração inicial do radical DPPH[•], enquanto o IAA, expressa o índice de atividade antioxidante, baseando-se na concentração inicial do radical e o valor de EC₅₀.

Tabela 15 – Resultados dos ensaios de avaliação da capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates de variedades clonais de cacauero e do Catongo pelo método do ensaio radical DPPH[•]

Variedade	<i>Nibs</i>		Chocolate	
	EC ₅₀ [*]	IAA ^{**}	EC ₅₀ [*]	IAA ^{**}
CCN 51	0,41±0,05 ^{bc}	58,86±6,72 ^{bc}	4,59±0,11 ^e	5,23±0,12 ^d
PSH 1319	0,33±0,03 ^{ab}	73,21±7,93 ^{ab}	4,46±0,10 ^e	5,38±0,09 ^d
BN 34	0,29±0,04 ^a	83,64±14,31 ^a	3,89±0,09 ^d	6,18±0,14 ^d
Catongo	0,29±0,05 ^a	85,84±16,93 ^a	3,69±0,29 ^c	6,50±0,61 ^d
Ácido cafeico	0,71±0,29 ^{de}	34,04±1,45 ^{de}	0,71±0,29 ^{ab}	34,04±1,45 ^c
Quercetina	0,65±0,03 ^d	36,84±1,72 ^{cde}	0,65±0,03 ^{ab}	36,84±1,72 ^b
Rutina	0,76±0,04 ^e	31,78±1,44 ^e	0,76±0,04 ^b	31,78±1,44 ^c
Catequina	0,43±0,03 ^c	56,13±3,96 ^{bcd}	0,43±0,03 ^a	56,13±3,96 ^a

Os valores correspondem à média das repetições em triplicata; Valores de uma mesma coluna, seguidos por mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

*EC₅₀: Concentração da amostra necessária para inibir 50% da concentração inicial do radical livre DPPH[•] (mg.L⁻¹).

**IAA: Índice de atividade antioxidante da amostra.

Fonte: Dados da pesquisa.

Como mostrado na Tabela 15, o estudo da capacidade antioxidante apontou melhores valores de EC_{50} para o *nibs* dos clones BN 34 e PSH 1319, respectivamente. Destaca-se o *nibs* procedente do clone BN 34, uma vez que, este diferenciou estatisticamente do *nibs* do clone CCN 51 ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$). Entretanto, observa-se que os valores de EC_{50} para todos os *nibs* analisados foram melhores aos encontrados para os padrões de rutina, ácido cafeico, quercetina e catequina.

Resultados semelhantes aos observados nesse estudo foram verificados por Schinella et al. (2010), ao avaliarem a capacidade antioxidante de extratos aquosos de cacau em pó da variedade clonal CCN 51, encontrando valores de EC_{50} iguais a $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$. Sob outra condição, a capacidade antioxidante, expressa em valores de EC_{50} , de extratos metanólicos de *nibs* de cacau produzidos em Gana ($1,1 \text{ mg.L}^{-1}$), Costa do Marfim ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e no Equador ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), encontrados por Arlorio et al. (2008), foram inferiores aos encontrados nesse trabalho.

Da mesma forma, Othman et al. (2007), verificaram valores de EC_{50} iguais a $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ em extratos etanólicos de *nibs* de cacau produzidos no Equador. No entanto, valores superiores de EC_{50} foram encontrados por Pedan, Fischer e Rohn (2015), em extratos hexânicos de *nibs* de cacau Trinitário, produzidos na Costa Rica ($3,43 \text{ mg.L}^{-1}$).

Foram verificadas diferenças significativas para os valores de IAA calculados para o *nibs* do clone BN 34 em relação aos observados para o clone CCN 51 e aos padrões utilizados, conforme mostrado na Tabela 15 (pág. 75). Em muitos trabalhos disponíveis na literatura foram observadas o uso diferentes concentrações do radical DPPH, que interferem na comparação dos resultados. Diante disso foi utilizado o cálculo do IAA, para a comparação entre alguns resultados avaliados.

Valores inferiores de IAA aos observados no presente estudo foram encontrados por Zyzelewicz et al. (2016), em extratos aquosos de *nibs* de cacau do grupo Forastero, produzido no Peru, onde o índice de atividade antioxidante foi equivalente a 38,0. O mesmo verificado por Locatelli et al. (2009), ao avaliarem a capacidade antioxidante de extratos metanólicos de *nibs* de cacau do grupo Forastero de diversos países, como Costa do Marfim, Equador, Itália e Gana, observaram valores de IAA entre 18,0 e 35,5.

