



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos
Área de Concentração: Ciência de Alimentos



MARÍLIA VIANA BORGES

**FARINHA DE CASCA DE CAFÉ: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS,
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E APLICAÇÃO EM CHOCOLATE ESCURO**

Campus Juvino Oliveira
Itapetinga, BA, abril 2020

MARÍLIA VIANA BORGES

**FARINHA DE CASCA DE CAFÉ: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS,
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E APLICAÇÃO EM CHOCOLATE ESCURO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Doutora”.

Orientador: Prof. *DSc.* Marcondes Viana da Silva

Co-orientadores: Prof. *DSc.* Leandro Soares Santos

Prof^a. *DSc.* Suzana Caetano da Silva Lannes

Campus Juvino Oliveira
Itapetinga, BA, abril 2020

664.06
B733f

Borges, Marília Viana.

Farinha de casca de café: características físicas, químicas, capacidade antioxidante e aplicação em chocolate escuro. / Marília Viana Borges. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2020.

125 f.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Marcondes Viana da Silva e coorientação dos Profs. D. Sc. Leandro Soares Santos e D. Sc. Suzana Caetano da Silva Lannes.

1. Café – Farinha da casca – Aplicação – Chocolate escuro. 2. Chocolate – Adição na formulação – Farinha de casca de café – Valor nutricional. **3. Theobroma cacao – Constituintes bioativos – Sustentabilidade.** I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Silva, Marcondes Viana da. III. Santos, Leandro Soares. IV. Lannes, Suzana Caetano da Silva. V. Título.

CDD(21): 664.06

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Farinha da casca de café : Usos : Chocolate escuro
2. Chocolate : Adição : Farinha de casca de café : Subprodutos
3. Farinha de casca de café : Valor nutricional
4. Theobroma cacao : Constituintes bioativos



INSTITUTO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Reconhecida pelo Decreto Estadual
Nº 16.025, de 04.07.2016



Governo do
Estado da Bahia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: FARINHA DE CASCA DE CAFÉ: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E APLICAÇÃO EM CHOCOLATE ESCURO.

Autor (a): MARÍLIA VIANA BORGES

Orientador (a): Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva

Coorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Prof.ª Dr.ª Suzana Caetano da Silva Lannes

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

Prof. Dr. Leandro Soares Santos
UESB

Prof.ª Dr.ª Carmen Wobeto
Membro Externo - UFMT

Prof.ª Dr.ª Gabrielle Cardoso Reis Fontan
UESB

Prof. Dr. Ben-Hur Ramos Ferreira Gonçalves
Membro Externo - UFSB

Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 29 de abril de 2020.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

À Deus

Aos meus pais

Aos meus irmãos

À Eduardo

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela sua força divina de me guiar e fortalecer em todos os meus dias, pois sem ele eu não seria nada.

Aos meus pais Rosalvo e Marinalva, pelo amor, carinho e confiança. Eles são o meu porto seguro, sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram.

As minhas irmãs Marina e Mônica que mesmo longe sei que posso contar com o apoio, carinho e amizade, são as melhores irmãs do mundo.

Ao meu namorado Eduardo, pelo amor e companheirismo, sempre me anima e incentiva e nunca me deixou duvidar da minha capacidade.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – PPGEAL, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo apoio financeiro ao projeto, Termo de outorga DTE004/2016 FAPESB.

A fazenda Floresta, localizado no município de Ibicoara – Ba, por disponibilizar as cascas de café orgânico mais do que o suficiente para realização de toda a pesquisa.

A meu orientador, professor Dr. Marcondes Viana da Silva, pela orientação, compreensão e confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço também meus co-orientadores, professor Dr. Leandro Soares dos Santos e Dr^a. Suzana Caetano da Silva Lannes, por me auxiliarem de forma técnica e intelectual necessários para o desenvolvimento e enriquecimento da pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Carmem Wobeto, Gabrielle Cardoso Reis Fontan, Leandro Soares dos Santos e Ben-Hur Ramos Ferreira Gonçalves, por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho.

Ao Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL), em especial Cristina, Ingrid, Márjorei e Márcia, por me receberem de braços abertos e pelos auxílios. Sem vocês não faria nem metade do que fiz. Amigas que levo para o resto da vida!

Aos colegas do doutorado, em especial Mylena e Mariana, minhas eternas amigas, pessoinhas que estão presentes em minha vida desde a graduação e que seguem comigo nesta mesma caminhada.

A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desta história.

Meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	16
SUMMARY	18
PREFÁCIO.....	19

CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO

1. Introdução geral.....	21
2. Referencial teórico	23
2.1. Café: aspectos gerais e geração de resíduos	23
2.2. Constituintes bioativos: constituintes fenólicos e alcaloides e suas presenças em casca de café e chocolate	26
2.2.1. Constituintes fenólicos	27
2.2.2. Alcaloides: xantinas.....	31
2.3. Chocolate: definição, beneficiamento do cacau e etapas de produção	33
2.4. Principais ingredientes utilizados para produção de chocolate	36
2.4.1. Massa de cacau	36
2.4.2. Manteiga de cacau	37
2.4.3. Açúcar.....	37
2.4.4. Emulsificantes	38
2.5. Adição de ingredientes não convencionais em chocolates	39
2.6. Legislação e parâmetros de qualidade do chocolate	40
2.7. Textura instrumental	41
2.8. Reologia	42
2.9. Avaliação Sensorial	44
Referências	45

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

1. Objetivos.....	59
1.1. Objetivo geral	59
1.2. Objetivos específicos	59

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTOXICIDADE E INVESTIGAÇÃO DE ANTINUTRIENTES EM FARINHA DE CASA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Resumo	61
1. Introdução.....	61
2. Material e Métodos.....	62
2.1. Obtenção da casca de café e produção da farinha.....	63
2.2. Caracterização nutricional da farinha da casca de café	63
2.2.1. Determinação de umidade	63
2.2.2. Determinação de cinzas	64
2.2.3. Determinação de acidez titulável (AT).....	64
2.2.4. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	64
2.2.5. Determinação de proteínas totais.....	64
2.2.6. Determinação de lipídeos totais.....	64
2.2.7. Determinação de açúcares totais, redutores e não redutores	64
2.2.8. Determinação da composição de minerais	65
2.3. Investigação de antinutrientes na farinha da casca de café.....	66
2.3.1. Determinação de Taninos condensados (TC) - Método do butanol acidificado	66
2.3.2. Determinação de nitratos	66
2.3.3. Determinação de saponinas	66
2.3.4. Determinação de ácido oxálico (oxalato)	67
2.4. Investigação da Atividade Hemolítica da farinha da casca de café (citotoxicidade).....	67
2.4.1. Obtenção de eritrócitos humano	67
2.4.2. Preparo da solução de eritrócitos.....	67
2.4.3. Efeito sobre a hemólise.....	67
2.5. Determinação dos constituintes fenólicos Totais (CFT) da farinha da casca de café	68
2.6. Determinação da capacidade antioxidante da farinha de casca de café.....	68
2.6.1. Método do radical 2,2' – azino – bis – 3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfônico (ABTS)	68
2.6.2. Inibição da oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico	69
2.6.3. Ensaio do poder redutor.....	69
3. Resultados e discussão	70
3.1. Caracterização química e física de farinha de casca de café	70
3.2. Investigação de antinutrientes e citotoxicidade da farinha da casca de café	73

3.3. Determinação dos Constituintes fenólicos totais e capacidade antioxidante da farinha da casca de café.....	75
4. Conclusão	76
Referências	76

CAPÍTULO IV - CHOCOLATES ESCUROS PRODUZIDOS COM ADIÇÃO DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.): CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA, REOLÓGICAS E AVALIAÇÃO SENSORIAL

Resumo	82
1. Introdução.....	82
2. Material e Métodos.....	84
2.1. Obtenção da casca de café e produção da farinha.....	84
2.2. Processamento das formulações de chocolate	85
1.1. Caracterização química e física do chocolate	87
1.1.1. Determinação de umidade	87
1.1.2. Determinação de cinzas	88
1.1.3. Determinação de acidez titulável (AT).....	88
1.1.4. Determinação do potencial de hidrogênio (pH)	88
1.1.5. Determinação de proteínas totais.....	88
1.1.6. Determinação de lipídios totais	88
1.1.7. Determinação de açúcares redutores, não redutores e totais	89
1.2. Análise instrumental de cor	89
1.3. Análises microbiológicas	89
1.4. Análise Granulométrica	90
1.5. Análise Reológica - Ensaio rotacional.....	90
1.6. Análise de textura instrumental	90
1.6.1. Análise do perfil de textura (Texture profile analysis – TPA)	90
1.6.2. Textura instrumental: tensão de ruptura (snap test).....	91
1.7. Análise sensorial	91
1.7.1. Teste de Aceitação e intenção de compra.....	91
1.7.2. Perfil sensorial - Check-All-That-Apply (CATA)	92
1.8. Delineamento experimental	92
2. Resultados e discussão	93
2.1. Produção e caracterização do chocolate adicionado da farinha da casca de café (FCC).	93

2.2.	Análise microbiológica	97
2.3.	Textura instrumental: tensão de ruptura (snap test)	97
2.4.	Textura instrumental: perfil de textura (TPA)	98
2.5.	Análise reológica	100
2.6.	Análise sensorial: teste de aceitação e intenção de compra	101
2.7.	Análise sensorial: perfil sensorial Check-All-That-Apply (CATA)	104
3.	Conclusão	105
	Referências	106
	ANEXO I	110

CAPÍTULO VI - INVESTIGAÇÃO DE FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EM CHOCOLATES ESCUROS ADICIONADOS DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

	Resumo	112
1.	Introdução	112
2.	Material e Métodos	114
2.1.	Obtenção da casca de café	115
3.1.	Processamento das formulações de chocolate	115
2.2.	Determinação dos constituintes fenólicos totais e individuais das formulações de chocolate	118
2.2.1.	Determinação de Constituintes Fenólicos Totais (CFT)	118
2.2.2.	Determinação dos Constituintes Bioativos Individuais (CBI)	118
2.2.2.1.	Preparo dos extratos	118
2.2.2.2.	Identificação e quantificação compostos fenólicos e metilxantinas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	119
2.3.	Determinação de Flavonoides totais	119
2.4.	Capacidade antioxidante das formulações de chocolate	119
2.4.1.	Método do radical 2,2' – azino – bis – 3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfônico (ABTS)	120
2.4.2.	Inibição da oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico	120
2.4.3.	Ensaio do poder redutor relativo (PRR)	121
2.5.	Delineamento experimental	121
3.	Resultados e discussão	122
3.1.	Constituintes fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e capacidade antioxidante (CA) das formulações de chocolate com adição da farinha de casca de café (FCC).	122

3.2. Identificação e quantificação dos Constituintes Bioativos Individuais (CBI) por CLAE	123
4. Conclusão	126
Agradecimentos	126
Referências	127

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Esquema da estrutura do fruto do café.....	23
Figura 2. Processamento industrial do café.....	24
Figura 3. Classificação dos constituintes bioativos.....	27
Figura 4. Fórmula estrutura representativa de um fenol.....	27
Figura 5. Fórmulas estruturas do ácido quínico e derivados do ácido trans-cinâmico.....	29
Figura 6. Formula estrutura da (+) catequina e (-) epicatequina.....	30
Figura 7. Fórmula estrutura do alcaloide serotonina.....	31
Figura 8. Fórmula estrutural da cafeína.....	31
Figura 9. Fórmula estrutural da teobromina.....	32
Figura 10. Fluxograma das etapas de fabricação do chocolate.....	35

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTOXICIDADE E INVESTIGAÇÃO DE ANTINUTRIENTES EM FARINHA DE CASA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Figura 1. Cascas de café secas (a) e trituradas no moinho de facas (b) e farinha de casa de café com granulometria de 60 mm (c).	63
--	----

CAPÍTULO IV - CHOCOLATES ESCUROS PRODUZIDOS COM ADIÇÃO DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.): CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA, REOLÓGICAS E AVALIAÇÃO SENSORIAL

Figura 1. Cascas de café secas (a) e trituradas no moinho de facas (b) e farinha de casa de café com granulometria de 60 mm (c).	85
Figura 2. Ilustração das etapas de moagem, mistura, conchagem e refino na Melanger Spectra 11	86
Figura 3. Temperadeira utilizada no processo de temperagem do chocolate.....	87
Figura 4. Chocolates após processo de moldagem e embalagem.....	87
Figura 5. Variáveis que apresentaram efeito linear crescente por meio da adição da FCC ao chocolate.....	94
Figura 6. Variável que apresentou efeito linear decrescente por meio da adição da farinha da casca de café ao chocolate.....	95
Figura 7. Variável que apresentou efeito quadrático por meio da adição da farinha da casca de café ao chocolate.....	96

Figura 8. Comportamento linear e quadrático observados para os parâmetros de dureza e coesividade entre as formulações de chocolate adicionados de casca de café.	99
Figura 9. Atributos que apresentaram efeito linear decrescente no teste sensorial de ceitação.	102
Figura 10. Resultado da intenção de compra dos provadores em relação as formulações de chocolate adicionados da farinha da casca de café.	103
Figura 11. Efeito linear decrescente do parâmetro intenção de compra obtidos para as formulações de chocolate adicionados da farinha da casca de café.	104
Figura 12. Análise de Componentes principais do perfil sensorial obtidos pelo método CATA.	105

CAPÍTULO VI - INVESTIGAÇÃO DE FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EM CHOCOLATES ESCUROS ADICIONADOS DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Figura 1. Cascas de café secas (a) e trituradas no moinho de facas (b) e farinha de casa de café com granulometria de 60 mm (c).	115
Figura 3. Temperadeira utilizada no processo de temperagem do chocolate.	117
Figura 4. Chocolates após processo de moldagem e embalagem.	118
Figura 5. Capacidade antioxidante das formulações de chocolate adicionados da FCC.	123
Figura 6. Cromatogramas representativo da identificação de constituintes fenólicos individuais nas formulações de chocolate. (A) chocolate com 0% da FCC, (B) chocolate com 10% da FCC.	125
Figura 7. Cafeína e Teobromina quantificada nas formulações de chocolate adicionados de casca de café por meio da CLAE.	125

LISTA DE TABELAS

CAPITULO III: CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.): COMPOSIÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ANTINUTRIENTES

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão da caracterização química e física da farinha da casca de café.....	71
Tabela 2. Teores médios da composição de minerais, percentual de valor diário de ingestão (% VD) da farinha de casca de café e Ingestão Diária Recomendada (IDR).....	72
Tabela 3. Avaliação de antinutrientes e citotoxicidade em farinha da casca de café.	73
Tabela 4. Constituintes Fenólicos Totais (CFT) e capacidade antioxidante (CA) da farinha da casca de café.	75

CAPÍTULO IV - CHOCOLATES ESCUROS PRODUZIDOS COM ADIÇÃO DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.): CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA, REOLÓGICAS E AVALIAÇÃO SENSORIAL

Tabela 1. Formulação utilizada para produção dos chocolates 55% (sólidos totais de cacau) com adição da farinha de casca de café (FCC).....	86
Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão da tensão de ruptura (dureza) e trabalho de cisalhamento das formulações de chocolate adicionadas da farinha de casca de café (FCC)...	99
Tabela 3. Parâmetros reológicos das formulações de chocolate adicionados de casca de café.	101

CAPÍTULO VI - INVESTIGAÇÃO DE FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EM CHOCOLATES ESCUROS ADICIONADOS DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Tabela 1. Formulação utilizada para produção dos chocolates 55% (sólidos totais de cacau) com adição da farinha de casca de café (FCC).....	117
---	-----

RESUMO

BORGES, M. V. **Farinha de casca de café: características físicas, químicas, capacidade antioxidante e aplicação em chocolate escuro**. Itapetinga, BA: UESB, 2020. 128 p. Tese. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).*

Chocolates adicionados de ingredientes não tradicionais (café, menta, frutas secas, dentre outros), destacam-se como tendência de mercado mundial. Com essa perspectiva, o presente estudo constitui uma proposta para aplicação tecnológica de farinha de casca de café, em chocolates, surgindo assim, como uma fonte alternativa de ingrediente com características funcionais e potencial antioxidante. Objetivou-se com o presente estudo obter e caracterizar a farinha oriunda de casca de café arábica orgânico (*Coffea arabica* L.) e promover sua aplicação em formulações de chocolates escuros, avaliando o seu impacto quanto a estabilidade física, propriedades bioativas e sensoriais. Para tanto, realizaram-se as determinações físico-químicas (umidade, cinzas, pH, acidez titulável, proteínas, lipídios, açúcares totais, redutores e não redutores) da FCC e das formulações de chocolate (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% da FCC), composição mineral e antinutrientes da FCC, além dos constituintes fenólicos totais e individuais e capacidade antioxidante (radical ABTS^{•+}, ensaio do poder redutor e oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico) da FCC, bem como das formulações de chocolates elaboradas. Ademais, realizaram-se avaliação das características de qualidade dos chocolates por meio das análises microbiológicas, reológicas, atividade de água, textura instrumental e perfil sensorial. A adição de FCC nas formulações resultou no aumento dos teores de umidade (1,12-1,86%), cinzas (1,27-2,11%), proteínas (6,21-7,15%), acidez (0,64-0,98 meq NaOH.100g⁻¹ de amostra) e açúcar redutor (13,48-16,84 mg. mL⁻¹), em comparação com a formulação controle, observou-se que a composição das formulações de chocolates, mantiveram-se dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira, bem como do *Códex Alimentarius*. A adição de FCC destacou-se pelo aumento da capacidade antioxidante das formulações de chocolates, com valores linearmente decrescente para os ensaios do radical ABTS^{•+} e poder redutor, e crescente para a oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico. Verificou-se aumento significativo nos teores de cafeína e teobromina, determinadas por CLAE com a adição crescente de FCC. Com os resultados obtidos, constata-se que a FCC, agrega-se

* Orientador: Marcondes Viana da Silva, DSc., UESB. Co-orientadora: Suzana Caetano da Silva Lannes, DSc., USP. Leandro Soares Santos, DSc., UESB.

às formulações de chocolate valor nutricional e características funcionais, sem alterar as características de qualidade.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, subproduto, constituintes bioativos, sustentabilidade.

SUMMARY

BORGES, M. V. **Coffee husk flour: technical, chemical characteristics, antioxidant capacity and application in dark chocolate**. Itapetinga, BA: UESB, 2020. 128 p. Thesis. (Doctorate in Engineering and Food Science, Area of Concentration in Food Science).*

Chocolates added with non-traditional ingredients (coffee, mint, dried fruits, among others), stand out as a worldwide market trend. With this perspective, the present study constitutes a proposal for the technological application of coffee husk flour, in chocolates, thus emerging as an alternative source of ingredient with functional characteristics and antioxidant potential. The objective of the present study was to obtain and characterize the flour from the husk of organic Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) and promote its application in dark chocolate formulations, evaluating its impact in terms of physical stability, bioactive and sensory properties. To this end, the physical and chemical determinations (moisture, ash, pH, titratable acidity, proteins, lipids, total sugars, reducers and non-reducers) of the FCC and of the chocolate formulations (0.0; 2.5; 5.0; 7.5 and 10.0% of the FCC), mineral composition and antinutrients of the FCC, in addition to the total and individual phenolic constituents and antioxidant capacity (ABTS^{•+} radical, test of the reducing power and coupled oxidation of β -carotene and linoleic acid) from the FCC, as well as from the elaborated chocolate formulations. In addition, the quality characteristics of the chocolates were assessed through microbiological, rheological, water activity, instrumental texture and sensory profiles. The addition of FCC in the formulations resulted in an increase in moisture content (1.12 - 1.86%), ash (1.27 - 2.11%), proteins (6.21 - 7.15%), acidity (0.64 - 0.98 meq NaOH. 100g⁻¹ of sample) and reducing sugar (13.48 - 6.84 mg. mL⁻¹), in comparison with the control formulation, it was observed that the composition of the chocolates, remained within the quality standards established by Brazilian legislation, as well as the *Códex Alimentarius*. The addition of FCC stood out for the increased antioxidant capacity of chocolate formulations, with linearly decreasing values for the tests of the ABTS^{•+} radical and reducing power, and increasing for the coupled oxidation of β -carotene and linoleic acid. There was a significant increase in the levels of caffeine and theobromine, determined by HPLC with the increasing addition of FCC. With the results obtained, it appears that the FCC, adds to the chocolate formulations nutritional value, functional characteristics, without changing the quality characteristics.

Key words: *Theobroma cacao*, By-product, bioactive constituents, Sustainability.

*Advisor: Marcondes Viana da Silva, DSc., UESB. Co-advisors: Suzana Caetano da Silva Lannes, DSc., USP. Leandro Soares Santos, DSc., UESB.

PREFÁCIO

O presente estudo foi desenvolvido com o propósito de utilizar a casca de café processada como farinha e utilizá-la como ingrediente em formulações de chocolate. Visando assim, agregar valor nutricional e funcional a partir de um resíduo abundante e de baixo custo, e que até então, tem sido negligenciado pela cadeia produtiva do café, e ainda não explorado como ingrediente em chocolate.

Apresenta-se aqui o trabalho de tese no formato de capítulos, organizado em cinco capítulos conforme intitulados a seguir:

No primeiro capítulo foram abordados os conceitos gerais da proposta de tese distribuídos por introdução e revisão bibliográfica, situando a relevância do trabalho no cenário tecnológico e social.

No segundo capítulo foram apresentados os objetivos geral e específico.

Os capítulos seguintes apresentam os resultados alcançados na forma de edições para publicação.

A primeira edição capítulo III, “AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTOXICIDADE E INVESTIGAÇÃO DE ANTINUTRIENTES EM FARINHA DE CASA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)”, apresenta resultados referentes a caracterização de casca de café, para que esta seja indicada para aplicação em composições alimentícias.

A segunda edição capítulo IV, “CHOCOLATES ESCUROS PRODUZIDOS COM ADIÇÃO DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.): CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA, REOLÓGICAS E AVALIAÇÃO SENSORIAL”, apresenta a avaliação das características de qualidade de formulações de chocolate adicionados da farinha da casca de café.

A última edição capítulo V, “INVESTIGAÇÃO DE FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EM CHOCOLATES ESCUROS ADICIONADOS DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)”, apresenta resultados referentes a adição de constituintes bioativos em formulações de chocolate por meio da adição da farinha da casca de café.

Capítulo I

Referencial teórico

1. Introdução geral

Na indústria de café são geradas quantidades consideráveis de subprodutos em todas as fases de sua cadeia produtiva, desde a colheita até o produto final (cascas, borras, palhas e polpa). A casca é o principal subproduto obtido após beneficiamento do café por via seca, e estima-se que 0,18 tonelada de casca seja gerada por cada tonelada de café colhido (CHERUIYOT et al., 2019). Apesar de possuir em sua composição elevada quantidade de compostos antioxidantes, como cafeína, ácido clorogênico, trigonelina e diterpenos que podem ser recuperados e usados como conservantes naturais em alimentos e aditivos em cosméticos e suplementos nutricionais, ou seja, produtos com valor agregado (DEL CASTILLO et al., 2019), sua aplicação ainda é muito limitada. Assim, esforços para encontrar uma tecnologia alternativa para explorá-la podem ser lucrativas, dada a sua abundância em todo o mundo.

Alguns estudos foram desenvolvidos visando o uso destes resíduos em ração animal, porém, o elevado teor de taninos, nitrogênio proteico de difícil degradação, cafeína e polifenóis promovem limitações para a referida aplicação (BLINOVÁ et al., 2017). As aplicações mais recentes da casca de café incluem, produção de biocombustível (WOLDESENBET et al., 2016; SANTOS et al., 2018), fermentação para obtenção de compostos aromáticos (BONILLA-HERMOSA et al., 2014), adsorvente de corantes (CHERUIYOT et al., 2019; MURTHY et al., 2019), fibras alimentares (BALLESTEROS, TEIXEIRA e MUSSATTO, 2014) e extração de constituintes bioativos (MURTHY e NAIDU, 2012a; RAMÓN-GONÇALVES et al., 2019). Tais estudos comprovam as diferentes possibilidades de utilização para a casca de café.

Desse modo, visando explorar outras possibilidades de aplicação da casca de café, como sua adição em produtos alimentícios, buscou-se a combinação com o chocolate, a fim de desenvolver um novo produto com grande potencial nutricional e com características sensoriais diferenciadas sem comprometer suas características de qualidade, sejam elas físicas, químicas, microbiológica, de textura ou sensoriais.

O processo de fabricação do chocolate, “produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (pasta ou liquor) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau com outros ingredientes contendo no mínimo 25% (m/m) de sólidos de cacau” (BRASIL, 2005), consiste em um conjunto de operações que envolve mistura, refino, conchagem, temperagem, moldagem, resfriamento, desmoldagem e embalagem (GUTIERREZ, 2017). Durante todo processo de produção, a qualidade do chocolate pode ser alterada provocando características indesejadas.

Para que o chocolate tenha uma boa qualidade, deve possuir uma superfície brilhante, ser duro e quebradiço à temperatura ambiente (20 °C a 25 °C), fundir rápida e completamente

na boca acompanhado de desprendimento de aroma e sabor e ausência de residual gorduroso nem arenoso durante a degustação. Sob o ponto de vista do processamento, deve possuir propriedades reológicas adequadas para ser facilmente transportada e preencher corretamente o molde e boa contração para facilitar o desmolde. Estas características são determinadas principalmente, pelo teor e a qualidade da manteiga de cacau, tamanho das partículas e umidade das matérias-primas (NIGHTINGALE, LEE e ENGESETH, 2011).

Assim, como a casca de café (resíduo) o cacau e produtos à base de cacau também são alimentos que possuem alto teor de constituintes bioativos, porém, durante as etapas de produção do chocolate, principalmente fermentação e secagem, ocorrem perdas significativas desses constituintes (AGIBERT e LANNES, 2018). Portanto, uma abordagem relativamente menos explorada para expandir o sabor e o perfil fenólico dos chocolates é adicionar constituintes polifenólicos naturalmente derivados de casca de café.

Estes compostos benéficos, estão presentes de forma expressiva em matérias primas não convencionais como cascas de frutas e vegetais, os quais têm sido incorporados em diversos produtos alimentícios, visando além de aumentar a quantidade de compostos bioativos, atender ao interesse de consumidores que buscam produtos agradáveis, práticos, com elevado valor nutricional e com características funcionais (SANDRI, BASTIANI e PIEMOLINI-BARRETO, 2012; BALDIN et al., 2016).

Foram comprovados em vários estudos que a utilização de materiais vegetais ricos em polifenóis, como folhas de framboesa (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2012), folhas de urtiga (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015), pericarpo de mangostão (SIM et al., 2016), amora (LONČAREVIĆ et al., 2018), amora preta (GULTEKIN-OZGUVEN et al., 2016), gengibre e canela (ALBAK e TEKIN 2014), sendo adicionados como material em pó seco, extrato ou na forma encapsulada trazem enriquecimento tanto nutricional quanto funcional a produtos alimentícios, exclusivamente chocolates os quais tais ingredientes foram adicionados.

A realização deste estudo, foi possível, por não ser encontrado nas bases de dados investigadas (nos últimos 10 anos) outros estudos relativos à aplicação de farinha de casca de café como ingrediente antioxidante na indústria produtora de chocolate.

Com essa perspectiva, o presente estudo constitui uma proposta para aplicação tecnológica da farinha de casca de café, aplicação em chocolate, se tornando uma fonte alternativa de ingrediente com características funcionais com potencial antioxidante. Com isso, cria-se um amplo campo de investigações científicas, ampliando a possibilidade de diversas aplicações industriais, além de contribuindo para a sustentabilidade da cadeia produtiva do café.

