



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA–UESB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DO FARELO DE CACAU POR
Penicillium roqueforti E AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

OZANA ALMEIDA LESSA

**ITAPETINGA/BAHIA
2012**

OZANA ALMEIDA LESSA

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DO FARELO DE CACAU POR
Penicillium roqueforti E AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra Alexilda Oliveira de Souza

Co-orientadora: Prof^ª. Dra Simone Andrade Gualberto

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
2012**

633.74 L632e	<p data-bbox="424 463 694 495">Lessa, Ozana Almeida</p> <p data-bbox="424 600 1353 745">Estudo da fermentação do farelo de cacau por <i>Penicillium roqueforti</i> e avaliação da composição química e atividade antioxidante. / Ozana Almeida Lessa. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012. 68p.</p> <p data-bbox="424 792 1353 938">Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Strictu Sensu</i>” do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D Sc. Alexilda Oliveira de Souza e co-orientação da Prof^a. D Sc. Simone Andrade Gualberto.</p> <p data-bbox="424 1014 1353 1234">1. Farelo de cacau – Fermentação – <i>Penicillium roqueforti</i> – Atividade antioxidante. 2. Farelo de cacau – Resíduo agroindustrial – Reaproveitamento. 3. <i>Penicillium roqueforti</i> – Composição química – Avaliação. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Souza, Alexilda Oliveira de. III. Gualberto, Simone Andrade. IV. Título.</p> <p data-bbox="1145 1285 1353 1317" style="text-align: right;">CDD(21): 633.74</p>
---------------------	---

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Farelo de cacau : Fermentação
2. *Penicillium roqueforti* : Atividade antioxidante
3. Farelo de cacau : Reaproveitamento
4. *Penicillium roqueforti* : Composição química



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Estudo da fermentação do farelo de cacau por *Penicillium roqueforti* e avaliação da composição química e atividade antioxidante.”

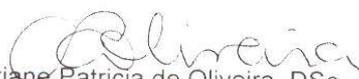
Autor: OZANA ALMEIDA LESSA

Orientadora: Prof^a. Alexilda Oliveira de Souza, DSc., UESB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof^a. Alexilda Oliveira de Souza, DSc., UESB


Prof^a. Ana Paula Trovatti Uetanabaro, DSc., UESC


Prof^a. Cristiane Patricia de Oliveira, DSc., UESC

Data da Realização: 14 de Dezembro de 2012.

A todos que se esforçam, mesmo com tantos empecilhos, para encontrar melhorias para a sociedade através da pesquisa, da fé e/ou de um gesto.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Louvo a Deus por me permitir subir mais este degrau da vida acadêmica. “Tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser vem de Ti, Senhor!”

Aos meus pais, Olímpio e Valneide, por serem minha base forte sempre e minha inspiração a prosseguir.

À minha irmã Bel, minhas sobrinhas Francly e Ozaninha, e todos familiares que torceram por cada etapa.

Minhas orientadoras maravilhosas, Alexilda e Simone, pelos ensinamentos, pela paciência, amizade e por acreditarem em mim.

À Banca Examinadora, professoras Ana Paula Uetanabaro e Cristiane Patrícia de Oliveira, pelas sugestões e correções.

Aos professores Marcelo Franco, Marcondes Viana e Julliana Simionato por disponibilizarem as instalações do LABRA, NECAL e CEACROM, respectivamente. E ainda, por acrescentarem a este trabalho valiosas ideias e informações.

Aos colegas do NUPESQ, que dividimos espaço, equipamentos e experiências.

À Clissiane, Ellen Lacerda, Girlana, Ingrid, Jeanny, Maisa e Matheus que me auxiliaram nos momentos difíceis, que pacientemente me ensinaram metodologias e cooperaram para que os resultados fossem obtidos.

À turma de mestrado do PPGEA 2011 pela amizade e torcida, especialmente minha amiga Larissa e William que me acompanharam de perto.

Aos amigos-família: Juliana, Juliane, Miné, Mylla, Nay. E aos amigos-família que se fizeram presentes na distância: Jacque, Hundy, Kau, Tai, Lilian e Márcio. Sei que a alegria não é minha, é nossa!

Aos colegas de trabalho da Visam pela imensa compreensão das fugidinhas e faltas nesse período. Só Deus sabe o quanto sou grata por cada um de vocês.

Aos amigos-irmãos que oraram e oram por minhas vitórias: Pr. Marco César, Geo, minha líder Sol e todas da minha célula, Dila, Lipe, Dam, Vasti e Robinho.

À UESB e ao PPGEA pela oportunidade de aprender e de representá-los.

A todos que contribuíram de alguma forma com esta pesquisa.

“O Senhor retribua o teu feito...” Rt. 2:12

Muito obrigada!

RESUMO

LESSA, O.A. **Estudo da Fermentação do Farelo de Cacau por *Penicillium roqueforti* e Avaliação da Composição Química e Atividade Antioxidante.** Itapetinga – BA: UESB, 2012. 68p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Processos de Alimentos).*

Diversos estudos acerca das características dos resíduos agroindustriais brasileiros têm sido realizados com a perspectiva de que estes sejam adequadamente reaproveitados. Nesse contexto, objetivou-se no presente trabalho realizar a prospecção química e avaliar a atividade antioxidante do farelo de cacau *in natura* e fermentado com o *Penicillium roqueforti*. Realizou-se fermentação em estado sólido utilizando uma cepa do fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* e como meio de cultivo o farelo de cacau *in natura* e o farelo restante após extração aquosa e hidroalcoólica. Foram também preparados, extratos aquosos e hidroalcoólicos do farelo *in natura* e dos fermentados. Foram realizadas análises para avaliação qualitativa de alguns metabólitos secundários, a quantificação de flavonoides e a avaliação da atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH. Foram quantificados carotenoides totais, antocianinas e flavonóis totais, compostos fenólicos e ácidos graxos. Os resultados evidenciaram que os extratos e os farelos avaliados apresentaram teores significativos de antocianinas, flavonóis, compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, além de eficiente atividade antioxidante e uma composição interessante de ácidos graxos. Os extratos obtidos dos farelos fermentados com o *Penicillium roqueforti* demonstraram a presença de saponinas, não encontradas nos extratos *in natura*. O perfil de ácidos graxos do farelo foi modificado após a fermentação, revelando um aumento dos ácidos graxos insaturados. Os resultados indicam uma potencialidade de reaproveitamento do resíduo estudado, bem como sua fermentação pelo *P. roqueforti*.

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial, Fermentação em Estado Sólido, Compostos Fenólicos, Metabólitos Secundários.

*Orientadora: Prof^ª. Dra. Alexilda Oliveira de Souza, UESB e Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Simone Andrade Gualberto, UESB.

ABSTRACT

LESSA, O. A. **Study of Cocoa Meal Fermentation by *Penicillium roqueforti* and Evaluation of Chemical Composition and Antioxidant Activity.** Itapetinga – BA: UESB, 2012. 68p. (Master's Thesis, Food Engineering – Food Engineering Processes).*

A number of studies regarding the characteristics of Brazilian agroindustrial residues have been conducted with the perspective that they can be adequately reused. In this context, the objective of the present work was to perform the chemical prospection and to evaluate the antioxidant activity of unprocessed cocoa meal fermented with *Penicillium roqueforti*. We performed solid-state fermentation with a strain of the filamentous fungus *Penicillium roqueforti* and unprocessed cocoa meal as cultivation medium, and the remainder meal after aqueous and hydroalcoholic extraction. Aqueous and hydroalcoholic extracts of the unprocessed and the fermented meals were also prepared. We performed analyses for the qualitative evaluation of some secondary metabolites, the quantification of flavonoids and for antioxidant activity using methods FRAP and DPPH. We quantified total carotenoids, anthocyanins and total flavonols, phenolic compounds and fatty acids. The results evidenced that the extracts and meals evaluated had significant levels of anthocyanins, flavonols, phenolic compounds, flavonoids and carotenoids, as well as an efficient antioxidant activity and an interesting fatty acid composition. The extracts obtained from meals fermented with *Penicillium roqueforti* showed the presence of saponins, which were not found in unprocessed extracts. The meal's fatty acid profile changed after fermentation, revealing an increase in unsaturated fatty acids. The results indicate potential for reuse of the residue researched, as well as its fermentation by *P. roqueforti*.

Keywords: Agroindustrial residue, solid-state fermentation, phenolic compounds, secondary metabolites.

*Thesis advisor: Alexilda Oliveira de Souza, D.Sc, UESB; Co-Advisor: Simone Andrade Gualberto, D.Sc, UESB.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição químico-bromatológica do farelo de cacau.....	19
Tabela 2.	Resultados da prospecção química in vitro dos extratos do farelo de cacau.....	50
Tabela 3.	Concentração de flavonoides totais nas amostras de farelo de cacau.....	51
Tabela 4.	Poder Antioxidante Redutor do íon Ferro produzido pelos extratos.....	53
Tabela 5.	Atividade Antioxidante dos extratos de farelo de cacau determinada pelo método de sequestro dos radicais livres DPPH.....	55
Tabela 6.	Teor de Fenólicos Totais nos farelos de cacau.....	56
Tabela 7.	Teor de Antocianinas e Flavonóis Totais.....	57
Tabela 8.	Teor de Carotenoides Totais nos farelos de cacau.....	58
Tabela 9.	Composição em ácidos graxos dos farelos de cacau.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Frutos do cacauero.....	15
Figura 2.	Indústrias Moageiras de Cacau no Brasil.....	16
Figura 3.	Farelo de cacau na saca.....	17
Figura 4.	Fluxograma geral do processamento das sementes de cacau até obtenção dos <i>liquors</i>	18
Figura 5.	Etapas da Fermentação em Estado Sólido.....	22
Figura 6.	<i>Penicillium roqueforti</i> visto em microscópio eletrônico, colorido artificialmente.....	25
Figura 7.	Estrutura química do DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.....	27
Figura 8.	Redução do TPTZ com Fe^{+3}	28
Figura 9.	Biossíntese dos principais metabólitos secundários de plantas.....	29
Figura 10.	Farelo de cacau depois de moído.....	33
Figura 11.	Fluxograma ilustrativo do procedimento experimental.....	34
Figura 12.	Teores de Flavonoides Totais nos diferentes tipos de extratos preparados a partir dos farelos de cacau.....	52
Figura 13.	Representação gráfica do Poder Antioxidante Redutor de íons Ferro produzido pelos extratos.....	53
Figura 14.	Representação gráfica da atividade antioxidante dos extratos de farelo de cacau determinada pelo método de sequestro dos radicais livres DPPH.....	55
Figura 15.	Teor de Fenólicos Totais nos farelos de cacau.....	56
Figura 16.	Percentual de ácidos graxos saturados e insaturados encontrados nos farelos de cacau.....	60

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µg	Miligramas
µL	Microlitros
AGPI	Ácidos Graxos Poli-insaturados
AGMI	Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGS	Ácidos Graxos Saturados
atm	Pressão atmosférica
CEACROM	Centro de Estudos e Análises Cromatográficas
CT	Carotenoides Totais
CUPRAC	Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity
DIC	Detector de Ionização de Chama
d.i.	Diâmetro Interno
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazil
ECL	Comprimento Equivalente de Cadeia
FES	Fermentação em Estado Sólido
FT	Fenólicos Totais
FRAP	Poder Antioxidante Redutor do Ferro
g	Gramas
GAE	Gramas de ácido gálico
h	Horas
H ₂	Hidrogênio
ISO	International Organization For Standardization
Kg	Quilograma
LABRA	Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
m	Metro
M	Molar
mm	Milímetro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N ₂	Nitrogênio
NECAL	Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos
nm	Nanômetro
NUPESQ	Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PA	Pura para Análise
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potencial Hidrogeniônico
t	Tonelada
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	OBJETIVOS.....	14
2.1.	Objetivo Geral.....	14
2.2.	Objetivos Específicos.....	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1.	O Cacau.....	15
3.2.	Farelo de Cacau.....	17
3.3.	Resíduos Agroindustriais.....	20
3.4.	Fermentação em Estado Sólido.....	21
3.5.	Fungos Filamentosos.....	23
3.6.	Antioxidantes.....	25
3.6.1.	Método DPPH.....	26
3.6.2.	Método FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro).....	27
3.7.	Metabólitos Secundários.....	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1.	Local de Execução do Projeto.....	33
4.2.	Obtenção da Matéria-prima.....	33
4.3.	Preparo da Amostra.....	33
4.4.	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	35
4.4.1.	Micro-organismo.....	35
4.4.2.	Preparo do inóculo.....	35
4.4.3.	Fermentação.....	36
4.5.	Obtenção dos Extratos.....	36
4.5.1.	Extratos Aquoso e Hidroalcoólico do Farelo <i>In Natura</i>	36
4.5.2.	Extratos Aquoso e Hidroalcoólico do Farelo Fermentados II e III.....	36
4.5.3.	Extratos Aquoso e Hidroalcoólico do Farelo Fermentado I.....	37
4.6.	Prospecção Química: Testes Qualitativos para Identificação de Compostos Secundários.....	37
4.6.1.	Testes para a Determinação de Metabólitos Secundários.....	38
4.6.1.1.	Teste para a determinação da presença de heterosídeos antociânicos.....	38
4.6.1.2.	Teste para a determinação da presença de saponosídeos.....	38
4.6.1.3.	Teste para a determinação da presença de gomas e mucilagem.....	39
4.6.1.4.	Teste para a determinação da presença de taninos.....	39
4.6.1.5.	Teste para a determinação da presença de catequinas.....	39
4.6.1.6.	Teste para a determinação da presença de esteroides e triterpenoides.....	39
4.6.1.7.	Teste para a determinação da presença de alcaloides.....	40
4.6.1.8.	Teste para a determinação da presença de compostos fenólicos.....	41
4.6.1.9.	Teste para a determinação da presença de compostos antraquinônicos livres.....	41
4.6.1.10.	Teste para a determinação da presença da presença de cumarinas.....	42
4.6.1.11.	Teste para a determinação da presença de flavonoides.....	42
4.7.	Quantificação de Flavonoides Totais.....	42
4.8.	Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).....	43
4.9.	Atividade Antioxidante pelo Sequestro do Radical DPPH.....	44

4.10.	Extração e Determinação dos Compostos Fenólicos	45
4.11.	Extração e Quantificação de Antocianinas Totais e Flavonóis Totais.....	45
4.12.	Extração e Quantificação de Carotenoides Totais.....	46
4.13.	Perfil de Ácidos Graxos.....	47
4.14.	Análise Estatística.....	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1.	Prospecção Química.....	49
5.2.	Flavonoides Totais.....	50
5.3.	Atividade Antioxidante.....	52
5.3.1.	Método FRAP.....	52
5.3.2.	Método DPPH.....	54
5.4.	Fenólicos Totais.....	56
5.5.	Quantificação de Antocianinas Totais e Flavonóis Totais.....	57
5.6.	Quantificação de Carotenoides Totais (CT).....	57
5.7.	Composição em Ácidos Graxos.....	58
6.	CONCLUSÃO.....	61
7.	TRABALHOS FUTUROS.....	62
8.	REFERÊNCIAS.....	63

INTRODUÇÃO

O cacau é um fruto muito popular, pois a partir de suas sementes é obtido um dos alimentos mais conhecidos e apreciados no mundo: o chocolate. No processamento do chocolate, bem como de outros derivados do cacau, é gerado um resíduo denominado farelo de cacau, também conhecido como casca ou testa da semente do cacau.