Entre os chocolates procedentes das três variedades clonais, não foram encontradas diferenças significativas para a capacidade antioxidante expressos em EC_{50} e IAA ($p < 0,05$), conforme a Tabela 15 (pág. 75). Estes resultados eram esperados, uma vez que, foram verificadas reduções significativas nos teores de fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de chocolate, quando comparados aos teores verificados no extrato de *nibs*.

Não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando as mesmas condições do ensaio do radical DPPH^{*}, expressos em EC_{50} , para a avaliação da capacidade antioxidante de chocolate. Diante disso, foi utilizado o cálculo do IAA para a comparação dos resultados.

Foram encontrados valores de IAA nos chocolates das variedades clonais variando de 5,2 a 6,2 (Tabela 15, pág.75). Leite et al. (2013), encontraram valores próximos em chocolates produzidos de variedades de cacaueteiro resistentes à vassoura de bruxa (SR162 e PH16), encontrando valores de IAA na faixa de 1,8 a 3,0. Já Belscak et al. (2009), encontraram valores de IAA iguais a 3,3 em extratos hidroetanólicos de chocolate 70% produzidos na Croácia.

Diversos fatores podem estar associados à redução da capacidade antioxidante nos chocolates, tais como a temperatura de processamento, a formulação do chocolate e o método de extração dos compostos antioxidantes. A redução da capacidade antioxidante e de fenólicos foi verificada por Sulistyowati e Misnawi (2008), em temperaturas variando de 40 a 80°C durante a conchagem. Além disso, Taberner, Serrano e Saura-Calixto (2006), demonstraram que a adição de leite em pó em formulações de chocolates, promove a redução de 60% da capacidade antioxidante, ao avaliarem amostras de chocolate (EC_{50} 7,0 mg.L⁻¹) e ao leite (EC_{50} 17,3 mg.L⁻¹).

Estes e outros fatores, como o tipo de solvente extrator, são determinantes para a capacidade antioxidante de amostras de chocolate, conforme observações realizadas por Komes et al. (2013) e Othman et al. (2007), que comparam os resultados da capacidade antioxidante de extratos aquosos e hidroetanólicos de chocolates. Em suas conclusões os autores apontam que as extrações mais eficientes de constituintes fenólicos são feitas utilizando solventes hidroetanólicos. Observações também feitas por Belscak-Cvitanovic et al. (2012), ao mencionarem que o teor total de constituintes fenólicos é influenciado pelo método de extração, sendo o solvente

um dos principais fatores, uma vez que água tende ser menos eficiente quando comparada com outros solventes, como etanol e metanol.

5.5.2 Capacidade antioxidante de *nibs* e chocolate pelo método FRAP

Os valores da capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates das variedades clonais de cacauero estão apresentados na Tabela 16. Os resultados estão expressos como mg equivalentes de Fe²⁺ por grama de amostra (FE mg.g⁻¹).

Tabela 16 – Resultados dos testes de capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos liofilizados de *nibs* e chocolates das variedades clonais de cacauero e do Catongo pelo método do ensaio FRAP

Variedade	<i>Nibs</i>		Chocolate	
	FE*	DP**	FE*	DP**
CCN 51	25,8 ^d	0,30	2,6 ^c	0,18
PSH 1319	36,4 ^c	0,83	2,3 ^c	0,12
BN 34	38,0 ^c	0,85	2,9 ^c	0,12
Catongo	34,7 ^{cd}	1,84	3,0 ^c	0,06
Quercetina	282,1 ^a	11,14	282,1 ^a	11,14
Rutina	102,7 ^b	7,88	102,7 ^b	7,88

Os valores correspondem à média das repetições em triplicata; Valores de uma mesma coluna, seguidos por mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

*Miligramas de equivalentes de Fe²⁺ por grama de amostra (mg.g⁻¹).

**Desvio padrão.

Fonte: Dados da pesquisa.

Foram observadas diferenças significativas entre os resultados da capacidade antioxidante de *nibs* das variedades clonais, pelo método FRAP ($p < 0,05$). Entre os resultados, os clones BN 34 e PSH 1319 mostraram resultados superiores de capacidade antioxidante, quando comparados ao clone CCN 51. Entretanto, nenhum dos clones apresentaram diferenças significativas em relação ao Catongo.

Resultados próximos foram encontrados por Jofia-Essien et al. (2008) e também por Othman et al. (2007), ao avaliarem a capacidade antioxidante de extratos hidroetanólicos de *nibs* procedentes de variedades clonais e tradicionais de cacauero.

Nesses estudos, foram encontrados valores superiores da capacidade antioxidante para os extratos de *nibs* das variedades clonais aos observados para os extratos de *nibs* procedentes das variedades tradicionais.