2. Referencial teórico

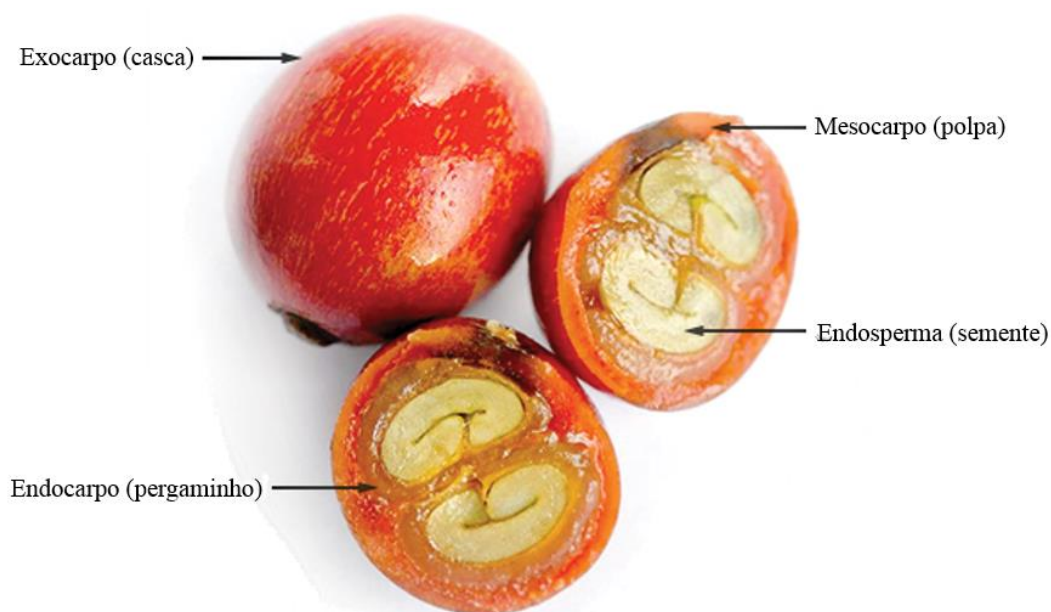
2.1. Café: aspectos gerais e geração de resíduos

O café foi introduzido no Brasil em 1727 no estado do Pará, em seguida, foi plantado no Maranhão e daí se expandiu, em pequenas plantações, para os estados vizinhos, sendo introduzido na Bahia em 1770 (PEREIRA e RIBEIRO, 2015).

O café pertence à família Rubiaceae que inclui mais de 500 gêneros e cerca de 13.000 espécies. No gênero *Coffea* existem mais de 100 espécies, todas nativas da África tropical (ROJO-JIMENEZ, 2014), no entanto duas estão entre as comercialmente mais produzidas, *Coffea arabica* L. (75% da produção mundial) que apresenta melhores propriedades sensoriais e a *Coffea canefora*, também chamada Robusta (25% da produção mundial), que é mais resistente às pragas (MUSSATTO et al., 2011).

O fruto do café é composto por dois endospermas (semente) envoltos pelo endocarpo (pergaminho). Em seguida, os grãos são cobertos pelo mesocarpo (polpa) e, por fim, pelo exocarpo (casca). Um esquema da estrutura do fruto do café é apresentado na Figura 1.

Figura 1. Esquema da estrutura do fruto do café.



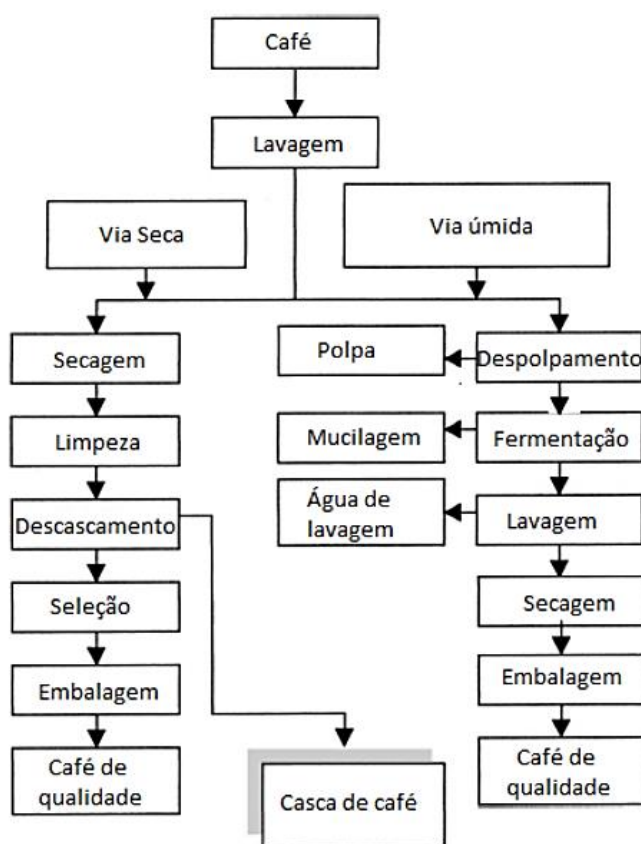
Fonte: Adaptado de Campos-Vegas (2015).

O processamento do grão do café pode ocorrer por duas vias: seca ou úmida, conforme apresentado na Figura 2. No entanto, ambos os processos de beneficiamento são responsáveis

por gerarem grandes quantidades de resíduos como casca e polpa, respectivamente (ULSIDO, ZELEKE e LI, 2016).

O processamento do café por via seca consiste em deixar os frutos secarem expostos à luz solar (naturalmente) ou por aquecimento em fornos. Em seguida, os grãos secos são descascados removendo o exocarpo e o mesocarpo, gerando o resíduo que é considerado casca de café (MURTHY e NAIDU, 2012b; OLIVEIRA e FRANCA, 2014). Estima-se que, durante o processamento de café por via seca, a relação obtida de grão beneficiado e casca seja de 1:1, em massa (GOUVEA et al., 2009; ANDRADE, 2012).

Figura 2. Processamento industrial do café.



Fonte: Adaptado de Soccol (2002).

Frente a grande quantidade de casca de café gerada, pesquisas têm sido realizadas para avaliar sua composição química, visando torná-los matérias-primas passíveis de exploração industrial. Muitos deles revelaram a presença de compostos bioativos de grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica, tais como os compostos fenólicos (WANG et al., 2010; ROCKENBACH et al., 2011; NEVES, 2019).

García e Del Bianchi (2015) avaliaram o efeito da fermentação fúngica no teor de compostos fenólicos em casca de café robusta e verificaram que o conteúdo de fenólicos totais aumentou de 159,5 até 243,2 mg EAG·g⁻¹ de substrato por efeito da fermentação em estado sólido. Enquanto, Baqueta et al. (2017) realizaram extrações de constituintes presentes na casca de café por Soxhlet, com solventes de diferentes polaridades e seletividades e concluíram que a casca de café apresenta grande potencial para extração de cafeína.

Outros trabalhos também têm sido realizados com intuito de avaliar o potencial antioxidante de resíduos provenientes da produção de café. Bravo et al. (2012) enfatizaram a riqueza em compostos bioativos do café, como a cafeína e ácido clorogênico, derivados do processo de extração durante a preparação da bebida, porém relatam que esta extração é incompleta e que tais componentes ainda podem ser extraídos dos resíduos resultante do processo de preparação (borra de café). Neves et al. (2019) avaliaram a eficiência da extração aquosa para a obtenção de fitoquímicos bioativos de cascas residuais de café arábica orgânico, e a partir desta, desenvolveram uma bebida, avaliando além da presença de antioxidantes naturais a sua aceitação sensorial, com os resultados obtidos concluíram que extrato aquoso de cascas de café surge como alternativa viável para indústria de bebidas.

Murthy e Naidu (2012b) reportaram em seus estudos que os resíduos de café (polpa, casca, tegumento e borra) são ricos em nutrientes e compostos orgânicos como cafeína, taninos e polifenóis, e que seus extratos podem apresentar boa atividade antioxidante. Del Castillo et al., (2018) e Esquivel e Jiménez (2012) determinaram que a casca de café possui alto conteúdo em carboidratos (35–85%), fibras solúveis (30,8%), minerais (3–11%) e proteínas (5–11%), sendo também rica de fitoquímicos como taninos (5–9%) e cianidinas (20%) constituintes importantes para as indústrias alimentícia.

Diante de estudos já realizados com cascas de café, suas aplicações mais recentes incluem, produção de biocombustível (WOLDESENBET et al., 2016; SANTOS et al., 2018), fermentação para obtenção de compostos aromáticos (BONILLA-HERMOSA et al., 2014), adsorvente de corantes (CHERUIYOT et al., 2019; MURTHY et al., 2019), fibras alimentares (BALLESTEROS, TEXEIRA e MUSSATTO, 2014) e extração de constituintes bioativos (MURTHY e NAIDU, 2012b; RAMÓN-GONÇALVES et al., 2019). No entanto, em formulação de alimentos não são encontrados relatos de sua aplicação.

Considerando a sua composição química e as aplicações apresentadas, a casca de café tem um grande potencial como ingrediente alimentar e como fonte natural de nutrientes e constituintes bioativos. Assim, informações sobre os parâmetros físico-químicos, nutricionais e características funcionais de produtos e subprodutos agroindustriais constituem-se em

ferramentas importante de qualidade, pois contribui para o interesse de consumo e desenvolvimento de novos produtos.

2.2. Constituintes bioativos: constituintes fenólicos e alcaloides e suas presenças em casca de café e chocolate

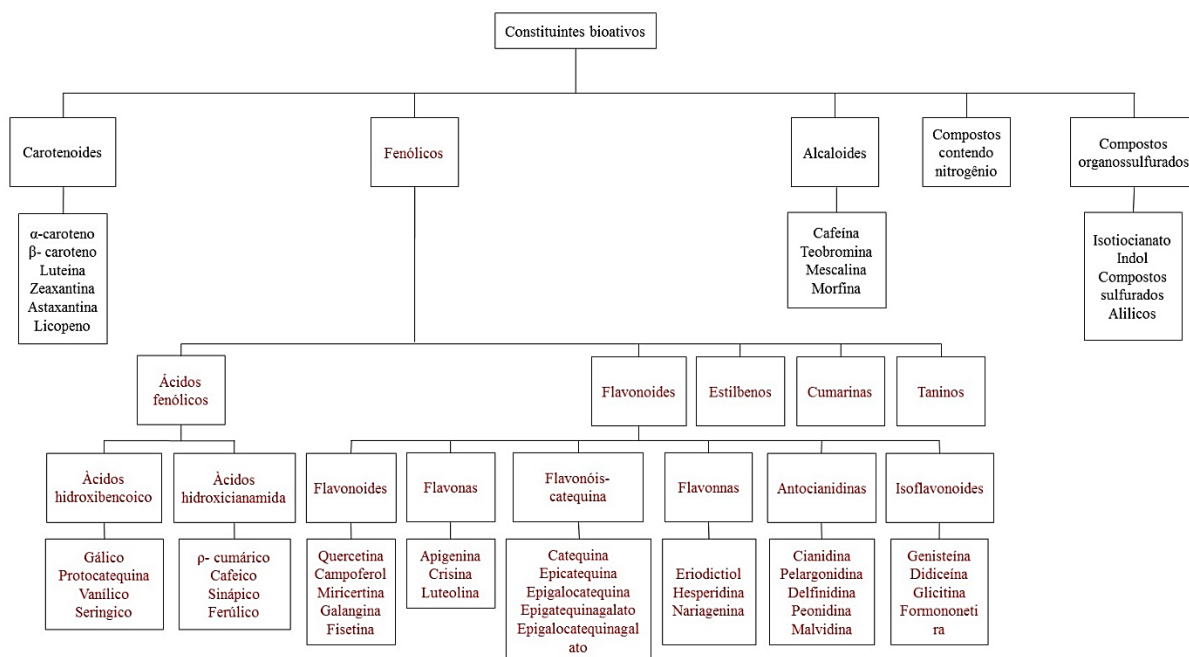
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define como substância bioativa os nutrientes ou não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica (BRASIL, 2002). Além disso, devem estar presentes em fontes alimentares, podendo ser de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança da sua ingestão. Os constituintes bioativos de origem natural são os metabólicos secundários, presentes em várias partes da planta, tais como folhas, caules, flores e frutas e que podem atuar como pigmentos que dão a aparência colorida aos vegetais ou apresentar funções de defesa das plantas contra agressões do ambiente tais como radiação ultravioleta, insetos, fungos e bactérias (SIMÕES et al., 2017). Esses produtos podem ser classificados em: carotenóides, fitoesteróis, flavonóides, fosfolipídios, organosulfurados e polifenóis (COSTA, NEUZA e ROSA, 2010; AZMIR et al., 2013; SIMÕES et al., 2017).

Compostos bioativos provenientes da dieta podem trazer benefícios a saúde por apresentarem ação antioxidante, sendo capaz de reverter quadros de estresse oxidativo em patologias, além de possuírem ação contra agentes microbianos (CASTRO et al., 2018; GRZESIK et al., 2018). Isso tem atraído a atenção da comunidade científica e da indústria alimentícia para o desenvolvimento dos “alimentos funcionais” ou alimentos ricos em um ou mais compostos bioativos que apresentam efeitos positivos na saúde (VIJAYALAXMI, JAYALAKSHMI e SREERAMULU, 2015; RUI et al., 2017).

A biossíntese dos constituintes bioativos podem sofrer variações de acordo com a interações de processos bioquímicos como, grau de amadurecimento, espécie, fatores ambientais, colheita, armazenamento, entre outros, que acabam por alterar a quantidade final, variando para mais ou menos a sua concentração final (HERRERO et al., 2012; MONTEBELLO et al., 2014).

Os constituintes fenólicos são os que representam a maior categoria dos constituintes bioativos como pode ser observado na Figura 3. São geralmente encontrados na forma natural em vegetais, frutas e chás, onde são responsáveis pela cor dos alimentos, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (KHODDAMI, WILKES e ROBERTS, 2013).

Figura 3. Classificação dos constituintes bioativos.

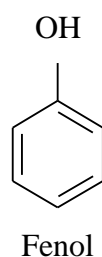


Fonte: Adaptado de LIU, 2013.

2.2.1. Constituintes fenólicos

Estruturalmente, os constituintes fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático e um ou mais grupos hidroxila (Figura 4) (SIMÕES et al., 2017). Além disso, podem ocorrer na forma livre ou conjugada a açúcares, ácidos e outras biomoléculas, sendo divididos em dois grandes grupos: flavonoides e ácidos fenólicos (VERRUCK, PRUDENCIO e SILVEIRA 2018).

Figura 4. Fórmula estrutura representativa de um fenol.



Os constituintes fenólicos são incluídos na categoria de inibidores de radicais livres (WANG et al., 2015) e é devido a essa capacidade que são reconhecidos como importantes antioxidantes (HELENO et al., 2015; ROLEIRA et al., 2015; SKROVANKOVA et al., 2015).

A eficácia dos antioxidantes fenólicos, depende do número e da posição dos grupos hidroxila ligados ao anel aromático, do tipo de substituintes e do seu local de ligação, da posição relativa dos grupos ligados e da sua habilidade para estabilizar e deslocalizar elétrons desemparelhados no anel aromático (GIADA, 2013).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^+ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio e reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (KYNGMI e EBELER, 2008).

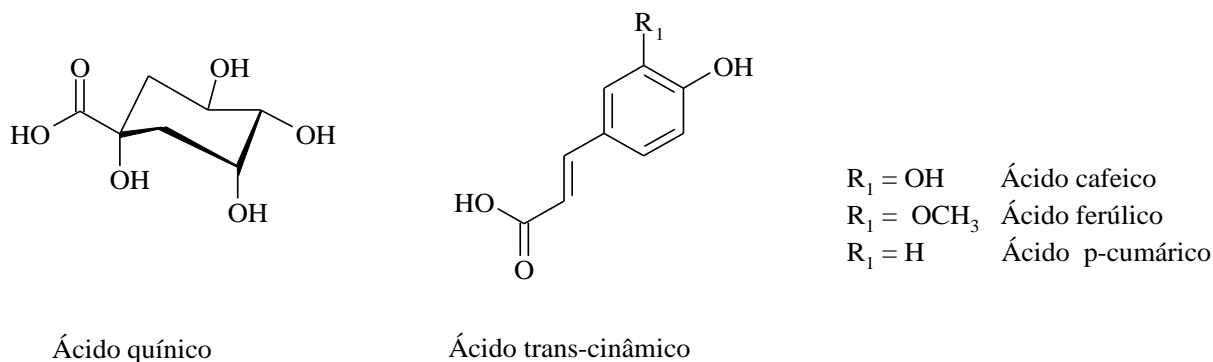
Os antioxidantes vegetais são de naturezas muito variadas, mas os constituintes fenólicos têm sido apontados como responsáveis pela maior parte de compostos com essa capacidade (FONSECA et al., 2009, REBELO et al., 2009). O consumo de produtos com elevada capacidade antioxidante, são importantes pois, radicais livres produzidos normalmente por meio da respiração são combatidos por componentes antioxidantes, porém quando a quantidade de radicais livres gerada no organismo é maior do que dos antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo das células, que consiste na geração de espécies reativas de oxigênio como radical hidroxila, ânion radical superóxido e hidroperoxila, responsáveis pelo envelhecimento, doenças degenerativas, disfunções cerebrais e por causar danos ao DNA (SALAR et al., 2016). Assim, dietas ricas em fitoquímicos, tais como os carotenoides e os constituintes fenólicos, provenientes de plantas com potencial ação terapêutica, têm sido estudadas e conseqüentemente associadas a um risco reduzido de doenças, tais como certas formas de cancro, inflamação, problema cardiovascular, cataratas, degeneração macular e doenças neurodegenerativas (SNYDER et al., 2011; TANAKA et al., 2012).

A capacidade antioxidante do café está associada principalmente pela presença de cafeína, trigonelina, ácido cafeico, ácido clorogênico, produtos da reação de Maillard e de compostos voláteis (furanos e pirróis). Portanto, os compostos fenólicos, além de contribuir para a formação do sabor e aroma característicos das bebidas como café, são conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante. Entre os principais componentes fenólicos presentes no café, e conseqüentemente na casca de café, está o ácido clorogênico (ACG), que é considerado o mais importante e o que se apresenta em maior quantidade, representando cerca de 6-12% em massa do grão. As cascas, embora em menor concentração quando comparada aos grãos, também são

ricas em ácido clorogênico, cafeína e taninos (CALVO, TELLO e VIGUEIRA, 2011; BAQUETA et al., 2017).

O ácido clorogênico (ACG) é classificado como ácidos fenólicos, uma subclasse dos compostos fenólicos ou polifenólicos. São formados pela reação de esterificação entre um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico (ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico ou sináptico) e o ácido quínico (GAUTHIER et al., 2016). A Figura 5 apresenta as estruturas químicas dos ácidos que dão origem aos ACG (GARAMBONE, 2007). O ácido clorogênico mais comum é o ácido 5-o-cafeoilquínico (5-ACG ou ácido clorogênico). No entanto, muitos outros isômeros estruturais estão presentes em plantas, tais como o ácido 3-o-cafeoilquínico (ácido 3-ACG ou ácido neoclorogênico) e ácido 4-o-cafeoilquínico (ácido 4-ACG ou ácido criptoclorogênico) (UPADHYAY, RAMALAKSHMI e RAO, 2012).

Figura 5. Fórmulas estruturas do ácido quínico e derivados do ácido trans-cinâmico.



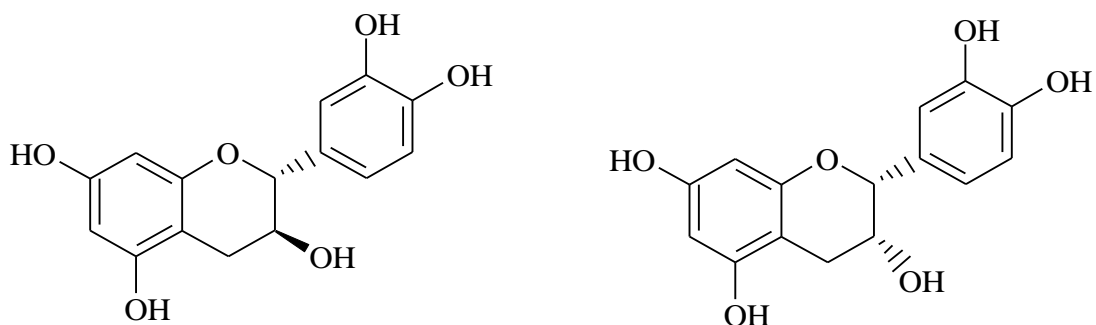
O ACG é utilizado como aditivo em bebidas, cosméticos e produtos à base de extrato, como alimentos e medicamentos. Este é facilmente solubilizado em água quente, devendo assim, está presente na bebida (MARIA e MOREIRA, 2004). Na casca de café o percentual de sua composição é de aproximadamente 2,5%. Além de conferir benefícios a saúde, também é responsável pela pigmentação e adstringência à bebida do café (FARAH e DONANGELO, 2006; DUARTE, PEREIRA e FARAH, 2010).

O cacau e seus produtos derivados também são considerados fontes ricas de polifenóis, em particular flavanóis, também conhecidos como flavan-3-ols ou catequinas. Os flavanóis fazem parte das mais de 4000 substâncias identificadas pertencentes ao grupo dos flavonoides, grupo que pode se apresentar de diversas formas, como por exemplo, flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (PEREIRA e CARDOSO, 2012; TODOROVIC et al., 2015).

Os três tipos de flavonoides que predominam nas sementes de cacau são proantocianinas, catequinas ou flavan-3-ols e antocianinas (URBANSKA e KOWALSKA,

2019). Porém, o cacau é particularmente rico em catequinas, elas incluem principalmente os monoméricos (-) epicatequina e (+) catequina (Figura 6). A epicatequina é a fração predominante equivalente a 35% do teor total de polifenóis (ELLINGER e STEHLE, 2016; LALIČIĆPETRONIJEVIĆ et al., 2016).

Figura 6. Formula estrutura da (+) catequina e (-) epicatequina



O conteúdo e a composição dos polifenóis diferem dependendo do genótipo, origem, condições de crescimento, grau de maturação do cacau e parâmetros de processamento de sementes (KOTHE, ZIMMERMANN e GALENSA, 2013; YELEWICZ, 2016).

Os polifenóis modelam não apenas propriedades antioxidantes, mas também afetam propriedades sensoriais, como cor e sabor (DABAS, 2016; GIACOMETTI, JOLIĆ e JOSIĆ, 2014). Durante todas as etapas do processamento, os polifenóis presentes nas sementes de cacau podem sofrer muitas transformações, incluindo polimerização, hidrólise ou reações com proteínas (ZYZELEWICZ et al., 2018). As altas temperaturas e a desidratação das sementes de cacau no processo de torrefação reduzem a concentração de polifenóis e muitos ácidos voláteis, especialmente o ácido acético, responsável pela acidez do produto, além do sabor amargo e adstringente (RAMLI et al., 2006).

As sementes de cacau que são apenas fermentadas e secas (não torradas, chamadas de "cruas") durante o processo de produção contêm muito mais compostos fenólicos, que podem ter um efeito positivo na saúde humana (ZYZELEWICZ et al., 2018). Omitir o processo de torrefação e não usar altas temperaturas durante a produção de chocolates crus resulta na incapacidade de evaporar muitos componentes voláteis do grão, incluindo ácido acético, além de aumentar a acidez de tais sementes.

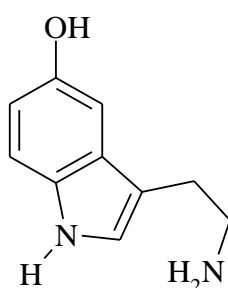
Os flavonoides também têm sido associados a resultados benéficos à saúde humana, por isso sua quantificação em espécies vegetais é tão importante. Alguns estudos epidemiológicos revelaram que seu consumo elevado ajuda a proteger contra doenças crônicas, como as

cardiovasculares, e que têm ação antioxidantes, anti-inflamatória e antitrombogênica (SIMÕES, 2017).

2.2.2. Alcaloides: xantinas

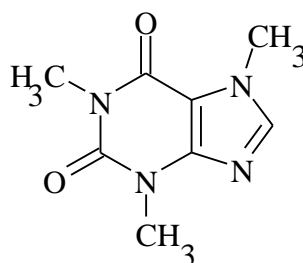
Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel (Figura 7). Na sua grande maioria os alcaloides possuem caráter alcalino, já que a presença do átomo de N representa um par de elétrons não compartilhados. Contudo, existem alcaloides de caráter ácido, como por exemplo a colchicina.

Figura 7. Fórmula estrutural do alcaloide serotonina



A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (Figura 8) é um alcaloide do grupo das xantinas que se encontra presente tanto no cacau e em seus derivados, quanto no café em proporções menores que o polifenol ácido clorogênico, aproximadamente 1%, apresenta atividades biológicas importantes, como atividade antioxidante, antimicrobiana e estimulante (ANDRADE et al., 2012). Portanto, é um insumo bastante empregado em indústrias de bebidas e farmacêuticas.

Figura 8. Fórmula estrutural da cafeína.



Cafeína

A cafeína pode ser detectada em vários tipos de alimentos e bebidas que consumimos cotidianamente, sendo maioritária no café. Relativamente ao café, a biossíntese da cafeína

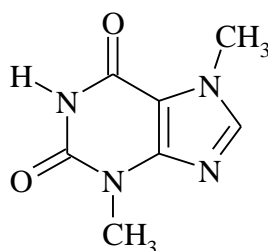
ocorre nas folhas e no pericarpo (parte externa do fruto), embora inicialmente o teor seja baixo. Nos tecidos do pericarpo, a luz estimula fortemente a etapa de metilação da síntese de cafeína. Quando a semente dentro do fruto começa a crescer, o alcaloide é translocado através das membranas e acumula-se no endosperma. Aqui, a concentração final é alcançada 8 meses após a floração (OESTREICH-JANZEN, 2013).

Devido às suas propriedades estimulantes sobre os sistemas nervoso e cardíaco, a cafeína é a metilxantina mais conhecida e estudada (MONTEIRO et al., 2016). O composto está presente nos grãos de café verde, em concentrações variando de 0,9 a 1,3 %, na espécie Arábica e de 1,5 e 2,5 %, na Robusta. Devido à estabilidade térmica, suas concentrações permanecem constantes, mesmo após o processo de torra dos grãos (LUDWIG et al., 2014). Estudos têm demonstrado a eficiência da cafeína em captar radicais hidroxila e metoxila, o que poderia explicar a atividade antioxidante do composto (LEÓN-CARMONA e GLANO, 2012).

Assim como a casca de café, o cacau e seus derivados (pó de cacau, licor de cacau e chocolate) também são fontes de metilxantinas (teobromina e cafeína) que garantem um papel importante na preservação da saúde humana (BARIŠIĆ et al., 2019).

A teobromina (3,7- dimetilxantina) (Figura 9) é o principal alcalóide do cacau (2% a 3%), a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) também é encontrada, porém apenas em pequenas quantidades (0,2%) (FRANCO, ONATIBIA-ASTIBIA e MARTINEZ-PINILLA, 2013). Chocolate amargo contém entre 5 a 7 mg de teobromina. g⁻¹ e entre 0,625 a 0,875 mg de cafeína.g⁻¹, enquanto o chocolate ao leite contém cerca de 1 mg de teobromina.g⁻¹ e 0,056 mg de cafeína.g⁻¹ (FRANCO, ONATIBIA-ASTIBIA e MARTINEZ-PINILLA, 2013).

Figura 9. Fórmula estrutural da teobromina.