Esse resíduo tem sido estudado para uso na alimentação animal, porém sem grandes sucessos, devido à presença de fatores antinutricionais, como a teobromina. A falta de estudos indicando sua possível aplicação tem feito com que o farelo de cacau seja descartado ou utilizado como combustível nas caldeiras das indústrias processadoras de cacau.

Uma crescente atenção tem sido dada aos resíduos agroindustriais na atualidade, principalmente aos resíduos sólidos. Eles costumam ocupar muito espaço quando descartados, o que causa grandes impactos ao meio ambiente, exigindo que mais estudos sejam realizados, buscando formas que garantam seu reaproveitamento.

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido desempenha um papel de destaque no reaproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, muitos dos quais apresentam grande interesse para o segmento industrial, além de elevado valor agregado.

Nessa técnica, diferentes tipos de micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos, biotransformando-os em produtos desejados por diversas indústrias, para aplicação farmacológica, alimentícia, dentre outras.

O fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* é utilizado na indústria de alimentos, na produção do queijo roquefort, e sua ação lipolítica é responsável pelo sabor do queijo, através da produção de compostos aromáticos. Tendo em vista a importância deste micro-organismo para a área de alimentos e a não formação de substâncias tóxicas ao organismo humano durante seu desenvolvimento, ele foi selecionado para aplicação no farelo de cacau.

A partir de compostos formados pelo crescimento de micro-organismos é possível isolar substâncias capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde. Esses compostos estão presentes em alimentos e plantas e são denominados metabólitos secundários.

Dentre os benefícios que os metabólitos secundários podem oferecer destaca-se a atividade antioxidante. Vários são os compostos que apresentam essa propriedade, sendo capazes de ajudar a combater ou inibir o processo oxidativo sofrido pelas células do organismo, o que é responsável pelo envelhecimento, desenvolvimento de doenças cardiovasculares e câncer. Esse efeito protetor atribuído aos antioxidantes naturais é produzido principalmente por um conjunto de metabólitos secundários conhecidos como compostos fenólicos.

Nesse contexto, objetivou-se no presente trabalho, realizar a prospecção química e avaliar a atividade antioxidante do farelo de cacau *in natura* e fermentado com *Penicillium roqueforti*, com a perspectiva de identificar e quantificar metabólitos com atividade antioxidante, com potencial para aplicação nutricional e tecnológica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Realizar a prospecção química e avaliar a atividade antioxidante do farelo de cacau *in natura* e fermentado com *Penicillium roqueforti*.

2.2. Objetivos Específicos:

- Obter os extratos aquosos e hidroalcoólicos do farelo de cacau *in natura*;
- Realizar a Fermentação em Estado Sólido (FES) com o fungo *Penicillium roqueforti* dos resíduos resultantes da extração aquosa e hidroalcoólica do farelo *in natura*;
- Realizar a Fermentação em Estado Sólido (FES) com o fungo *Penicillium roqueforti* do farelo *in natura*;
- Preparar os extratos aquosos e hidroalcoólicos dos farelos fermentados;
- Identificar qualitativamente a presença de alguns metabólitos secundários nos extratos;
- Quantificar os flavonoides presentes nos extratos;
- Quantificar a atividade antioxidante dos extratos obtidos;
- Quantificar os compostos fenólicos, antocianinas totais, flavonóis totais e carotenoides totais nos farelos fermentados e *in natura*;
- Determinar a composição de ácidos graxos no farelo *in natura* e nos farelos fermentados;
- Avaliar o reaproveitamento do farelo de cacau.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O Cacau

O cacaeiro é originário de regiões de florestas pluviais da América Tropical, onde até hoje é encontrado em estado silvestre, desde o Peru até o México. É pertencente ao gênero *Theobroma*, família das Esterculiáceas. Foi citado pela primeira vez na literatura botânica por Charles de Ecluse, que o descreveu sob o nome de *Caçã fructus*. Em 1737, foi descrito como *Theobroma fructus* por Linneu, que em 1753 propôs o nome *Theobroma cacao*, que permanece até hoje (BARROCO E MORORO, 1989).

O fruto do cacaeiro é chamado de cacau (**Figura 1**). A origem do nome “cacau” é nobre, remonta a uma lenda asteca, em que Quatzalcault, deus da agricultura asteca, ensinou seu povo a cultivar e aproveitar o cacaeiro. Em latim significa manjar dos deuses.



Figura 1. Frutos do cacaeiro (Fonte: marscacau.com.br)

As primeiras mudas de cacau foram plantadas no Brasil no Estado da Bahia, no século XVIII e, por cento e cinquenta anos deram muita riqueza e poder aos ditos “coronéis” da região, transformando o país no maior produtor e exportador de cacau do

mundo. Hoje em dia, o cacau continua sendo cultivado, porém, devido a pragas, baixo preço no mercado internacional, falta de investimentos e concorrência com outros países, já não ocupa tal posição de destaque no mercado (PEREIRA, 2012).

No Estado da Bahia, a produção cacauera constitui uma importante atividade agrícola brasileira, uma vez que é responsável pela produção de aproximadamente 130 mil toneladas de cacau por ano, representando cerca de 82,3% do cacau produzido no país, vindo, em seguida, os estados do Pará, com 12,8% e Rondônia, com 3,5% (CEPLAC, 2001). Ainda segundo a CEPLAC, a produção anual de cacau em amêndoa no Brasil é de 163,8 mil toneladas e a Bahia é responsável pela maior parte da produção (CEPLAC, 2003).

Segundo Zugaib *et al.* (2004), as principais empresas moageiras em 2003, situadas no Brasil, são a Cargill com 33%, a AdmCocoa (Joanes) com 23%, a Barry Callebaut com 22%, a Nestlé com 13% e a Indeca com 9%, sendo que 95% das empresas estão situadas na Bahia (**Figura 2**). Atualmente esses dados inalterados.

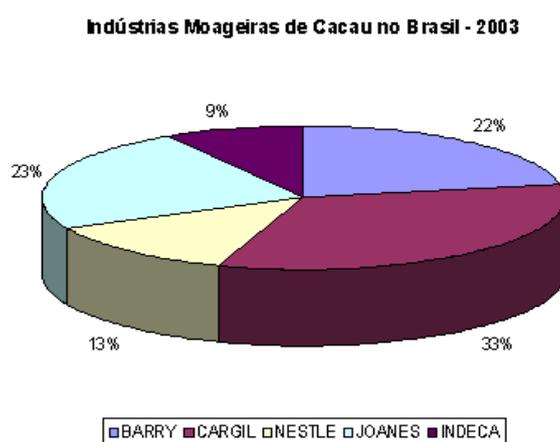


Figura 2. Indústrias moageiras de cacau no Brasil (ZUGAIB *et al.*, 2004)

A porção aproveitável de subprodutos e resíduos do cacau é bastante expressiva, pois menos de 8% do peso do fruto do cacau, em estado normal de maturação, é

usado pela indústria beneficiadora. Em geral, um fruto com peso médio de 500 g, é constituído de 80% de casca e 20% de semente, na qual estão presentes o grão seco (10%), a amêndoa (8%), a testa (1,5%) e outros constituintes (0,5%) (FREIRE *et al.*, 1990).

3.2. Farelo de Cacau

O fruto do cacau apresenta um pericarpo carnoso composto de três partes distintas: o epicarpo que é carnoso e espesso, cujo extrato epidérmico exterior pode estar pigmentado; o mesocarpo, que é delgado e duro, mais ou menos lignificado e o endocarpo, que é carnoso, mais ou menos espesso (ZUGAIB *et al.*, 2004). Esse mesocarpo corresponde à casca da semente que após torrada na indústria é denominada farelo de cacau (**Figura 3**).



Figura 3. Farelo de cacau na saca. (Fonte: O Autor)

O farelo de cacau é um resíduo do processamento do grão do cacau para fabricação do chocolate e outros produtos (**Figura 4**).

As amêndoas chegam às indústrias fermentadas e secas. Após seleção, seguem para a torrefação, onde são expostas a temperatura em torno de 150°C, até que a umidade atinja cerca de 2%. Os grãos seguem para o descasque, pois se tornam

quebradiços, facilitando a separação do nibs (amêndoa sem a casca) e da casca. Nesse processo, a diferença de densidade entre a casca e o nibs faz com que sopradores de ar suguem as cascas para a área destinada a resíduos e os nibs seguem para as demais fases do processamento.

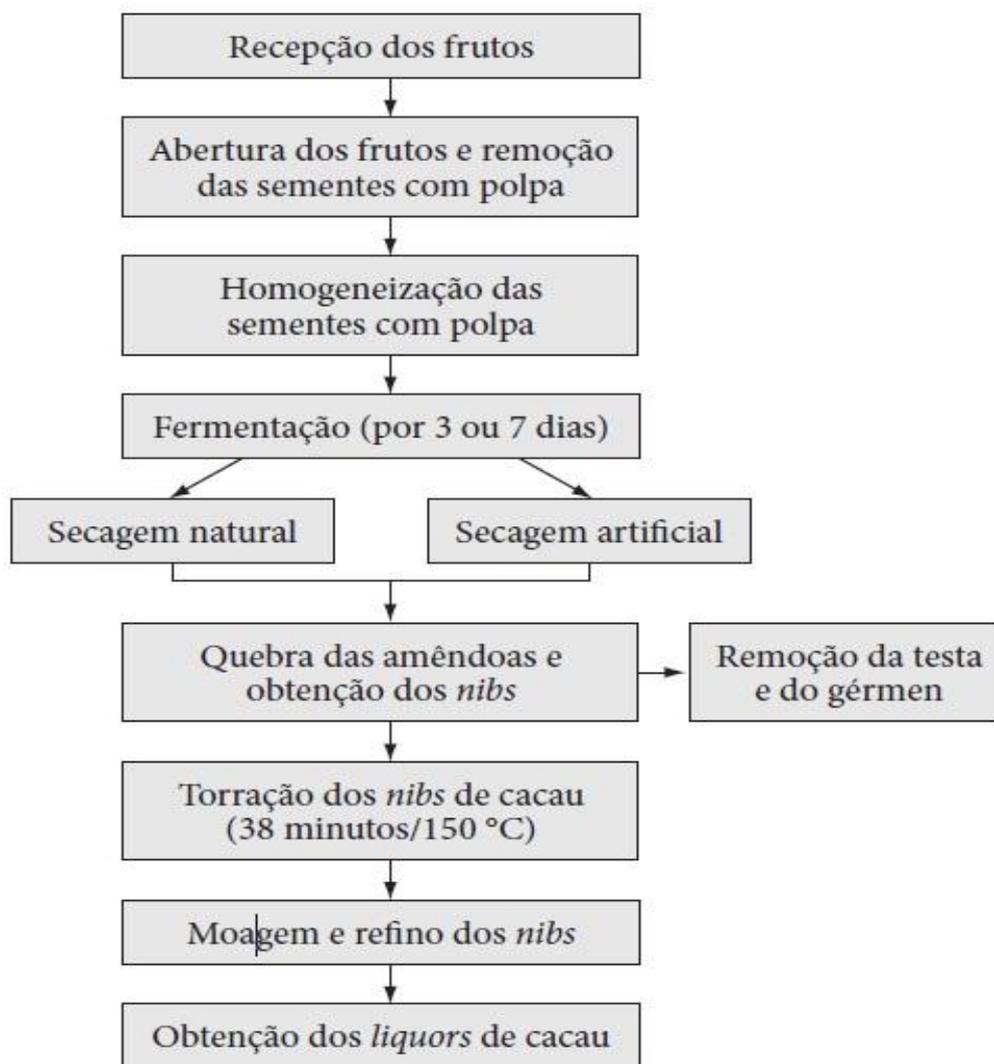


Figura 4. Fluxograma geral do processamento das sementes de cacau até obtenção dos *liquors*. (Fonte: EFRAIM *et al.*, 2010)

Segundo Belitz e Gosch (1988), na etapa de tostagem, os compostos fenólicos, como os taninos presentes nos grãos são oxidados e é eliminado, também, o ácido acético formado durante a fermentação, ésteres e outras substâncias aromáticas não

desejáveis, além de ovos de eventuais parasitas. Após o tratamento térmico, o aroma e a cor dos grãos são reforçados.

Além da tostagem, outro processo pode ser usado para separar a casca do grão, que consiste em lavá-los após secagem ao ar e, em seguida, submetê-los a vapor em equipamento apropriado. Dessa maneira, o grão incha e a casca se solta. Este processo produz um farelo com 16% de proteína bruta, 2,5% de extrato etéreo, 17% de fibra bruta, 8% de matéria mineral e teor máximo de 1,5% de teobromina (CARGILL, 1999).