Possivelmente, os níveis superiores de fenólicos totais e flavonoides totais de *nibs* proveniente do clone BN 34, sejam os responsáveis no aumento da capacidade antioxidante do extrato. Esta afirmação também pode explicar a capacidade antioxidante inferior verificada para o extrato de *nibs* do CCN 51, dado que, menores teores de fenólicos totais e flavonoides totais foram encontrados para o extrato de *nibs* desta variedade clonal, conforme mostrado nas Tabelas 13 e 14 (pág. 71 e 73, respectivamente).

Resultados semelhantes ao do presente estudo foram encontrados por Jonfia-Essien et al. (2008), ao avaliarem a capacidade antioxidante de *nibs* de cacau de quatro variedades clonais, encontrando valores de 21,6 a 45,5 FE mg.g⁻¹. Enquanto que, valores inferiores aos encontrados no presente estudo foram observados por Othman et al. (2007), em extratos etanólicos de *nibs* (5,8 a 10,5 FE mg.g⁻¹), e por Sarmadi, Ismail e Hamid (2011), ao avaliarem a capacidade antioxidante de um extrato de amêndoa de cacau não fermentada, utilizando acetona como solvente extrator (5,3 a 9,3 FE mg.g⁻¹).

Os valores de capacidade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de chocolates procedentes dos três clones, não diferiram entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) (Tabela 16, pág. 78). Ademais, nenhum dos extratos de chocolates das variedades clonais, apresentaram valores superiores aos encontrados para o Controle. Cadiz-Gurrea et al. (2014), notaram diferenças significativas nos valores de capacidade antioxidante de extratos concentrados de chocolate. Contudo, os valores informados compreendem a faixa de 1,3 a 6,2 FE mg.g⁻¹, valores próximos aos valores encontrados no presente estudo.

Assim como verificado por Cadiz-Gurrea et al. (2014), outros autores também mencionam resultados próximos aos encontrados no presente estudo, a exemplo de Di Mattia et al. (2014), em amostras de extratos aquosos de chocolate com 64% de massa de cacau (3,2 FE mg.g⁻¹), e por Maleyki e Smail (2008), ao avaliarem a capacidade antioxidante de extratos hidroetanólicos de cacau em pó (3,6 FE mg.g⁻¹).

Hidalgo, Sánchez-Moreno, Pascual-Teresa (2010), mencionam que muitas vezes os resultados da capacidade antioxidante não mostram uma relação clara com

o teor de constituintes fenólicos. Isso pode ser explicado a partir da interação entre os constituintes fenólicos, o que pode reduzir ou aumentar a capacidade antioxidante da amostra analisada (HIDALGO, SÁNCHEZ-MORENO e PASCUAL-TERESA, 2010). O método FRAP, por exemplo, mostra resultados mais baixos em frações com níveis de metilxantinas (teobromina, cafeína e teofilina) elevados, ao passo que, em amostras com níveis de procianidinas elevados, apresentam melhores resultados (MALEYKI e ISMAIL, 2000).

Além disso, os menores valores de atividade antioxidante observados para os extratos de chocolates em relação aos encontrados para os extratos de *nibs*, podem estar relacionados às oxidações dos constituintes fenólicos, ocorridas durante o processamento do produto em questão, principalmente, pela aplicação de calor no processo (GADKARI e BALARAMAN, 2013). Uma vez que a diminuição dos teores de fenólicos na amostra irá influenciar diretamente nos valores de capacidade antioxidante (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997). Suposição comprovada por Di Mattia et al. (2014), ao avaliarem reduções da capacidade antioxidante em extratos aquosos de chocolates, produzidos com diferentes tempos de conchagem a 90°C. Nesse estudo, foi observado o valor de 5,1 FE mg.g⁻¹ para o controle, e após 6 horas de processo, o valor foi reduzido para 3,2 FE mg.g⁻¹.

O processamento e o solvente extrator podem influenciar nos valores observados para a capacidade antioxidante determinada pelo método FRAP, como relatado por Othman et al. (2007), ao observarem que o solvente extrator afetou significativamente a capacidade antioxidante. Sendo que, os extratos hidroetanólicos apresentaram valores superiores quando avaliados pelo método FRAP. O mesmo foi observado por Komes et al. (2013) ao avaliarem a capacidade antioxidante de extratos aquosos (3,8 FE mg.g⁻¹) e metanólicos (9,1 FE mg.g⁻¹) de chocolate 70%.

CONCLUSÕES

- Com o presente estudo verifica-se que a composição centesimal de *nibs* e chocolates, das três variedades clonais de cacauero e da variedade Catongo, encontram-se com valores aproximados dos constituintes analisados.
- Dentre as variedade clonais, o clone BN 34 apresenta maiores valores de constituintes fenólicos totais e flavonoides totais. Entretanto, nenhuma das variedades clonais apresentam diferenças significativas em relação a variedade Catongo.
- Os *nibs* e chocolates do clone BN 34, apresentaram melhores resultados em relação a capacidade antioxidante do que os clones CCN 51 e PSH 1319.