Porém, sabe-se que o processamento pós-colheita, como fermentação e torrefação, afetam as concentrações de polifenóis e metilxantinas e portanto, a atividade antioxidante das sementes de cacau, influenciando assim a qualidade funcional do produto final (ACULEY et al., 2010). Durante o processo de fermentação, a combinação de atividades enzimáticas endógenas e exógenas, juntamente com a difusão de metabólitos nos cotilédones, permite a polimerização de polifenóis, o que diminui sua solubilidade, reduzindo assim o amargor e a

adstringência das sementes e auxiliando na liberação de metilxantinas. Durante o processo de torrefação, condições como tempo e temperatura afetam a estabilidade fenólica e as características do sabor resultante (ORACZ, NEBESNY e ZYZELEWICZ, 2014).

2.3. Chocolate: definição, beneficiamento do cacau e etapas de produção

Chocolate é o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao L.*), massa (ou pasta ou liquor) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% (g. 100g⁻¹) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (BRASIL, 2005).

Os primeiros estágios da produção tradicional de chocolate são os processos de fermentação e secagem das sementes de cacau. A fermentação é essencial para obtenção de produtos de boa qualidade pois, durante este processo ocorrem reações bioquímicas complexas que envolve a ação microbiana na polpa de cacau gerando calor, e produzindo etanol, ácido acético e ácido lático que resultam na criação de um ambiente adequado para o desenvolvimento dos compostos precursores do sabor característico do chocolate (CRUZ et al., 2013; APROTOSOAIE, LUCA e MIRON, 2016). A diminuição do pH e o aumento da temperatura (45-50 °C) são responsáveis pela morte do gérmen, ou seja, elimina o poder de germinação da semente, à partir desse momento, passam e se denominar amêndoas (AFOAKWA, 2010; FARHAT et al., 2014).

Durante a fermentação ocorre também a redução da acidez, adstringência e amargor das sementes de cacau devido à oxidação dos compostos fenólicos, formando complexos com proteínas e peptídeos, traduzindo-se, entre outras, na transformação da cor púrpura a marrom dos cotilédones, com o aumento da concentração de ácido acético e oxidação das antocianinas (CRUZ, 2013). É também um passo fundamental na formação de açúcares redutores e aminoácidos, que são os precursores da reação de Maillard durante a torração (HUANG, BARRINGER, 2010; GARTI e WIDLAK, 2015).

Após a fermentação as amêndoas do cacau seguem para etapa de secagem que tem como principal objetivo interromper a fermentação e reduzir seu teor de umidade a fim de evitar a rancificação hidrolítica dos lipídios do cacau e proliferação de fungos, além do promover o escurecimento dos cotilédones, contribuindo com a formação dos precursores de sabor desejáveis de chocolate tornando-as mais estáveis ao armazenamento. Muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam durante a secagem, permitindo a redução do amargor, da adstringência e da acidez das amêndoas (BECKETT, 2009; SOUZA, 2013; GLICERINA et al., 2014).

Segundo Efraim et al. (2010) a secagem ao sol, em estruturas conhecidas como barcaças, permite a obtenção de produtos com melhor qualidade sensorial em relação à secagem realizada de forma artificial, em estufas. As sementes podem ser secas também em câmaras de secagem que são aquecidas pela queima de lenha, ou ainda em secadores de ar forçado. Com a secagem em câmaras as sementes podem adquirir sabor de fumaça, o que representa um problema de qualidade sensorial (GARTI e WIDLAK, 2015; AFOAKWA, 2016). O processo de secagem reduz a umidade das amêndoas de 60 para 7% (AFOAKWA, et al., 2008).

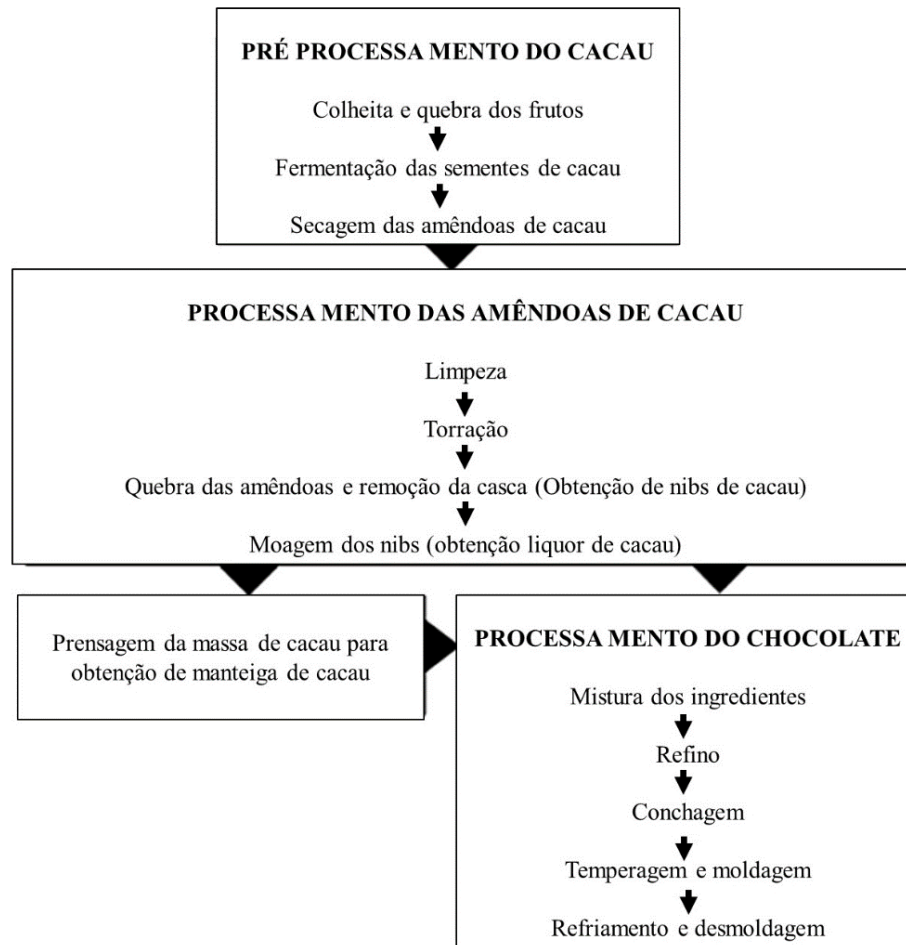
Após a fermentação e secagem, as amêndoas geralmente são transportadas dos produtores para fabricantes de chocolate. Os próximos passos são torra e moagem, então uma massa de chocolate é obtida (licor de cacau). Durante a torrefação das amêndoas de cacau, o sabor típico torrado e de chocolate são desenvolvidos, este sabor é o resultado de uma mistura complexa de um grande número de compostos combinados, incluindo pirazinas, aldeídos, éteres, tiazóis, fenóis, cetonas, alcoóis, furanos e ésteres, sendo assim impossível caracterizá-lo por um único componente. Esses compostos são formados através da reação de Maillard e degradação de Strecker de aminoácidos e açúcares (FRAUENDORFER, SCHIEBERLE, 2008; CASTRO-ALAYO et al., 2019).

As temperaturas de torrefação variam de 95 a 145°C, dependendo do processo, equipamento, tipos de nibs processados, e ainda o produto final desejado (ZZAMAN, BHAT e YANG, 2016; ZYZELEWICZ et al., 2016).

Após a torrefação, as amêndoas são descascadas e podem ser encaminhadas para dois processos, a moagem realizada para obtenção da massa de cacau, também conhecida como líquor, ou prensagem para a obtenção de manteiga e torta de cacau, sendo que esta última pode ser moída em moinho de pinos originando o cacau em pó natural (COHEN, JACKIX e SOUSA, 2004).

O chocolate é preparado a partir da massa cacau misturados a outros ingredientes básicos (açúcar, manteiga de cacau, leite em pó e lecitina de soja) e submetidos as etapas de refinamento, conchagem, temperagem e modelagem (Figura 10). A composição do chocolate varia em todo o mundo devido às diferenças culturais e de legislação em relação às concentrações de cacau e sólidos do leite e as quantidades e tipos de gorduras vegetais permitidas (CARNEIRO et al, 2011).

Figura 10. Fluxograma das etapas de fabricação do chocolate.



Fonte: Adaptado de Gutierrez, 2017.

A etapa de refino é realizada com o intuito de quebrar as partículas sólidas (açúcar, sólidos do leite e cacau) de modo que se tornem suficientemente pequenas para não serem percebidas na língua; em geral as partículas devem ser menores que 30 μm , idealmente entre 20-25 μm (BECKETT, 2009; BOHME et al., 2016). A etapa seguinte, denominada conchagem, é caracterizada pela agitação constante do chocolate por um longo período de tempo (acima de 6 horas), com o objetivo de diminuir a umidade dos ingredientes e compostos voláteis indesejáveis, formados na fermentação das sementes de cacau, entre eles o ácido acético, bem como desenvolver os aromas e sabores desejáveis originários da reação de Maillard (BECKETT, 2009). Essa etapa ainda é importante para promover a homogeneização dos ingredientes.

Por fim, e não menos importante, realiza-se a temperagem do chocolate. Tal etapa está relacionada essencialmente a uma cristalização controlada, onde por meio de tratamentos térmicos e mecânicos, é produzida uma quantidade específica de cristais na forma mais estável

da manteiga de cacau que é a forma β pois, apresenta maior ponto de fusão e é formada por cristais largos com maior grau de compactação (CABALLERO, FINGLAS e TOLDRÁ, 2015).

Gorduras cristalizadas na forma β' são mais macias, fornecem boa aeração e possuem excelentes propriedades de cremosidade na elaboração de tortas e produtos de panificação (GILABERT-ESCRIVA et al., 2002). Os principais objetivos da etapa de temperagem são, permitir rápida solidificação do chocolate no molde, induzir um empacotamento adequado dos triglicerídeos e assim maior contração de volume, facilitando a desmoldagem. E ainda, é evitada a formação do *fat bloom* no resfriamento e armazenamento. Portanto, é obtido um produto final com boas características de brilho, textura e fusão (COHEN, LUCCAS e JACKI, 2004).

2.4. Principais ingredientes utilizados para produção de chocolate

Uma formulação de chocolate é basicamente formada por líquido/massa de cacau, manteiga de cacau, açúcar, emulsificante (geralmente lecitina de soja) e em alguns casos leite em pó (BECKTT et al., 2017). Carneiro et al. (2011) e Sandri et al. (2012) relatam que as formulações utilizadas para elaboração de chocolates são inúmeras e dependem de preferências regionais e culturais e de legislação de cada país em relação às concentrações de cacau e sólidos do leite e as quantidades e tipos de gorduras vegetais permitidas.

Normalmente, as grandes indústrias mantêm em sigilo os detalhes que garantem a diferenciação dos seus produtos, pois a composição do chocolate desempenha um papel importante durante o processamento. As diferentes interações que ocorrem entre os ingredientes determinam a microestrutura final do produto que influencia as propriedades de fusão e cristalização e a formação de fat Bloom (FERNANDES, MÜLLER e SANDOVAL, 2013).

2.4.1. Massa de cacau

De acordo com a Anvisa (BRASIL, 2005) a massa (ou pasta ou líquido) de cacau é o produto obtido das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) por processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos. É obtida após a etapa de moagem das amêndoas de cacau previamente torradas (AFOAKWA, 2014; CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2015).

A massa de cacau é o principal ingrediente responsável por conferir o sabor característico de um chocolate, a quantidade adicionada varia de acordo com o chocolate produzido sendo maior em chocolate amargo do que ao leite.

2.4.2. Manteiga de cacau

Outro ingrediente de extrema importância é a manteiga de cacau, obtida pela prensagem das amêndoas do cacau para retirada de parte da gordura. A manteiga de cacau é responsável pela textura agradável do chocolate resultante do derretimento na boca (AFOAKWA, 2010). Também é responsável por diversas características de qualidade do chocolate como dureza e quebra à temperatura ambiente (snap), rápida e completa fusão na boca, brilho, contração no molde e rápido desprendimento de sabor durante a degustação (MUÑOZ E GUTIRREZ, 2015). Assim, a cristalização das gorduras determina importantes propriedades dos alimentos, como a consistência e plasticidade durante as etapas de produção e estocagem (manteiga, margarina e chocolates); propriedades sensoriais, como sensação de fusão na boca; estabilidade física e aparência visual (SANTOS, MING e GONCALVES, 2014).

Na temperagem do chocolate o ponto de fusão das formas cristalinas da manteiga de cacau constitui um indicativo de sua estabilidade estrutural, portanto, é necessário cristalizar a manteiga de cacau na forma polimórfica mais estável (BECKETT, FOWLER e ZIEGLER, 2017). A forma γ , também conhecida como sub-alfa, é a menos estável e de menor ponto de fusão, formada quando a gordura é submetida a um rápido resfriamento até baixas temperaturas. As formas βV e βVI são as mais estáveis, sendo a βV a forma preferida na fabricação de chocolate, pois seu ponto de fusão é suficientemente elevado para que o sólido seja relativamente firme e brilhante à temperatura ambiente, mas baixo o suficiente para derreter na boca (GUTIERREZ e PÉREZ, 2015; BECKETT, FOWLER e ZIEGLER, 2017; MASUCHI BUSCATO et al., 2018). Ocorre de forma lenta e gradual, sob movimentação constante (FERREIRA et al., 2019).

2.4.3. Açúcar

O principal açúcar utilizado em formulações de chocolate é a sacarose, nas formulações de chocolates suas principais funções são conferir gosto doce e atuar como agente de corpo (AIDOO, 2014). Além disso, sofre o processo de caramelização, fundamental no chocolate ao leite, tendo uma grande influência no sabor final e sob determinadas condições, também pode ocorrer reação de Maillard na etapa de conchagem, acima de 40 °C (EFRAIM, ALVES e JARDIM, 2011).

O açúcar é um dos principais ingredientes adicionados ao chocolate pois, em uma formulação tradicional, sua concentração pode variar entre 30 e 50% (BELŠČAK-CVITANOVIĆ, 2015). Porém, diante da busca pela redução de açúcar em alimentos, associado

a melhor qualidade de vida, vários estudos tem sido realizados promovendo a substituição parcial ou total da sacarose adicionada em formulações de chocolate, tal substituição pode ser realizada com a utilização de fibras alimentares, como inulina (RESENDE et al., 2015), seiva de plantas (SAPUTRO et al., 2017) e segundo Belščak-Cvitanović et al. (2015) essa substituição pode ser realizada também por mel, xarope de plantas, açúcar de frutas e vegetais.

Sendo a sacarose responsável não apenas pelo sabor (doçura), mas também por outras características sensoriais muito importantes como a textura, sua substituição (parcial ou total) deve ser avaliada para que não sejam alteradas as características de qualidade do produto final (RICHTER, SILVA e LANNES, 2007).

2.4.4. Emulsificantes

O chocolate se comporta como uma fase contínua de lipídios e açúcar, contendo o grupo hidrofílico e o grupo hidrofóbico (portanto, não solúvel). Como a interação entre o grupo hidrofílico e a parte hidrofóbica não ocorre espontaneamente, o agente emulsificante torna-se o responsável por essa interação (CUNHA, QUAST e LUCCAS, 2010).

Emulsificantes têm sido muito utilizados para modificar as propriedades reológicas das massas de chocolates. Devido à sua estrutura molecular especial, estes ingredientes tensoativos diminuem a tensão interfacial e o atrito, entre as fases dispersa e contínua, facilitando a formação e estabilização da emulsão. Além da reologia, afetam um número de propriedades, tais como a sensibilidade à umidade e a temperatura (SCHANTZ, ROHM, 2005; RICHTER, LANNES, 2007).

Os emulsificantes são adicionados à massa de chocolate em concentrações que variam geralmente de 0,3 - 0,5%, com o objetivo de reduzir as forças interfaciais, resultando em maior fluidez da massa e aumentando a eficiência da conchagem (SCHANTZ e ROHM, 2005; BOHME et al., 2016). Assim, desempenha função importante na fabricação de chocolate, pois diminui a viscosidade e o limite de escoamento (RICHTER, LANNES, 2007; BECKETT, 2017).

A lecitina de soja é um dos emulsificantes que é comumente adicionado em chocolate. Sua adição reduz a quantidade de manteiga de cacau necessária para atingir a textura desejada. Assim, a adição de lecitina pode reduzir o custo da produção. Adição de lecitina em 0,3% reduz a viscosidade do chocolate e aumenta a tolerância à umidade. No entanto, o excesso de lecitina causa off-flavours e aumenta a viscosidade do chocolate (PRAWIRA, BARRINGER, 2009; AFOAKWA, 2007).

2.5. Adição de ingredientes não convencionais em chocolates

O chocolate é consumido em todo o mundo, em todos os segmentos da sociedade e por pessoas de todas as idades pois, é muito utilizado na elaboração de alimentos para adultos e crianças como bolos, biscoitos, pães, sorvetes, entre outros, e a quantidade de nutrientes presentes neste ingrediente tem grande importância nutricional (RICHTER e LANNES, 2007). Portanto, a popularidade deste alimento não está apenas associada ao seu potencial para despertar o prazer sensorial e emoções positivas (EL-KALYOUBI et al., 2011), como também por ser fonte de polifenóis bioativos, com potenciais benefícios para a saúde, incluindo a redução do risco de doença cardiovascular (HOOPER et al., 2012) e atividade prebiótica (TZOUNIS et al., 2011).

Os efeitos mais nobres do chocolate estão relacionados ao seu teor de flavonoides e tal constituinte fenólico acaba por estar mais presente em alimentos com maior conteúdo de cacau. Porém, apesar do alto teor de ocorrência natural de flavonoides no cacau, durante as etapas de produção do chocolate, principalmente fermentação e secagem, ocorre perdas significativas destes constituintes fenólicos (EFRAIM, ALVES e JARDIM, 2011).

Chocolates escuros com alto teor de cacau, produtos gourmet premium e produtos contendo outros constituintes bioativos adicionados intencionalmente são tendências no mercado mundial devido aos efeitos benéficos à saúde (AGIBERT e LANNES, 2018).

Assim, estudos vêm sendo realizados com intuito de agregar maior valor nutricional ao chocolate, enriquecendo seu conteúdo de fenólicos e até mesmo adicionar constituintes bioativos como no caso do chocolate branco. Estes compostos benéficos estão presentes de forma expressiva em matérias primas não convencionais como cascas de frutas e vegetais, os quais têm sido incorporados em diversos produtos alimentícios, visando além de aumentar a quantidade de compostos bioativos, atender ao interesse de consumidores que buscam produtos agradáveis, práticos e com elevado valor nutricional (SANDRI, BASTIANI e PIEMOLINI-BARRETO, 2012; BALDIN et al., 2016).

Foram comprovados em vários estudos que a utilização de materiais vegetais ricos em polifenóis, como folhas de framboesa (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2012), folhas de urtiga (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015), pericarpo de mangostão (SIM et al., 2016), amora (LONČAREVIĆ et al., 2018), amora preta (GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN et al., 2016), gengibre e canela (ALBAK e TEKIN 2014), sendo adicionados como material em pó seco, extrato ou na forma encapsulada trazem enriquecimento tanto nutricional quanto funcional a produtos alimentícios, exclusivamente chocolates os quais tais ingredientes foram adicionados.

A adição de folhas de chá verde e sakura ou açafão influenciou e modificou o perfil fenólico de amostras de chocolate, resultando em aumento da concentração fenólica. Desta forma, pode-se perceber a maximização do efeito benéfico de seu consumo devido aos efeitos positivos dos constituintes bioativos para a saúde. O açafão e chá verde foram adicionados por meio da redução na quantidade de açúcares e calorias introduzidas anteriormente ao chocolate (MARTINI, CONTE e TAGLIAZUCCHI, 2018).

Visando agregar constituintes bioativos em chocolate branco Loncarevic et al. (2018) adicionaram suco de amora-preta encapsulado ao chocolate objetivando investigar a influência de diferentes concentrações de polifenóis de amora-preta nas propriedades reológicas do chocolate e impacto nas suas propriedades físicas, características sensoriais e teor de polifenóis. Enquanto, Sim et al. (2016) realizaram adição do pericarpo em pó de mangostão (*Garcinia mangostana* Linn.) em quantidades graduadas (1%, 2% e 3% p/p) a chocolates escuros e verificaram que a adição do pericarpo do mangostão expandiu significativamente o perfil de constituintes bioativos.

2.6. Legislação e parâmetros de qualidade do chocolate

A resolução RDC n° 264, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a atual legislação que aprova o regulamento técnico para chocolate e produtos de cacau, porém ela só define o teor mínimo de sólidos de cacau que o produto deve ter para que seja considerado chocolate (BRASIL, 2005). Assim, a RDC n° 227, de 28 de agosto de 2003 que alterou a resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) n° 12, de 24 de julho de 1978, da ANVISA, apesar de revogada, ainda é utilizada para avaliar a qualidade de chocolates tanto nas discussões em artigos científicos quanto nas indústrias, pois é baseada no CODEX Alimentarius, legislação utilizada nos países da América Latina e nos Estados Unidos da América. Tal legislação define os padrões físico-químicos que o chocolate deve seguir como, umidade (máximo 3,0% p/p); Glicídios não redutores, em sacarose (máximo 68,0% p/p), Lipídios (mínimo 20,0% p/p) e resíduo mineral fixo (máximo 2,5% p/p) (BRASIL, 1978).

Além dos parâmetros físico-químicos, definidos pela legislação, outros parâmetros também são levados em consideração para avaliar a qualidade do chocolate. A textura e a aparência do produto tem sido cada vez mais valorizadas na definição de qualidade e na previsão de alterações que podem ocorrer e desvalorizar os chocolates (AFOAKWA et al., 2008).

A textura e a aparência do chocolate são atributos-chave na escolha e aceitabilidade do consumidor, embora o sabor seja frequentemente considerado importante na identificação do produto (STORTZ e MARANGONI, 2011). Por definição, sabor é o conjunto de percepções olfativas, táteis e cinestésicas que permitem ao consumidor identificar um alimento e estabelecer o grau de prazer ou aversão que ele traz (GURIÉRREZ, 2017).

O sabor final do chocolate refere-se às suas qualidades sensoriais e informações visuais que caracterizam objetos, incluindo brilho, cor, forma, rugosidade, textura da superfície, brilho e translucidez, que são resumidas em atributos de aparência. Como a demanda por chocolates derretidos e sólidos está aumentando nos mercados globais, entender os fatores que influenciam a textura e a aparência teria valor na previsão de mudanças na qualidade (AFOAKWA et al., 2008).

O estudo de propriedades físicas é fundamental para avaliar o comportamento do produto durante a produção, armazenamento e acondicionamento até o momento do consumo (AFOAKWA et al., 2009), pois ao controlar as propriedades físicas do chocolate (reologia, comportamento calorimétrico e parâmetros de textura) é possível garantir a viabilidade da produção industrial de produtos estáveis e de qualidade. E ao apresentar boa correlação com os testes sensoriais, a medição instrumental das características de textura também pode ser usada em estudos de rotina e avaliação de qualidade (AFOAKWA et al., 2009).

2.7. Textura instrumental

A textura é uma combinação da estrutura física do material e suas propriedades mecânicas e de superfície (OSTROWSKA-LIGEZA et al., 2019). A textura do chocolate é uma combinação de estruturas de empacotamento de triglicerídeos, propriedades microestruturais, partículas dispersas, distribuição de tamanho de partícula e teor de gordura sólida (NIGHTINGALE, LEE e ENGESETH, 2011).

Segundo Leite et al. (2013) e Konar et al. (2016), a textura do chocolate requer um comportamento específico, no qual o produto deve apresentar-se solidificado à temperatura ambiente (20-25 °C) e, à temperatura da boca (37 °C), deve fundir-se rapidamente, se tornando um fluido de viscosidade apropriada.

As propriedades de textura podem ser medidas por métodos sensoriais com provadores treinados/não treinados ou por métodos instrumentais (ARES, 2015). Os fatores tempo e alto custo, associados à análise sensorial motivaram o desenvolvimento e utilização dos ensaios mecânicos, que apresentam respostas válidas, em que é possível obter informações valiosas de

parâmetros importantes como firmeza, elasticidade, coesividade dentre outros, e, ainda podem ser correlacionadas com os dados da avaliação sensorial (CHEN, 2013).

A análise do perfil de textura (Texture profile analysis – TPA) de um produto é determinado através da simulação da mastigação por meio de um procedimento que realiza um ciclo duplo de compressão vertical em uma amostra, visando promover o monitoramento e registro das propriedades de textura da amostra através da determinação de curvas características (CHEN; OPARA, 2013).

Dentre os parâmetros avaliados no TPA encontram-se: dureza, elasticidade, coesividade, adesividade, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade (CHEN; OPARA, 2013).

A dureza pode ser classificada como a força máxima registrada no primeiro ciclo de compressão da amostra. A elasticidade refere-se à tendência que a amostra tem de recuperação do seu formato original após ser submetida a uma deformação. A coesividade descreve a razão entre o trabalho realizado no segundo ciclo em relação ao trabalho realizado no primeiro ciclo. A adesividade corresponde a uma força negativa devido ao trabalho necessário para superar a força de atração entre o alimento e a sonda. A fraturabilidade é registrada quando dois picos de força são identificados no primeiro ciclo de análise, sendo que a fratura corresponde ao primeiro. A gomosidade relaciona-se com a força necessária para desintegrar uma amostra semissólida, enquanto a mastigabilidade é o trabalho necessário para mastigar uma amostra sólida. A gomosidade relaciona a dureza e a coesividade, enquanto a mastigabilidade relaciona a gomosidade e a elasticidade (CHEN e OPARA, 2013).

2.8. Reologia

A reologia é o estudo da deformação e fluxo de materiais em resposta à ação de uma força aplicada (GONÇALVES e LANNES, 2010). A reologia em alimentos estuda as propriedades físicas que tratam das propriedades texturais da matéria-prima, produto intermediário, ingrediente e produto final. O conhecimento da reologia alimentar é fundamental e é útil conhecer o comportamento textural dos alimentos e seus padrões de mudança afetados pela microestrutura dos alimentos, que se comporta de maneira diferente sob diferentes processos químicos, físicos e outros para atingir o objetivo final (WANG, SHI e SHAH, 2019).

No chocolate é um dos atributos cruciais da qualidade, pois fornece uma indicação do comportamento do seu fluxo sob várias condições (HINNEH et al., 2019). As medidas reológicas da massa de chocolate predizem o comportamento de massa durante o

processamento, bem como a organização estrutural, as interações dentro do sistema e as propriedades sensoriais do produto final (PAJIN et al., 2013; ZARIC et al., 2016).

O chocolate fundido apresenta propriedades não-Newtonianas, cujas propriedades de fluxo; por exemplo, tensão inicial e viscosidade, são amplamente dependentes da composição e interações entre os constituintes do chocolate (HINNEH et al., 2019). Os fluidos não-Newtonianos podem ser subdivididos em dependentes do tempo: tixotrópicos e reopéticos; e independentes do tempo: pseudoplásticos ou shear thinning, dilatantes ou shear thickening e plásticos de Bingham (TADROS, 2010).

O chocolate, assim como acontece para muitos alimentos que se encontram, em alguma fase de seu processamento ou na sua forma final de comercialização, como suspensões ou emulsões, geralmente mostram variação da viscosidade com o tempo (fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo) (TONELLI, MURR e PARK, 2005). Se houver um aumento da viscosidade ao longo do tempo para uma mesma taxa de deformação chama-se o fluido de reopético (ou antitixotrópico); por outro lado se houver um decréscimo da propriedade com o tempo tem-se um fluido tixotrópico.

Os comportamentos mais comuns de fluidos não-Newtonianos independentes do tempo são do tipo pseudoplástico, ou seja, à temperatura constante e independente do tempo, a viscosidade é função da taxa de deformação, e a taxa de acréscimo na tensão de cisalhamento diminui com o aumento da taxa de deformação (AGIBERT e LANNES, 2018). Este comportamento é observado porque o fluido em repouso apresenta um estado desordenado, e quando submetido a uma tensão de cisalhamento suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada, assim quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação e menor será a viscosidade aparente (SAMPAIO, 2011).