Na **Tabela 1** são apresentados os dados da composição químico-bromatológica do farelo de cacau determinados por Carvalho *et al.* (2008).

Tabela 1. Composição químico-bromatológica do farelo de cacau

Item	% no farelo de cacau
Matéria Seca	89,8
Matéria Orgânica^{1%}	92,6
Proteína Bruta^{1%}	13,5
Extrato Etéreo^{1%}	9,9
Fibra em Detergente Neutro^{1%}	48,5
Fibra em Detergente Neutro Isenta de Fibras e Proteínas^{1%}	43,6
Fibra em Detergente Ácido^{1%}	40,0
Cinzas^{1%}	7,4
Lignina^{1%}	17,9
Celulose^{1%}	23,1
Hemicelulose^{1%}	8,5
Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro^{1%}	1,1
Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido^{1%}	1,0
Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro^{2%}	50,5
Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido^{2%}	47,7
Carboidratos Totais^{1%}	69,2
Carboidratos Não Fibrosos^{1%}	25,7
Digestibilidade <i>in vitro</i> da Matéria Seca^{1%}	47,0

1 % da MS; 2 % do NT.

Sodré (2010) calcula que, uma tonelada de amêndoa com 7% de umidade, pode gerar de 80 a 120 kg desse resíduo após o processamento. E que, no Estado da Bahia, onde estão instaladas cinco indústrias de moagem, são gerados por ano aproximadamente 10.000 t do farelo de cacau.

Segundo Silva Neto (2001), a casca do grão obtida após o processo de torrefação na indústria, pode ser usada no preparo de chá, extração de pectina e teobromina, como ração animal, adubo orgânico e fonte de energia, através de sua combustão em geradores de calor como fornalhas e caldeiras.

3.3. Resíduos Agroindustriais

A Organização Mundial de Saúde (OMS), segundo Valle (2002) define resíduos como “algo que seu proprietário não mais deseja, em um dado momento e em determinado local, e que não tem valor de mercado”.

Os resíduos sólidos de agroindústrias são constituídos por restos de alimentos, fibras ou madeira. Eles incluem os produzidos por usinas sucro-alcooleiras, matadouros e indústrias do processamento de carnes (vísceras e carcaça de animais), frutas e hortaliças (bagaço, tortas, refugo e restos), indústria da celulose e papel (resíduos da madeira, lodo do processo de produção e do tratamento de águas residuárias), curtume (aparas de couro e lodo do processo e tratamento de águas residuárias), etc.

Segundo Valle (2002) “a poluição industrial é uma forma de desperdício e um indício de ineficiência dos processos produtivos utilizados. Resíduos industriais representam, na maioria dos casos, perda de matéria prima e insumos”.

O aumento na produção desses resíduos vem provocando impactos ambientais, pois sua taxa de geração é muito maior que sua taxa de degradação. Dessa forma, é cada

vez mais urgente a necessidade de reduzir, reciclar, ou reaproveitar os resíduos gerados pelo homem, com o objetivo de recuperar matéria e energia, de preservar os recursos naturais e evitar a degradação do meio ambiente (STRAUS E MENEZES, 1993).

3.4. Fermentação em Estado Sólido

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismo sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Pinto *et al.* (2005), afirmam que a bioconversão dos resíduos agrícolas e das indústrias de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que, essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado.

Considerando-se o grande potencial do Brasil para a produção agrícola, há uma grande geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais. Nesse sentido, a fermentação em estado sólido se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, de agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos,

aromas, pigmentos e agentes de controle biológico de pragas, entre outros e, com isso, contribuir para uma maior diversificação do agronegócio nacional.

Todos os processos de FES compreendem essencialmente as mesmas operações unitárias (**Figura 5**). Em todos os casos se requer uma seleção cuidadosa das matérias-primas a utilizar, um ou vários tratamentos prévios do substrato (ZADRAZIL E PUNIA, 1995), a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita, o controle da mesma, a separação e, em alguns casos, a purificação exaustiva dos produtos que se deseja (SANTOS *et al.*, 2006).

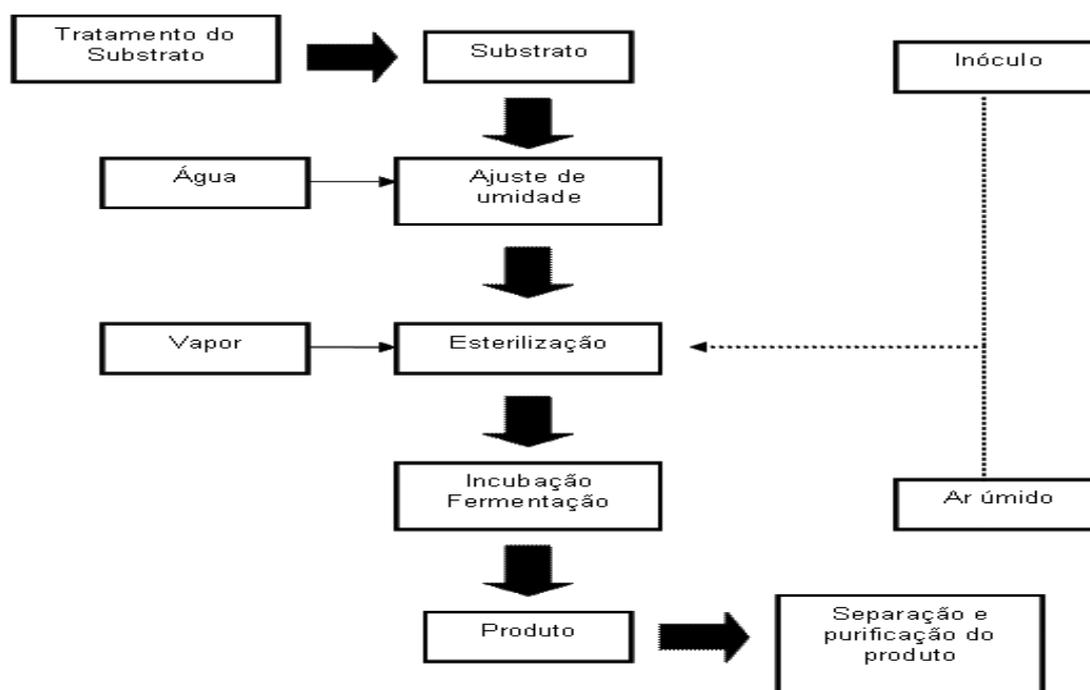


Figura 5. Etapas da Fermentação em Estado Sólido. (Fonte: SANTOS *et al.*, 2006)

Em escala comercial, uma das principais aplicações da FES é a produção de ácido cítrico a partir de farelo de trigo. Esse processo, conhecido por “Koji”, representa um quinto de todo o citrato produzido anualmente no Japão (PANDEY *et al.*, 2001) .

Aidoo *et al.* (1982), afirmam que diferentes tipos de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo.

3.5. Fungos Filamentosos

São fungos que formam filamentos chamados hifas, também conhecidos como bolores e mofos, amplamente distribuídos na natureza e encontrados em solo, em superfície de vegetais, nos animais, no ar e na água. As hifas formam micélios responsáveis pela fixação do fungo ao alimento e pela sua reprodução, inclusive por meio de produção de esporos. Os micélios são também responsáveis pela coloração (juntamente com os esporos) e pelo aspecto característico das colônias: cotonosa (semelhante a algodão), secas, úmidas, compactas, aveludadas ou gelatinosas (GAVA *et al.*, 2008).

Os fungos filamentosos têm diversas aplicações, como por exemplo a produção de:

- ✓ Antibióticos: penicilina (*Penicillium notatum* e *P. chrysogenum*);
- ✓ Progesterona e ácido cítrico (*Aspergillus niger*);
- ✓ Esteroides (*Fusarium sp.*);
- ✓ Exopolissacarídeos com potencial terapêutico;
- ✓ Aromatizadores de alimentos (sopas e cremes);
- ✓ Maturação de queijos do tipo roquefort e camembert (*Penicillium*);
- ✓ Saquê (*Aspergillus oryzae*);
- ✓ Enzimas (amilases, celulasas, pectinases, lipases, etc.);

- ✓ Champignon (*Agaricus*) e Fungi (*Pleurotus*) - quando cultivados em meio sólido.

Gava *et al.*(2008), explicam que para o seu desenvolvimento, na sua grande maioria, os fungos são aeróbios, o que limita seu crescimento à superfícies em contato com o ar. Adaptam-se muito bem a ambientes ácidos. Com relação à temperatura, preferem ambientes na faixa de 20 a 30°C, embora um grande número de fungos se desenvolvam em temperatura de refrigeração. De modo geral, não se adaptam a temperaturas mais elevadas e são capazes de se desenvolver em ambientes com baixa disponibilidade de água.

O gênero *Penicillium* é muito conhecido por produzir transformação em produtos de origem vegetal. No início tomam um aspecto semelhante ao algodão (branco) e, depois de desenvolvidos, os esporos apresentam-se com um aspecto pulverulento, de cores variadas (azul, castanho, esverdeado), conforme a cor do esporo e a idade (GAVA, 1984).

Várias espécies diferentes de *Penicillium* são usadas na fabricação de queijos, seja injetando-se a cultura de fungos no queijo (maturação interna do queijo), seja envolvendo-o com fungos (maturação da superfície do queijo). Os fungos dão um bom sabor ao queijo e um “aveludado” macio à sua casca. Entre as espécies mais usadas estão *P. camemberti*, para o queijo *camembert*; *P. glaucum*, para gorgonzola; *P. candidum* para o *brie*, o *coulommiers* e vários queijos franceses de leite de cabra, e o *P. roqueforti* para o queijo *roquefort*, o dinamarquês azul e o *stilton* (WOLKE, 2005). Esses micro-organismos produzem metabólitos que dão gosto e cheiro aos queijos ou formam gases para criar os buracos característicos (RAW *et al.*, 2001).

O *Penicillium roqueforti* (**Figura 6**) é um fungo saprófito, que pode ser isolado do solo, degradando substâncias orgânicas e partes vegetais. A principal utilização

industrial deste fungo é a produção de queijos azuis, antifúngicos, polissacarídeos, proteases e outras enzimas (SOUSA *et al.*, 2010).

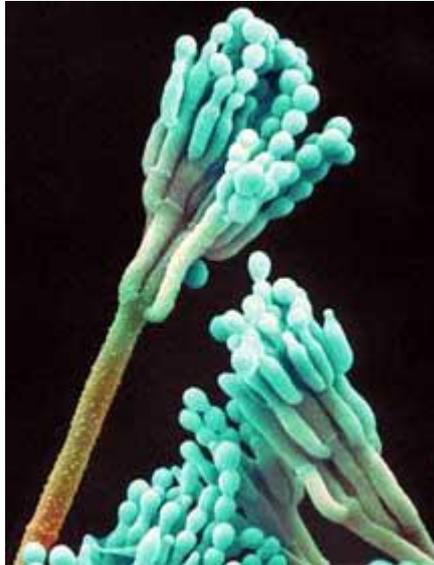


Figura 6. *Penicillium roqueforti* visto em microscópio eletrônico, colorido artificialmente. (Fonte: sobiologia.com.br)

Teuber e Engel (1983), afirmam que vários dos metabólitos secundários isolados de *P. roqueforti* são tóxicos, mas, ao que parece, eles representam um baixo risco para a saúde pública, já que os queijos azuis são ingeridos diariamente em grandes quantidades.

3.6. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000).

A importância de compostos naturais com capacidade antioxidante para a medicina preventiva vem sendo amplamente reconhecida nos últimos anos. Acredita-se que alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, bem como

diabetes e doenças reumáticas sejam causadas ou aceleradas por estresse oxidativo (WEISBURGER e WILLIAMS, 2000).

Segundo Coultate (2002), os antioxidantes são substâncias utilizadas como aditivos alimentares para retardar as reações oxidativas. Alguns antioxidantes vindos da indústria química são produtos totalmente sintéticos, porém, os naturais são cada vez mais apreciados, tanto pelos consumidores quanto pela indústria de alimentos, apresentando-se como uma alternativa mais saudável.

Os métodos de detecção da atividade antioxidante podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução de metais (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura de radicais orgânicos (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do caroteno) (FRANKEL e MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003), e outros.

3.6.1. Método DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável, de coloração violeta, que aceita um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de antioxidantes e adquirindo a coloração amarela (**Figura 7**). Na forma de radical, o DPPH possui uma absorbância característica a 517 nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001).

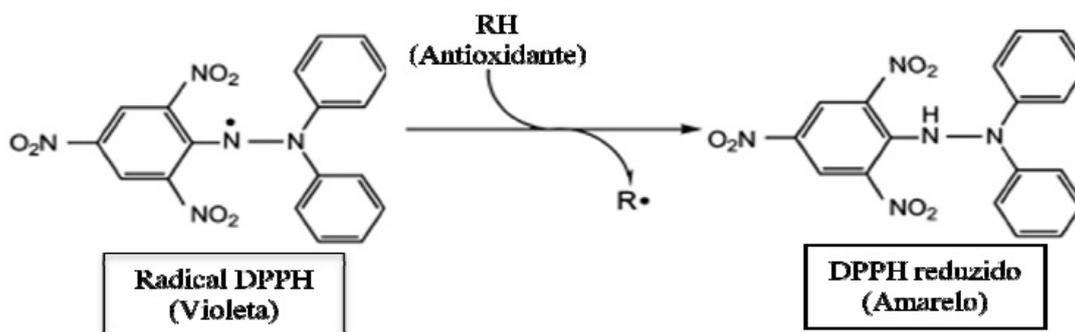


Figura 7. Estrutura química do DPPH e reação de estabilização com um antioxidante. Fonte: Moon e Shibamoto (2009).

Prior *et al.* (2005), relatam alguns inconvenientes desse método: a absorvância a 517 nm pode interferir com a de outros compostos, como os carotenoides, com o qual sobrestimaria o DPPH restante e, portanto, a atividade antioxidante da amostra; pode ocorrer um impedimento estérico nas moléculas com elevado peso molecular.