REFERÊNCIAS

ALBARICI, T. R.; PESSOA, J. D. C. e FORIM, M. R. Efeito das variações de pH e temperatura sobre as antocianinas na polpa de açaí – estudos espectrofotométricos e cromatográfico. **Comunicado Técnico**, São Carlos - SP, 2006.

ANDRES-LACUEVA, C.; MONAGAS, M.; KHAN, N.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; URPI-SARDA, M.; PERMANYER, J.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3111-3117, 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Resolução RDC n. 360, de 23 de dezembro de 2003**. Brasília, 2003. Acesso em: 23 de fevereiro de 2016.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 9th ed., Washington, D.C., 2010.

APAK, R.; OZYUREK, M.; GUCLU, K.; CAPANOGLU, E. Antioxidant activity/capacity measurement: I. Classification, physicochemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 10, p. 997-1027, 2016.

ARÉVALO, E.; RAM, A. MONTEIRO, W. R.; VALLE, R. R. Integração de práticas de manejo no cultivo de cacau. In: VALLE, R. R. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**, CEPLAC/CEPEC/SEFIS, 467p, 2007.

ARLORIO, M., LOCATELLI, M., TRAVAGLIA, F., COÏSSON, J. D., DEL GROSSO, E., MINASSI, A., et al. Roasting impact on the contents of clovamide (N -caffeoyl-L-DOPA)

and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), **Journal of Food Chemistry**, v. 106, p. 967–975, 2008.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2001.

ARRANZ, S.; VALDERAS-MARTINEZ, P.; CHIVA-BLANCH, G.; CASAS, R.; URPI-SARDA, M; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ESTRUCH, R. Cardioprotective effects of cocoa: Clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans. **Journal of Nutrition and Food Science**, v. 57. p. 936–947, 2013.

BELSCAK, A.; KOMES, D.; HORZIC, D.; GANIC, K. K.; KARLOVIC, D. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. **Journal of Food Research International**, v. 42, p. 707-716, 2009.

BELSCAK-CVITANOVIC, A., DURGO, K., GACINA, T., HORZIC, D., FRANKELIC, J., KOMES, D. Comparative study of cytotoxic and cytoprotective activities of cocoa products affected by their cocoa solids content and bioactive composition. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 173–186, 2012.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the Frap assay. **Analytical Biochemistry**. v. 239, p. 70-76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, M. E.; CUVELIER; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm Wiss U Technology Journal**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRIDLE, P. e TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. **Journal of Food Chemistry**, v. 58, p. 103-109, 1997.

BROUILLAR, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P., Anthocyanins as Food Colors. New York: **Academic Press**, 1982, p.1-39.

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Journal of Food Chemistry**, v. 127, p. 1821-1827, 2011.

CADIZ-GUERRA, M. L.; LOZANO-SANCHEZ, J.; COTRETERAS-GAMEZ, M.; LEGEAI-MALLET, L.; FERNANDEZ-ARROYO, S.; SEGURA-CARRETERO, A. Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 485-498, 2014.

CALIGIANI, A.; MARSEGLIA, A.; PALLA, G. Cocoa: Production, Chemistry, and use. **Encyclopedia of Food and Health**, Elsevier, ed. 1, 2016.

CAMU, N.; GONZALEZ, A.; WINTER, T.; SCHOOR, A. V.; BRUYNE K.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; ADDO, S. K; VUYST, L. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in ghana. **American Society for Microbiology**, v. 74, p. 86–98 2008a.

CAMU, N.; WINTER, T; ADDO, S. K.; TAKRAMA, J. S.; BERNAERT, H.; VUYST¹, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 88, p. 2288–2297, 2008b.

CAON, T.; KAISER, S.; FELTRIN, C.; CARVALHO, A.; SINCERO, T. C. M.; ORTEGA, G. G.; SIMÕE, C. M. O. Antimutagenic and antiherpetic activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat's claw). **Journal of Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 30-35, 2014.

CARRILLO, L. C.; LONDONO, J. L.; GIL, A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. **Journal of Food Research International**, v. 60, p. 273-280, 2014.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and associations with oil quality. **Revista Nutrição**, v. 24, p. 173-187, 2011.

CHEYNIER, V.; LABARBE, B.; MOUTOUNET, M. Estimation of procyanidin chain length. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 82-94, 2001.

COHEN, K. de O.; JACKIX, M. de N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 182-190, 2005.

CONSTANT, P. B. L. **Extração, Caracterização e Aplicação de Antocianinas de Açaí (*Euterpe oleraea*, M.)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 183 p., Viçosa, 2003.