Os modelos frequentemente utilizados para descrever o comportamento não-Newtoniano são: Ostwald-de-Waele (Lei da Potência), Herschel-Bulkley, Bingham e Casson. O modelo de Bingham foi o primeiro a ser usado para descrever o comportamento de fluxo de chocolates e, mais tarde, em 1973 o IOCCC (International Office for Cocoa, Chocolate and Confectionary) recomendou o uso do modelo de Casson como método padrão para determinar as propriedades reológicas do chocolate (LANNES, 1997; SAMPAIO, 2011). Portanto, é geralmente o mais utilizado para estudar o comportamento reológico das dispersões de chocolate.

A reologia de chocolate é geralmente quantificada durante a produção usando os dois parâmetros: tensão de inicial e viscosidade aparente. A tensão inicial é uma propriedade material que denota a transição entre comportamentos pseudo-sólidos e pseudo-líquidos – correlacionado a uma mínima tensão de cisalhamento na primeira evidência de fluxo – ou

transição de deformações elásticas para viscosas. A viscosidade plástica, por sua vez, determina as características de bombeamento, preenchimento ou recobrimento de superfícies, além de características sensoriais da massa de chocolate. Portanto, a viscosidade da massa de chocolate está relacionada com o processo de fabricação, tamanho e distribuição das partículas.

A aceitação do consumidor pelo chocolate depende principalmente da aparência e sabor, mas também muito da sensação na boca, que depende principalmente do tamanho da partícula e da viscosidade da massa de chocolate derretida (BOLENZ, MANSKE e LANGER, 2014). Portanto, a reologia está relacionada com as características sensoriais do produto pois, os consumidores não gostam da sensação de boca arenosa quando consomem chocolate e preferem derretimento rápido (AFOAKWA et al., 2009; BOLENZ e MANSKE, 2013).

É sugerido que chocolates com alta viscosidade apresentam palatabilidade pastosa, maior tempo para derretimento, e sugere-se que isso está relacionado com a distribuição do tamanho de partículas, composição e processamento (DICOLLA et al., 2019).

2.9. Avaliação Sensorial

As características sensoriais, como o sabor, aroma, textura e cor dos produtos de chocolate são os principais critérios para determinar a aceitabilidade pelo consumidor. Produtos de chocolate com características de qualidade desejadas são amplamente consumidos por pessoas de todas as idades em todo o mundo (TOKER et al., 2018).

Chocolates escuros são suspensões de sacarose e partículas de cacau, revestidas em fosfolipídios em uma fase adiposa contínua, geralmente manteiga de cacau, com conteúdo sólido total de 65% a 75%. O caráter sensorial central do chocolate é uma composição lipídica de fase contínua (principalmente manteiga de cacau), que influencia as propriedades de fusão e o caráter da sensação na boca (APROTOSOAIE, LUCA e MIRON, 2016).

O aroma e sabor de chocolate não existe naturalmente nas sementes de cacau, ele é o resultado de um processo tecnológico aplicado nestas sementes que se inicia com a fermentação pós-colheita e continua através da secagem, torrefação e concha. Os processos de fermentação e torrefação são considerados como os mais importantes para a formação de compostos aromáticos (HUANG e BARRINGER, 2010; APROTOSOAIE, LUCA e MIRON, 2016).

Dentre as técnicas que vem sendo mais utilizadas para coletar informações relacionadas a percepção dos consumidores sobre as características sensoriais dos produtos está a metodologia Check-All-That-Apply (CATA), pois permite aos consumidores escolher todos os atributos possíveis para descrever o produto, a partir de uma lista apresentada (ALCANTARA e FREITRAS-SÁ, 2018). Os termos desta lista podem ser gerados por um painel de avaliadores

treinados ou por um grupo de consumidores, ao testar o produto (por exemplo, em um grupo focal) (DOOLEY, LEE e MEULLENET, 2010). Além disso, os descritores não são limitados aos atributos sensoriais do produto, mas também podem estar relacionados ao uso do produto ou ao conceito em que se encaixam. Como as respostas CATA estão diretamente ligadas à percepção dos consumidores em relação as características do produto, essas respostas podem ser utilizadas como dados suplementares, para maximizar a aceitação dos produtos (ALCANTARA e FREITRAS-SÁ, 2018).

Pesquisas anteriores mostram que as respostas sensoriais obtidas a partir das perguntas do CATA são mais confiáveis e podem ser comparadas com as respostas obtidas por painelistas treinados (ARES e JAEGER, 2015). Além disso, afirma-se que as perguntas do CATA podem produzir dados detalhados, discriminatórios e confiáveis, fáceis de serem utilizados pelos consumidores (JAEGER et al., 2017). O método CATA permite que os entrevistados escolham apenas características apropriadas a eles, em vez de serem forçados a avaliar em uma determinada escala (MEYNER, CASTURA e CARR, 2013).

Referências

- ACULEY, P. C.; SNITKJAER, P.; OWUSU, M.; BASSOMPIERE, M.; TAKRAMA, J.; NORGAARD, L.; NIELSEN, D. S. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 300-307, 2010.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Fator influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 290-298, 2007.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 840-857, 2008.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and technology**. Oxford: wiley-Blackwell, 2010, p. 1-51.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2016.
- AGIBERT, S. A. C.; LANNES, S. C. S. Dark chocolate with a high oleic peanut oil microcapsule content. **Journal Science Food Agriculture**, v. 98, p. 5591-5597, 2018.
- AIDOO, R. P.; AFOAKWA, E. O.; DEWETTINCK, K. Optimization of Inulin and Polydextrose mixtures as sucrose replacers during sugar-free chocolate manufacture – Rheological, microstructure and physical quality characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 226, p. 1259-1268, 2014.

- ALBAK, F.; TEKIN, A.R. The effect of addition of ingredients on physical properties of dark chocolate during conching. **Journal of Food Science and Technology**, v. 1, p. 51-59, 2014.
- ALCANTARA, M.; FREITAS-SA, D. G. C. Metodologias sensoriais descritivas mais rápidas e versáteis – uma atualidade na ciência sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. e2016179, 2018.
- ANDRADE, K. S.; GONÇALVEZ, R. T.; MARASCHINB, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544-552, 2012.
- ANDRADE, M. A.; AZEVEDO, C. S.; MOTTA, F. N.; SANTOS, M. L.; SILVA, C. L.; SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 444, 2016.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in food: a brief review. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, p. 1-9, 2007.
- APROTOSOAIE, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products - An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 73-91, 2016.
- ARES G.; JAEGER, S. Examination of sensory product characterization bias when check-allthat-apply (CATA) questions are used concurrently with hedonic assessments. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 40, p. 199-208, 2015.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.
- BALDIN, J. C.; MICHELIN, E. C.; POLIZER, Y. J.; RODRIGUES, I.; DE GODOY, S. H.; FREGONESI, R. P.; PIRES, M. A.; CARVALHO, L. T.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; DE LIMA, C. G.; FERNANDES, A. M.; TRINDADE, M. A. Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. **Meat Science**, v. 118, p. 15-21, 2016.
- BALLESTEROS, L.; TEIXEIRA, J.; MUSSATTO, S. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3493-3503, 2014.
- BAQUETA, M. R.; SILVA, J. T. P.; MOREIRA, T. F. M.; CANESIN, E. A.; GONÇALVES, O. H.; SANTOS, A. R.; COQUEIRO, A.; JUNIOR, B. D.; LEIMANN, F. V. Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal casca de café. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, p. 68-89, 2017.
- BARIŠIĆ, V.; KOPJAR, M.; JOZINOVIC, A.; FLANJAK, I.; ACKAR, D.; MILICEVIC, B.; ŠUBARIC, D.; JOKIC, S.; BABIC, J. The Chemistry behind Chocolate Production. **Molecules**, v. 24, 2019.

BECKETT S. 2009. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4th ed. Oxford, Oxfordshire (OXF), UK.: Blackwell Publishing Ltda.

BECKETT, S. T. **The Science of Chocolate**: 2. ed. RSC Publishing. 2008.

BECKETT, S. T.; FOWLER, M. S.; ZIEGLER, G. R. **Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 5th ed.; Wiley Blackwell: West Sussex, UK, 2017.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; BENKOVIĆ, M.; KARLOVIĆ, S.; HEČIMOVIĆ, I.; JEŽEK, D.; BAUMAN, I. Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties, **Food Research International**, v. 48, p. 820-830, 2012.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; DUJMOVIĆ, M.; KARLOVIĆ, S.; BIŠKIĆ, M.; BRNČIĆ, M.; JEŽEK, D. Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. **Food Chemistry**. v. 15, p. 61-70, 2015.

BLINOVÁ, L.; SIROTIK, M.; BARTOŠOVÁ, A.; SOLDÁN, M. Faculty of materials science and technology in trnava review: utilization of waste from coffee production. **Resumarch Pumapers**, v. 25, p. 91-101, 2017.

BOHME, B.; SYMMANK, C.; ROHM, H. Physical and sensory properties of chocolate made with lecithin of different origin. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1839-1845, 2016.

BOLENZ, S.; MANSKE, A.; LANGER, M. Improvement of process parameters and evaluation of milk chocolates made by the new coarse conching process. **Eur Food Res Technology**, v. 238, p. 863-874, 2014.

BONILLA-HERMOSA, V. A.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 142-150, 2014.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Resolução número 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de julho de 1978. Seção I, parte 1, p. 11499-11527. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, Reativas a Alimentos (e Bebidas). Corrigidas pelo Comunicado número 37/80 da Divisão Nacional de Normas e Vigilância Sanitária de Alimentos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – anvisa. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chocolate e Chocolate Branco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2005.

BRAVO, J.; JUÁNIZ, I.; MONENTE, C.; CAEMMERER, B.; KROH, L. W.; DE, PAZ. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of

- hydrophilic bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12565-12573, 2012.
- CABALLERO, B.; FINGLAS, P.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Waltham: Academic Press, 2015.
- CALVO, L.; TELLO, J.; VIGUERA, M. Extraction of caffeine from robusta coffee (*Coffea canephora* var. *Robusta*) husks using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 59, p. 53-60, 2011.
- CAMPOS-VEGA, R.; LOARCA-PIÑA, G.; VERGARA-CASTAÑEDA, H. A.; OOMAH, B. D. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 24-36, 2015.
- CARNEIRO, A. P. G.; FONTELES, T. V.; COSTA, M. G. M.; ROCHA, E. M. F. F.; RODRIGUES, M. C. P. Parâmetros de textura em barras de chocolate ao leite. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 259-264, 2011.
- CASTRO, A. C. C. M.; ODA, F. B.; ALMEIDA-CINCOTTO, M. G. J.; DAVANÇO, M. G.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; CICARELLI, R. M. B.; PECCININI, R. G.; ZOCCOLO, G. J.; RIBEIRO, P. R. V.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B.; SANTOS, A. G. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48-57, 2018.
- CASTRO-ALAYO, E. M.; IDROGO-VÁSQUEZ, G.; SICHE, R.; CARDENAS-TORO, F. P. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. **Heliyon**, v. 5, p. 1157, 2019.
- CHEN, L.; OPARA, U. L. Texture measurement approaches in fresh and processed foods - A review. **Food Research International**, v. 51, p. 823-835, 2013.
- CHERUIYOT, G. K.; WANYONYI, W. C.; KIPLIMO, J. J.; MAINA, E. N. Adsorption of toxic crystal violet dye using coffee husks: Equilibrium, kinetics and thermodynamics study. **Scientific African**, v. 5, p. 01-16, 2019.
- COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M. N. H. Revisão: Temperagem ou pré-cristalização do chocolate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, p. 23-30, 2004.
- COSTA, NEUZA M.B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais - Componentes bioativos e feitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.
- CRUZ, J. F. M. et al. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 5218-5225. 2013.
- CUNHA, K.M.; QUAST, L. B.; LUCCAS, V. Influência da adição de lecitina de soja e do poliglicerol poliricinolato nas propriedades reológicas do chocolate. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, p. 321-330, 2010.
- DABAS, D. Review: Polyphenols as colorants. **Advances in food technology and nutritional sciences**, v. 2, 1-6, 2016.

DEL CASTILLO, M. D.; FERNANDEZ-GOMEZ, B.; MARTINEZ-SAEZ, N.; IRIONDO-DEHOND, A.; MESA, M. D. (2018). **Coffee by-products**. In A. Farah (Ed.). *Coffee: Chemistry, quality and health implications*. Oxfordshire: Royal Society of Chemistry.

DEL CASTILLO, M. D.; IRIONDO-DEHOND, A.; FERNANDEZ-GOMEZ, B.; MARTINEZ-SAEZ, N.; REBOLLO-HERNANZ, M.; MARTÍN-CABREJAS, M. A.; FARAH, A. Coffee Antioxidants in Chronic Diseases. A. Farah (Ed.), *Coffee: Consumption and Health Implications*, **Royal Society of Chemistry**, p. 20-56, 2019.

DICOLLA, C. B.; EVANS, J. L.; HAINLY, L. .; CELTRUDA, S. C.; BROWN, B. D.; ANANTHESWARAN, R. C. Descriptive sensory analysis of heat-resistant milk chocolates. **Food Science e Nutrition**, v.7, p. 2806-2816, 2019.

DOOLEY, L.; LEE, Y. S.; MEULLENET, J. F. The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. **Food Quality and Preference**, v. 21, p. 394-401, 2010.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v. 118, p. 851-855, 2010.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. Review: Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p.181-201. 2011.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 142-150, 2010.

EL-KALYOUBI, M.; KHALLAF, M. F.; ABDELRAHMAN, A.; MOSTAFA, E. M. Quality characteristics of chocolate – Containing some fat replacer. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, p. 89-96, 2011.

ELLINGER, S.; STEHLE, P. Impact of Cocoa Consumption on Inflammation Processes - A Critical Review of Randomized Controlled Trials. **Nutrients**, v. 8, p.321, 2016.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. Functional properties of coffee and coffee byproducts. **Food Research International**, v. 46, p. 488-495, 2012.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, p. 26-36, 2006.

FARAH, D. M. H; ZAIBUNNISA, A. H.; MISNAWI, J.; ZAINAL, S. Effect of Roasting Process on the Concentration of Acrylamide and Pyridines in Roasted Cocoa Beans from Different Origins. **APCBEE Procedia**, v. 4, p. 204-208, 2012.

FARHAT, G.; DRUMMOND, S.; FYFE, L.; AL-DUJAILI, E. A. Dark chocolate: An obesity paradox or a culprit for weight gain?. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 791-797, 2014.

FERNANDES, V. A.; MÜLLER, A. J.; SANDOVAL, A. J. Thermal, structural and rheological characteristics of dark chocolate with diferente compositions. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 97-108, 2013.

FERREIRA, D. N. S.; LOPES, V. C.; LOPES, V. C. S.; PEREIRA, I. L.; GÓES, A. O. S. Process of Temperagem Cocoa Butter: analyzes, concepts and synergies in a multinational company. **Brazilian Journals of Business**, v. 1, n. 3, p. 1207-1217, 2019.

FONSECA, A. M.; BIZERRA, A. M. C.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDELL, G. A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 193-198, 2009.

FRANCO, R.; ONATIBIA-ASTIBIA, A.; MARTINEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. **Nutrients**, v. 5, p. 4159-73, 2013.

FRAUENDORFER, F.; SCHIEBERLE, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10244-10251, 2008.

GARAMBONE, R. E. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 229-235, 2007.

GARCÍA, R. P.; DEL BIANCHI, V. L. Effect of fungal fermentation in phenolics content in robusta coffee husk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 777-786, 2015.

GARTI, N.; WIDLAK, N.R. **Cocoa Butter and Related Compounds**. Elsevier, 2015.

GAUTHIER, L.; BONNIN-VERDAL, M. N.; MARCHEGAY, G.; PINSON-GADAIS, L.; DUCOS, C.; F. RICHARD-FORGET, F.; ATANASOVA-PENICHON, V. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: new insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. **International Journal Food Microbiology**, v. 221, p. 61-68, 2016.

GIACOMETTI, J.; JOLIĆ, S. M.; JOSIĆ, D. **Processamento de cacau e impacto na composição. Em Processamento e Impacto em Componentes Ativos em Alimentos**; Elsevier Inc.: Amsterdã, Holanda, 2014; p. 605-612.

GIADA, M. L. R. “**Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power**”, in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, J. A. Morales-González, Ed. Rijeka: InTech, cap. 4, 2013.

GILABERT-ESCRIVA, M. V. L.; GONÇALVES, A. G.; SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian *Theobroma* Amazonian species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1425-1431, 2002.

GLICERINA, V.; BALESTRA, F.; ROSA, M. D.; BERGENHSTÅL, B.; TORNBERG, E.; ROMANI, S. The Influence of Different Processing Stages on Particle Size, Microstructure, and Appearance of Dark Chocolate. **Journal of Food Science**, v. 79, p.1359-1365, 2014.

GONÇALVES, E. V.; LANNES, S. C. S. Chocolate rheology. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 845-851, 2010.

GOUVEA, B.; TORRES, C.; FRANCA, A.; OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA E. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnol. Lett.**, v. 31, p. 1315-1319, 2009.

GRZESIK, M.; NAPARŁO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, p. 480-492, 2018.

GULTEKIN-OZGUVEN, M.; KARADAG, A.; DUMAN, S.; OZKAL, B.; OZÇELIK, B. fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and biocessability studies. **Food Chemistry**, v. 201, p. 205-212, 2016.

GUTIÉRREZ, T.; PÉREZ, E. Cocoa post harvest, and in its manufacture. **Food Science and Tecnology**, v. 1, p. 1-47, 2015.

GUTIÉRREZ, T. J. State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 1313-1344, 2017.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

HERRERO, M.; PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. **Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food**. Institute of Food Science Research (CIALCSIC), Madrid, Spain, 2012. Elsevier Inc. All rights reserved.

HINNEH, M.; WALLE, D. V.; HAECK, J.; ABOTSI, E. E.; WINNE, A.; SAPUTRO, A. D.; MESSENS, K.; DURME, J. V.; AFOAKWA, E. O.; COOMAN, L.; DEWETTINCK, K. Aplicabilidade do melanger para refino de chocolate e misturador Stephan para conchagem como técnicas alternativas de produção de chocolate em pequena escala. **Journal of Food Engineering**, v. 253, p. 59-71, 2019.

HOOPER, L.; KAY, C.; ABDELHAMID, A.; KROON, P. A.; COHN, J. S.; RIMM, E. B.; CASSIDY, A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. **The American journal of clinical nutrition**, v. 95, p. 740-751, 2012.

HUANG, Y.; BARRINGER, S. A. Alkylpyrazines and Other Volatiles in Cocoa Liquors at pH 5 to 8, by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**, v. 75, 2010.

JAEGER, S. R.; FISZMAN, S.; REIS, F.; CHHEANG, S. L.; KAM, K.; PINEAU, B.; DELIZA, R.; ARES, G. Influence of evoked contexts on hedonic product discrimination and sensory characterizations using CATA questions. **Food Quality and Preference**, v. 56, p. 138-148, 2017.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KONAR, N.; TOKER, O. S.; OBA, S.; SAGDIC, O. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 35-44, 2016.

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

KYNGMI, M. S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 96-104, 2008.

LALIČIĆ-PETRONIJEVIĆ, J.; KOMES, D.; GORJANOVIĆ, S.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; PEZO, L.; PASTOR, F.; OSTOJIĆ, S.; POPOV-RALJIĆ, J.; SUŽNJEVIĆET D. Effect of Chocolate Storage on Total Phenolics, Flavan-3-Ols, Proanthocyanidins, Oxidative Stability and Antioxidant Capacity. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, p.13-20, 2016.

LEITE, P. B.; LANNES, S. C. S.; RODRIGUES, A. M.; SOARES, F. A. S. M.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Rheological study of chocolates made with different cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 192, 2013.

LEÓN-CARMONA, J. R.; GALANO, A. Free radical scavenging activity of caffeine's metabolites. **International Journal of Quantum Chemistry**. 2012, v. 112, p. 3472-3478, 2012.

LIU, R. H. Health- Promoting Componentes of fruits vegetables in the Diet. **Advances in nutritions: an internacional review jornal**, v. 4, p. 384-392, 2013.

LONČAREVIĆ, I.; PAJIN, B.; FIŠTEŠ, A.; ŠAPONJAC, V. T.; PETROVIĆ, J.; JOVANOVIĆ, P.; VULIĆ, J.; ZARIĆ, D. Enrichment of white chocolate with blackberry juice encapsulate: Impact on physical properties, sensory characteristics and polyphenol content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 458-464, 2018.

LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; LEAN, M. E. J.; ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food & Function**, v. 5, p. 1695-1717, 2014.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, p. 586-592, 2004.

MARTINI, S.; CONTE, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Comprehensive evaluation of phenolic profile in dark chocolate and dark chocolate enriched with Sakura green tea leaves or turmeric poder. **Food Research International**, v. 112, p. 1-16, 2018.

MASUCHI BUSCATO, H. M.; HARA, L. M.; BONOMI, E. C.; CALLIGARIS, G. A.; CARDOSO, L. P.; GRIMALDI, R.; KIECKBUSCH, T. G. Delaying fat bloom formation in dark chocolate by adding sorbitan monostearate or cocoa butter stearin. **Food Chemistry**, v. 256, p. 390-396, 2018.

MEYNNERS, M.; CASTURA, J. C.; CARR, T. Existing and new approaches for the analysis of CATA data. **Food Quality and Preference**, v. 30, p. 309-319, 2013.

MONTEBELLO, N. P.; ARAÚJO, W. M. C.; BOTELHO, R. B. A. **Alquimia dos Alimentos**. v. 2, 3. ed. Brasília: Senac Distrito Federal, 2014.

MONTEIRO, J. P.; ALVES, M. G.; OLIVEIRA, P. F.; SILVA, B. M. Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. **Molecules**, v. 21, p. 974-1005, 2016.

MORAIS-FERREIRA, J. M.; AZEVEDO, B. M.; SILVA, F. G. D.; LUCCAS, V.; BOLINI, H. M. A. Isosweetness concentrations of sucrose and high-intensity sweeteners and antioxidant activity in white chocolate with functional properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 2114-2122, 2016.

MUÑOZ, Y. G.; GUTIÉRREZ, T. Evaluation of the sensory quality of chocolate. **Food Science and Tecnology**, v.1, p. 167-201, 2015.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 897-903, 2012a.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. Resources, **Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45-58, 2012b.

MURTHY, T. P. K.; GOWRISHANKAR, B. S.; PRABHA, M. N. C.; KRUTHI, M.; KRISHNA, R. H. Studies on batch adsorptive removal of malachite green from synthetic wastewater using acid treated coffee husk: Equilibrium, kinetics and thermodynamic studies. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 192-201, 2019.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; JOSÉ, A.; TEIXEIRA, J. A. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 661-672, 2011.

NEVES, J. V. G.; BORGES, M. V.; SILVA, D. M.; LEITE, C. X. S.; SANTOS, M. R. C.; LIMA, N. G. B.; LANNES, S. C. S.; SILVA, M. V. Total phenolic content and primary antioxidant capacity of aqueous extracts of coffee husk: chemical evaluation and beverage development. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 348-353, 2019.

NIGHTINGALE, L.; LEE, S. Y.; ENGESETH, N. Impacto do armazenamento em chocolate amargo: textura e polimorfismo. **Journal Food Science**, v. 76, p. 142-153, 2011.

OESTREICH-JANZEN, S. **Chemistry of Coffee**, March 2013. Elsevier Inc., 2013.

OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 283-291, 2014.

ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ZYZELEWICZ, D. Effect of roasting conditions on the fat, tocopherol, and phytosterol content and antioxidant capacity of the lipid fraction from cocoa beans of diferente Theobroma cacao L. cultivars. **European Journal of Lipid Science and Tecnology**, v. 116, p. 1002-1014, 2014.

OSTROWSKA-LIGEZA, E.; MARZEC, A.; GÓRSKA, A.; WIRKOWSKA-WOJDYŁA, M.; BRYŚ, J.; REJCH, A.; CZARKOWSKA, K. A comparative study of thermal and textural properties of milk, white and dark chocolates. **Thermochemica Acta**, v. 671, p. 60-69, 2019.

PAJIN, B.; DOKIĆ, J. L.; ZARIĆ, D.; ŠORONJA-SIMOVIĆ, D.; LONČAREVIĆ, L.; NIKOLIĆ, L. Crystallization and rheological properties of soya milk chocolate produced in a ball mil. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 70-74, 2013.

PEREIRA, L. L.; RIBEIRO, A. C. **O perfil da organização produtiva dos cafeicultores das microrregiões Serranas e Caparaó do Espírito Santo**. 1 ed, 2015, p. 174. Editora Appris.

- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, p. 146-52, 2012.
- RAMLI, N.; HASSAN, O.; SAID, M.; SAMSUDIN, W.; IDRIS, N.A. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, p. 280–298, 2006.
- RAMÓN-GONÇALVES, M.; GÓMEZ-MEJÍA, E.; ROSALES-CONRADO, N.; LEÓN-GONZÁLEZ, M. E.; MADRI, Y. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. **Waste management**, v. 96, p. 15-24, 2019.
- REBELO, M. M.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 230-235, 2009.
- REZENDE, N. V.; BENASSI, M. T.; VISSOTTO, F. Z.; AUGUSTO, P. P. C.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of fat replacement and fibre addition on the texture, sensory acceptance and structure of sucrose-free chocolate. **International journal of Food Science & Technology**, v. 50, p. 1413-1420, 2015.
- RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 357-369, 2007.
- ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. D. S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.
- ROJO-JIMENEZ, E. Café I (*G. Coffea*). **Reduca**, v. 7, p. 113-132, 2014.
- ROLEIRA, F.M.F.; TAVARES-DA-SILVA, E.J.; VARELA, C.L.; COSTA, S.C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary antioxidants: anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.
- RUI, L.; XIE, M.; HU, B.; ZHOU, L.; SAEEDUDDIN, M.; ZENG X. Enhanced solubility and antioxidant activity of chlorogenic acid-chitosan conjugates due to the conjugation of chitosan with chlorogenic acid. **Carbohydr Polym**, v. 170, p. 206-216, 2017.
- SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; BHATTI, M. S. Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with *Aspergillus awamori* MTCC-548. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, p. 148-157, 2016.
- SANDRI, I. G.; BASTIANI, S.; PIEMOLINI-BARRETO, L. T. Chocolate branco adicionado de cogumelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, p.203-209, 2012.
- SANTOS, L. C.; ADARME, O. F. H.; BAÊTA, B. E. L.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 601-612, 2018.

- SANTOS, C. A.; MING, C. C.; GONÇALVES, L. A. G. Emulsificantes: atuação como modificadores do processo de cristalização de gorduras. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 567-574, 2014.
- SAPUTRO, A. D.; VAN DE WALLE, D.; AIDOO, R. P.; MENSAH, M. A.; DELBAERE, C.; CLERCQ, N.; DURME, J. V.; DEWETTINCK, K. Quality attributes of dark chocolates formulated with palm sap-based sugar as nutritious and natural alternative sweetener. **European Food Research and Technology**, v. 243, p. 177–191, 2017.
- SCHANTZ, B.; ROHM, H. Influence of lecithin-PGPR blends on the rheological properties of chocolate. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 42-45, 2005.
- SIM, S. Y. J.; FORDE, C. G.; HENRY, C. J. Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. **Food Chemistry**, v. 200, p. 46-54, 2016.
- SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 848.
- SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 24673 – 24706, 2015.
- SNYDER, S. M.; REBER, J. D.; FREEMAN, B. L.; ORGAD, K.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Controlling for sugar and ascorbic acid, a mixture of flavonoids matching navel oranges significantly increases human postprandial serum antioxidant capacity. **Nutrition Research**, v. 31, p. 519-526, 2011.
- SOUZA, J.; HADLICH, D. P. F.; MAAHS, T. R. Automação da produção de chocolates em escala não industrial. **Revista Liberato**, v. 14, p. 113-238, 2013.
- STORTZ, T. A.; MARANGONI, A. G. Heat resistant chocolate. **Trends Food Science Technology**, v. 22, p. 201–214, 2011.
- TADROS, T. F. **Rheology of Dispersions: Principles and Applications**. Weinheim: WILEY-VCH, 2010.
- TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, p. 3202-3242, 2012.
- TODOROVIC, V.; REDOVNIKOVIC, I. R.; TODOROVIC, Z.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M.; SOBAJIC, S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 137-143, 2015.
- TOKER, O. S.; KONAR, N.; PIROUZIAN, H. R.; OBA, S.; POLAT, D. G.; PALABIYIK, I.; POYRAZOGLU, E. S.; SAGDIC, O. Developing functional white chocolate by incorporating different forms of EPA and DHA-Effects on product quality. **LWT-Food Science and Technology**, v. 87, p. 177-185, 2018.
- TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Review estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.7, p.181-204, 2005.