3.6.2. FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

Pulido *et al.* (2000), consideram o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente aos estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas.

Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir Fe^{+3} a Fe^{+2} , na presença de 2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), em condições ácidas. A redução é acompanhada pela formação de um complexo de cor azul intenso com o Fe^{+2} (**Figura 8**).

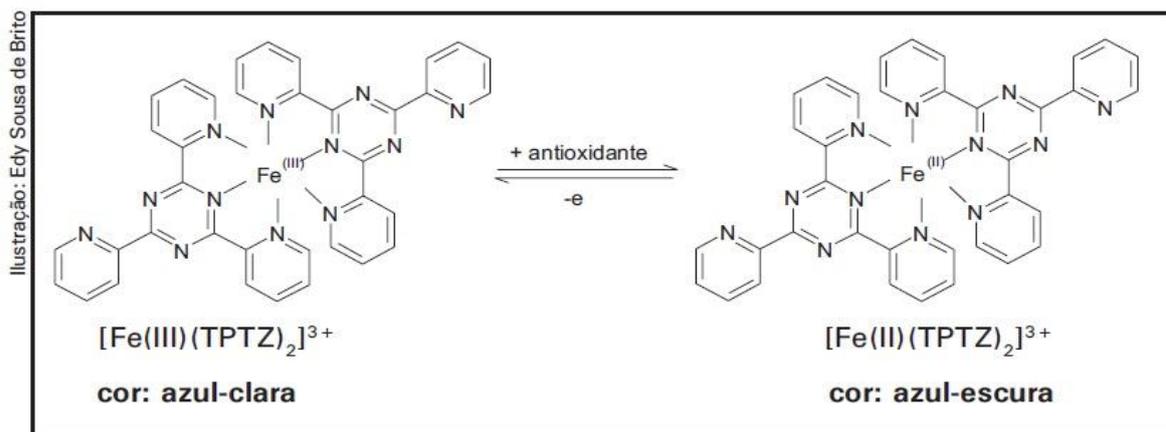


Figura 8. Redução do TPTZ com Fe^{+3} . (Fonte: RUFINO *et al.*, 2006)

Algumas críticas também são feitas a este método, como: alguns compostos como o ácido ascórbico, além de reduzir o íon férrico a ferroso, podem reagir com este último formando novos radicais livres (PRIOR e CAO, 1999); o pH não fisiológico (PRIOR e CAO, 1999; PULIDO *et al.*, 2000); o comprimento de onda de 593 nm, onde podem absorver outros compostos, como a bilirrubina oxidada, que produz biliverdina, aumentando o valor do FRAP (PRIOR e CAO, 1999; OU, 2002).

3.7. Metabólitos Secundários

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário (VAINSTEIN *et al.*, 2001).

Entende-se por metabolismo primário, o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila. Em contrapartida, o metabolismo

secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas (PERES, 2012).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e, também, de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (VIZZOTTO *et al.*, 2010). A **Figura 9** mostra as principais vias de produção dos metabólitos secundários.

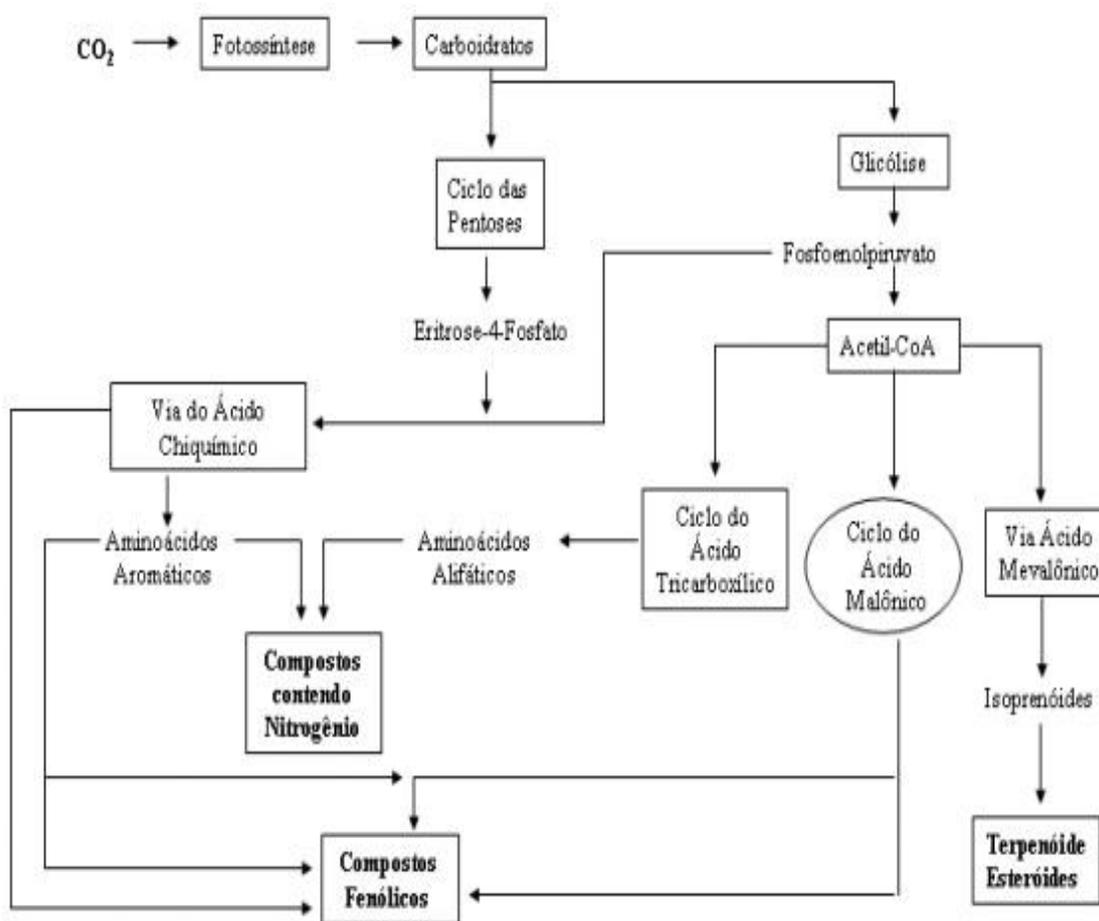


Figura 9. Biossíntese dos principais metabólitos secundários de plantas. (Fonte: TAIZ e ZEIGER,1998)

Existe uma quantidade enorme de metabólitos secundários e eles podem ser tóxicos ou benéficos à saúde humana. Abaixo, são apresentados alguns metabólitos e seus respectivos benefícios:

- **Flavonoides:** Substâncias fenólicas de ampla distribuição no reino vegetal. Ocorrem de forma livre (agliconas) ou ligadas a açúcares (glicosídeos). Um crescente número de estudos tem evidenciado diversos efeitos benéficos à saúde proporcionados pelos flavonoides, na prevenção e atenuação do risco de desenvolvimento de determinadas doenças, especialmente em relação à saúde cardiovascular (SANBONGI *et al.*, 1998; WOLLGAST e ANKLAN, 2000; MAO *et al.*, 2000; REIN *et al.*, 2000; STEINBERG *et al.*, 2003; VINSON *et al.*, 2006); prevenção de cânceres (WEISBURGER e WILLIAMS, 2000); atividade anti-inflamatória (SIES *et al.*, 2005); e melhoria das funções endoteliais e das funções vasculares (GRASSI *et al.*, 2005; HEISS *et al.*, 2007). Grande parte dos benefícios à saúde promovidos pelo consumo de derivados do cacau é causada pelas proantocianidinas (WOLLGAST e ANKLAM, 2000; STEINBERG *et al.*, 2003).
- **Flavonóis:** Os flavonóis são importantes por atuarem na co-pigmentação das antocianinas e são pigmentos de cor amarela clara, encontrados em frutas, hortaliças, folhas e flores (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Segundo Pimentel *et al.* (2005), a atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são o resveratrol, a quercetina, o ácido caféico e os flavonóis.

- **Mucilagens:** São polissacarídeos (condensação de açúcares mais simples) que em contato com a água incham formando um composto viscoso. As mucilagens agem protegendo as mucosas contra compostos irritantes, atenuando inflamações, bem como reguladoras da atividade digestiva em pequenas doses, em doses maiores tornam-se laxativas (BEVILAQUA *et al.*, 2007).
- **Antocianinas:** As antocianinas são os componentes de muitas frutas vermelhas e hortaliças escuras, apresentando grande concentração nas cascas de uvas escuras (DOWNHAM *et al.*, 2000). Desempenham papel importante na prevenção ou inibição do aparecimento de várias doenças, por suas propriedades antioxidantes (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002; KUSKOSKI *et al.*, 2004; DOWNHAM *et al.*, 2000).
- **Saponinas:** São glicosídeos com propriedade de formar espuma abundante em presença de água (de onde provem seu nome, indicando propriedades iguais às do sabão). Com atividades fungicidas e antibióticas, ou anti-inflamatórias e antiulcerosas (BEVILAQUA *et al.*, 2007).
- **Carotenoides:** Nas indústrias de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, com o objetivo de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios.

Com o crescente interesse pela saúde, os carotenoides também têm sido adicionados aos alimentos, devido às suas atividades biológicas (anticarcinogênica, imunomoduladora, antioxidante, pró-vitamina A), a fim de enriquecer o produto alimentar (SIMPSON *et al.*, 1971). Além disso, são também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores, coloração específica e fotoproteção (SÁNCHEZ-CONTRERAS *et al.*, 2000).

- **Glicosídeos:** Substâncias que por aquecimento em meio ácido, ou por ação de enzimas, liberam um ou mais açúcares e outro componente denominado aglicona. Os mesmos são de ocorrência frequente em plantas e são agrupados de acordo com a estrutura das agliconas. Glicosídeos cardiotônicos - aumentam a capacidade de contração do coração, cardiotóxicos e cardioativos. Glicosídeos cianogênicos - de alta toxicidade e que liberam ácido cianídrico (BEVILAQUA *et al.*, 2007).
- **Alcaloides:** São substâncias nitrogenadas de reação alcalina (de onde vem o nome), com um ou mais átomos de carbono, normalmente em estrutura cíclica. Apresentam atividades farmacológicas marcantes e muito diversificadas. Podem acarretar distúrbios neuropsíquicos, como exemplo a hioscinamina, escopolamina, atropina. Esta última é usada no tratamento de envenenamento com agrotóxicos fosfatados e carbamatos (BEVILAQUA *et al.*, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de Execução do Projeto

O projeto foi executado no Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada (NUPESQ), Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA), Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL) e Centro de Estudos e Análises Cromatográficas (CEACROM), todos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

4.2. Obtenção da Matéria-prima

O farelo de cacau, cerca de seis quilos, foi doado por uma empresa processadora de cacau instalada na cidade de Ilhéus, região Sul da Bahia.

4.3. Preparo da Amostra

O farelo de cacau foi submetido a um processo de trituração (**Figura 10**) em moinho de facas e separação granulométrica com uso de peneira.



Figura 10. Farelo de cacau depois de moído. (Fonte: O Autor)

O fluxograma ilustrado na **Figura 11** descreve o procedimento utilizado para a obtenção das amostras.

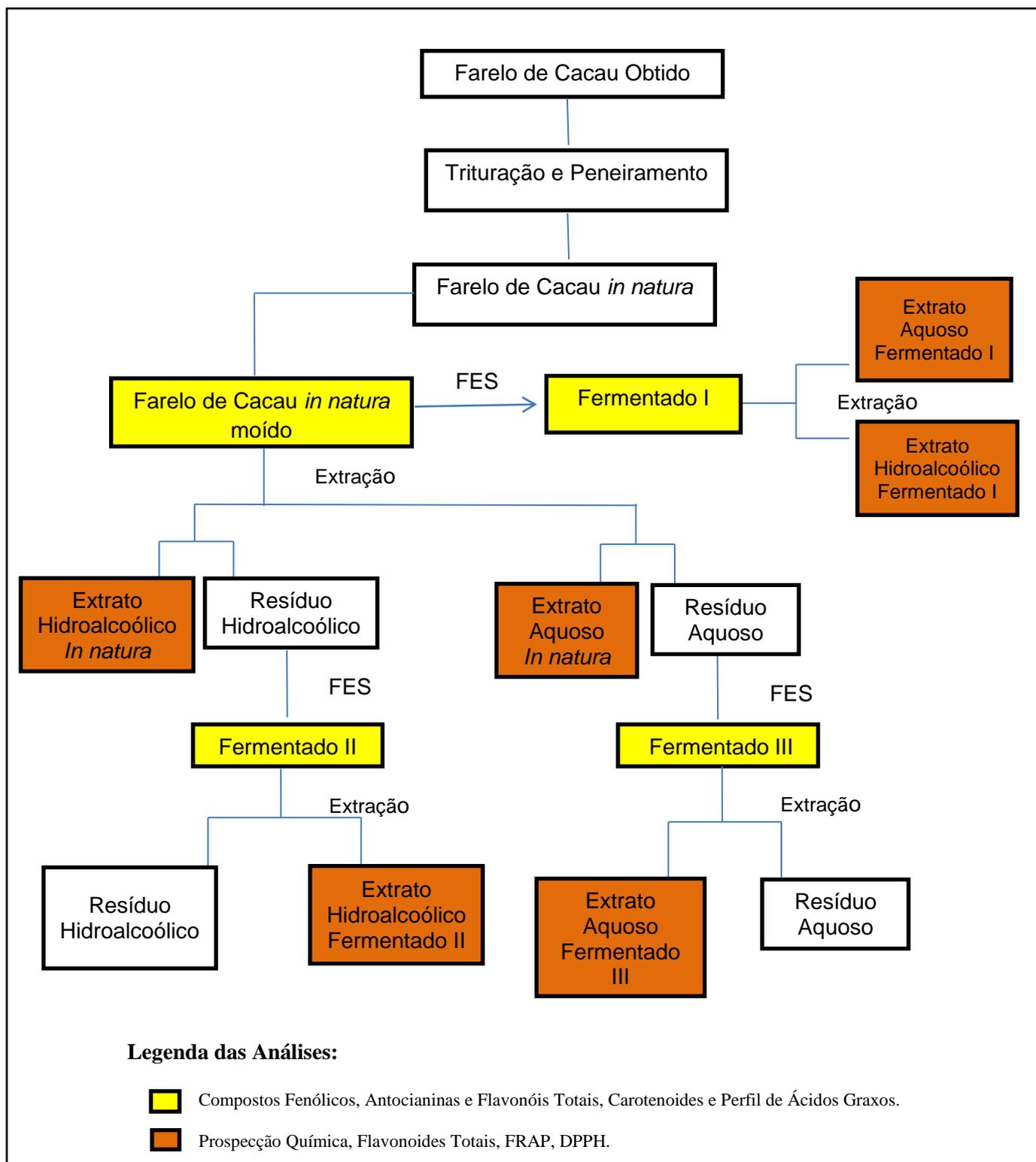


Figura 11. Fluxograma ilustrativo do procedimento experimental

4.4. Fermentação em Estado Sólido (FES)

Para a FES utilizou-se o farelo *in natura*, obtendo-se o Fermentado I.