COOK, N. C. e SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CORDERO-HERRERA, I.; MARTIN, M. A.; FERNANDEZ-MILLAN, E.; ALVAREZ, C.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa and cocoa flavanol epicatechin improve hepatic lipid metabolism in in vivo and in vitro models. Role of PKC ζ . **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 761-773, 2015.

CORDERO-HERRERA, I.; MARTIN, M. A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. **Journal of Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 10-19, 2014.

COUNET, C.; COLLIN, S. Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6816-6822, 2003.

COUNET, C.; OUWERX, C.; ROSOUX, D.; COLLIN, S. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 6243-6249, 2004.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNI, C.; MASELA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità Journal**, v. 43, p. 348-361, 2007.

BRITO, E. S. de; GARCIA, N. H. P.; GALLAO, M. I.; CORTELAZZO, A. L.; FEVEREIRO, P. S.; BRAGA, M. R. Structural and chemical changes in cocoa

(*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 281-288, 2000.

DI MATTIA, C., MARTUSCELLI, M., SACCHETTI, G., BEHEYDT, B., MASTROCOLA, D.; PITTIA, P. Effect of different conching processes on procyanidins content and antioxidant properties of chocolate. **Journal of Food Research International**, v. 63, p. 367-372, 2014.

DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T.; CLOUTIER, A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from Piceamariana bark and its proanthocyanidin-rich fractions. **Journal of Food Chemistry**, v. 113, p. 897-902, 2009.

DIXON, R. A.; XIE, D.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?. **Journal New Phytologist**, v. 165, p. 9-28, 2005.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. 226 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2009.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 181-201, 2011.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCIA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R. EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 142-150, 2010.

ESATBEYOGLU, T.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Isolation of dimeric, trimeric, tetrameric and pentamericprocyanidins from unroasted cocoa beans (*theobroma cacao* l.) using countercurrent chromatography. **Journal of Food Chemistry**, v. 179, p. 278–289, 2015.

FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. G. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 8, p. 505-509, 1957.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins, critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

GADKARI, P. V., BALARAMAN, M. Catechins: sources, extraction and encapsulation: a review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 122-138, 2013.

GIACOMETTI, J.; JOLIĆ, S. M.; JOSIĆ, D. Cocoa processing and impact on composition. **Processing and Impact on Active Components in Food**, v. 1, p. 605–612, 2015.

GONZALEZ-GALLEGO, J.; GARCIA-MEDIAVILLA, M. V.; SANCHES-CAMPOS, S.; TUNON, M. J. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 15-27, 2010.

GOUVÊA, A. C. M. S. **Quantificação das antocianinas majoritárias do açaí por cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, 2010.

GRANADO-SERRANO, A. B.; MARTIN, M. A.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; GOYA, L.; BRAVO, L.; RAMOS, S. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2020-2027, 2005.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; FERRI, C. Blood pressure and cardiovascular risk: What about cocoa and chocolate?. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 112-115, 2010.

GU, L. KELM. M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; GEBHARDT, S.; PRIOR, R. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 134, p. 613-617, 2004.

GU, L.; HOUSE, S. E.; WU, X.; OU, B.; PRIOR, R. L. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4057-4061, 2006.

GU, L.; KELM, M.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; CUNNINGHAM, D.; VANNOZZI, S.; PRIOR, R. L. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase hplc-ms fluorescent detection method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4852-4860, 2002.

GUEHI, S. T.; DABONNE, S.; BAN-KOFFI, L. B.; KEDJEBO, D. K.; ZAHOU, I. B. Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, p. 163-171, 2010.

GUIST, M. M.; WROLSTAD, R. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. v. 1, 2001.

GUO, H. e XIA, M. Anthocyanins and diabetes regulation - polyphenols in human health and disease. **Academic Press**, v.1, p. 83-93, 2014.

HAMMERSTONE, J. F.; LAZARUS, S. A.; MITCHELL, A. E.; RUCKER, R.; SCHMITZ, H. H. Identification of procyanidins in cocoa (*theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 490-496, 1999.

HAN, K.; KITANO-OKADA, T.; SEO, J.; KIM, S.; SASAKI, K.; SHIMADA, K.; FUKUSHIMA, M. Characterisation of anthocyanins and proanthocyanidins of adzuki bean extracts and their antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 692-701, 2015.

HARDY, F. Cacao Manual. Inter-American Institute of Agriculture Science, Turrialba, Costa Rica, 1960. In: PRABHAKARAN, N. K. P. The agronomy and economy of important tree crops of the developing world. **Agricultural Research New Delhi**, v. 1, p. 131-180, 2010.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Reviews Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUALTERESA, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Journal of Food Chemistry**, v.121, p.691-6, 2010.

HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 54-67, 2015.

HU, J. H.; KIM, B.; BAIK, M. Physicochemical properties and antioxidant capacity of raw, roasted and puffed cacao beans. **Journal of Food Chemistry**, v. 194, p. 1089-1094, 2016.

HUANG, D.; OU, B. PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

INSTITUTO ADOLF LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a ed., Brasília, 2008. 1020p.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Production of cocoa beans. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, v. 11, p. 1-1, 2015.

IOANNONE, F.; Di MATTIA, C.D.; DE GREGORIO, M.; SERGI, M.; SERAFINI, M. SACCHETTI, G. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. **Journal of Food Chemistry**, v. 174, p. 256-262, 2015.

ISO 14502-1. Content of total polyphenols in tea – Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. ISO: January, 2005. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=31356>. Acesso em 13 fev. 2016.

JANEIRO, P.; BRETT, A.M.O. Redox behavior of anthocyanins present in *Vitisvinifera* L. **Electroanalysis**. v. 19, p. 1779-1786, 2007.

JOLIC, S. M.; REDOVNIKOVIC, I. R.; MARKOVIC, K.; SIPUSIC, D. I.; DELONGA, K. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in coco beans processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1793–1800, 2011.

JONFIA-ESSIEN, W. A.; WEST, P. G.; ALDERSON, G. T. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. **Journal of Food Chemistry**, v. 108, p. 1155-1159, 2008.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. **Journal of Food Chemistry**. v. 86, p. 593-600, 2004.

KEALEY, K. S.; SNYDER, R. M.; ROMANCZYK, L. J.; GEYER, H. M.; MYERS, M. E.; WHITACRE, E. J.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. **Cocoa components, edible products having enriched polyphenol content, methods of making same and medical uses**. Patente US n. CA2323207-A1, 12 mar. 1999, 16 set. 2001. Disponível em: <http://brevets-patents.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/2323207/summary.html>>. Acesso em: 28 jul. 2015.

KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1090-1092, 1984.

KIRKA, A. OZKAN, M. e CEMEROGLU, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. **Journal of Food Chemistry**, v. 97, p.598–605, 2006.

KOMES, D. BELSCAK-CVITANOVIC, A.; SKRABAL, S.; VOJVODIC, A.; BUSIC, A. The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 360-369, 2013.

KOTHE, L.; ZIMMERMANN, B. F.; GALENSA, R. Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. **Journal of Food Chemistry**, v. 141, p. 3656-3663, 2013.

KRYSIAK, W. Effects of convective and microwave roasting on the physicochemical properties of cocoa beans and cocoa butter extracted from this material. **Journal od Grasas e Aceites**, v. 62, p. 467-478, 2011.

LEE, D. E.; KANG, N. J.; LEE, K. M.; LEE, B. K.; KIM, J. H.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Cocoa polyphenols attenuate hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication by blocking phosphorylation of connexin 43 via the MEK/ERK signaling pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 680-686, 2010.

LEITE, P. C.; MACIEL, L. F.; OPRETZKA, L. C. F.; SOARES, E. S.; BISPO, E. da S. Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from “witch broom disease” resistant and non resistant cocoa cultivars. **Revista Ciência Agrotécnica**, v. 37, p. 244-250, 2013.

LESSCHAEVE, I.; NOBLE, A. C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 330-335, 2005.

LIMA, L. J. R.; ALMEIDA, M. H.; ROB NOUT, M. J.; ZWIETERING, M. H. *Theobroma cacao* L., “the food of the gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 731-761, 2011.

LIU, Y.J.; ZHAN, J.; LIU, X.L.; WANG, Y. JI, J. e HE, Q.Q. Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Clinical Nutrition**, v. 33, p. 59-63, 2014.

LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J. D.; RIALDI, M.; ARLORIO, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Journal of Food Chemistry**, v. 114, p. 889-897, 2009.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MALEYKI, M. J. A., & ISMAIL, A. Antioxidant properties of cocoa powder. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 111–128, 2010.

MARTIN, A. A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in câncer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 336-351, 2013.

MARTINI, M. H.; TAVARES, D. de Q. Reservas das sementes de sete espécies de Theobroma: revisão. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 64, p. 10-19, 2005.

MATTHEWS, S.; MILA, I.; SCALBERT, A.; DONNELLY, D. M. X. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. **Phytochemistry**, v. 45, p. 405-410, 1997.

MEYER, A. S. YI, O.S.; PEARSON, D.A.; WATERHOUSE, A.L. e FRANKEL, E.N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitisvinifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1638-1643, 1997.