TZOUNIS, X.; RODRIGUEZMATEOS, A.; VULEVIC, J.; GIBSON, G. R.; KWIKURIBE, C. Spencer avaliação prébiótica de flavanols derivados do cacau em humanos saudáveis, usando um duplocego controlado, randomizado, de intervenção de crossover. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 62-72, 2011.

ULSIDO, M. D.; ZELEKE, G.; LI, M. Biogas Potential Assessment From a Coffee Husk: an Option for Solid Waste Management in Gidabo Watershed of Ethiopia. **15th International Scientific Conference on Engineering for Rural Development**, p. 1348-1354, 2016.

UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. "Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans". **Food Chemistry**, v. 130, p. 184188, 2012.

URBAŃSKA B.; KOWALSKA J. Comparison of the Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Chocolate Obtained from Roasted and Unroasted Cocoa Beans from Different Regions of the World. **Antioxidants (Basel)**, v. 8, p. 283, 2019.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S.; SILVEIRA, S. M. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. **Revista CSBEA**, v. 4, n. 1, 2018.

VIJAYALAXMI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2761-2769, 2015.

WANG, Q.; SHI, A.; SHAH, F. Rheology instruments for food quality evaluation. **Evaluation Technologies for Food Quality**, p. 465-490, 2019.

WANG, X.; LI, C.; LIANG, D.; ZOU, Y.; LI, P.; MA, F. Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1086-94, 2015.

WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J. D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1156-1162, 2010.

WOLDESENBET, A. G.; WOLDEYES, B.; CHANDRAVANSI, B. S. Bio-ethanol production from wet coffee processing waste in Ethiopia. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1903, 2016.

YELEWICZ, D.; KRYSIAK, W.; ORACZ, J.; SOSNOWSKA, D.; BUDRYN, G.; NEBESNY, E. The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. **Food Research International**, v. 89, p. 918-929, 2016.

ZARIC, D.; BULATOVIĆ, M.; RAKIN, M.; KRUNIĆ, T.; LONČAREVIĆ, L.; PAJIN, B. Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball mill. **RSC Advances**, v. 6, p. 13934-13941, 2016.

ZYZELEWICZ, D.; BUDRYN, G.; ORACZ, J.; ANTOLAK, H.; KREGIEL, D.; KACZMARSKA, M. O efeito nos componentes bioativos e nas características do chocolate pela funcionalização com grãos de cacau crus. **Food Research International**, v. 113, p. 234-244, 2018.

ŻYŻELEWICZ, D.; KRYSIAK, W.; ORACZ, J.; SOSNOWSKA, D.; BUDRYN, G.; NEBESNY, E. The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. **Food Research International**, v. 89, p. 918-929, 2016.

ZZAMAN, W.; BHAT, R.; YANG, T. A. Impact of convectional and superheated-steam roasting on the physicochemical and microstructural properties of cocoa butter extracted from cocoa beans. **Journal of Food Processing and Preservation**, Sylhet, 2016.

Capítulo II

Objetivos

1. Objetivos

1.1. Objetivo geral

Objetivou-se com o presente estudo obter e caracterizar a farinha oriunda de casca de café arábica orgânico (*Coffea arabica L.*) e promover sua aplicação em formulações de chocolates escuros, avaliando o seu impacto quanto a estabilidade física, propriedades bioativas e sensoriais.

1.2. Objetivos específicos

- Obtenção da casca de café e produção da farinha.
- Determinar a composição química e características física da farinha de casca de café e das formulações de chocolate escuro (0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%);
- Avaliar a qualidade da farinha de casca de café através do estudo de sua citotoxicidade;
- Produzir formulações de chocolate escuro com adição de farinha de casca de café;
- Avaliar a capacidade antioxidante da farinha de casca de café e das formulações de chocolate escuro;
- Avaliar os constituintes fenólicos totais na farinha de casca de café e das formulações de chocolate escuro;
- Determinar os ácidos fenólicos individuais presentes nas formulações de chocolate escuro por meio da CLAE;
- Avaliar textura instrumental das formulações de chocolate escuro;
- Avaliar as propriedades reológicas das formulações de chocolate escuro;
- Analisar o perfil sensorial dos chocolates por meio do *Check-All-That-Apply* (CATA) e verificar a aceitação e intenção de compra dos chocolates escuros.

Capítulo III

I Etapa

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTOXICIDADE E INVESTIGAÇÃO DE ANTINUTRIENTES EM FARINHA DE CASA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Resumo

O Brasil destaca-se como maior produtor e exportador mundial de café, associado a este fato, são geradas grandes quantidade de resíduos, em especial cascas. Assim, objetivou-se com o presente estudo, valiar a qualidade nutricional, constituintes fenólicos totais, capacidade antioxidante, investigação de antinutrientes e citotoxicidade em farinha de casca de café, visando a possibilidade de ampliar sua utilização como ingrediente em formulações alimentícias. Determinou-se as características físicas e químicas, investigação de antinutrientes, citotoxicidade, constituintes fenólicos totais e capacidade antioxidante (ABTS, poder redutor e oxidação acoplada ao β -caroteno e ácido linoleico). Ademais, constata-se que a casca de café é uma boa fonte de proteínas (5,79 mg. 100 g⁻¹), lipídeos (4,19 mg. 100 g⁻¹), carboidratos (23,63 mg. 100 g⁻¹) e minerais, destacando-se como fonte ferro, além de cálcio, potássio, magnésio, manganês e fósforo. Apresentando ainda, um expressivo teor de constituintes fenólicos (1.358,65 mg de EAG. 100 g⁻¹) e elevada capacidade antioxidante. Quanto aos teores de antinutrientes investigados, observou-se baixos teores de oxalatos (6,40 mg. 100g⁻¹), fitatos (4,43 mg. 100g⁻¹), saponinas (1,29 mg. 100g⁻¹) e taninos (7,61 mg. 100g⁻¹). Além de apresentar baixa atividade hemolítica (5,86%). Conclui-se que, cascas de café, surgem como uma alternativa sustentável e inovadora e sustentável para cadeia produtiva do café, possibilitando assim, sua utilização em formulações alimentícias, além de não apresentando risco a saúde humana.

Palavras-chave: Fitoquímicos bioativos, antioxidantes, fenólicos, hemólise, fator antinutricional, subproduto.

1. Introdução

O desperdício de alimentos no âmbito mundial ocorre de modo crescente, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estimou que cerca de 1,3 bilhões de toneladas de alimentos são desperdiçados no planeta a cada ano, calcula-se que esses alimentos seriam suficientes para alimentar dois bilhões de pessoas (FAO, 2019). Embora não façam parte dos hábitos de grande parte da população, muitos alimentos podem ser utilizados de forma integral, diminuindo assim a geração de resíduos e aumentando o valor nutricional na preparação de alimentos, visto que estes podem ser mais nutritivos que as partes nobres (polpa) geralmente utilizadas (SANCHO et al., 2015).

Na cadeia de produtos agrícolas, o café se destaca com elevada produção. A safra mundial de café em 2018/19 foi de aproximadamente 167 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, sendo o Brasil o maior produtor mundial do fruto, correspondendo a um terço da produção mundial (CONAB, 2018; IOC, 2019). Durante o processamento do café, geralmente realizado por via seca, onde os grãos secos são descascados removendo pele, polpa, mucilagem e pergaminho, todos juntos em uma única fração, obtendo desta forma, a casca, principal resíduo gerado nest etapa (MURTHY e NAIDU, 2012; OLIVEIRA e FRANCA, 2014). Estima-se que 0,18 tonelada de casca seja gerada por cada tonelada de café colhido (CHERUIYOT et al., 2019).

Frente a grande quantidade de casca de café gerada, pesquisas têm sido realizadas para avaliar sua composição, visando torná-las matérias-primas passíveis de exploração industrial. Muitos delas revelaram a presença de constituintes bioativos de grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica, tais como os constituintes fenólicos (ácido clorogênico) e metilxantinas (cafeína) (WANG et al., 2010; ROCKENBACH et al., 2011; NEVES et al., 2019).

Basicamente, a casca de café é constituída por quantidades consideráveis de fibras, açúcares, lipídeos, cinzas, proteína, taninos e cafeína. Murthy e Naidu (2012) reportaram em seus estudos que os resíduos de café (polpa, casca, tegumento e borra) são ricos em nutrientes e compostos orgânicos como cafeína, taninos e polifenóis, e que seus extratos podem apresentar boa atividade antioxidante. Del Castillo et al. (2019) e Esquivel e Jiménez (2012) determinaram que a casca de café possui alto conteúdo em carboidratos (35–85%), fibras solúveis (30,8%), minerais (3–11%) e proteínas (5–11%), sendo também rica de fitoquímicos como taninos (5–9%) e cianidinas (20%), constituintes importantes para as indústrias alimentícias.

Portanto, considerando a riqueza de nutrientes e constituintes bioativos, vislumbra-se a aplicação de farinha de casca de café em formulações alimentícias, perspectiva até então, não explorada pela indústria alimentícia.

Assim, objetivou-se com o presente estudo, avaliar a qualidade nutricional, constituintes fenólicos totais, capacidade antioxidante, presença de antinutrientes e citotoxicidade em farinha de casca de café, visando sua utilização como ingrediente em formulações alimentícias, com alegações funcional e nutracêutico, ampliando assim, suas possibilidades de aplicações.

2. Material e Métodos

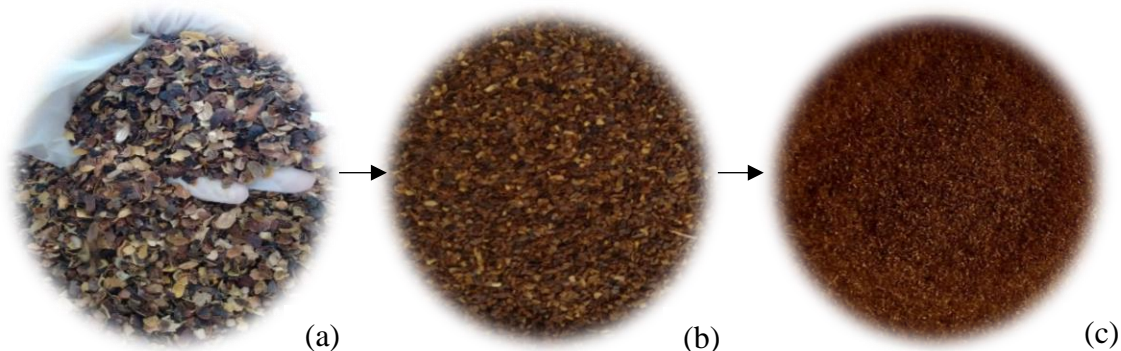
O experimento foi conduzido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Itapetinga-BA. As análises de caracterização química, física, constituintes fenólicos

totais, capacidade antioxidante, antinutrientes e citotoxicidade da farinha da casca de café foram realizadas no laboratório do Núcleo de Estudos em Ciências de Alimentos (NECAL). Na condução do experimento foram realizadas três repetições em replicatas, utilizadas em cada uma das análises.

2.1. Obtenção da casca de café e produção da farinha

Foram utilizadas cascas de café da espécie *Coffea arabica* L., produzidos com manejo orgânico na Fazenda Floresta - Povoado de Pau Ferrado, município de Ibicoara-BA, localizada na região da Chapada Diamantina, meridional 13°, 24', 50,7" latitude Sul e 41°, 17', 7,4" longitude oeste de Greenwich e altitude aproximada de 1.027 m acima do nível do mar. A precipitação mínima anual é de 1.179 mm e máxima anual de 1.868 mm, sendo o maior nível encontrado de outubro a março (FAZENDA FLORESTA, 2012). As cascas de café previamente secas, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey (Solab, SL-031, Brasil), peneiradas para redução da granulometria das partículas em 60 mm e obtenção da farinha (Figura 1).

Figura 1. Cascas de café secas (a) e trituradas no moinho de facas (b) e farinha de casca de café com granulometria de 60 mm (c).



Fonte: próprio autor

2.2. Caracterização nutricional da farinha da casca de café

2.2.1. Determinação de umidade

Determinou-se de acordo com a metodologia nº 984.25 da AOAC (2010), por secagem em estufa (Fanem, 315 SE, Brasil) a 105 ± 2 °C até peso constante em balança analítica (Aux220, Shimadzu, Japão), sendo utilizadas 5 g de amostra.

2.2.2. Determinação de cinzas

Quantificou-se através da calcinação de 5 g de amostra em mufla, (Marconi, Brasil) a 550 ± 2 °C até peso constate conforme o procedimento nº 925.51 proposto pela AOAC (2010).

2.2.3. Determinação de acidez titulável (AT)

Determinou-se por meio do método potenciométrico, utilizando-se 10 g da amostra previamente macerada em 100 mL de água destilada seguindo metodologia nº 942.15 descrita pela AOAC (2010).

2.2.4. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

As medidas do pH foram realizadas por potenciometria, conforme a metodologia nº 981.12 descrita pela AOAC (2010). As leituras foram realizadas diretamente em pHmetro digital (BEL W3B, Bel Engineering, Itália) previamente calibrado.

2.2.5. Determinação de proteínas totais

Determinou-se a concentração de nitrogênio total utilizando o método semi-micro Kjeldahl, segundo a metodologia nº 920.152 proposto pela AOAC (2010). O resultado foi multiplicado pelo fator de conversão (Fc) 5,75.

2.2.6. Determinação de lipídeos totais

Para extração da fração lipídica das amostras utilizou-se a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959). Foram pesados 3 g da farinha de casca de café. Os resultados foram expressos em $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

2.2.7. Determinação de açúcares totais, redutores e não redutores

Determinaram-se os açúcares redutores (AR) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). O método baseia-se na redução do DNS (cor amarelo), a um composto de coloração avermelhada, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, pela oxidação dos monossacarídeos redutores em meio alcalino.

A mistura reacional foi constituída de 1 mL da amostra e 1 mL do reagente DNS e seguido de agitação. Posteriormente, a mistura foi aquecida em banho-maria por 5 min para o desenvolvimento da cor. Após o resfriamento da mistura, adicionou-se 13 mL de água destilada e agitou-se para dissolução. Para quantificação dos AR foram geradas curvas analíticas de glicose nas concentrações variando de 25×10^{-6} a 20×10^{-4} mg. mL⁻¹, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 540 nm. Os coeficientes de determinação das curvas analíticas não foram inferiores a 0,9985. Para determinação de açúcares totais (ACT) utilizou-se o método adaptado por Matissek et al. (1998), nesta etapa açúcares não redutores (ANR) foram hidrolisados com HCl concentrado sob aquecimento. Posteriormente, a mistura foi neutralizada com NaOH (15 g. 100 mL⁻¹). A quantificação se procedeu de modo idêntico para os AR. Calculou-se os ANR pela diferença entre os teores de ART e AR. Os resultados foram expressos em mg de glicose.100 mL⁻¹.

2.2.8. Determinação da composição de minerais

O procedimento de decomposição ácida da casca de café consistiu na adição, em tubos de digestão, de 0,5 g de amostra e 3 mL de ácido nítrico concentrado deixando em capela de exaustão por 24 h. Após esse período, no interior da capela de exaustão, as amostras foram aquecidas em chapas aquecedoras até à fervura (≈ 150 °C). Após 30 min, foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio. Decorrida uma hora de digestão foram adicionados 3 mL de ácido nítrico, acrescidos de 2 mL de peróxido de hidrogênio. As amostras foram mantidas nessa condição até a formação de solução límpida, sem coloração amarela.

Após o resfriamento, as amostras digeridas foram transferidas para tubos falcon descontaminados e desmineralizados, e completado o volume para 12,5 mL com água deionizada. Os brancos analíticos constituíram-se da mesma mistura, ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, usada na digestão, sem a presença da amostra.

A determinação dos analitos foi realizada empregando-se o espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado, VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália) simultâneo com arranjo axial, com câmara de nebulização Sturman-Master e nebulizador V-Groove, equipado com detector de estado sólido com arranjo CCD (dispositivo de carga acoplada).

Argônio com 99,998% de pureza (White Martins, Brasil) foi utilizado como gás de arraste. Todas as determinações foram realizadas com três repetições expressas em miligramas de mineral correspondente por quilograma de amostra (mg.kg⁻¹). As condições operacionais do equipamento foram: radiofrequência do gerador de 40 MHz, potência do gerador de

radiofrequência 1,3 kW, tempo de integração do sinal de 1s, 15 L.min⁻¹ vazão do argônio principal, 1,5 L.min⁻¹ vazão do argônio auxiliar, 0,8 L.min⁻¹ vazão do argônio de nebulização, pressão de nebulização de 200 kPa, velocidade da bomba peristáltica de 2 mL.min⁻¹, detector CCD linha de emissão Bário (285,213 nm), Carbono (193,027 nm), Cálcio (422,673 nm), Cobre (324,754 nm), Ferro (238,204 nm), Potássio (766,491 nm), Magnésio (285,213 nm), Manganês (257,610 nm) e Sódio (588,995 nm).

2.3. Investigação de antinutrientes na farinha da casca de café

2.3.1. Determinação de Taninos condensados (TC) - Método do butanol acidificado

Determinou-se por meio do método butanol-ácido os taninos condensados seguindo metodologia recomendada por Porter et al. (1987). Esse método baseia-se na despolimerização oxidativa dos taninos condensados, catalisada por ácido, resultando em antocianidina. Os resultados foram expressos em mg de catequina.100g⁻¹ de farinha de casca de café.

2.3.2. Determinação de nitratos

Determinou-se conforme o procedimento proposto por Cataldo et al. (1975). O ensaio fundamenta-se na complexação do ácido salicílico pelo íon nitrato sendo as absorbâncias medidas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 410 nm. O nitrato foi extraído com água deionizada a 45 °C. A mistura reacional foi constituída de 0,25 mL do extrato e 0,8 mL de ácido salicílico 5% (v.v⁻¹) em H₂SO₄ concentrado. A mistura foi mantida em repouso por 20 min à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Posteriormente, o pH foi ajustado para 12 pela adição de 19 mL de NaOH 2N. Para quantificação do nitrato foram construídas curvas analíticas, utilizando como padrão analítico soluções de nitrato de potássio com diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em mg de nitrato. 100 g⁻¹ de farinha de casca de café.

2.3.3. Determinação de saponinas

As saponinas foram determinadas por meio do procedimento proposto por Vigo et al. (2003), utilizando cloreto de cobalto como reagente cromogênico em meio ácido. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 284 nm. Os resultados foram expressos em g de saponina. 100 g⁻¹ de farinha de casca de café.

2.3.4. Determinação de ácido oxálico (oxalato)

Determinou-se conforme o protocolo proposto por Loures e Jokl (1990). O ensaio fundamenta-se na extração do ácido oxálico sob aquecimento, na presença do ácido clorídrico, sendo precipitado e quantificado pela titulação do oxalato de cálcio com permanganato de potássio. Os resultados foram expressos em mg de oxalato. 100 g⁻¹ de amostra.

2.4. Investigação da Atividade Hemolítica da farinha da casca de café (citotoxicidade)

2.4.1. Obtenção de eritrócitos humano

Os eritrócitos foram obtidos a partir de coletas de sangue venoso de pessoas voluntárias sadias e não fumantes. Os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE: 64801417.5.0000.0056). As coletas foram realizadas por profissional habilitado do campus Juvino Oliveira, em Itapetinga, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

2.4.2. Preparo da solução de eritrócitos

A solução de eritrócitos foi preparada de acordo descrito por Gião et al. (2010), as amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 x g por 15 min, sendo desprezado o sobrenadante (plasma). A camada inferior, constituída de eritrócitos foi adicionada de tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4 a 10 mM, e posteriormente centrifugado a 1000 x g por 10 min. O sobrenadante foi removido e os eritrócitos foram lavados com PBS até o sobrenadante ficar transparente. Os eritrócitos foram reconstituídos com PBS de forma a obter uma solução a 10%.

2.4.3. Efeito sobre a hemólise

O ensaio foi conduzido de acordo o método proposto por Latoud (1986) com adaptações propostas por Zhen et al. (2015). A mistura reacional foi constituída de 1 mL da suspensão de eritrócitos, 1 mL da amostra e 2 mL do tampão fosfato salino. Para cada amostra preparou-se um tubo branco, onde a suspensão de eritrócitos foi substituída pelo tampão fosfato salino. Como controle positivo foi utilizada a suspensão de eritrócitos adicionada de água. Para o controle negativo utilizou-se a suspensão de eritrócitos e o tampão fosfato salino. As misturas

foram incubadas a 37 °C por 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de PBS (4 °C). Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 1000 x g por 10 min. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em % de hemólise de acordo a Equação 2.

$$\% \text{ Hemolise} = \left[\frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle negativo}})}{A_{\text{controle positivo}} - A_{\text{controle negativo}}} \right] - 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

A_{amostra} : absorvância da amostra;

$A_{\text{controle negativo}}$: absorvância do controle negativo;

$A_{\text{controle positivo}}$: absorvância do controle positivo.

2.5. Determinação dos constituintes fenólicos Totais (CFT) da farinha da casca de café

Determinaram-se os CFT de acordo com a ISO 14502-1: (2005), utilizando o reagente de Folin-Ciocauteau. O ensaio fundamenta-se na redução dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela), por agentes redutores (constituintes fenólicos), originando os chamados complexos molibdênio-tungstênio de coloração azul. Assim, a alteração na coloração permite determinar a concentração das substâncias redutoras.

Para quantificação utilizou-se uma curva analítica de ácido gálico nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,09 mg.mL⁻¹. Os coeficientes de determinação das curvas analíticas não foram inferiores a 0,9992. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG). 100 g⁻¹ de farinha de casca de café.

2.6. Determinação da capacidade antioxidante da farinha de casca de café

2.6.1. Método do radical 2,2' – azino – bis – 3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfônico (ABTS)

Determinou-se a capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+} de acordo com RE et al. (1999). Previamente o radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da mistura reacional da solução aquosa de ABTS a 7 mM em 2,45 mM de persulfato de potássio, mantendo-se a mistura ao abrigo da luz, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 16 horas. A solução radicalar foi diluída em etanol até se obter uma leitura de absorvância 0,7 ± 0,05 a 734 nm. O ensaio baseia-

se na redução do radical ABTS^{•+} de coloração azul-esverdeado, relativamente estável, por antioxidantes, resultando em um produto incolor oxidado ABTS.

As amostras com diferentes concentrações foram adicionadas à solução do ABTS^{•+} e após 6 min a absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão). Os resultados foram expressos em Concentração Efetiva média (CE₅₀), a partir da porcentagem de inibição do ABTS (Eq. 3). A partir da porcentagem de inibição do ABTS das diferentes concentrações dos extratos, foram construídos os gráficos de dispersão, plotando-se no eixo Y a porcentagem de inibição e no eixo X as concentrações dos extratos (mg.mL⁻¹). Para calcular o CE₅₀ utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de Y por 50 para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do radical ABTS.

$$\% \text{ de inibição ABTS} = \left(\frac{\text{Leitura}_{\text{ABTS0}} - \text{Leitura}_{\text{ABTSf}}}{\text{Leitura}_{\text{ABTS0}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 3)}$$

2.6.2. Inibição da oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico

Utilizou-se o sistema modelo do beta-caroteno e ácido linoleico, adotando o procedimento proposto por Marco (1968) modificado por Miller (1971). Este método utiliza o ácido linoléico, monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e o β -caroteno. Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico.

A mistura reacional foi constituída de 0,2 mL de amostra em diferentes concentrações e 5 mL de solução β -caroteno (1 mg de β -caroteno diluído em 10 mL de clorofórmio foi misturado a 20 mg de ácido linoléico e 200 mg do emulsificante Tween 20, após obtenção de uma solução homogênea, o clorofórmio foi removido da mistura, a 50 °C, em evaporador rotativo, em seguida adicionou-se 50 mL de água destilada sob vigorosa agitação. A mistura foi incubada a 50 °C durante 120 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 470 nm em intervalos de tempo de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em porcentagem de capacidade antioxidante (CA%).

2.6.3. Ensaio do poder redutor

O poder redutor das amostras foi determinado por meio da metodologia descrita por Oyaizu (1988). O ensaio fundamenta-se na capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe (III)/ ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, à forma ferrosa, Fe (II), em meio ácido para manter a solubilidade do ferro. Observando-se assim, a mudança da coloração amarela (Fe^{3+} /ferrocianeto) para tons de verde ou azul Fe (II).

A mistura reacional foi constituída de 1 mL de amostra e diferentes concentrações, 2,5 mL de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL da solução de ferricianeto de potássio na concentração de $1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. A mistura foi incubada a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Posteriormente, foi adicionado 2,5 mL da solução aquosa de ácido tricloroacético a $10 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, seguido de centrifugação a $1000 \times \text{g}$. Transferiu-se 2,5 mL dessa mistura para outros tubos de ensaio, e adicionou-se 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a $0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, e agitou-se. O tubo branco foi preparado nas mesmas condições, excetuando-se a amostra. A partir das absorbâncias das diferentes concentrações dos extratos, foram construídos os gráficos de dispersão, plotando-se no eixo Y as absorbâncias e no eixo X as concentrações dos extratos ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos em Concentração Efetiva média (CE_{50}). Para calcular o CE_{50} utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de Y por 50 para obter a concentração de extrato com capacidade de reduzir 50% do complexo Fe (III)/ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$. A absorbância foi lida em 700 nm.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização química e física de farinha de casca de café

Os valores médios da caracterização química e física da farinha da casca de café estão apresentados na Tabela 1. A farinha de casca de café apresentou umidade de $9,55 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, valor que se enquadra nos parâmetros definidos pela legislação, que estabelece teor máximo de umidade de 15% para farinhas obtidas de frutos e sementes (BRASIL, 2005b). Resultados de umidade dentro do padrão determinado pela legislação também foram observados por Durán et al. (2017) que em seu artigo de revisão sobre os aspectos gerais e aproveitamento do café para além da bebida, apresentou resultados de composição da casca de café como umidade (13-15%), cinzas (5,4-6,2%), proteínas (7-11%), lipídeos (0,3-2,0%), açúcar total (22,8-26,5%), entre outros.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão da caracterização química e física da farinha da casca de café.

Determinações	Médias \pm desvio (g.100g⁻¹)
Umidade	9,55 \pm 0,01
Cinzas	8,73 \pm 0,00
Proteínas	5,79 \pm 0,81
pH	4,72 \pm 0,02
AT (meq de NaOH. 100 g ⁻¹)	1,27 \pm 0,16
Lipídeos	4,19 \pm 0,95
Açúcar redutor	21,11 \pm 0,54
Açúcar não redutor	2,52 \pm 0,25
Açúcar total	23,63 \pm 0,02

Os resultados de cinzas (8,73 g.100g⁻¹) e açúcar total (23,63 g.100g⁻¹) encontrados no estudo em questão, também se apresentaram próximos aos observados por Durán et al. (2017). Porém o conteúdo de proteínas (5,79 g.100g⁻¹) ficou mais próximo aos resultados encontrados por Del Castillo et al., (2019) e Esquivel e Jiménez (2012) quem determinaram que a casca de café possui alto conteúdo em carboidratos (35–85%), fibras solúveis (30,8%), minerais (3–11%) e proteínas (5–11%).