Os resíduos resultantes da extração hidroalcoólica e aquosa do farelo *in natura* foram secos, separadamente, em estufa de circulação de ar a 60°C durante 24 h e também foram submetidos à FES, obtendo-se o Fermentado II e Fermentado III, respectivamente.

4.4.1. Micro-organismo

Foi utilizada uma cepa do fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* proveniente da coleção de cultura do Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA) da UESB *Campus* de Itapetinga.

4.4.2. Preparo do Inóculo

A obtenção do inóculo para a FES foi realizada através da propagação dos esporos da cepa de *Penicillium roqueforti* a 25°C por 7 dias em meio composto de ágar-ágar e PDA (Potato Dextrose Agar) na proporção 1:1.

Os esporos foram raspados, suspensos em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7) e contados em câmara de Neubauer, conforme o método descrito por Rosa (2002). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^9 esporos/20g de meio sólido.

4.4.3. Fermentação

Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL como biorreatores e 20 g de farelo de cacau como meio de cultivo. Estes foram autoclavados junto com água destilada e todo material utilizado para a inoculação, a 1,0 atm por 15 minutos e, após o resfriamento, inoculou-se 1,0 mL da suspensão de esporos e 1,87 mL de água destilada para ajustar a umidade do meio para 50% com o auxílio de um infravermelho. Em seguida, as fermentações foram conduzidas em estufa a temperatura de 25°C durante 7 dias.

4.5. Obtenção dos Extratos

4.5.1. Extratos Aquoso e Hidroalcoólico do Farelo *in natura*

Os extratos foram obtidos a frio, através da agitação de 40 g do farelo de cacau *in natura* com água deionizada e solução hidroetanólica a 80%, separadamente, por 1 hora, ambos na proporção 1:7 de farelo:solvente. Os extratos obtidos foram denominados: Extrato Aquoso *in natura* e Extrato Hidroalcoólico *in natura*, respectivamente. Ambos foram acondicionados em frascos âmbar sob refrigeração até a realização das análises.

4.5.2. Extratos Aquoso e Hidroalcoólico dos Farelos Fermentados II e III

Os resíduos sólidos resultantes da obtenção dos extratos anteriores foram secos em estufa de circulação de ar a 60°C e, posteriormente, fermentados utilizando a metodologia descrita no item 4.3.3. Os farelos obtidos foram denominados,

respectivamente, de Fermentado II (obtido do resíduo hidroalcoólico) e Fermentado III (obtido do resíduo aquoso). Em seguida, ambos foram extraídos a frio, com solução hidroetanólica a 80% e água deionizada, conforme descrito anteriormente no item 4.5.1., para obtenção dos extratos denominados: Extrato Hidroalcoólico Fermentado II e Extrato Aquoso Fermentado III, respectivamente. Todos os extratos foram acondicionados em frascos âmbar sob refrigeração até a realização das análises.

4.5.3. Extratos Aquoso e Hidroalcoólico do Farelo Fermentado I

O farelo de cacau *in natura* foi fermentado de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.3, para obtenção do Fermentado I. Posteriormente, o farelo Fermentado I foi extraído a frio, com água deionizada e solução hidroetanólica a 80%, conforme descrito anteriormente no item 4.5.1. Os extratos obtidos foram denominados Extrato Aquoso Fermentado I e Extrato Hidroalcoólico Fermentado I, respectivamente. Ambos foram acondicionados em frascos âmbar sob refrigeração até a realização das análises.

4.6. Prospecção Química: Testes Qualitativos para Determinação da Presença de Metabólitos Secundários

Os ensaios de identificação de metabólitos secundários *in vitro* foram realizados seguindo a metodologia descrita por Bessa *et al* (2007) e Matos (1988), com todos os extrato obtidos. Com os extratos aquosos foram realizados testes para avaliar a presença de: heterosídeos antociânicos, saponinas, gomas e mucilagens, taninos e catequinas. Já com os extratos hidroalcoólicos analisou-se a presença de esteroides, triterpenoides,

alcaloides, cumarinas, compostos fenólicos, compostos antraquinônicos livres (quinonas) e flavonoides. Os resultados foram avaliados visualmente e classificados em positivo ou negativo de acordo com cada reação.

4.6.1. Testes para a Determinação de Metabólitos Secundários

4.6.1.1. Testes para a Determinação da Presença de Heterosídeos Antociânicos

Em quatro tubos de ensaio foram adicionados 3 mL do extrato aquoso. Um destes tubos serviu como padrão. Os outros três tubos restantes foram tratados da seguinte forma: o primeiro foi alcalinizado com solução de NaOH a 5%, o segundo foi acidificado com ácido clorídrico a 10% e o terceiro foi mantido a pH neutro. Para a verificação do pH dos extratos contidos nos tubos de ensaio foram empregadas fitas de pH da Merck. Foi avaliada a mudança de coloração dos três tubos. O aparecimento de coloração diferente nos tubos indicou a presença de heterosídeos antociânicos nos extratos.

4.6.1.2. Testes para a Determinação da Presença de Saponosídeos

O tubo de ensaio com o extrato aquoso básico (1º tubo) obtido no item anterior foi agitado vigorosamente em vórtex e deixado em repouso por cinco minutos. Foi avaliado o aparecimento de espuma persistente e que não se desfez nesse tempo para considerar a reação positiva.

4.6.1.3. Testes para a Determinação da Presença de Gomas e Mucilagens

Foram colocados 5 mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio e adicionado, aos poucos, gotas de acetato de chumbo neutro, até cessar o aparecimento de precipitado. Filtrou-se em papel de filtro e acrescentou-se 1,0 mL de acetato de chumbo ácido. O aparecimento de precipitado indicou reação positiva.

4.6.1.4. Testes para a Determinação da Presença de Taninos

Em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL do extrato aquoso e acrescentou-se cinco gotas de alúmen de ferro a 1%. Avaliou-se o aparecimento de precipitado escuro ou a mudança de coloração da solução como resultado positivo.

4.6.1.5. Testes para a Determinação da Presença de Catequinas

Umedeceu-se a madeira de um palito de fósforo com o extrato aquoso, e posteriormente, em ácido clorídrico concentrado. Secou-se flambando ao calor de uma chama forte. Foi avaliada a formação de coloração na madeira. O aparecimento de cor vermelha a castanho denotou a presença de catequinas.

4.6.1.6. Testes para a Determinação da Presença de Esteroides e Triterpenoides

Foram evaporados, em banho-maria, 20 mL do extrato hidroalcoólico. O resíduo obtido foi dissolvido por três vezes com porções de 1 mL de clorofórmio, de modo a se obter 3 mL da solução clorofórmica, que foi filtrada em papel de filtro. Adicionou-se à

solução 2 mL de anidrido acético, agitando suavemente e, em seguida, adicionou-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado. A ocorrência de coloração castanha avermelhada foi avaliada como indicação da presença desses metabólitos.

4.6.1.7. Testes para a Determinação da Presença de Alcaloides

Foram transferidos 20 mL do extrato hidroalcoólico para um béquer de 50 mL e evaporou-se o solvente em banho-maria, até um quinto do volume inicial. À solução restante adicionou-se hidróxido de sódio 1 M até se obter pH básico. Completou-se o volume para 20 mL com água deionizada. O extrato alcalino foi extraído em funil de separação com três porções de 20 mL de clorofórmio. Os extratos clorofórmicos foram reunidos e, novamente extraídos em funil de separação com 20 mL de uma solução de ácido clorídrico a 2%. Foram transferidos 3 mL do extrato aquoso ácido para três tubos de ensaio e foram adicionadas cinco gotas dos reagentes de Bouchardat, Dragendorff e Mayer, em cada tubo. Os tubos foram agitados em vórtex e, posteriormente, deixados em repouso por aproximadamente 1 hora. A formação de precipitado, pelo menos em dois tubos, indicou a presença de alcaloides.

O Reagente de Bouchardat (também conhecido como Reagente de Wagner) foi preparado dissolvendo-se 1,27 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 5 mL de água deionizada e completando-se o volume para 100,0 mL com água deionizada.

O reagente de Dragendorff foi preparado da seguinte forma:

Solução A: dissolveu-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água deionizada.

Solução B: dissolveu-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água deionizada.

O reagente deve ser preparado no momento de sua utilização através da mistura de partes iguais das soluções A e B.

Para a obtenção do Reagente de Mayer misturaram-se 1,36 g de cloreto de mercúrio e 5 g de iodeto de potássio em aproximadamente 70 mL de água deionizada, completando-se o volume para 100 mL com água deionizada.

4.6.1.8. Testes para a Determinação da Presença de Compostos Fenólicos

O restante do extrato hidroalcoólico obtido no item anterior foi transferido para um béquer e evaporado em banho-maria até a secura. Ao precipitado obtido foram adicionados 5 mL de água deionizada. Tomou-se 1 mL do extrato aquoso obtido, transferiu-se para um tubo de ensaio e acrescentou-se cinco gotas de uma solução de cloreto férrico a 1%. A formação de precipitado e/ou a mudança na coloração da solução indicou reação positiva.

4.6.1.9. Testes para a Determinação da Presença de Compostos Antraquinônicos

Livres

Aos 4 mL restantes do extrato obtido no item anterior foram adicionados 3 mL de tolueno e 2 mL de solução de amônia a 3 M. A solução foi agitada vigorosamente em agitador magnético e deixada em repouso por 10 minutos. A reação positiva foi indicada pelo aparecimento de coloração rósea ou vermelha.

4.6.1.10. Testes para a Determinação da Presença de Cumarinas

Adicionou-se gotas de ácido clorídrico concentrado em 10 mL do extrato hidroalcoólico, até se obter pH 1,0 e transferiu-se a solução para um funil de separação, extraíndo-se por três vezes com porções de 2 mL de éter de petróleo. Os extratos etéreos foram reunidos e o volume reduzido para cerca de 2 mL em banho-maria. Algumas gotas desta solução foram adicionadas em uma tira de papel de filtro, com o auxílio de um capilar de vidro. Sobre a mancha obtida adicionou-se uma gota de solução de hidróxido de sódio a 5% e observou-se sob a luz ultravioleta. A observação de fluorescência na mancha indicou a presença de cumarinas.

4.6.1.11. Testes para a Determinação da Presença de Flavonoides

Em um tubo de ensaio foram adicionados 5 mL do extrato hidroalcoólico e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado e, posteriormente, adicionou-se um pedaço de fita de magnésio. Deixou-se em repouso por quinze minutos e avaliou-se o aparecimento de cor, variando do laranja à rósea, e o desprendimento de bolhas de ar, para caracterizar a presença de flavonoides.

4.7. Quantificação de Flavonoides Totais

A quantificação de flavonoides nos extratos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998). Em um tubo de ensaio âmbar adicionou-se 0,5 mL do extrato (aquoso e hidroalcoólico), 1,5 mL de álcool etílico a 95%, 0,1 mL de cloreto de alumínio a 10%, 0,1 mL de acetato de potássio a 1 M e 2,8

mL de água deionizada. Incubou-se a mistura ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 30 minutos e procedeu-se a leitura espectrofotométrica a 415 nm. Como branco utilizou-se todos os reagentes sem a adição da amostra e nas mesmas condições. Para a preparação da curva analítica linear partiu-se de uma solução estoque de quercetina na concentração de 25 mg/mL e, a partir dela, foram preparadas diluições nas concentrações de 0,1 a 0,4 mg/mL.

A partir da curva de regressão linear obtida foram calculadas as concentrações de flavonoides nos extratos. Os resultados foram expressos em mg de quercetina por 100 g de farelo de cacau.

4.8. Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

Para a quantificação da atividade antioxidante dos extratos pelo método FRAP, adotou-se a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2006). Em frascos âmbar foram preparadas três diluições diferentes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/mL) dos extratos, em triplicata. Em ambiente escuro, transferiram-se alíquotas de 90 µL de cada diluição dos extratos para tubos de ensaio. Acrescentaram-se 270 µL de água deionizada e 2,7 mL do reagente de FRAP (para obtenção desse reagente juntou-se 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). Homogeneizou-se em vórtex e deixou-se em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. As leituras das absorbâncias foram feitas a 595 nm, utilizando o reagente de FRAP como branco. Para a curva padrão utilizou-se sulfato ferroso 2 mM com concentrações de 0 a 2000 µM. A partir das absorbâncias obtidas para as diferentes diluições dos extratos, plotou-se em um gráfico e obteve-se a equação da reta. Para calcular a atividade antioxidante total, substituiu-se na equação da reta a absorbância

equivalente a 1.000 μM do padrão de sulfato ferroso. O resultado encontrado na equação foi dividido por 1.000 para obter-se o valor em g. O resultado final foi calculado pela divisão de 1.000 (μM) e multiplicado por 1 (g) para encontrar o valor final que é expresso em μM sulfato ferroso/g de farelo de cacau.