MILLER, K.B.; STUART, D.A.; SMITH, N.L.; LEE, C.Y.; MCHALE, N.L.; FLANAGAN, J.A.; OU, B.; HURST, W.J. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 4062–4068, 2006.

MIRANDA, I.; LIMA, L.; QUILHÓ, T.; KNAPIC, S.; PEREIRA, H. The bark of *Eucalyptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 81-87, 2016.

MISNAWI, J. S.; BAKAR, J.; SAARI, N. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 559-566, 2002.

MONTEIRO, W.; RAM, A.; MIDDLEJ, S. D.; VALLE, R. R. Renovação de cacauais na Bahia: Alternativas de uso de mudas. In: VALLE, R. R. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. CEPLAC/CEPEC/SEFIS. 467p, 2007.

NATSUME, M.; OSAKABE, N.; YAMAGISHI, M.; TAKIZAWA, T.; NAKAMURA, T.; MIYATAKE, H. HATANO, T.; YOSHIDA, T. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 2581-2587, 2000.

NAZARUDDIN, R.; SENG, L. K.; HASSAN, O.; SAID, M. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 24, p. 87-94, 2006.

NAZARUDDIN, R.; YATIM, A. M.; SAID, M.; KOK, H. C. HPLC determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 7, p. 377-386, 2001.

NEHLIG, A. The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 716-727, 2012.

NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; ELWERS, S.; NDOUMOU, D.; LIEBEREI, R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 612-619, 2006.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; AGUILAR, M. A. G.; BEZERRA, K. M. T.; ANHERT, D. E. Componentes Fenólicos e Enzimas Oxidativas em Clones de *Theobroma cacao* Resistentes e Suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Revista Fitopatologia brasileira**, v. 28, p. 148-154, 2003.

OFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 840-857, 2008.

OLIVEIRA, R. M. de O.; COSTA, W. R. C. da C.; SAMBUICHI, R. R.; FILHO, P. H. Importância do sistema agroflorestal cabruca para a conservação florestal da região. **Revista Geográfica de América Central**, v. 1, p. 1-12, 2011.

OLIVEIRA, T. B. de O.; GENOVESE, M. I. Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Food Research International**, v. 51, p. 929-935, 2013.

OLIVEIRA, T. B.; ROGERO, M. M.; GENOVESE, M. I. Polyphenolic-rich extracts from cocoa (*Theobroma cacao* L.) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* W.) liquors: A

comparison of metabolic effects in high-fat fed rats. **Journal of Pharma Nutrition**, v. 3, p. 20-28, 2015.

OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; GHANI, N. A.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Journal of Food Chemistry**, v. 100, p. 1523-1530, 2007.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PAYNE, M. J.; HURST, J.; MILLER, K. B.; RANK, C. STUART, D. A. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, p. 10518-10527, 2010.

PEDAN, V.; FISCHER, N.; ROHN, S. An online NP-HPLC-DPPH method for the determination of the antioxidant activity of condensed polyphenols in cocoa. **Journal of Food Research International**, v. 71, p. 01-11, 2015.

PEREIRA, G. V. de M.; MIGUEL, M. G. de C.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5395-5405, 2012.

PETERSON, J. e DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995-2018, 1998.

PIASENTIN, F. B.; SAITO, C. H. Os diferentes métodos de cultivo de cacau no sudeste da Bahia, Brasil: aspectos históricos e percepções. **Revista Ciências Humanas**, v. 9, p. 61-78, 2014.

PINA, M. G. M. **Aproveitamento de subprodutos e resíduos do cacau**. Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira. Belém, CEPLAC, 2001.

PINTO, L. R. M. P.; PIRES, J. L. Seleção de plantas resistentes à Vassoura-de-bruxa. **Boletim Técnico**, CEPLAC/CEPEC, n. 181, 1998.

PRABHAKARAN, N. K. P. The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World. **Agricultural Research New Delhi**, v. 1, p. 131-180, 2010.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. M. Standard methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. S. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAMIRO-PUIG, E.; CASTELL, M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 931-940, 2009.

RAMOS, A.; SODRÉ, G. A.; PORTO, J. S.; COSTA, R. de Q. Desenvolvimento de mudas de cacaueteiro em função de níveis de aplicação de água. **Revista Agrotópica**, v. 27, p. 19-24, 2015.

RAWEL, H. M.; KULLING, S. E. Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 2, p. 399-406, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 22-26, 1999.

ROHAN, T. A. Precursors of chocolate aroma. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 14, p. 456-459, 1963.

RUSCONI, M.; CONTI, A. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 5-13, 2010.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCH, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Journal of Food Control**, v. 29, p. 167-187, 2013.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276, 1998.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SARMADI, B.; ISMAIL, A.; HAMID, M. Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. **Journal of Food Research Internaciotional**, v. 44, p. 290-296, 2011.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 782-796, 2015.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Journal of Food Chemistry**, v. 112, p. 654-658, 2009.