Estas variações na composição da casca de café ocorrem normalmente, pois depende diretamente do tipo e eficiência de processamento do café, da variedade, da cultura, do clima e das condições de cultivo, como o tipo de solo (GARCÍA e DEL BIANCHI, 2015).

Os teores médios da composição de minerais, percentual de valor diário de ingestão (%VD) da farinha de casca de café e Ingestão Diária Recomendação (IDR), estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que a farinha da casca de café possui elevado conteúdo de cálcio, ferro, potássio, magnésio, manganês e fósforo, pois apresentaram elevado %VD.

A legislação define que um alimento precisa apresentar no mínimo 15% do %VD para que possa ser empregado em produtos ou preparações alimentícias como fonte de minerais e mínimo de 30% para ser considerado como rico (BRASIL, 2012). Assim, percebe-se que a farinha da casca de café só não se apresentou como fonte dos minerais cobre, sódio e zinco com resultados de 0,07%, 1,52% e 10,71%, respectivamente.

Tabela 2. Teores médios da composição de minerais, percentual de valor diário de ingestão (%VD) da farinha de casca de café e Ingestão Diária Recomendada (IDR).

Elemento	Teor médios ± desvio padrão (mg.100g⁻¹)	%VD	IDR (mg)
Bário	0,34 ± 0,01	-	-
Cálcio	241,24 ± 27,06	24,12%	1.000,00
Cobre	0,67 ± 0,01	0,07%	900,00
Ferro	30,48 ± 2,45	338,66-203,20%	9,00-15,00
Potássio	2.928,81 ± 56,12	83,68%	3.500,00
Magnésio	98,04 ± 9,67	37,70%	260,00
Manganês	0,72 ± 0,01	31,30%	2,30
Sódio	24,34 ± 2,10	1,52%	1.600,00
Fósforo	158,28 ± 15,20	22,61%	700,00
Zinco	0,75 ± 0,05	10,71%	7,00

Fonte: BRASIL, 2005a.

Os resultados obtidos de cálcio (24,12%) e magnésio (37,70%) presentes na casca de café ajudam na manutenção de um conjunto de atividades hormonais vitais ao organismo, pois a deficiência do cálcio pode provocar osteoporose em adultos e até raquitismo em crianças (SILVEIRA, 2017). Já a deficiência de magnésio pode promover interferência no metabolismo dos carboidratos (SALES et al., 2014).

É importante que os níveis de magnésio estejam adequados no organismo humano, para prevenção de diversas doenças, incluindo as cardiovasculares e sistêmicas. Inclusive, a baixa ingestão regular desse mineral foi associada à maior chance de desenvolvimento de depressão em adultos (TARLETON e LITTENBERG, 2015).

A quantidade de ferro presente em 100 g da farinha da casca de café apresentou %VD bem acima da IDR, dessa forma seriam necessárias quantidades menores que 50 g da farinha para atingir valores dentro do intervalo recomendado da IDR.

O ferro é um mineral essencial para os seres vivos, pois desempenha importantes funções no metabolismo humano (MILMAN, 2011). Esse metal é componente de citocromos, de moléculas ligantes de oxigênio (hemoglobina e mioglobina) e cofator de uma série de reações enzimáticas. O ferro participa de reações metabólicas essenciais tais como transporte e armazenamento de oxigênio, síntese de DNA e reações de liberação de energia na cadeia de transporte de elétrons (LIU et al., 2016).

O ferro provido da dieta constitui-se de dois tipos: o ferro heme e o ferro não heme. O primeiro é encontrado na hemoglobina e mioglobina, proveniente das carnes vermelhas, principalmente vísceras (fígado e miúdos), carne de aves, suínos, peixes e mariscos, enquanto o ferro inorgânico é obtido de cereais, hortaliças folhosas verde-escuras e leguminosas como o feijão e a lentilha (GROTTO, 2010).

O potássio se destacou entre os minerais avaliados, pois apresentou um %VD de 83,68%, o consumo de alimentos contendo esse mineral é muito importante, pois é regulador da atividade neuromuscular, como, por exemplo, a fadiga, fraqueza e câibras, e promoção do crescimento celular (MARQUES et al., 2010).

O fósforo também é um elemento essencial aos ossos, além dos dentes e sistema nervoso. Com o resultado de 22,61% a farinha da casca de café também se apresenta como fonte de fósforo.

Diante dos resultados obtidos de composição química e física, a farinha da casca de café se torna uma matéria-prima rica em nutrientes, pois apresenta elevado conteúdo de proteínas, lipídeos, carboidratos e minerais.

3.2. Investigação de antinutrientes e citotoxicidade da farinha da casca de café

Os componentes que se apresentam como antinutrientes são caracterizados por se ligar a vitaminas e minerais e impedir dessa forma sua absorção no organismo, além de se tornarem tóxicos quando consumidos em quantidades elevadas. Assim, os valores médios da composição de antinutrientes e a citotoxicidade por meio da capacidade hemolítica da farinha da casca de café estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação de antinutrientes e citotoxicidade em farinha da casca de café.

Antinutrientes	Médias ± desvio (mg.100g⁻¹)
Nitratos	4,43 ± 0,94
Oxalatos	6,40 ± 0,56
Saponinas	1,29 ± 0,05
Taninos condensados – butanol (mg.ml ⁻¹)	7,61 ± 0,70
Citotoxicidade	(%)
Hemólise	5,86 ± 0,31

A farinha da casca de café apresentou 4,43 mg de nitrato. 100 g⁻¹ de amostra. Resultado que pode ser considerado baixo quando comparado aos valores de ingestão diária aceitável

(IDA) para nitratos e nitritos preconizados pela legislação. A IDA para nitrito é de 0,06 (mg.kg.dia⁻¹)⁻¹ e para nitrato é de 3,7 (mg.kg.dia⁻¹)⁻¹, ressaltando que a IDA não deve ser aplicada às crianças menores de 3 meses de idade. Alimentos destinados às crianças com menos de 6 meses de idade não podem conter nitrito como aditivo (FAO, 1996).

Os nitratos interferem no metabolismo da vitamina A e nas funções da glândula tireoide, podendo sofrer redução a nitrito no organismo e, após absorvidos, originar cianoses devido à formação de metamioglobina, ou ainda, reagir com aminas secundárias e terciárias formando composto N-nitrosos, potencialmente carcinogênicos (LOPES, 2009).

Também pode-se observar baixos teores de oxalatos na farinha da casca de café (6,40 mg.100 g⁻¹ de amostra). O oxalato está presente em grande quantidade nos alimentos de origem vegetal, sendo o espinafre e a carambola (180-730 mg.100 g⁻¹) alimentos considerados com elevada quantidade de oxalatos, assim não são recomendados para pessoas com tendência a formação de cálculos renais e com outros problemas relacionados a estes tipos de sais, como artrite e reumatismo (MASSEY, 2007; MOREIRA, 2010). O ácido oxálico se liga ao cálcio, diminuindo sua disponibilidade para a realização de numerosos processos fisiológicos, formando oxalato de cálcio, pouco solúvel na urina, que aumenta o risco de formação de cálculos renais.

Ademais, de acordo com (Fassett, 1973) para que os teores de oxalato, expresse efeito adverso a saúde, é necessária que uma razão entre os teores de oxalato:cálcio, exceda 9:4. Isto não se observa em nossos resultados. Deste modo, a farinha da casca de café não apresenta risco a saúde do consumidor.

Quanto aos teores de taninos, observa-se que na literatura ainda não existe dados relacionados com a quantidade mínima para seu efeito adverso (DAMODARAN, 2010; DELFINO, 2010). Embora, estes fitoquímicos são considerados agentes antinutricionais devido à sua capacidade de ligar diferentes proteínas e enzimas, bem como ao fato de interferirem na biodisponibilidade do ferro e outros minerais (SAMTIYA, ROTIMI, DHEW, 2020).

A atividade de taninos e polifenóis relacionados, é altamente depende da dose aplicada e das sinergias estabelecida entre moléculas atuantes. Portanto, é necessário continuar investigações sobre os mecanismos de ação dessas substâncias, favorecendo o seu uso em produtos farmacêuticos formulações alimentícias (OGAWA, YAZAKI, 2018, FRAGA-CORRAL et al, 2020).

As saponinas desempenham um amplo espectro de efeitos biológicos, incluindo propriedades citotóxicas e antitumorais, que são as mais estudadas. A toxicidade das saponinas para animais de sangue quente depende do método de administração, fonte, composição e concentração da mistura de saponinas (SOBOLEWSKA et al., 2020).

A fim de avaliar a citotoxicidade da farinha de casca de café foi realizado o teste hemolítico. A farinha da casca de café apresentou 5,86% de hemólise e com este resultado, pode-se inferir que esta não é tóxica, uma vez que valores inferiores a 20% de hemólise são considerados baixos. Segundo Andrade et al. (2016) um alimento só é considerado tóxico quando os resultados de hemólise forem maiores que 50%.

Diante dos resultados obtidos de antinutrientes e citotoxicidade da farinha de casca de café, pode-se inferir que esta não apresenta risco de consumo pois, possui baixo conteúdo de antinutrientes e % hemolítica.

3.3. Determinação dos Constituintes fenólicos totais e capacidade antioxidante da farinha da casca de café

Os valores médios dos constituintes fenólicos totais (CFT) e capacidade antioxidante da farinha da casca de café estão apresentados na Tabela 4. Observa-se que a casca de café apresenta elevado teor de constituintes fenólicos totais sendo, portanto, fonte em potencial para inserir ou agregar, em formulações alimentícias, uma maior quantidade de fenólicos, constituintes que trazem benefícios a saúde por apresentarem capacidade antioxidante.

Tabela 4. Constituintes Fenólicos Totais (CFT) e capacidade antioxidante (CA) da farinha da casca de café.

Determinações	Médias ± desvio
CFT (mg de EAG.100g ⁻¹)	1.358,65 ± 36,05
Capacidade antioxidante	
ABTS ^{•+} (CE ₅₀ mg.ml ⁻¹)	18,63 ± 0,76
Poder Redutor (CE ₅₀ mg.ml ⁻¹)	2,28 ± 0,02
Inibição da oxidação β-caroteno e ácido linoleico (%CA)	73,43 ± 4,41

EAG=equivalente em ácido gálico; ABTS= radical 2,2' - azino - bis - 3 - etilbenzotiazolína - 6 - ácido sulfônico; CE₅₀=concentração efetiva média.

Os resultados CFT encontrados no estudo em questão foram superiores aos valores encontrados por Melo (2013) em casca de café seca (823,67 mg EAG 100 g⁻¹) e por Neves (2019) em extrato aquoso de cascas de café (396,8 mg EAG.100 g⁻¹ à 454,5 mg EAG.100 g⁻¹). Porém, esta variação nos teores de fenólicos encontrados é justificada pela influência de diversos fatores, tais como: maturação, espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento (SOUSA et al., 2010). Além disso, a quantidade de fenólicos presentes nos vegetais pode variar de acordo com fatores

que não são intrínsecos ao alimento, como radiação solar, época do ano, períodos chuvosos ou não, radiação UV, dentre outros fatores, que podem interferir no metabolismo e produção de fenólicos nos alimentos (MACHADO et al., 2008).

A capacidade antioxidante foi avaliada por meio das análises de ABTS, poder redutor e β -caroteno e ácido linoleico, sendo que tais análises indicaram excelente ação das cascas de café na prevenção contra oxidação. O ensaio por meio do radical ABTS^{•+}, indicou que seriam necessários apenas um pouco mais do que 18 mg de amostra para inibir 50% da oxidação. Esta capacidade antioxidante foi confirmada com a realização dos demais métodos de investigação.

Resultados mais baixos obtidos por CE₅₀, indicam maior capacidade antioxidante pois, está relacionada com a quantidade (mg) de amostra necessária para inibir a oxidação em 50%. Ao avaliar a CA pelo ensaio poder redutor, foi possível confirmar o potencial da farinha da casca de café como alimento com elevada capacidade antioxidante.

No ensaio de inibição da oxidação acoplada do β -caroteno, a farinha da casca de café se mostrou capaz de inibir 73,43% da oxidação.

4. Conclusão

Constatou-se que a farinha da casca de café possui compostos de valor agregado com alta funcionalidade e/ou bioatividade, sendo uma fonte promissora para estudos nutricionais em proteínas, lipídeos, carboidratos e minerais, destacando-se como fonte de cálcio, potássio, magnésio, manganês e fósforo, além de ser rica em ferro. Apresenta ainda, um expressivo teor de constituintes fenólicos e elevada capacidade antioxidante.

Dessa forma, as cascas de café surgem como uma alternativa inovadora com possibilidade de utilização em formulações alimentícias, não apresentando risco a saúde humana por antinutrientes e citotoxicidade.

Conclui-se que, cascas de café, surgem como uma alternativa sustentável e inovadora com destaque para cadeia produtiva do café, com possibilidade de utilização em formulações alimentícias, além de não apresentando risco a saúde humana.

Referências

ANDRADE, M. A.; AZEVEDO, C. S.; MOTTA, F. N.; SANTOS, M. L.; SILVA, C. L.; SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 444, 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, v. 27, p. 911-917, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem. **Diário Oficial** [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 26 dez. 2003. Seção 1, nº 251. p. 33-4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005a. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 263, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial** [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 set. 2005b. Seção 1.

CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHARADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Science and Plant Analysis*, v. 6, p. 71-80, 1975.

CHERUIYOT, G. K.; WANYONYI, W. C.; KIPLIMO, J. J.; MAINA, E. N. Adsorption of toxic crystal violet dye using coffee husks: Equilibrium, kinetics and thermodynamics study. **Scientific African**, v. 5, p. 01-16, 2019.

Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café, v. 5– Safra 2018, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-84, dezembro de 2018.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Fennema's Food Chemistry**. Editora: CRC Press, 5 ed., p. 1123, 2017.

DEL CASTILLO, M. D.; IRIONDO-DEHOND, A.; FERNANDEZ-GOMEZ, B.; MARTINEZ-SAEZ, N.; REBOLLO-HERNANZ, M.; MARTÍN-CABREJAS, M. A.; FARAH, A. Coffee Antioxidants in Chronic Diseases. A. Farah (Ed.), *Coffee: Consumption and Health Implications*, **Royal Society of Chemistry**, p. 20-56, 2019.

DELFINO, R. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade protéica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 308-12, 2010.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F.; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 107-134, 2017.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. Functional properties of coffee and coffee byproducts. **Food Research International**, v. 46, p. 488-495, 2012.

FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Technical Report Series 859 – Evaluation of certain food additives and contaminants. 44th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 1996.

FAO. Food and Agriculture Organization. Semana Nacional de Conscientização da Perda e Desperdício de Alimentos. 2018. <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1163036/>

FASSETT, D. W. **Oxalates**. In: Toxicants occurring naturally in foods. 2ed. Washington: National Academy of Sciences, 1973, p. 346-362.

FRAGA-CORRAL, M., GARCÍA-OLIVEIRA, P., PEREIRA, A. G., LOURENÇO-LOPES, C., JIMENEZ-LOPEZ, C., PRIETO, M. A, SIMAL-GANDARA, J. Technological application of tannin-based extracts. **Molecules**, V. 24, p. 1-27, 2020.

GARCÍA, R. L. P.; DEL BIANCHI, V. L. The effect of fungal fermentation in phenolics content in robusta coffee husk Lady Rossana Palomino. **Ciências Agrárias**, v. 36, p. 777-786, 2015.

GIÃO, M.S.; LEITÃO, I.; PEREIRA, A.; BORGES, A.B.; GUEDES, C.J.; FERNANDES, J.C.; BELO, L.; SANTOS-SILVA, A.; HOGG, T.A.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection. **Food Control**, v. 21, p. 633-638, 2010.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p.08-17, 2010.

ISO, 2005. ISO14502-1: 2005 Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1. Content of total polyphenols in tea-colorimetric method using Folin–Ciocalteu reagent. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland.

LATOUD, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; GENET, R.; MORGAT, J.L. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 856, p. 526-535, 1986.

LIU, J. et al. Hepcidin: A Promising Therapeutic Target for Iron Disorders: A Systematic Review. **Medicine**, v. 95, n. 14, p.31-50, 2016.

LOPES, C. O.; DESSIMONI, G. V.; COSTA, M. S.; VIEIRA, G.; PINTO, N. A. V. Aproveitamento, composição nutricional e antinutricional da farinha de quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 669-675, 2009.

LOURES, A. e JOKL, L. **Microtécnica para determinação de ácido oxálico em folhas e derivados**. In: Encontro nacional de analistas de alimentos. Resumos: Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, p.59, 1990.

MATISSEK, R.; SCHNEPEL, F.M.; STEINER, G. **Análisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones**. Zaragoza: Acribia, p. 416p, 1998.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594- 598, 1968.

MASSEY, L. K. Food Oxalate: factors affecting measurement, biological variation, and bioavailability. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 107, p. 1191-94, 2007.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31 p. 426–428, 1959.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p.91, 1971.

MILMAN, N. Anemia—still a major health problem in many parts of the world! **Annals Of Hematology**, v. 90, n. 4, p.369-377, 2011.

MOREIRA, F. G.; IERVOLINO, R. L.; DALL'ORTO, S. Z.; BENEVENTI, A. C. A.; FILHO, J. L. O.; GÓIS, A. F. T. Intoxicação por carambola em paciente com insuficiência renal crônica: relato de caso. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 22, p. 395-98, 2010.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 897-903, 2012.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. Resources, **Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45-58, 2012.

NEVES, J. V. G.; BORGES, M. V.; SILVA, D. M.; LEITE, C. X. S.; SANTOS, M. R. C.; LIMA, N. G. B.; LANNES, S. C. S.; SILVA, M. V. Total phenolic content and primary antioxidant capacity of aqueous extracts of coffee husk: chemical evaluation and beverage development. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 348-353, 2019.

NUNES, C. R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; BARBOSA, J. B.; PEREIRA, S. M. F.; OLIVEIRA, D. B. Atividade antioxidante e o teor de taninos e fenóis totais dos frutos de *Annona muricata* L. **Vértices**, v.15, p. 93-110, 2013.

Official methods of analysis of the AOAC International. Soluble and Insoluble Dietary Fiber in foods - AOAC International. Method 991.43. Gaithersburg: Published by AOAC International, 1990.

OFFICIAL methods of analysis of the AOAC International - AOAC International Fruits and Fruit Products. Gaithersburg: Published by AOAC International. Cap. 37, 2010.

OGAWA, S., YAZAKI, Y. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin Determination and Biological Activities. **Molecules**. v. 23, p. 1-18, 2018.

OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 283-291, 2014.

OYAIZU, M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. Nippon Journal of the Japanese Society for **Food Science and Technology**, v. 35, p. 771-775, 1988.

PORTER, L. H.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B. C. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to groups in foods. **Journal of Food Science**, v. 56, p.128-132, 1991.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. D. S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.

SALES, C. H.; SANTOS, A. R.; CINTRA, D. E.; COLLI, C. Magnesium-deficient high-fat diet: effects on adiposity, lipid profile and insulin sensitivity in growing rats. **Clinical Nutrition**, v. 33, p. 879-888, 2014.

SAMTIYA, M., ROTIMI, E. A., DHEW, T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 2, p. 1-14, 2020.

SANCHO, S. de O.; SILVA, A. R. A. da; DANTAS, A. N. de S.; MAGALHÃES, T. A.; LOPES, G. S.; RODRIGUES, S.; COSTA, J. M. C. da; FERNANDES, F. A. N.; SILVA, M. G. V. Characterization of the Industrial Residues of Seven Fruits and Prospection of Their Potential Application as Food Supplements. **Journal of Chemistry**, p. 1-9, 2015.

SOBOLEWSKA, D., GALANTY, A., GRABOWSKA, K., MAKOWSKA-Was, J., WRÓEL-BIEDRAWA, D., PODOLAK, I. Saponins as cytotoxic agents: an update (2010–2018). Part I-steroidal saponins. **Phytochem Reviews**, v. 19, p 139–189. 2020.

SILVEIRA, M. G. G. **Prevenção da obesidade e de doenças do adulto na infância**. Editora: vozes, 208 p., 2017.

SREERAMA, Y. N.; NEELAM, D. A.; SASHIKALA, V. B.; PRATAPE, V. M. Distribution of nutrients and antinutrients in milled fractions of chickpea and horse gram: seed coat phenolics and their distinct modes of enzyme inhibition. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4322-30, 2010.

TARLETON, E. K.; LITTENBERG, B. Magnesium intake and depression in adults. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 28, p. 249-256, 2015.

ULSIDO, M. D.; ZELEKE, G.; LI, M. Biogas Potential Assessment From a Coffee Husk: an Option for Solid Waste Management in Gidabo Watershed of Ethiopia. **15th International Scientific Conference on Engineering for Rural Development**, p. 1348-1354, 2016.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfafia glomerata* (Spreng) Pedersen – *Amaranthaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 46-49, 2003.

WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J.D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1156-1162, 2010.

Capítulo IV

II Etapa

CHOCOLATES ESCUROS PRODUZIDOS COM ADIÇÃO DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arábica* L.): CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA, REOLÓGICAS E AVALIAÇÃO SENSORIAL

Resumo

Para produção de chocolate é indispensável o conhecimento dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos definidos por legislações outros parâmetros também são levados em consideração para avaliar a qualidade do chocolate, como textura, parâmetros reológicos e sensoriais. Assim, objetivou-se produzir chocolates escuros com adição de farinha da casca de café e avaliar os efeitos nas características de textura, reológicas e sensoriais. Foram produzidos chocolates escuros com adição de diferentes proporções da farinha da casca de café (0%; 2,5%; 5%; 7,5% 2 10% de farinha de casca de café). Realizou-se as determinações físicas e químicas (pH, acidez, cinzas, proteínas, umidade, açúcar redutor, não redutor e total e lipídeos), microbiológicas (coliformes totais, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, bolores e leveduras), reológicas (viscosidade e tensão inicial de Casson e tixotropia), textura instrumental (TPA e ensaio de corte) e avaliação sensorial (aceitação, intenção de compra e CATA). Verificou-se um aumento significativo dos teores de umidade, cinzas, proteínas e acidez titulável na composição das formulações de chocolate à medida que se aumentou a proporção de FCC. As formulações de chocolates se apresentaram em conformidades para os padrões microbiológicos. Ademais, constatou-se ótimos parâmetros de textura e reologia. Os provadores, mesmo atribuindo notas menores para as formulações de chocolate adicionadas de FCC, ainda se observou boa aceitação com médias que variaram entre 6,08 e 8,13. Observando-se, portanto, que os provadores gostaram de todas as formulações. Com a análise do CATA verifica-se que atributos, como maior acidez e amargor, identificadas com maior intensidade nas amostras com porcentagem maiores da FCC podem ter influenciado nas notas atribuídas pelos provadores no teste de aceitação. Assim, conclui-se pelos parâmetros testados, que o as formulações de chocolate com adição de FCC apresentaram bons parâmetros de qualidade, relativos as determinações físicas, químicas, microbiológicas, de textura, reológicos e sensoriais.

Palavras-chave: Ensaio rotacional, Casson, textura, cor, CATA.

1. Introdução

Uma formulação de chocolate é basicamente constituída por líquido/massa de cacau, manteiga de cacau, açúcar, emulsificante (geralmente lecitina de soja) e em alguns casos leite em pó (BECKTT et al., 2017). Carneiro et al. (2011) e Sandri et al. (2012) relatam que as formulações utilizadas para elaboração de chocolates são inúmeras e dependem de preferências

regionais, culturais e da legislação de cada país em relação às concentrações de cacau, sólidos do leite e quantidades e tipos de gorduras vegetais permitidas.

Normalmente, as grandes indústrias mantêm em sigilo os detalhes que garantem a diferenciação dos seus produtos, pois a composição do chocolate desempenha um papel importante durante o processamento. As diferentes interações que ocorrem entre os ingredientes determinam a microestrutura final do produto que influencia as propriedades de fusão, cristalização e formação de fat Bloom (FERNANDES, MÜLLER e SANDOVAL, 2013).

Dentre os diferentes tipos de chocolates comercializados, os chocolates escuros com alto teor de cacau, produtos gourmet premium e produtos contendo outros constituintes bioativos adicionados intencionalmente são tendências no mercado mundial devido aos efeitos benéficos à saúde (AGIBERT e LANNES, 2018). De acordo com Sandri et al. (2012) e Baldin et al. (2016), os referidos constituintes, encontram-se em abundância em matérias primas não convencionais, como cascas de frutas e vegetais, os quais têm sido incorporados em diversos produtos alimentícios, visando além de aumentar a quantidade de funcional, atender ao apelo de consumidores que buscam produtos agradáveis, práticos e com elevado valor nutricional.

Desse modo, visando explorar outras possibilidades de aplicação da farinha da casca de café, como sua adição em produtos alimentícios, buscou-se a combinação com o chocolate, a fim de desenvolver um novo produto com grande potencial funcional e nutricional e com características sensoriais distintas, sem comprometer suas características de qualidade, sejam elas físicas, químicas, microbiológica, de textura ou sensoriais.

Segundo Leite et al. (2013) e Konar et al. (2016), a textura do chocolate requer um comportamento específico, no qual o produto deve apresentar-se solidificado à temperatura ambiente (20-25 °C) e, à temperatura da boca (37 °C), deve fundir-se rapidamente, se tornando um fluido de viscosidade apropriada.

A análise de reologia avalia essa viscosidade e dessa forma se torna um dos parâmetros cruciais da qualidade. A reologia fornece uma indicação do comportamento do fluxo do chocolate sob várias condições (GONÇALVES e LANNES, 2010; HINNEH et al., 2019) e predizem o comportamento da massa durante o processamento, bem como a organização estrutural, as interações dentro do sistema e as propriedades sensoriais do produto final (PAJIN et al., 2013; ZARIC et al., 2016).

Portanto, o estudo de propriedades físicas é fundamental para avaliar o comportamento do produto durante a produção, armazenamento e acondicionamento até o momento do consumo (AFOAKWA et al., 2009), pois ao controlar as propriedades físicas do chocolate (reologia, comportamento calorimétrico e parâmetros de textura) é possível garantir a viabilidade da produção industrial de produtos estáveis e de qualidade. E ao apresentar boa

correlação com os testes sensoriais, a medição instrumental das características de textura também pode ser usada em estudos de rotina e avaliação de qualidade (GLICERINA et al., 2013; GUNARATNE et al., 2019).

Sendo assim, objetivou-se produzir chocolates escuros com adição de farinha de casca de café e avaliar os efeitos nas características de textura, reológicas e sensoriais.

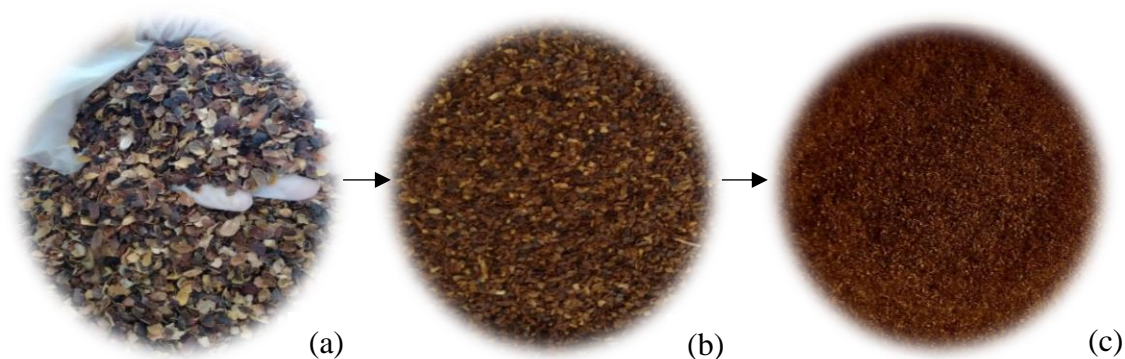
2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Itapetinga-BA, utilizando o Laboratório de Processamento de Leite e Derivados, laboratório do Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL), Laboratório de Ensaio dos materiais e Laboratório de Análise sensorial. Utilizou-se também o laboratório de tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de ciências farmacêutica da Universidade de São Paulo (USP). Na condução do experimento foram realizadas três repetições em replicatas, utilizadas em cada uma das análises.