4.9. Atividade Antioxidante pelo Sequestro do Radical DPPH

Para a quantificação da atividade antioxidante dos extratos pelo método DPPH, adotou-se a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007) com adaptações. Em frascos âmbar foram preparadas três diluições diferentes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/mL) em triplicata. Em ambiente escuro, transferiram-se alíquotas de 0,5 mL de cada diluição dos extratos para tubos de ensaio, contendo 1,5 mL de solução metanólica de DPPH a 0,06 mM e homogeneizou-se em vórtex. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 515 nm, imediatamente após a adição dos extratos (tempo zero) e após 30 minutos de repouso em ambiente escuro. Álcool metílico PA foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical e foram calculados pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do radical} = \frac{(1 - A_f)}{A_o} \times 100$$

Onde: A_o : absorbância inicial

A_f : absorbância final.

4.10. Extração e Determinação dos Compostos Fenólicos

Para a extração dos compostos fenólicos pesou-se 1 g de cada farelo (*in natura*, Fermentados I, II e III) e colocou-se em agitação a frio, com 20 mL de solução hidroetanólica a 80%. Após 30 minutos de extração, filtrou-se a vácuo e o filtrado foi utilizado para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, segundo procedimento proposto por Wettasinghe e Shahidi (1999). Em tubos de ensaio, 0,5 mL dos extratos obtidos anteriormente foram homogeneizados com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, 0,5 mL de extrato e 1,0 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). O volume da mistura foi ajustado para 10 mL pela adição de 8,0 mL de água deionizada e submetida à agitação vigorosa em agitador de tubos. A mistura foi mantida em repouso à temperatura ambiente e mantida no escuro por 25 minutos. O branco foi constituído de 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, 0,5 mL de solução hidroetanólica a 80%, 1,0 mL de solução saturada de NaHCO₃ e 8,0 mL de água deionizada. A leitura foi realizada a 773 nm. A curva analítica foi obtida utilizando-se soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 0,01 a 0,5 mg/mL, obtidas a partir de uma solução estoque de ácido gálico na concentração de 1,0 mg/mL. A concentração de compostos fenólicos presentes nos extratos foi expressa em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g do farelo de cacau.

4.11. Extração e Quantificação de Antocianinas Totais e Flavonóis Totais

As antocianinas e os flavonóis totais foram determinados de acordo a metodologia proposta por Lees *et al.* (1972). Em um erlemeyer de 125 mL revestido com papel alumínio foram homogeneizados 0,5 g dos farelos de cacau com 30 mL de

solução extratora (HCl a 1,5 M em etanol a 95% na proporção de 85:15 v/v) e estocados por 12 horas a 4°C. Após filtração a vácuo, os filtrados foram coletados em balões volumétricos de 100 mL revestidos com papel alumínio e o resíduo foi lavado exaustivamente com a solução extratora até completa remoção dos pigmentos. O volume foi completado para 100 mL com a solução extratora, mantendo-se a mistura em repouso por 2 horas a temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 535 nm e 374 nm, para a quantificação das antocianinas e flavonóis, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg de quercetina por 100 g de farelo de cacau.

Para determinar as concentrações dos flavonóis totais e das antocianinas totais, foram utilizadas as seguintes expressões:

$$\text{Antocianinas totais (mg de quercetina/g)} = A_{535} \cdot Fd \cdot \frac{10}{\bar{E}}$$

Onde: $A_{535\text{nm}}$ = absorvância a 535 nm;

\bar{E} = 765 (coeficiente de extinção molar para quercetina a 1 % a 535 nm);

Fd = fator de diluição.

$$\text{Flavonóis totais (mg de quercetina/g)} = A_{374} \cdot Fd \cdot \frac{10}{\bar{E}}$$

Onde: A_{374} = absorvância a 374 nm;

\bar{E} = 982 (coeficiente de extinção molar para quercetina a 1% a 374 nm);

Fd = fator de diluição.

4.12. Extração e Quantificação de Carotenoides Totais

Para a quantificação dos carotenoides totais adotou-se o procedimento proposto por Kimura *et al.* (2003). Em erlenmeyer de 125 mL foram agitados 0,3 g dos farelos de cacau com 1,0 g de celite em 50 mL de acetona PA previamente resfriada. A mistura foi

filtrada em papel de filtro e o filtrado fracionado com 20 mL de éter de petróleo em funil de separação. Posteriormente, a fração etérea foi lavada com porções de 50 mL de água destilada por seis vezes até a completa remoção da acetona. O extrato etéreo foi filtrado para um balão volumétrico de 50,0 mL, através de um funil de vidro tampado com um pedaço de algodão contendo 5 g de sulfato de sódio anidro, para a remoção da água residual. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 450 nm e, para a quantificação dos carotenoides totais utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{A_{450} \cdot V \text{ (mL)} \cdot 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot \text{peso da amostra (g)}} \cdot 100$$

Onde: $A_{450\text{nm}}$ = absorbância a 450 nm;

V = volume total do extrato (50 mL);

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de extinção molar do β -caroteno em éter de petróleo = 2592.

4.13. Determinação do Perfil de Ácidos Graxos

A extração dos lipídios totais das amostras dos farelos de cacau *in natura* e fermentados foi realizada utilizando a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959) e a transesterificação dos triacilgliceróis realizada conforme o método 5509 da ISO (1978).

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados por um cromatógrafo gasoso ThermoFinnigan, modelo Trace-GC-Ultra, equipado com Detector de Ionização de Chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida BPX-70 (120 m, 0,25 mm d.i.). As vazões dos gases (White Martins) foram de 8 mL.min⁻¹ para o gás de arraste (N₂); 30 mL.min⁻¹ para o gás auxiliar (H₂); 30 mL.min⁻¹ para o H₂ e 250 mL.min⁻¹ para o ar sintético da chama. A razão da divisão da amostra foi de 90:10.

Os parâmetros de funcionamento foram estabelecidos após a verificação da condição de melhor resolução. As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 140°C por 10 minutos, seguida por uma primeira rampa de 15°C/min até atingir 200°C, permanecendo por 1 minuto. A segunda rampa foi de 10°C/min até atingir 230°C, permanecendo 1 minuto nesta temperatura. A terceira rampa de 0,4°C/min até atingir 233°C por 3 minutos. A última rampa foi de 0,5°C/min até atingir 238°C por 2 minutos. O tempo total de análise foi de 41,5 minutos.

As injeções foram realizadas em duplicata e os volumes das injeções foram de 1,2 µL. As áreas dos picos dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foram determinadas através do software ChromQuest 4.1.

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada após verificação do Comprimento Equivalente de Cadeia (ECL - *EquivalentLengthof Chain*) dos picos (VISENTAINER E FRANCO, 2006) e comparação dos tempos de retenção de ésteres metílicos do padrão 189-19 (Sigma, EUA) com os das amostras.

4.14. Análise Estatística

Todas as determinações foram efetuadas em triplicata, os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). A análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, usando o Sistema de Análises Estatísticas e Genética (SAEG) versão 8.0. As curvas padrões foram plotadas utilizando o software Excel.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Prospecção Química

Os resultados da prospecção química (**Tabela 2**) evidenciaram que a maioria dos metabólitos analisados foram encontrados no farelo de cacau *in natura* e após fermentação com o fungo *Penicillium roqueforti*.

Entretanto, notou-se a presença de saponosídeos (saponinas) nos dois farelos fermentados, sendo que para o extrato *in natura* este resultado foi negativo. Com isso, é possível sugerir que houve uma biotransformação do resíduo pelo *Penicillium roqueforti*, gerando ou aumentando a um nível detectável, esse metabólito, bastante interessante na nutrição animal (FRANCIS *et al.*, 2002) e na produção de anticoncepcionais (DJERASSI, 1970).

As saponinas são surfactantes naturais produzidos por plantas e, também, por alguns animais marinhos e bactérias. Apresentam importantes ações farmacológicas, como redução da taxa de colesterol e triglicérides sanguíneos, efeito imunogênico, redução da produção de amônia e controle de parasitas (FRANCIS *et al.*, 2002; CHEEKE, 2002).

Tabela 2. Resultados da prospecção química *in vitro* dos extratos do farelo de cacau

Matabólitos Secundários	Extratos		
	<i>In Natura</i>	Fermentado I	Fermentado II e III
Extratos Aquosos			
Heterosídeos Antociânicos	+	+	+
Saponinas	-	+	+
Gomas e Mucilagem	+	+	+
Taninos	+	+	+
Catequinas	+	+	+
Extratos Hidroalcoólicos			
Esteroides e Triterpenoides	+	+	+
Alcaloides	+	+	+
Cumarinas	-	-	-
Compostos Fenólicos	+	+	+
Antraquinônicos Livres	-	-	-
Flavonoides	+	+	+
- teste negativo + teste positivo			

5.2. Flavonoides Totais

Conforme se pode observar na **Tabela 3**, os resultados para a quantificação de flavonoides totais nos extratos analisados demonstram uma maior concentração desse metabólito no extrato hidroalcoólico *in natura*, correspondente a 37,5 mg de quercetina por 100 g de farelo.

Tabela 3. Concentração de flavonoides totais nas amostras de farelo de cacau

Amostras	Concentração de Flavonoides Totais (mg de quercetina/100 g de farelo)
Extrato Hidroalcoólico <i>In natura</i>	37,5 ^a
Extrato Aquoso <i>In natura</i>	31,7 ^b
Extrato Hidroalcoólico Fermentado II	31,5 ^b
Extrato Hidroalcoólico Fermentado I	23 ^c
Extrato Aquoso Fermentado I	21 ^c
Extrato Aquoso Fermentado III	4,2 ^d

Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Para obtenção dos resultados utilizou-se uma curva analítica com coeficiente de regressão (R^2) 0,9995. Observa-se também, que os extratos aquoso *in natura* e hidroalcoólico II não apresentaram diferença significativa na quantidade de flavonoides, sendo, respectivamente, 31,7 e 31,5 mg de quercetina por 100 g de farelo de cacau.

A diferença observada no teor de flavonoides pode ser explicada pela polaridade dos extratos, já que uma maior concentração foi detectada nos extratos hidroalcoólicos, como é possível melhor visualizar na **Figura 12**.

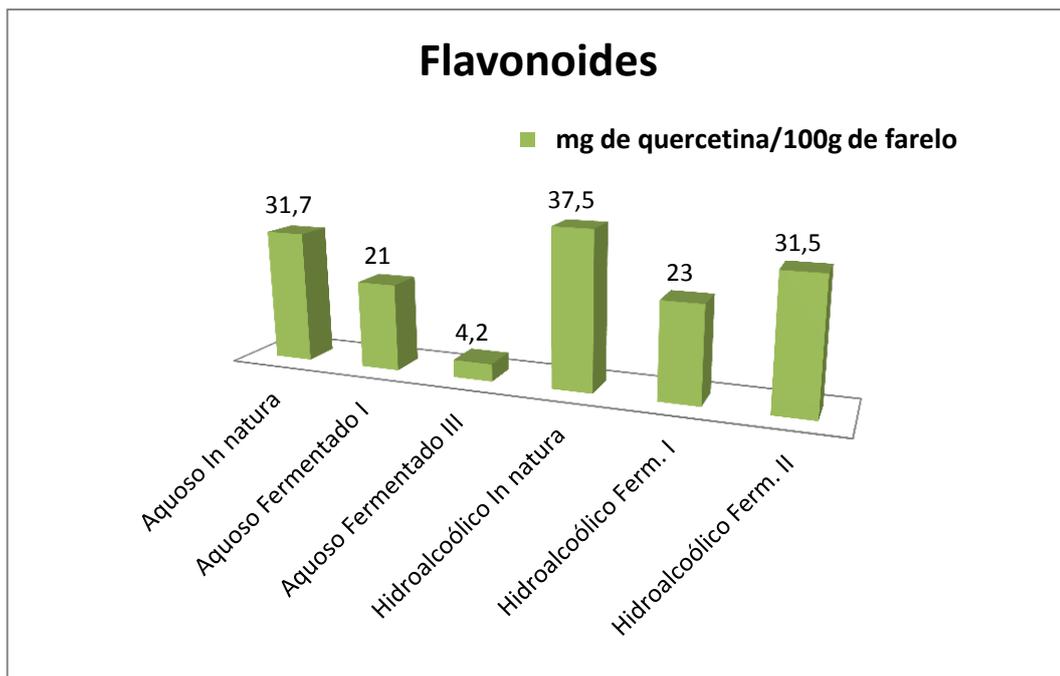


Figura 12. Teores de Flavonoides Totais nos diferentes tipos de extratos preparados a partir dos farelos de cacau

5.3. Atividade Antioxidante

5.3.1. Método FRAP

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP estão apresentados na **Tabela 4**. O maior valor do poder redutor foi encontrado para o extrato hidroalcoólico *in natura*, com concentração correspondente a 33,5 μM de sulfato ferroso por g de farelo, seguido do extrato aquoso *in natura*, com concentração de 28,6 μM de sulfato ferroso por g de farelo. Nos extratos fermentados o poder redutor dos extratos variaram de 8,0 a 23,2 μM de sulfato ferroso por g de farelo. Assim, todas as amostras diferiram estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Poder Antioxidante Redutor de íons Ferro produzido pelos extratos

Amostras	FRAP (μM sulfato ferroso/g de farelo)
Extrato Hidroalcoólico <i>In natura</i>	33,5 ^a
Extrato Aquoso <i>In natura</i>	28,6 ^b
Extrato Hidroalcoólico Fermentado I	23,2 ^c
Extrato Aquoso Fermentado I	17,8 ^d
Extrato Aquoso Fermentado III	9,3 ^e
Extrato Hidroalcoólico Fermentado II	8,0 ^f

Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A **Figura 13** ilustra através de um gráfico de barras os resultados encontrados. Percebe-se que os extratos *in natura* apresentaram maior atividade antioxidante por este método. Após as fermentações, essa atividade caiu, principalmente nas amostras que sofreram duas extrações, tanto a aquosa quanto a hidroetanólica.