SCHINELLA, G.; MOSCA, S.; JOVELLANOS, E. C.; PASAMAR, M. A.; MUGUERZA, B.; RAMON, D.; RIOS, J. L. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. **Journal of Food Research International**, v. 43, p. 1614-1623, 2010.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 205-221, 2010.

SHAO, Y. BAO, J. Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. **Journal of Food Chemistry**, v. 180, p. 86-97, 2015.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Journal of Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SIEBERT, K. J., TROUKHANOVER, N. V.; LYNN, P. Y. Nature of polyphenol e protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 80-85, 1996.

SILVA, A. G. da. **Extração e estabilidade dos carotenóides obtidos de tomate processado (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. 107 pag., 2001.

SMITH, D. F. Benefits of flavanol-rich cocoa-derived products for mental well-being: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 10-15, 2013.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STRINGHETA, P. C.; BOBBIO, P. A. Copigmentação de antocianinas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 14, p. 34-37, 2000.

SULISTYOWATI; MISNAWI. Effects of alkali concentration and conching temperature on antioxidant activity and physical properties of chocolate. **International Food Research Journal**, v. 15, p. 297-304, 2008.

TABERNERO, M.; SERRANO, J.; SAURA-CALIXTO, F. The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 28–32, 2006.

TALLON, M. J. Authorised EU health claim for cocoa flavanols. **Foods, Nutrients and Food Ingredients**, v. 2, p. 75-93, 2015.

TANWAR, B.; MODGIL, R. Flavonoids: dietary occurrence and health benefits. **Spatula DD**, v. 2, p. 59-68, 2012.

TEIXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C. e OLIVEIRA, F.A. de. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, p. 297-304, 2008.

TERRIER, N. LEGRAND-PONCET, C.; CHEYNIER, V. Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. **Wine Chemistry and Biochemistry**, v. 1, p. 463-507, 2009.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. **Distribution of anthocyanins in food plants: Anthocyanins as food colors**. Academic Press, ed.1, 1982.

TODOROVIC, V.; REDOVNIKOVIC, I. R.; TODOROVIC, Z.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M.; SOBAJIC. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 137-143, 2015.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

VALLE, R. R. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. CEPLAC/CEPEC/SEFIS. 467p, 2007.

VALLS, J.; MILLAN, S.; MARTI, M. P.; BORRAS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromathography**, v. 1216, p. 7143-7172, 2009.

VINSON, J. A. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. **American Chemical Society**, v. 47, p. 4821-4824, 1999.

VOIGT, J.; HEINRICHS, H.; VOGT, G.; BIEHL, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. **Journal of Food Chemistry**, v. 50, p. 177-184, 1994.

WALLACE; T. C.; GUISTI, M. M. Selective removal of the violet color produced by anthocyanins in procyanidin-rich unfermented cocoa extracts. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 1010-1017, 2011.

WANG, G. X.; YUAN, S.; WANG, J.; LIN, P.; LIU, G.; LU, Y.; ZHANG, J.; WANG, W.; WEI, Y. Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 215, p. 168-178, 2006.

WOLLGAST, J. **The contents and effects of polyphenols in chocolate**. Dissertação (Doutorado). Agricultural and nutritional sciences, home economics, and environmental management at the university of Gießen, Germany, 2004. 332p.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, p. 423-447, 2000.

WROLSTAD, R.E. Anthocyanin Pigments Bioactivity and Coloring Properties. **Journal of Food Science**, v.69, p. 419-425, 2004.

XAVIER, M.F. **Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2004.

XIE, D.; DIXON, R. A. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2127-2144, 2005.

XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4251-4260, 2014.

YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 64-71, 2006.

ZAHOULI, G. I. B.; GUEHI, S. T.; FAE, A. M.; NEMLI, J. G. Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. **Journal of Food Science**, v. 2, p. 184-190, 2010.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Journal of Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZUGAIB, A. C. C.; BARRETO, R. C. S. Mercado internacional de cacau: previsão da demanda, oferta e preços. **Revista Bahia Agrícola**, v. 9, p. 80-87, 2016.

ZYZELEWICZ, D. SZYDA, M. Z.; JUSKIEWICZ, J.; BOJCZUK, M.; ORACZ, J.; BUDRYN, G.; MISKIEWICZ, K.; KRYSIAK, W.; ZDUNCZYK, Z.; JARGONSKI, A. Cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) phenolic extracts as PTP1B inhibitors, hepatic HepG2 and pancreatic β -TC3 cell cytoprotective agents and their influence on oxidative stress in rats. **Journal of Food Research International**, v. 10, p. 1-12, 2016.