2.1. Obtenção da casca de café e produção da farinha

Foram utilizadas cascas de café da espécie *Coffea arabica* L., produzidos com manejo orgânico na Fazenda Floresta - Povoado de Pau Ferrado, município de Ibicoara-BA, localizada na região da Chapada Diamantina, meridional 13°, 24', 50,7" latitude Sul e 41°, 17', 7,4" longitude oeste de Greenwich e altitude aproximada de 1.027 m acima do nível do mar. A precipitação mínima anual é de 1.179 mm e máxima anual de 1.868mm, sendo o maior nível encontrado de outubro a março (FAZENDA FLORESTA, 2012). As cascas de café previamente secas, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey (Solab, SL-031, Brasil), peneiradas para redução da granulometria das partículas em 60 mm e obtenção da farinha (Figura 1).

Figura 1. Cascas de café secas (a) e trituradas no moinho de facas (b) e farinha de casa de café com granulometria de 60 mm (c).



Fonte: próprio autor.

2.2. Processamento das formulações de chocolate

As formulações de chocolate foram previamente padronização em função do teor de sólidos de cacau (massa e manteiga de cacau) em 55% e lecitina de soja 0,4%. O teor de açúcar variou em função da adição de farinha de casca de café, testadas nas concentrações de 0,0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0%, conforme demonstrado na (Tabela 1).

Tabela 1. Formulação utilizada para produção dos chocolates 55% (sólidos totais de cacau) com adição da farinha de casca de café (FCC).

Ingredientes	F1	F2	F3	F4	F5
Massa de cacau	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0
Manteiga de cacau	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Açúcar refinado	44,6	42,1	39,6	37,1	34,6
Lecitina de soja	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Farinha de casca de café	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Total	100	100	100	100	100

F1= formulação com 0% de casca de café; F2= formulação com 2,5% de casca de café; F3= formulação com 5,0% de casca de café; F4= formulação com 7,5% de casca de café; F5= formulação com 10,0% de casca de café. Valores em porcentagem (%).

As formulações de chocolates escuro foram produzidas um moinho de pedra (Melanger Spectra 11, EUA) a temperatura média de $(57 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$, sendo nesta, realizada as etapas de conchagem e refino (Figura 2). Foram adicionados a massa de cacau e homogeneizada por 1

hora. Sequencialmente, misturou-se lentamente, o açúcar, a farinha de casca de café e parte da manteiga de cacau. A mistura dos ingredientes foi mantida sob agitação por 21 horas. Posteriormente, foram adicionadas a quantidade remanescente da manteiga de cacau. Finalmente, adicionou-se a lecitina, 30 minutos antes de finalizar a elaboração dos chocolates, totalizando assim, 24 horas de processamento.

Figura 2. Ilustração das etapas de moagem, mistura, conchagem e refino na Melanger Spectra 11



Fonte: próprio autor.

Após o processo de mistura, refino e conchagem, o chocolate foi conduzido para o processo de temperagem em temperadeira (Finamac, Mini Chocomachine, São Paulo, Brasil) (Figura 3), o chocolate permaneceu por 30 min a 45 °C na temperadeira sob constante agitação, após isso, foi resfriado até atingir uma temperatura de 30 °C, para posterior moldagem em formas de acrílico.

Figura 3. Temperadeira utilizada no processo de temperagem do chocolate.



Fonte: próprio autor.

As formas passaram por vibração manual para evitar formação de bolhas de ar na superfície dos chocolates. Em seguida, foram refrigerados à temperatura de 4 °C. Após resfriados, os chocolates foram embalados com papel chumbo (Figura 4) e armazenados em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) para posterior análises.

Figura 4. Chocolates após processo de moldagem e embalagem.



Fonte: próprio autor.

1.1. Caracterização química e física do chocolate

1.1.1. Determinação de umidade

A umidade foi determinada de acordo com a metodologia nº 984.25 da AOAC (2010), por secagem em estufa (SX-DTME, Marca Prolab - Brasil) a $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante, sendo utilizadas 5 g de amostra.

1.1.2. Determinação de cinzas

O teor de cinzas totais foi determinado por calcinação de 5 g de amostra em mufla, (Marconi - Brasil) a $550\pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante conforme o procedimento nº 925.51 proposto pela AOAC (2010).

1.1.3. Determinação de acidez titulável (AT)

A acidez titulável foi determinada por meio do método potenciométrico, utilizando-se 10 g da amostra previamente macerada em 100 mL de água destilada seguindo metodologia nº 942.15 descrita pela AOAC (2010).

1.1.4. Determinação do potencial de hidrogênio (pH)

As medidas do pH foram realizadas por potenciometria, conforme a metodologia nº 981.12 descrita pela AOAC (2010). As leituras foram realizadas diretamente em pHmetro digital (BEL W3B) previamente calibrado.

1.1.5. Determinação de proteínas totais

O teor de proteína foi determinado, avaliando-se a concentração de nitrogênio total utilizando o método semi-micro Kjeldahl, segundo a metodologia nº 920.152 proposto pela AOAC (2010), recolhendo-se a amônia liberada em ácido bórico a 4%. O resultado será multiplicado pelo fator de conversão (Fc) nitrogênio: proteína estabelecido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2003).

1.1.6. Determinação de lipídios totais

Os lipídios foram extraídos e determinados conforme metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959). Foram pesados 3 g para amostra da farinha de casca de café e 2 g para as amostras de nibs e chocolate. Os resultados foram expressos em $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

1.1.7. Determinação de açúcares redutores, não redutores e totais

Determinou-se os açúcares redutores (AR) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). O método baseia-se na redução do DNS (cor amarelo), a um composto de coloração avermelhada, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, pela oxidação dos monossacarídeos redutores em meio alcalino.

A mistura reacional foi constituída de 1 mL da amostra e 1 mL do reagente DNS e seguido de agitação. Posteriormente, a mistura foi aquecida em banho-maria por 5 minutos para o desenvolvimento da cor. Após o resfriamento da mistura, adicionou-se 13 mL de água destilada e agitou-se para dissolução. Para quantificação dos AR foram geradas curvas analíticas de glicose nas concentrações variando de $25,10^{-6}$ a $20,10^{-4}$ mg. mL⁻¹, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 540 nm. Os coeficientes de determinação das curvas analíticas não foram inferiores a 0,9985. Para determinação de açúcares totais (ACT) utilizou-se o método adaptado por Matissek et al. (1998), nesta etapa açúcares não redutores (ANR) foram hidrolisados com HCl concentrado sob aquecimento. Posteriormente, a mistura foi neutralizada com NaOH (15 g. 100 mL⁻¹). A quantificação se procedeu de modo idêntico para os AR. Calculou-se os ANR pela diferença entre os teores de ART e AR. Os resultados foram expressos em mg de glicose. 100 mL⁻¹.

1.2. Análise instrumental de cor

A análise instrumental de cor das formulações de chocolate foi realizada por meio do sistema de leitura de três parâmetros, o CIELAB, proposto pela "Comission Internacionale de l'Eclairage" (CIE), em 1971. Os parâmetros L*, a* e b* foram fornecidos pelo colorímetro Colorquest XE (Hunter Lab, Estados Unido), no qual L* define a luminosidade (L* = 0 preto e L* = 100 branco) e as coordenadas a* e b* são responsáveis pela cromaticidade (+a* vermelho, -a* verde, + b* amarelo, -b* azul).

O índice de brancura foi calculado em função dos valores L*, a* e b*, utilizando a equação $(WI) = 100 - ((100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2)^{0,5}$, conforme proposto por Lohman e Hartel (1994).

1.3. Análises microbiológicas

Para verificar a eficiência do processamento, as formulações de chocolate foram analisadas microbiologicamente avaliando a ausência de coliformes totais e coliformes

termotolerantes. A confirmação dos coliformes totais foi feita em caldo Verde Brilhante Bile, com incubação a 35°C por 48 horas. Para coliformes termotolerantes, foi utilizado caldo EC incubado a 45°C por 24 horas, resultados expressos em UFC/ml (FDA, 2005).

Também foi avaliado a ausência de Salmonella, com resultados expressos como presença ou ausência em 25 g de produto (FDA, 2005) e bolores e leveduras.

1.4. Análise Granulométrica

A granulometria das partículas de chocolate foi determinada por meio de micrômetro digital (Mitutoyo, Braisl) com escala de 0µm a 25µm. Uma pequena parte da amostra de chocolate foi fundida em placa de metal e misturada a um óleo mineral antes de ser transferida, com uma pequena espátula, para leitura direta no equipamento.

1.5. Análise Reológica - Ensaio rotacional

O ensaio rotacional foi realizado em um Reômetro Haake-MARS (ThermoScientific, Alemanha), com auxílio do software Rheowin. Utilizou-se sensor cone placa (C35/2Ti não polida) com *gap* de 0,105mm, e banho termostaticado à temperatura de 40°C, seguindo método proposto pela IOCC (2000).

O ensaio rotacional foi conduzido com taxa de cisalhamento controlada (CR), em três passos: (1) 0,00 1/s a 65,00 1/s, t = 180 s; (2) 65,00 1/s, t = 60 s; (3) 65,00 1/s a 0,00 1/s, t = 180 s. Os dados de viscosidade plástica (η) e tensão inicial (τ_0) obtidos, foram adequados à equação de casson (IOCCC, 2000). As análises foram realizadas em triplicata avaliando três repetições.

1.6. Análise de textura instrumental

As análises de textura instrumental (Análise do perfil de textura e ensaio tensão de ruptura) foram conduzidas em um texturômetro (TA.HD Plus, Stable Micro Systems, Inglaterra).

1.6.1. Análise do perfil de textura (*Texture profile analysis* – TPA)

Utilizou-se um texturômetro equipado com uma célula de carga de 750 kg. Sendo as condições dos ensaios (definidas por pré-testes): velocidade de pré-teste 1,0 mm.s⁻¹; velocidade

de teste $1,0 \text{ mm.s}^{-1}$; velocidade pós-teste 2 mm.s^{-1} . utilizando 50% de taxa de deformação e taxa de aquisição de dados de 200 pontos por segundo, probe p/100. As amostras utilizadas para realização da análise foram no formato alpino (2,5 cm de altura x 1,5 cm de largura) massa de aproximadamente 10 g. Foram obtidos resultados referentes a dureza, adesividade, gomosidade e coesividade. Para obtenção de uma boa estimativa da avaliação dos ensaios foram realizadas 10 medições para cada repetição (BOURNE, 2002).

1.6.2. Textura instrumental: tensão de ruptura (*snap test*)

O ensaio mecânico realizado promoveu o corte utilizando a probe (Extended Craft Knife A/ECB), taxa de deformação de 2 mm.s^{-1} , distância de compressão de 5 mm e gatilho de 0,09 N. A coleta de dados foi realizada por meio do programa computacional Texture Expert for Windows 1.20. A força máxima de ruptura aplicada no centro das medalhas de chocolate, expressa em quilogramaforça (kgf), avaliou-se através do registro da curva força versus deformação. Os valores da força obtidos em cada ensaio foram divididos pela área de secção transversal de cada medalha e a tensão de ruptura foi expressa em $\text{kgf. (cm}^2\text{)}^{-1}$ e convertida em N. Para obtenção de uma boa estimativa da avaliação dos ensaios, realizou-se 10 medições para cada repetição (BOURNE, 2002).

1.7. Análise sensorial

Antes da realização dos testes sensoriais, o presente estudo passou por aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB - CEP/UFRB. Para cada voluntário participante foram entregues duas vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE: 64801417.5.0000.0056).

Um total de 111 consumidores participaram deste estudo. Os participantes foram recrutados entre alunos e funcionários da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia que demonstraram interesse no estudo, apresentaram disponibilidade de tempo e afinidade pelo produto.

1.7.1. Teste de Aceitação e intenção de compra

Cinco amostras, cada uma com aproximadamente 3g, de chocolate escuro com farinha de casca de café (0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%), codificadas com números aleatórios de três

dígitos, foram servidas separadamente, em cabines individuais iluminadas por luz branca, onde os consumidores avaliaram, para o teste de aceitação, os atributos aparência, aroma, textura, sabor e impressão global. Foi utilizada a escala hedônica de nove pontos, onde o valor 1 correspondeu a “desgostei muitíssimo” e o valor 9 a “gostei muitíssimo”. Em seguida, os consumidores indicaram por meio de uma escala de atitude de 5 pontos (1 correspondeu a “decididamente não compraria” e 5 correspondeu a “decididamente compraria”), o grau de Intenção de Compra do produto (DUTCOSKY, 2013). As fichas utilizadas para realização dos testes estão representadas no anexo I.

1.7.2. Perfil sensorial - *Check-All-That-Apply* (CATA)

Na mesma ficha, onde foram avaliadas aceitação e intenção de compra, foram apresentados aos participantes uma lista contendo 24 termos, descritos a seguir: aroma fraco e forte de chocolate, aroma fraco e forte de casca de café, aroma fraco e forte doce, sabor pouco e muito amargo, sabor pouco e muito adstringente, sabor pouco e muito ácido, sabor fraco e forte de casca de café, sabor fraco e forte residual, textura pouco e muito dura, textura pouco e muito arenoso, textura pouco e muito cremoso de acordo com a ficha de avaliação representada no Anexo I. Os termos foram obtidos por meio de referências obtidas na literatura e por possíveis características que a adição da casca de café ao chocolate pudesse apresentar.

1.8. Delineamento experimental

O experimento seguiu um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com cinco tratamentos (0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% de adição da farinha de casca de café) e três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de regressão em função dos tratamentos à 5% de significância. Os modelos matemáticos foram escolhidos de acordo com os efeitos significativos do modelo proposto ($p < 0,05$), falta de ajustamento não significativa ($p > 0,05$) e coeficientes de determinação (R^2) em relação ao SQTRAT que foram capazes de explicar a variação total por meio da regressão ajustada. Todas as análises foram realizadas por meio do pacote estatístico *Statistical Analysis System® versão 9.0*.

2. Resultados e discussão

2.1. Produção e caracterização do chocolate adicionado da farinha da casca de café (FCC).

Os chocolates produzidos, após passarem pela etapa de refino, apresentaram partículas com granulometria que se mantiveram entre 0,20 e 0,22 μm não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações sem e com FCC. Isso demonstra que a adição de FCC nas concentrações estudadas não afetou esse importante parâmetro de qualidade.

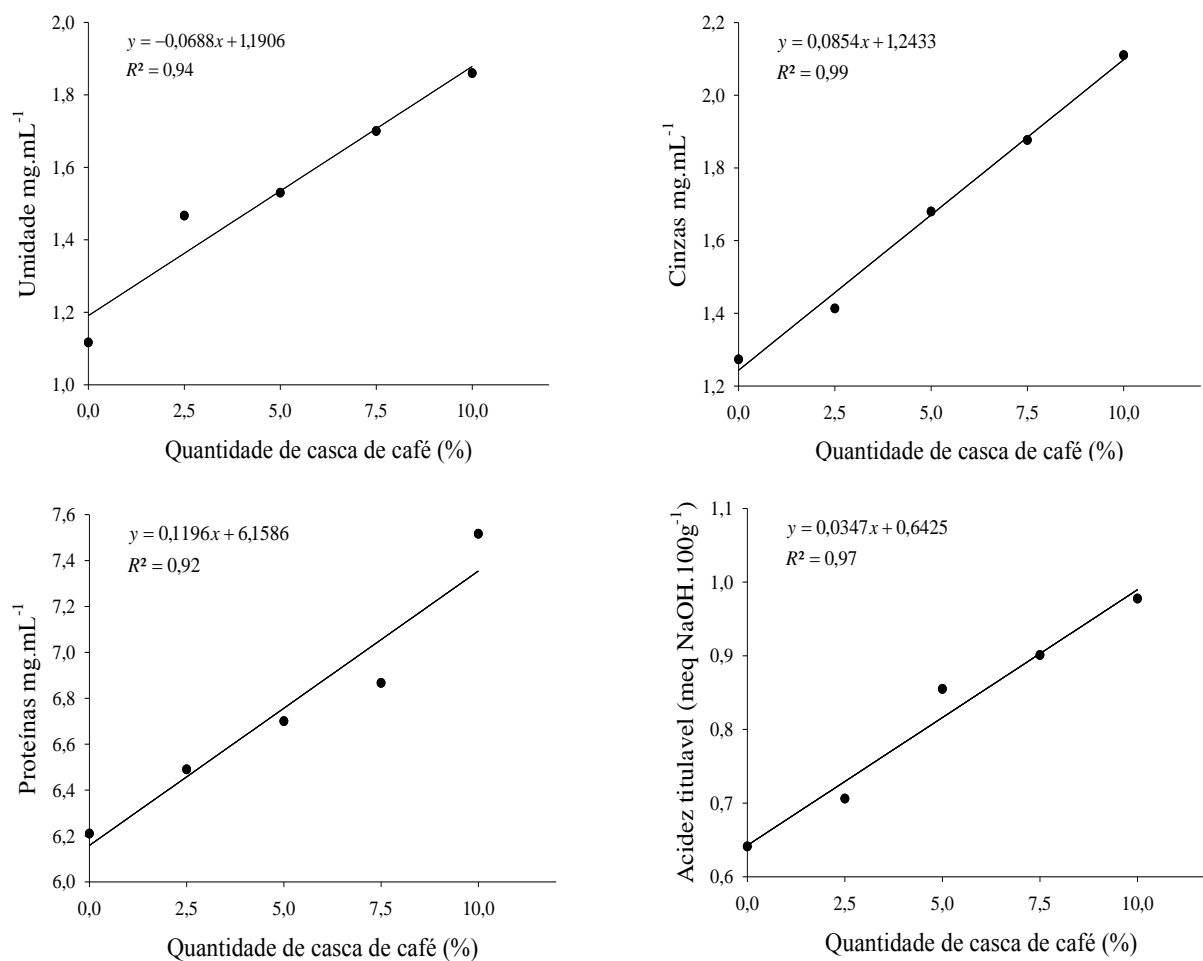
Segundo Bohme et al. (2016) as partículas devem ser menores que 30 μm , idealmente entre 20-25 μm de modo que se tornem suficientemente pequenas para não serem percebidas. O tamanho das partículas distribuídas no chocolate tem influência nas características físicas e sensoriais desse produto como a arenosidade, que é a sensação de partículas ásperas no produto ao ser derretido na boca e pode estar associada a presença de partículas grandes no produto (BECKETT, FOWLER, e ZIEGLER, 2017). Portanto, as formulações de chocolate com adição da FCC apresentaram partículas dentro do que é considerado ideal.

De acordo com os resultados obtidos para verificar a influência da adição da FCC na composição dos chocolates escuros observou-se que as variáveis umidade, cinzas, proteínas e acidez titulável apresentaram efeito linear crescente em sua composição a medida que se aumentou a proporção da FCC adicionada (Figura 5).

A variação de umidade ficou entre 1,12 e 1,86 meq de NaOH. 100 g^{-1} de amostra. O aumento no conteúdo de umidade das amostras de chocolate testadas foi influenciado pela umidade presente na casca de café que apresentou em sua composição umidade de 9%. Porém, mesmo apresentando um aumento significativo entre as formulações, a umidade dos chocolates se manteve dentro do limite permitido pela legislação que preconiza valores máximos de 3% (BRASIL, 1978).

Um chocolate com umidade elevada provoca aumento da sua viscosidade, que prejudica todas as etapas de manufatura e o produto acabado e, conseqüentemente, favorece o “sugar bloom” (SCHUMACHER et al., 2010). O teor de umidade das barras de chocolate depende diretamente da umidade dos ingredientes, do processamento e da vida-de-prateleira do produto.

Figura 5. Variáveis que apresentaram efeito linear crescente por meio da adição da FCC ao chocolate.



O conteúdo de cinzas, mesmo com aumento significativo, também se enquadrou nos limites estabelecidos pela legislação, que preconiza resultados inferiores a 2,5% (BRASIL, 1978). O aumento no conteúdo de cinzas condiz com a quantidade dos minerais nas formulações testadas pois, assim como o cacau, a casca de café é fonte em inúmeros minerais essenciais, como cálcio, magnésio, potássio e manganês (RICHTER e LANNES, 2007).

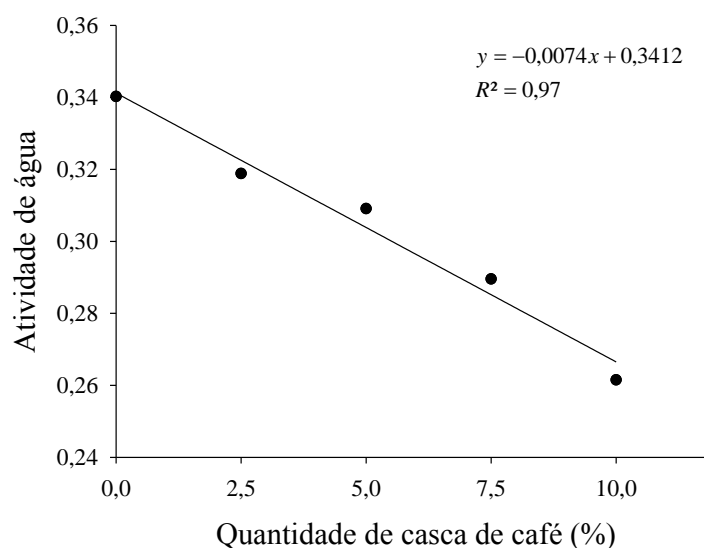
A acidez apresentou resultados que variaram entre 0,64 e 0,98 meqNaOH.100g⁻¹ apresentando aumento significativo ($p < 0,05$) a medida em que foi sendo adicionada maiores proporções da farinha da casca de café. A acidez em formulações de chocolate é diretamente influenciada pelas etapas de fermentação, onde ocorre a formação do ácido acético, e secagem, torra e concha, onde este ácido é volatilizado, a volatilização é essencial para que não ocorra influência negativa na formação dos precursores de sabor do chocolate. Porém nas formulações de chocolate em questão, a acidez foi influenciada apenas pela adição da farinha da casca de

café, pois foram utilizadas a mesma massa de cacau em todas as formulações e o processo de concha foi padronizado para ser realizado da mesma forma em todas as formulações.

O conteúdo de proteínas também foi maior a medida em que foi sendo adicionada maiores proporções da farinha de casca de café, os resultados variaram entre 6,21 e 7,51 g.100g⁻¹, apesar desse aumento na quantidade de proteína, sua composição não interferiu na formação de um chocolate com coloração mais escura.

Observou-se efeito contrário para a variável atividade de água (a_w), quando comparado aos parâmetros avaliados anteriormente. A medida em que foi sendo adicionada a FCC, esta variável apresentou efeito linear decrescente (Figura 6).

Figura 6. Variável que apresentou efeito linear decrescente por meio da adição da farinha da casca de café ao chocolate.



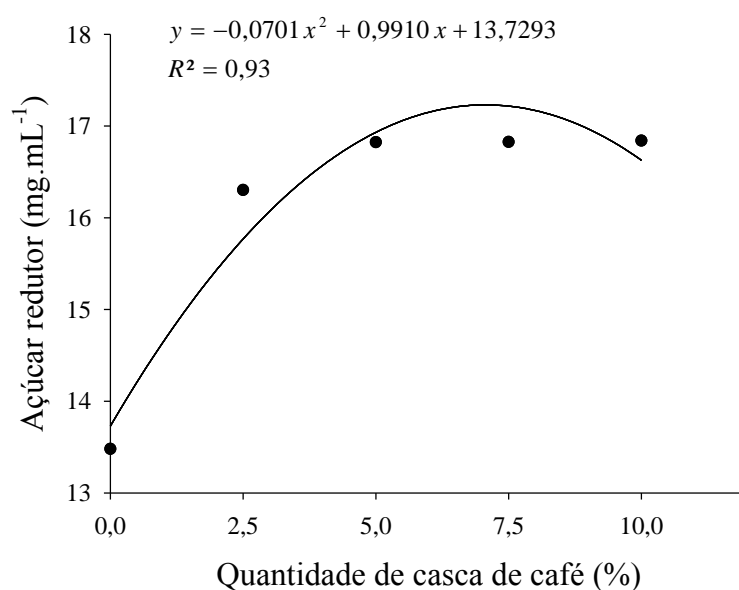
Segundo Beckett (2009) a atividade de água de chocolates deve estar entre 0,4 e 0,5. Em estudos realizados por Carvalho et al. (2017), chocolates ao leite adicionados de 2,15% de uvas liofilizadas apresentaram teores de atividade de água de 0,519, sendo valores mais altos quando comparados aos chocolates do presente estudo. Porém, em estudos realizados por Agibert et al. (2018), o resultado encontrado para atividade de água, de chocolates produzidos com óleo de amendoim encapsulado, foi de 0,358. Sem, portanto, padrões definidos para este parâmetro na influência de qualidade do chocolate.

O parâmetro açúcar redutor foi o único que apresentou comportamento quadrático entre as formulações (Figura 7). A amostra com 0% de casca de café apresentou resultado inferior as demais amostras que praticamente se mantiveram constantes a partir da adição de 5% de casca

de café. Assim, a maior composição de açúcar redutor presente na casca agregou em maior concentração deste componente no chocolate.

Esperava-se que, a maior presença de açúcar redutor juntamente com a maior quantidade de proteína na composição do chocolate ocorresse influência na cor final do chocolate, devido a reação de Maillard, porém, não foi observada alterações significativas na coloração dos chocolates entre as formulações. A temperatura empregada no processo de produção acaba por promover influência para não formação de coloração perceptível entre as formulações.

Figura 7. Variável que apresentou efeito quadrático por meio da adição da farinha da casca de café ao chocolate.



As variáveis pH (5,12), lipídios (40,72 g. 100g⁻¹), açúcar total (57,38 g. 100g⁻¹), açúcar não redutor (41,59 g. 100g⁻¹) e cor (L* (30,52), a* (6,60), b* (4,93) e WI (29,62)) não apresentaram modelo de regressão linear ou quadrático significativo ($p > 0,05$), indicando não haver diferença estatística nestas variáveis entre as formulações de chocolates estudadas, ou seja, a adição de até 10% da FCC não influenciou nestas características das amostras.

Em um processo de conchagem eficiente o pH do chocolate pode se levar saindo de valores próximos de 4,95 para próximos a 5,70, valor considerado bom para chocolates, tendo em vista que um baixo pH e um teor elevado de ácidos orgânicos, principalmente, o acético, proveniente da fermentação das sementes de cacau, afetam de forma indesejável o sabor do chocolate.

Em relação ao índice de brancura (WI), somente quando a gordura visual atinge um nível relevante, $WI > 35$, a percepção de cor do produto é afetada e o defeito denominado fat

bloom pode ser confirmado (SON et al., 2018). Desta maneira, observa-se que as formulações de chocolate, principalmente com maior percentual da farinha da casca de café os resultados do WI ficaram bem abaixo do valor indicado, portanto não apresentaram migração da gordura para superfície dos chocolates.