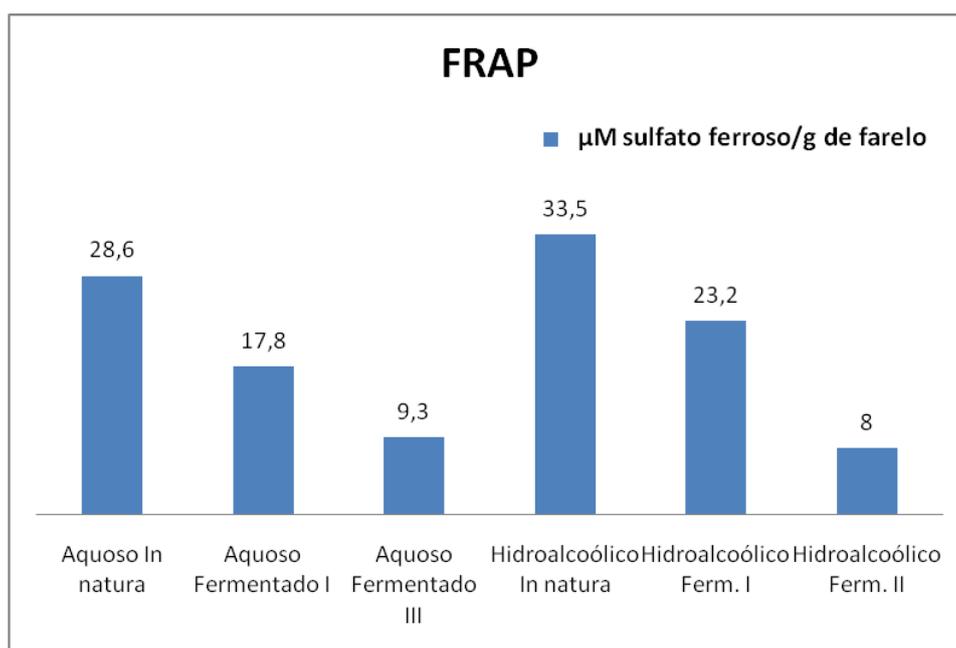


Figura 13. Representação gráfica do Poder Antioxidante Redutor de íons Ferro produzido pelos extratos

A curva analítica linear foi obtida com soluções padrão de sulfato ferroso e o reagente FRAP e coeficiente de regressão (R^2)= 0,9995.

5.3.2 Método DPPH

Os resultados da atividade antioxidante, em porcentagem de inibição dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), promovida pelos extratos do farelo de cacau estão apresentados na **Tabela 5**.

Observa-se que os extratos hidroalcoólicos *in natura* e Fermentado II exibiram capacidade média de sequestrar os radicais DPPH (percentual entre 60 e 80%), enquanto o extrato hidroalcoólico Fermentado I exibiu uma forte capacidade de sequestrar os radicais DPPH, com valores superiores a 80% de inibição.

Dos extratos aquosos, o *in natura* apresentou maior percentual de inibição, sendo classificado como média sua capacidade sequestradora do radical DPPH e os fermentados expressaram uma fraca capacidade de sequestro do DPPH (percentual de sequestro inferior a 60%).

A diferença encontrada entre os extratos, para os percentuais de inibição dos radicais podem ser observadas também na **Figura 14**.

Tabela 5. Atividade Antioxidante dos extratos de farelo de cacau determinada pelo método de sequestro dos radicais livres DPPH

Amostras	DPPH (% de inibição)
Extrato Hidroalcoólico Fermentado I	81,3 ^a
Extrato Hidroalcoólico In Natura	79,2 ^b
Extrato Aquoso In Natura	78,5 ^c
Extrato Hidroalcoólico Fermentado II	73,4 ^d
Extrato Aquoso Fermentado I	57,7 ^e
Extrato Aquoso Fermentado III	57,3 ^f

Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

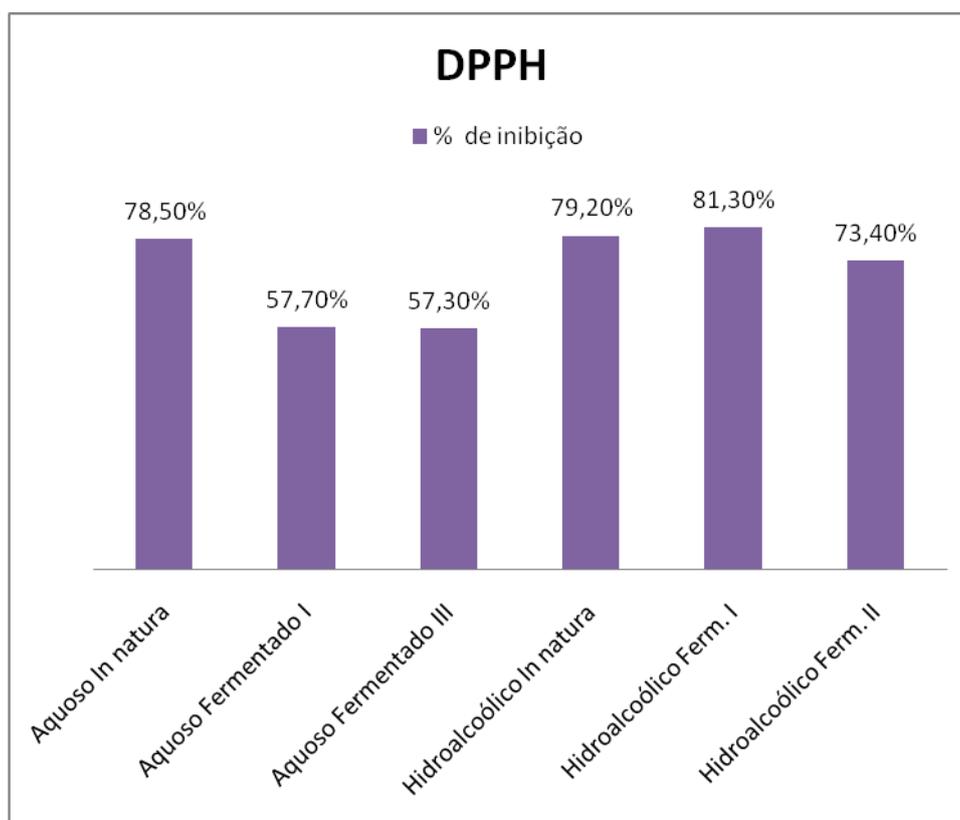


Figura 14. Representação gráfica da atividade antioxidante dos extratos de farelo de cacau determinada pelo método de sequestro dos radicais livres DPPH

5.4. Fenólicos Totais

Os resultados obtidos nos experimentos de quantificação dos compostos fenólicos totais (FT) são apresentados na **Tabela 6** e ilustrados na **Figura 15**. O teor de FT no farelo de cacau variou de 766,6 a 2120 mg de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por 100 g de farelo, sendo o maior teor encontrado no farelo *in natura*. As amostras fermentadas não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 6. Teores de Fenólicos Totais nos farelos de cacau

Farelo de Cacau	Fenólicos Totais (mg GAE /100g de farelo)
In natura	2120 ± 20 ^a
Fermentado I	926,6 ± 61 ^b
Fermentado II	766,6 ± 64 ^b
Fermentado III	893,3 ± 92 ^b

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

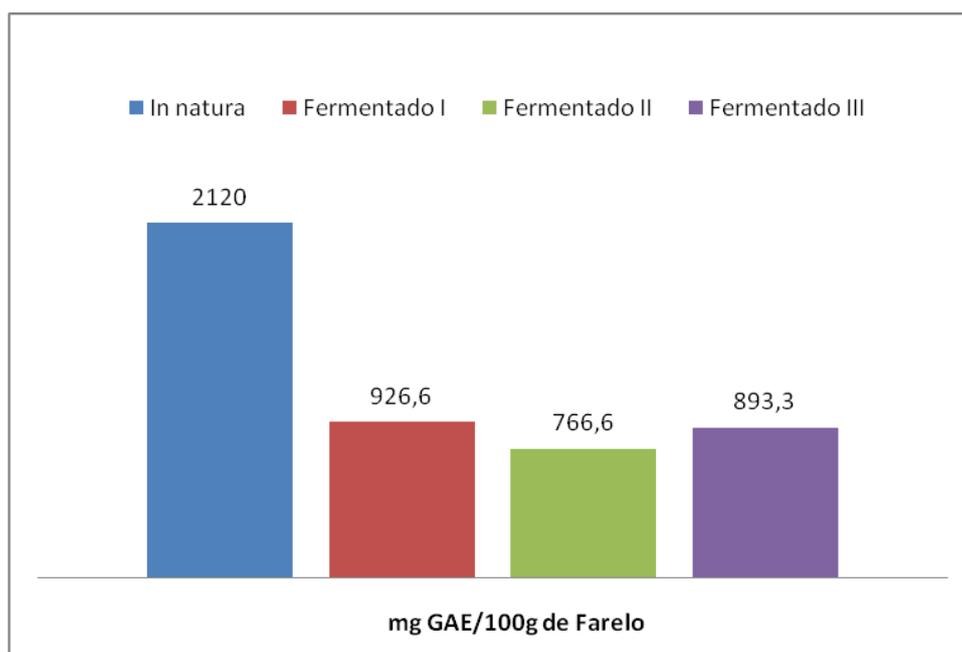


Figura 15. Teor de Fenólicos Totais nos farelos de cacau

5.5. Quantificação de Antocianinas Totais e Flavonóis Totais

As antocianinas e os flavonóis são metabólitos secundários que pertencem ao grupo dos flavonoides e são responsáveis pela coloração que varia de vermelho vivo à violeta e de branco a amarelo claro, respectivamente, das espécies vegetais (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

Considerando os resultados obtidos na quantificação dos teores de antocianinas e flavonóis totais (**Tabela 7**), observou-se que o farelo fermentado II apresentou maiores concentrações de antocianinas e flavonóis totais, correspondente a 0,8 e 1,9 µg de quercetina/100g de farelo, respectivamente, diferindo estatisticamente das demais apenas para antocianinas totais.

Tabela 7. Teor de Antocianinas e Flavonóis Totais

Farelo de Cacau	Antocianinas Totais (µg de quercetina/100g de farelo)	Flavonóis Totais (µg de quercetina/100g de farelo)
Fermentado II	0,8 ± 0,03 ^a	1,9 ± 0,1 ^a
Fermentado III	0,5 ± 0,08 ^b	1,6 ± 0,07 ^a
Fermentado I	0,5 ± 0,1 ^b	1,5 ± 0,1 ^a
In natura	0,4 ± 0,03 ^b	1,5 ± 0,2 ^a

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

5.6. Quantificação de Carotenoides Totais (CT)

O farelo *in natura* apresentou conteúdo de carotenoides totais maior que os farelos fermentados, correspondente a 0,8 mg de β-caroteno por 100 g de farelo. Os

farelos fermentados III e II que apresentaram 0,5 e 0,4 mg de β -caroteno por 100 g de farelo respectivamente, não diferiram entre si estatisticamente, como mostra a **Tabela 8**.

Tabela 8. Teor de Carotenoides Totais no farelo de cacau

Farelo de Cacau	Carotenoides Totais (mg de β -caroteno/100 g de farelo)
In natura	0,8 \pm 0,03 ^a
Fermentado III	0,5 \pm 0,01 ^{ab}
Fermentado II	0,4 \pm 0,08 ^{ab}
Fermentado I	0,2 \pm 0,03 ^b

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em triplicata mais desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

5.7. Composição em Ácidos Graxos

Os resultados da composição de ácidos graxos (AG) obtidos para os farelos de cacau estão destacados na **Tabela 9**. Foram identificados e quantificados os ácidos graxos: palmítico (16:0), margárico (17:0), esteárico (18:0), oleico (18:1n9c), linoleico (18:2n6), gama-linolênico (18:3n6), araquídico (20:0), alfa-linolênico – LNA (20:5n-3), behênico (22:0) e lignocérico (24:0).

Nota-se que a concentração de ácidos graxos foi modificada após a FES, pois no farelo *in natura* o ácido graxo majoritário foi o esteárico (41,67%), já nos farelos fermentados o que está presente em maior concentração é o ácido oleico, variando de 34,3 a 37,5%, em relação ao teor de gordura do farelo de cacau *in natura*.

Tabela 9. Composição em ácidos graxos dos farelos de cacau

Ácidos graxos	Conteúdo de ácido graxo (% de AG)			
	In Natura	Fermentado I	Fermentado II	Fermentado III
Saturados				
16:0	15,6 ^a	19,6 ^a	21,1 ^a	22,33 ^a
17:0	0,32 ^b	1,12 ^a	1,12 ^a	0,15 ^b
18:0	41,67 ^a	24,23 ^b	24,23 ^b	36,8 ^{ab}
20:0	1,9 ^b	1,24 ^b	4,4 ^a	1,2 ^b
22:0	3,64 ^a	1,1 ^b	0,8 ^b	0,64 ^b
24:0	0,83 ^a	0,6 ^a	0,39 ^a	0,56 ^a
Monoinsaturados				
18:1n9c	28,7 ^a	35,8 ^a	34,3 ^a	37,5 ^a
Poli-insaturados				
18:2n6	2,6 ^b	5,4 ^a	6,04 ^a	4,9 ^a
18:3n6	2,3 ^{bc}	8,26 ^a	4,9 ^b	3,1 ^{bc}
20:5n-3	1,13 ^{ab}	1,73 ^a	1,7 ^a	0,75 ^{ab}
Total de AGI¹	34,7%	51,2%	47%	45,5%
Total de AGS²	64%	48%	51,6%	61,7%

Os dados estão apresentados por média de amostras analisadas em duplicata. Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

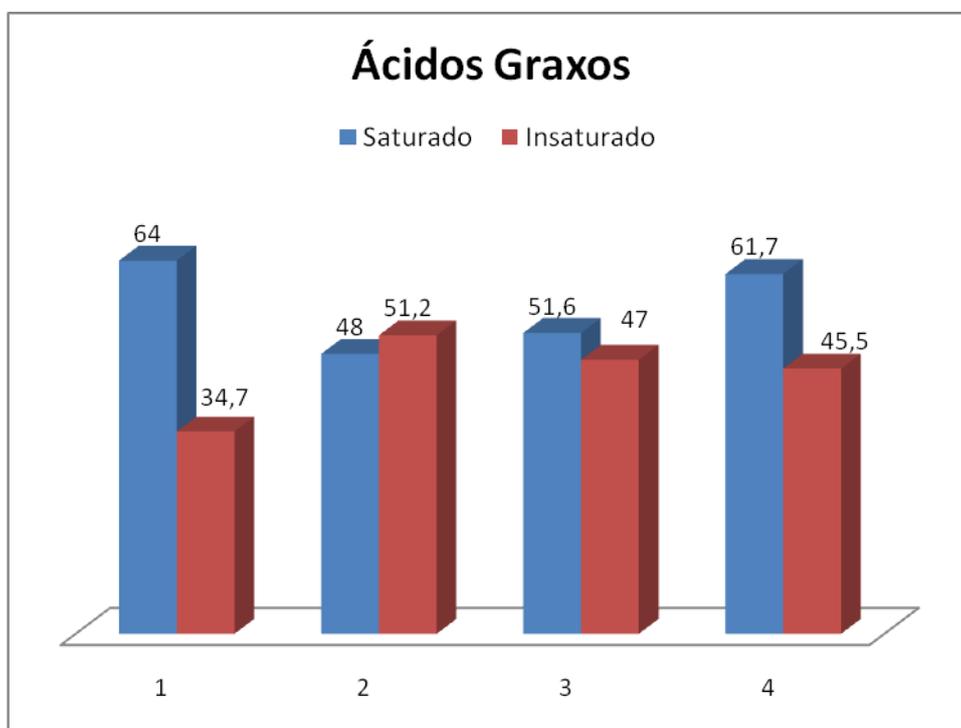
¹AGI: Ácido Graxo Insaturado

²AGS: Ácidos Graxos Saturados

O ácido oléico é o mais importante do grupo dos ácidos graxos monoinsaturados. Uma dieta rica em ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico, auxilia na diminuição plasmática das lipoproteínas de baixa densidade, sem redução das lipoproteínas de alta densidade, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SALGADO *et al.*, 2005).

Além do ácido oleico, um aumento significativo dos ácidos linoleico (18:2n6) e gama-linolênico (18:3n6) também merece destaque, afinal, os ácidos n-6 e n-3 são considerados ácidos graxos essenciais por serem necessários para a saúde, uma vez que, não são biossintetizados pelos animais e o homem, sendo adquiridos através da dieta (GÓMEZ, 2003).

Observando a **Figura 16** é possível visualizar a mudança no perfil de ácidos graxos saturados e insaturados após a fermentação em estado sólido pelo *Penicillium roqueforti*.



1: Farelo *In natura*; 2: Farelo Fermentado I; 3: Farelo Fermentado II; 4: Farelo Fermentado III

Figura 16. Percentual de ácidos graxos saturados e insaturados encontrados nos farelos de cacau.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no escopo dessa dissertação revelaram que o farelo de cacau é um resíduo que apresenta uma diversidade de compostos bioativos de interesse econômico e funcional. A prospecção química *in vitro* do farelo fermentado com o fungo *Penicillium roqueforti* demonstrou a presença de saponinas, não encontradas no farelo *in natura*, sendo um indício que o fungo possa sintetizar esse metabólito a partir do substrato utilizado.

As análises da atividade antioxidante dos farelos também demonstraram alta capacidade deste resíduo nos testes de sequestro do radical DPPH e de poder redutor do ferro.

Além disso, também foram observados aumentos significativos nas concentrações dos ácidos oleico, linoleico e gama-linolênico, que são de grande importância para a saúde, nos farelos fermentados.

Assim, é possível sugerir o reaproveitamento desse resíduo, bem como sua fermentação pelo *P. roqueforti*, com vistas à aplicação na indústria de alimentos em substituição aos antioxidantes sintéticos, como também na indústria farmacêutica e cosmética.

7. TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho abre-se a perspectiva para o desenvolvimento de novos projetos, visando:

- A quantificação das saponinas nos farelos *in natura* e fermentados;
- A realização de testes de citotoxicidade dos extratos;
- A aplicação dos extratos em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, para avaliar sua capacidade antioxidante;
- A aplicação dos extratos em revestimentos comestíveis e avaliação do potencial antioxidante como embalagens ativas.

REFERÊNCIAS

- AIDOO, K.E.; HENRY, R.; WOOD, B.J.B. Solid state fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v.28, p.201-237, 1982.
- ARNAO, M. B. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidante Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.
- ARUOMA, O.I. Methodological Characterizations For Characterizing Potential Antioxidant Actions Of Bioactive Components In Plant Foods. **Mutation Research**, v.9-20, p.523-524, 2003.
- BARROCO, H. E., MORORO, R. C. Sugestões ao “Programa de expansão de consumo de cacau - PECCA”. Brasília: CEPLAC, 1989.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia,1998.
- BEVILAQUA, G.A.P; SCHIEDECKG.; SCHWENGBER, J. E. Identificação e Tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. **Circular Técnica 61**. Embrapa. Pelotas, RS. 2007.
- BESSA, T.; TERRONES, M.G.H. e SANTOS, D.Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. **Revista Horizonte Científico** vol.1, nº 7, Uberlândia/MG, 2007.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; Can. **J. Biochemistry and Physiology**. 1959, 37, 911.
- BOBBIO P. A., BOBBIO F. O. Introdução à Química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Varela; 1995.
- CARGILL. Rótulo da saca de farelo de cacau, 1999.
- CARVALHO, G. G. P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; PEREIRA, O.G.; FERNANDES, F.E.P.; CECON, P.R.; AZEVÊDO, J.A.G. Fracionamento de proteínas de silagem de capim-elefante emurhecido ou com farelo de cacau. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 648-656, jul./set. 2008.
- CHEEKE, P.R. Actual and potential applications of yucca schidigera and quillaja saponária saponins in human and animal nutrition. **II Simpósio sobre ingredientes na alimentação animal**, CBNA-Uberlândia, MG, p. 217-229, 2002.
- CEPLAC, Sinopse do cacau – Estatística Até 2001: Produção de cacau em grão por Estado – AAB, 2001. Disponível em: http://www.ceplac.gov.br/Sinopse_Cacau/Producao/producao1.htm. Acessado em: 12/11/2012.
- CEPLAC, Produção Brasileira de Cacau em Amêndoa – AAI, 2003. Disponível em: http://www.ceplac.gov.br/Sinopse_Cacau/Producao/producao2.htm. Acessado em 12/11/2012.

COULTATE, T.P. Manual De Química y Bioquímica de Los Alimentos. Editorial Acribia S.A, 3ª Ed. Zaragoza, 2002.

DJERASSI, C. Birth control after 1984. **Science**, 169:941, 1970.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**; 35(1):5-22. 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J; GENOVESE, M.I; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, 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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30 (Supl.1): 142-150, maio 2010.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: review. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.587-605, 2002.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The Problem Of Using One Dimensional Methods To Evaluate Multifunctional Food And Biological Antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.

FREIRE, E.S.; ROMEU, A.P.; PASSOS, F.V. *et al.* Aproveitamento de resíduos e subprodutos da pós-colheita do cacau. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1990.

GAVA, ALTANIR JAIME. Princípios da Tecnologia de Alimentos. Ed Nobel. São Paulo, 1984.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.J. Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações. Ed Nobel. São Paulo, 2008.

HAYMAN, E.P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.O; SIMPSON, K.L.. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorulaglutinis*. **Juornal of Bacteriology**, v. 120, p. 1339-1343, 1974.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **Method ISO 5509**. Geneve: ISO, 6p. 1978.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial Carotenoids. **Advances in Biochenical Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 297-326, 1995.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. R. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. **J. Agric. Food Chemistry**.v.51, 2603-2607, 2003.

KING A, YOUNG G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**. 1999; 50 (2): 213-8.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; GARCIA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**; 24(4):691-693. 2004.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, p. 83-84, 1972.

MAO, T. K.; POWELL, J.; WATER, J.V.; KEEN, C.L.; SCHMITZ, H.H.; HAMMERSTONE, J.F.; GERSHWIN, M.E. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences**, v. 66, n. 15, p. 1377-1386, 2000.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Ceará: Edições UFC, 1988.

MARTÍNEZ-FLÓREZ S.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M; TUÑÓN, M.J. Los Flavonóides: Propriedades Y Acciones Antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**;17(6):271-278, 2002.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1656, 1999.

MENSOR, L.L. *et al.* Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODIL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis Of Antioxidant Actitives Of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) And Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. **Journal Agricultural and Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Solid State Fermentation In Biotechnology. Nova Deli: Asiatech, p. 221,2001.

PEREIRA, Fernanda Nascimento. Cacau. Artigo científico disponível em: http://www.nutrociencia.com.br/upload_files/arquivos/Artigo%20-%20cacau.doc.

Acessado em: 10/11/2012.

PIETTA, P.G. Flavonoids As Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI V.M.; GOLLÜCKE A.P.B. Alimentos Funcionais: Introdução às Principais Substâncias Bioativas em Alimentos. São Paulo: Varela; 2005.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico On line 102 da Embrapa**. Fortaleza, CE. Agosto, 2005.

PRIOR, R.L.; CAO G. In Vivo Total Antioxidante Capacity: Comparison Of Different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, nov/dez, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH K. Standardized Methods For The Determination Of Antioxidant Capacity And Phenolics In Foods And Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 53, n.10, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity Of Dietary As Determined By A Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAIMBAULT, M. General And Microbiological Aspects Of Solid Substrate Fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

RAW, I.; MENNUCCI, L.; KRASILCHICK, M.A. *Biologia e o Homem*. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

REIN, D.; LOTITO, S.; HOLT, R.R; KEEN, C.L.; SCHIMITZ, H.H.; FRAGA, C.G. Epicatechin in human plasma: In vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 2109S-2114S, 2000.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; *Práticas de micologia veterinária*. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO; F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico On line Embrapa 125**. Fortaleza, CE. Dezembro, 2006.

RUFINO, M. S. M. ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO; F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico On line Embrapa 127**. Fortaleza, CE. Julho, 2007.

SALVADOR, I. Atividade Antioxidante e Teor de Resveratrol em Cacau, Chocolates, Achocolatados em Pó e Bebidas Lácteas Achocolatadas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S. OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SÁNCHEZ, S. Bioconversion of Lutein to Products With Aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 528-534, 2000.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used To Evaluate The Free Radical Scavenging Activity In Foods And Biological Systems. **Food Science and Technology International**,v.8, p.121-137, 2002.

SANTOS, D.T.; SARROUH, B.F.; SANTOS, J.C.; PERÉZ, V.H.; SILVA, S.S. Potencialidades e Aplicações da Fermentação Semi-Sólida em Biotecnologia. **Revista Científica Janus**. Ano 3, nº 4, 2º semestre de 2006.

SIES, H.; SCHEWE, T.; HEISS, C.; KELM, M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 304S-312S, 2005.

SILVA NETO, P. J.; MATOS, P.G.G.; MARTINS, A.C.S.; SILVA, A.P. Sistema de Produção de Cacau para a Amazônia Brasileira. Belém, CEPLAC, 2001.

SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O.; PHAFF, H. J. Carotenoid Pigments of Yeast. **Academic Press**, New York, p. 493-515,1971.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 2, p. 215-223, 2003.

SODRÉ, George Andrade. Resíduos regionais usados como substratos na região sul da Bahia. Artigo disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/viensub/palestras/palestra%20%20-%20george%20sodre.pdf>. Acessado em: 11/11/2012.

SOUSA, C.P.; LIMA, M.L.P. Aspectos Gerais e Morfológicos do fungo *Penicillium sp.* 2010. Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/10/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_865.html. Acessado em: 12/11/2012.

STRAUS, E. L.; MENEZES L. V. T. Minimização de Resíduos. In: Anais do 17ºCongresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, p.212- 225, 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Sufarce Protection and Secondary Defense Compounds. **Plant Physiology**. Redwood City: Benjamin Cummings, p. 318-345, 1991.

TEUBER, M. & ENGEL, G. Low Risk of Mycotoxin Production in Cheese. **Microbiol Aliment Nutr** 1, p. 193-197, 1983.

VAINSTEIN, A.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E.; WEISS, D. Floral fragrance.New inroads into an old commodity. **Plant Physiology**, 127:1383-1389, 2001.

VALLE, CYRO EYER DO. Qualidade Ambiental: ISO 14 000. São Paulo: **SENAC**, 2002.

VINSON, J.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA,P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G.A. Chocolate is a Powerful Ex Vivo And In Vivo Antioxidant, an Antiatherosclerotic Agent in an Animal Model and a Significant Contributor to Antioxidants in the Euorpean and American Diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 8071-8076, 2006.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, Documento 316, p.10,novembro 2010.

WEISBURGER, J. H. & WILLIAMS, G. M. The Distinction Between Genotoxic And Epigenetic Carcinogens And Implication For Cancer Risk. **Toxicology Science**; v. 49, p. 231-246, 2000.

WETTASINGHE, M., SHAHIDI, F. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1801-1812, 1999.

WOISKY, R.G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, 37(2): 99-105. 1998.

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

WOLKE, ROBERT L. O Que Einstein Disse Ao Seu Cozinheiro, 2: Mais Ciência Na Cozinha. Ed. Jorge Zahar. Rio de Janeiro, 2005.

ZADRAZIL, F.; PUNIA, A. K. Studies on the Effect of Particle Size on Solid State Fermentation of Sugarcane Bagasse Into Animal Feed Using Whiterot Fungi. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 85-87, 1995.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZUGAIB, A.C.C.; SANTOS, A.M.; FILHO, L.P.S. Mercado de Cacau. 2004. Pesquisa disponível em: http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado_cacau.htm. Página acessada em: 12/11/2012.