2.2. Análise microbiológica

Os parâmetros de qualidade microbiológica das formulações de chocolate adicionados da FCC foram avaliados a fim de verificar a eficiência do processo. Nenhuma das formulações de chocolate analisadas apresentaram contaminação por *Salmonella*, estando, portanto, de acordo com a legislação vigente que estabelece ausência de *Salmonella* em 25 g (BRASIL, 2019).

Quanto a análise de coliformes totais e termotolerantes, as formulações também se apresentaram adequadas para consumo, pois apresentaram resultados abaixo do limite máximo permitido pela legislação de 10 UFC/g (BRASIL, 2019). A mesma legislação também define padrões microbiológicos para contagem de bolores e leveduras, máximo de 10^2 /g, dessa forma com resultados de no máximo 2×10^0 /g, as amostras estão dentro dos padrões microbiológicos definidos pela legislação garantindo, portanto, a possibilidade da realização da análise sensorial.

Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2005) as etapas de mistura, refino, conchagem e temperagem, do chocolate apresentam baixa influência sobre a microbiota final do produto. Mesmo em uma conchagem com temperaturas entre 60-80°C, os microrganismos não seriam eliminados por estarem protegidos pela baixa *aw* e o alto teor de gordura do chocolate.

2.3. Textura instrumental: tensão de ruptura (*snap test*)

Os valores médios da dureza relacionados a força de quebra das formulações de chocolate adicionados da farinha da casca de café estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que as formulações não apresentaram modelo de regressão linear ou quadrático significativo ($p > 0,05$), ou seja, a FCC não interferiu em maior ou menor dureza nas formulações de chocolate estudadas.

Alguns estudos determinaram que a dureza avaliada em formulações de chocolate está correlacionada com o tipo e a quantidade de gordura utilizada, tipo de açúcar, distribuição e tamanho de partícula, condições de revestimento, bem como temperatura da concha (KONAR,

2013; TAN e BALASUBRAMANIAN, 2017). Assim, é um dos principais parâmetros de qualidade estrutural do chocolate.

Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão da tensão de ruptura (dureza) e trabalho de cisalhamento das formulações de chocolate adicionadas da farinha de casca de café (FCC).

Variáveis	F1	F2	F3	F4	F5	R ²
Dureza (N)	28,52 \pm 4,70	28,50 \pm 3,24	28,19 \pm 5,63	31,40 \pm 5,47	29,82 \pm 5,40	***

F1= formulação com 0% de casca de café; F2= formulação com 2,5% de casca de café; F3= formulação com 5,0% de casca de café; F4= formulação com 7,5% de casca de café; F5= formulação com 10,0% de casca de café.

***não houve parâmetro de regressão significativo ($p > 0,05$) para o modelo linear ou quadrático.

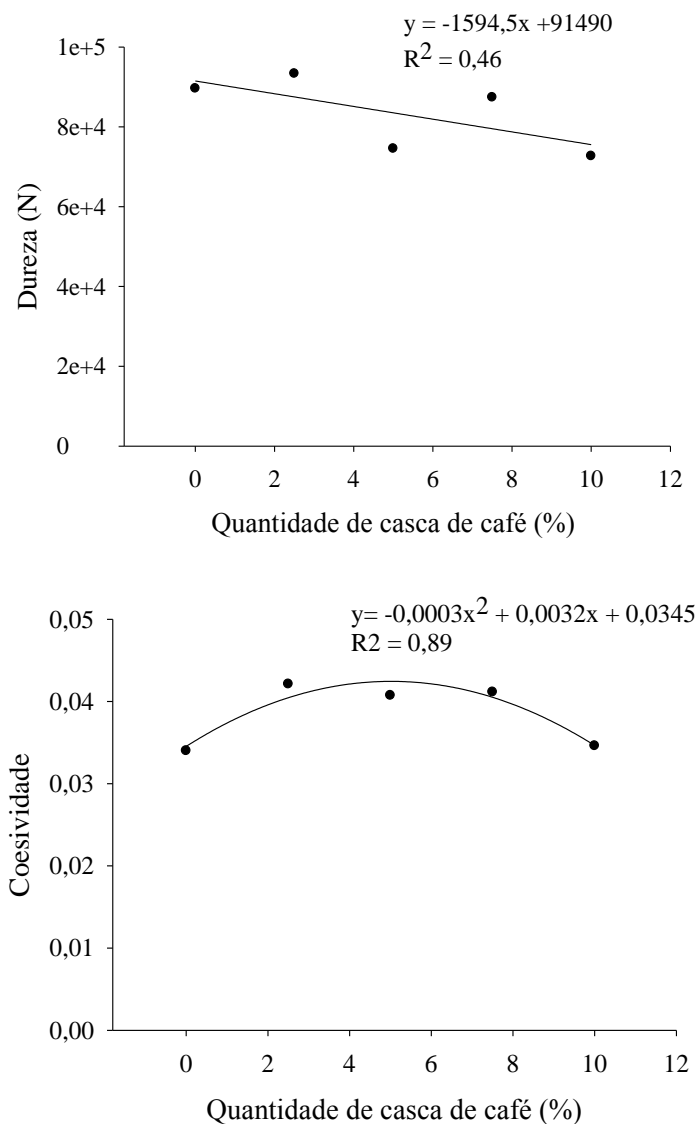
O revestimento de partículas sólidas com gordura durante a concha e temperagem promove o desenvolvimento de propriedades texturais como o snap (PRAWIRA e BARRINGER, 2009). Assim, é possível verificar que a adição da FCC não provocou alteração nesta característica desejada em formulações de chocolate, o snap, e que o processo de concha e temperagem foram realizados de forma igual para todas as formulações, já que diferentes propriedades texturais também podem ser obtidas nos produtos finais dependendo das condições usadas durante a concha e temperagem, por exemplo, uso de diferentes combinações de tempo x temperatura (KONAR, 2013).

2.4. Textura instrumental: perfil de textura (TPA)

Ao avaliar a influência da adição da FCC no perfil de textura das formulações de chocolates estudadas, observou-se alterações significativas ($p < 0,05$) apenas para os parâmetros de dureza e coesividade.

A dureza, definida como força necessária para o material se deformar, apresentou efeito linear decrescente (Figura 8), os resultados variaram entre 78.721,02 N e 93.893,61 N. Os chocolates com adição da FCC apresentaram como característica menor dureza, tal resultado pode estar relacionado com menor quantidade de açúcar adicionado, visto que o açúcar é responsável por características texturais nas formulações de chocolate (RICHTER, SILVA e LANNES, 2007). Outro fator que se deve levar em consideração é que a farinha da casca de café apresenta proteínas em sua composição, e que podem ter atividade emulsificante promovendo redução das forças interfaciais tornando o chocolate mais macios a medida em que uma maior proporção da farinha da casca de café foi sendo adicionada.

Figura 8. Comportamento linear e quadrático observados para os parâmetros de dureza e coesividade entre as formulações de chocolate adicionados de casca de café.



A Coesividade apresentou efeito quadrático com resultados que variaram entre 0,034 e 0,042 (Figura 8). As forças coesivas são responsáveis pela tensão superficial, um fenômeno que resulta na tendência da superfície em resistir à ruptura quando colocado sob tensão ou estresse. Dessa forma, corresponde a extensão a que um material pode ser deformado antes da ruptura.

Os resultados de mastigabilidade e adesividade, parâmetro que representa o trabalho necessário para superar a força de atração entre as superfícies do alimento e a que ele está em contato, não apresentou modelo linear ou quadrático significativo ($p > 0,05$) para as formulações estudadas, a adição da farinha da casca de café não promoveu maior ou menor mastigabilidade e adesividade entre as formulações.

2.5. Análise reológica

Os parâmetros reológicos viscosidade plástica de Casson (η_{ca}) e tensão inicial de Casson (τ_{ca}), das formulações estudadas, assim como os coeficientes de correlação linear (R^2) e tixotropia estão apresentados na Tabela 3. Os coeficientes de correlação demonstram bom ajuste dos dados experimentais ao modelo de Casson.

Nenhum dos parâmetros do ensaio rotacional, tensão inicial, viscosidade plástica e tixotropia, apresentaram modelo de regressão linear ou quadrático significativo ($p > 0,05$), indicando não haver diferença estatística nestas variáveis entre as formulações de chocolates estudadas. A adição da FCC não interferiu de forma significativa nas propriedades reológicas do chocolate.

Tabela 3. Parâmetros reológicos das formulações de chocolate adicionados de casca de café.

Amostras	τ_{ca} (Pa)	η_{ca} (Pa.s)	R^2	Tixotropia (Pa/s)
F1	4,37±0,14	1,19±0,17	0,9942	4645,33±492,03
F2	3,51±0,46	1,08±0,21	0,9946	4064,80±670,48
F3	5,55±0,97	1,11±0,29	0,9919	4741,00±415,38
F4	6,74±0,84	1,84±0,56	0,9926	5234,33±253,98
F5	5,50±0,87	1,15±0,18	0,9942	4799,00±793,23
Modelo	***	***	***	***

F1= formulação com 0% de casca de café; F2= formulação com 2,5% de casca de café; F3= formulação com 5,0% de casca de café; F4= formulação com 7,5% de casca de café; F5= formulação com 10,0% de casca de café.

τ_{ca} = tensão inicial de Casson; η_{ca} = viscosidade plástica de Casson; R^2 = coeficiente de correlação.

*** não houve parâmetro de regressão significativo ($p > 0,05$) para o modelo linear ou quadrático.

Os resultados de viscosidade plástica se apresentaram dentro do esperado, pois segundo Vissotto et al., (2016) os dados de limite de viscosidade (η_{Ca}) para chocolates devem se encontrar na faixa entre 1-20Pa.s. Porém, os valores de tensão (τ_{ca}) estão abaixo do limite considerado como ideal para formulações de chocolate pois, devem se apresentar entre 10-200Pa. Menores valores de tensão configuram em um produto com maior fluidez. Segundo Konar (2014) a tensão inicial está relacionada com a superfície de contato das partículas, quanto menor o tamanho de partícula, maior será a interação entre elas, aumentando sua área superficial, facilitando o escoamento do líquido (KONAR, 2014). Como a granulometria das partículas se apresentaram dentro da faixa considerada como ideal entre 20-25 μm (BOHME et al., 2016), talvez tenha promovido essa facilidade no escoamento do chocolate.

Estudar esta variação tanto para viscosidade quanto para a tixotropia é extremamente relevante do ponto de vista dos requerimentos energéticos para o processamento, pois quanto maior a tixotropia do fluido, mais fácil torna-se o seu bombeamento. Assim, valores ótimos de tixotropia juntamente com um valor ideal de limite de escoamento asseguram melhores condições de processo e manutenção da estabilidade de produtos.

Loncarevic et al. (2018) também investigaram os efeitos da adição de extrato de amora encapsulado nos parâmetros reológicos de formulações de chocolate e verificaram que ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) nos três parâmetros avaliados (viscosidade, tensão e tixotropia). A viscosidade de Casson apresentou resultados que variaram entre 0,63 e 1,22 Pa.s e a tensão inicial variou entre 4,11 e 6,05 Pa, resultados muito próximos aos encontrados no presente estudo.

Assim como Loncarevic, Carvalho e Lannes (2018) verificaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros reológicos em suas formulações de chocolate com adição de couve e uva liofilizada. Os autores também destacaram que a reologia em formulações de chocolate pode ser afetada pelo tamanho das partículas, quanto maior o tamanho da partícula, menor será a viscosidade. Portanto, o tamanho da partícula é inversamente proporcional à tensão inicial e viscosidade plástica. E que quanto menor o tamanho de partículas, maior interação entre as partículas, aumentando a área superficial e resultando em melhor fluxo (AFOAKWA, 2010; BECKETT, 2011; KONAR et al., 2014).

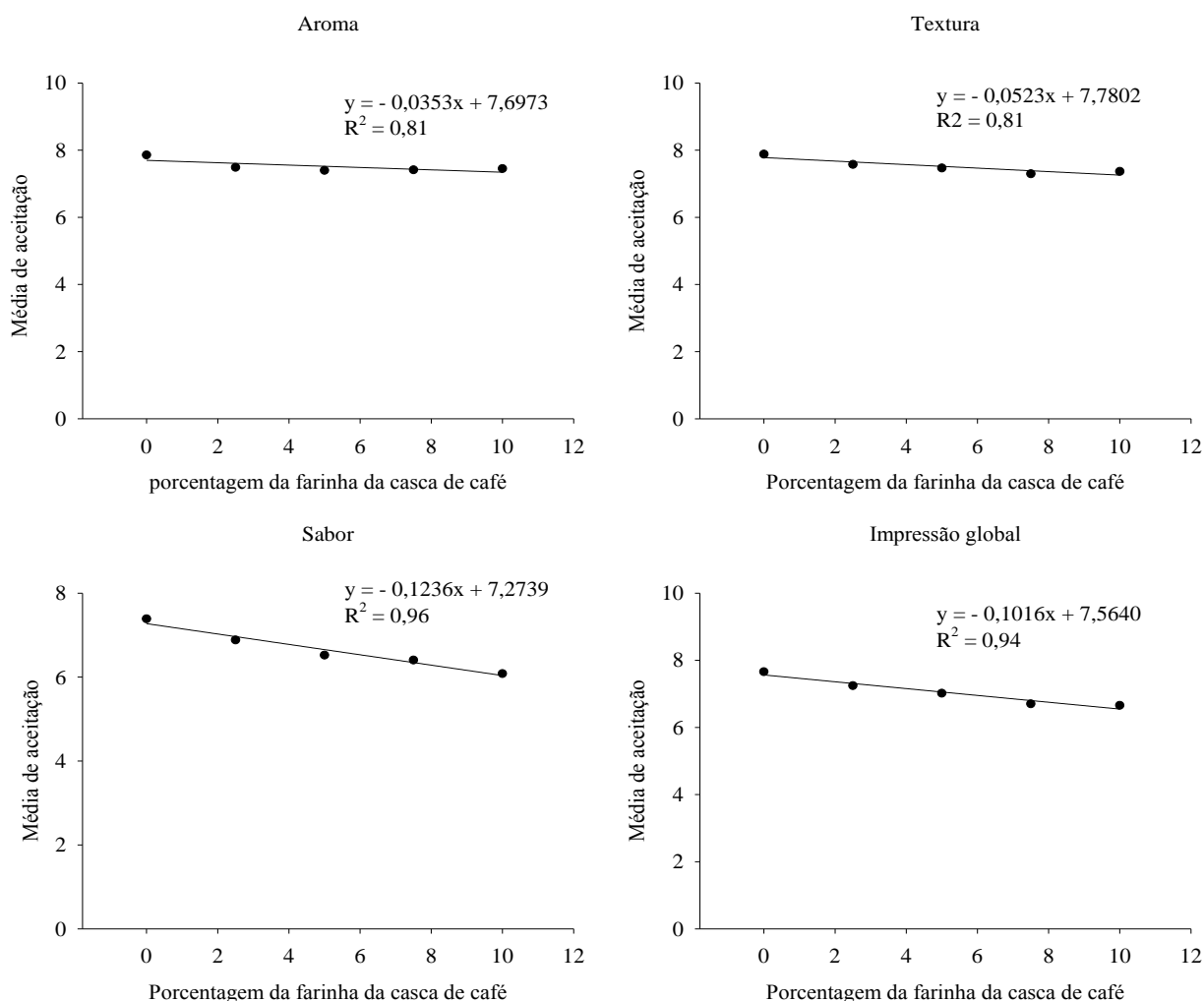
2.6. Análise sensorial: teste de aceitação e intenção de compra

Por meio das médias obtidas no teste de aceitação para os atributos, aparência, aroma, textura, sabor e impressão global, verificou-se que os atributos, aroma, textura, sabor e impressão global, apresentaram modelo de regressão linear significativo ($p < 0,05$), tendo apenas o atributo aparência, com pontuação média de 8,1, como atributo que não apresentou diferença estatística entre as formulações de chocolates estudadas, ou seja, a adição de até 10% da farinha de casca de café ao chocolate não promoveu uma alteração perceptível, entre os provadores, na aparência do produto. Portanto, não apresentou modelo de regressão linear ou quadrático significativo ($p > 0,05$).

Dentro de uma escala de nove pontos, médias acima de 6 pontos podem ser considerados como um produto de boa aceitação, então, mesmo ocorrendo redução nas médias para as formulações com adição da farinha da casca de café, estas ainda apresentaram boa aceitação entre os provadores. Verificou-se diante das médias, modelo ajustado e coeficiente de determinação, que os atributos aroma, textura, sabor e impressão global apresentaram efeito

linear decrescente em sua aceitação a medida que se aumentou a proporção da casca de café adicionada (Figura 9).

Figura 9. Atributos que apresentaram efeito linear decrescente no teste sensorial de ceitação.

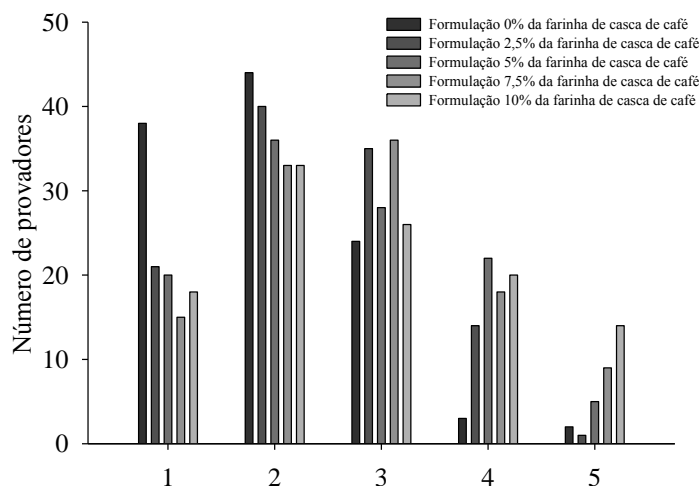


Observa-se que os provadores optaram por menores notas para o atributo sabor a medida em que aumentou a adição da FCC, tal comportamento pode estar relacionado com o sabor mais amargo perceptível nas formulações com adição da farinha da casca de café, pois para que a mesma fosse adicionada realizou-se a redução parcial da porcentagem de açúcar adicionado inicialmente, além da adstringência e acidez presentes naturalmente na casca de café. Desta forma, o sabor foi o parâmetro que mais gerou efeito na percepção sensorial, pois apresentou maior coeficiente de inclinação quando comparado aos demais atributos.

A percepção na diferença entre os parâmetros sabor, textura e aroma interferiram nas notas atribuídas para impressão global, porém as médias ainda se mantiveram boas com resultados acima de 6.

Após o teste de aceitação, os provadores foram questionados quanto a intenção de compra. O número de provadores que optarão por decididamente comprar ou não cada formulação, estão apresentados na Figura 10.

Figura 10. Resultado da intenção de compra dos provadores em relação as formulações de chocolate adicionados da farinha da casca de café.

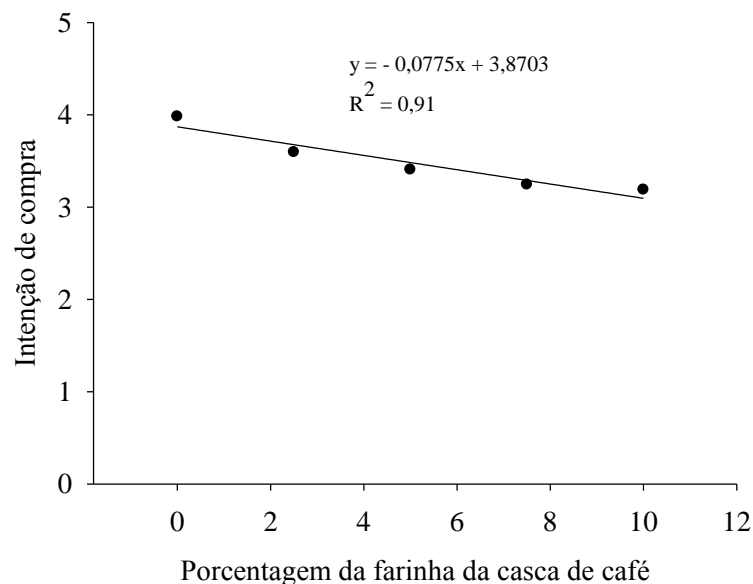


1 = decididamente compraria; 2= provavelmente compraria; 3 = talvez compraria; 4 = provavelmente não compraria; 5 = decididamente não compraria.

Mesmo com a percepção da diferença entre as notas dadas pelos provadores em cada amostra de chocolate, é possível notar que foram baixos o número de provadores que decididamente não comprariam o chocolate com maior adição da farinha da de casca de café.

Os valores médios obtidos em relação a intenção de compra entre os provadores, para a formulações de chocolate, apresentaram efeito linear decrescente a medida em que foram sendo adicionados maiores proporções da farinha da casca de café (Figura 11). A percepção da diferença entre as amostras, mais uma vez influenciou os provadores em suas notas, provavelmente a amostra sem adição da farinha, conseqüentemente mais doce, se tornou mais agradável ao paladar da maioria dos provadores pelo costume do consumo de chocolates mais convencionais, com menor conteúdo de cacau e maior de açúcar, já que este é um dos ingredientes que é adicionado em maior proporção em formulações de chocolate.

Figura 11. Efeito linear decrescente do parâmetro intenção de compra obtidos para as formulações de chocolate adicionados da farinha da casca de café.



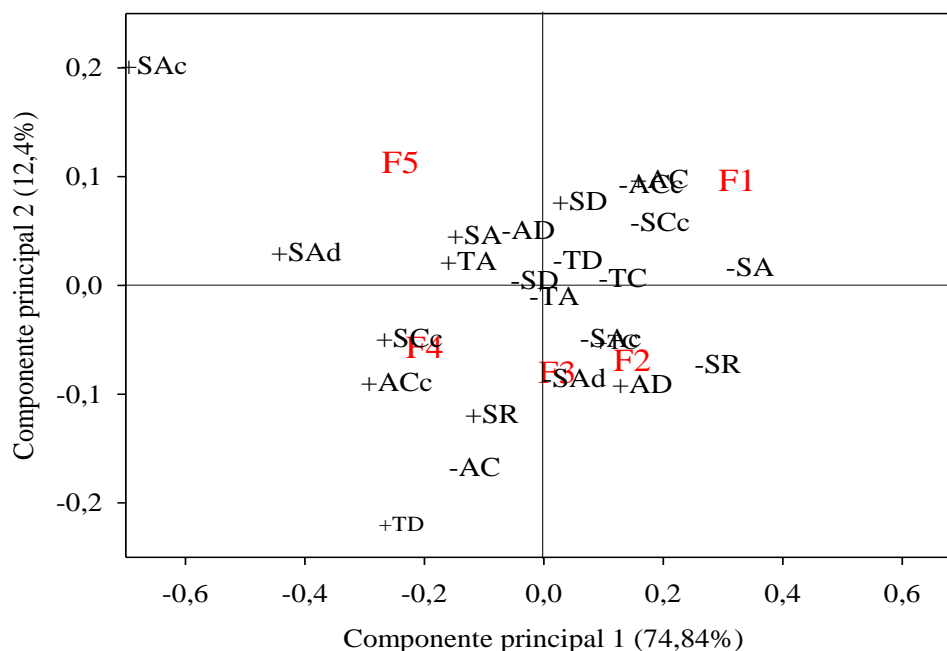
2.7. Análise sensorial: perfil sensorial *Check-All-That-Apply* (CATA)

A partir dos dados coletados no CATA foi possível construir o gráfico correspondente à análise dos componentes principais (ACP) apresentado na Figura 12. Por meio deste gráfico é possível observar a distância das amostras e a influência de cada atributo. Verificou-se que 74,84% da variação ocorrida entre as amostras foi explicada pelo primeiro eixo (Componente Principal 1) e 12,40% pelo segundo (Componente Principal 2). Os Componentes Principais 1 e 2 explicam juntos 87,24% da variação entre as amostras.

Observou-se que os provadores conseguiram perceber diferenças entre as formulações, pois foram escolhidos diferentes atributos com maior intensidade em cada uma delas. A F1 (formulação com 0% da farinha da casca de café) apresentou como características mais fortes o sabor doce e aroma de chocolate, já a F5 (formulação com 10% da farinha da casca de café) apresentou características mais marcantes relacionadas ao sabor ácido, adstringente e amargo, além da textura arenosa, resultados que comprovam a menor aceitação nos atributos sabor e textura entre as formulações.

As F2 (formulação com 2,5% da farinha da casca de café) e F3 (formulação com 5% da farinha da casca de café) apresentaram resultados muito próximos sendo classificadas pelo aroma doce, já a F4 (formulação com 7,5% da farinha da casca de café) ficou caracterizada por atributos como, sabor de casca de café e residual, aroma de casca de café e textura dura.

Figura 12. Análise de Componentes principais do perfil sensorial obtidos pelo método CATA.



F1= formulação com 0% de casca de café; F2= formulação com 2,5% de casca de café; F3= formulação com 5,0% de casca de café; F4= formulação com 7,5% de casca de café; F5= formulação com 10,0% de casca de café.
 + = forte; - = fraco; AC = aroma de chocolate; ACc = aroma de casca de café; AD = aroma doce; SA = sabor amargo; SD = sabor doce; SAC = sabor ácido; SAd = sabor adstringente; SCc = sabor de casca de café; SR = Sabor residual; TD = textura dura; TA = textura arenosa; TC = textura cremosa.

3. Conclusão

De acordo com os resultados observados para as determinações físico-químicas, microbiológicas, de textura, reológicas e sensoriais das formulações de chocolate avaliadas, verifica-se a que a adição da farinha de casca de café (FCC) promoveu modificações, porém sem comprometer composição e qualidade das formulações de chocolate.

Observou-se aumento significativo nas determinações de umidade, cinzas, proteína e acidez, além da redução da atividade de água. Contudo, estas alterações permaneceram em conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira, bem como do *Códex Alimentarius*.

Também se observa para as determinações (microbiológicas, ensaio de corte, perfil de textura e reologia), que ocorre diferenças entre as formulações testadas apenas para dureza e coesividade, avaliados no perfil de textura. Verificou-se, que a medida em que se adiciona a FCC aumenta-se a maciez das formulações de chocolate estudadas.

Quanto avaliação sensorial, constata-se que os provadores evidenciaram diferenças entre as formulações de chocolate testadas de acordo com os atributos avaliados. Destaca-se que as médias atribuídas foram positivas para todas formulações.

Referências

AFOAKWA, E. O. **Chocolate science and technology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and tecnologia**. Oxford: wiley-Blackwell, 2010, p. 1-51.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 840-857, 2008.

AFOAKWA, E. O; PATERSON, A; FOWLER, M.; VIEIRA, J. Microstructure and mechanical properties related to particle size distribution and composition in dark chocolate. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.111-119, 2009.

AGIBERT, S. A. C.; LANNES, S. C. S. Dark chocolate with a high oleic peanut oil microcapsule content. **Journal Science Food Agriculture**, v. 98, p. 5591-5597, 2018.

BECKETT S. 2009. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4th ed. Oxford, Oxfordshire (OXF), UK.: Blackwell Publishing Ltda.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. New Jersey: John Wiley & Sons, 4. ed. 2011.

BECKETT, S. T.; FOWLER, M. S.; ZIEGLER, G. R. **Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 5th ed.; Wiley Blackwell: West Sussex, UK, 2017.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, v. 27, p. 911-917, 1959.

BOHME, B.; SYMMANK, C.; ROHM, H. Physical and sensory properties of chocolate made with lecithin of different origin. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1839-1845, 2016.

BOURNE, M. **Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 2002. 415 p.

BRASIL. Leis, Decretos, Resolução número 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de julho de 1978. Seção I, parte 1, p. 11499-11527. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, Reativas a Alimentos (e Bebidas). Corrigidas pelo Comunicado número 37/80 da Divisão Nacional de Normas e Vigilância Sanitária de Alimentos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa N° 8, de 11 de junho de 2003. Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para a Classificação do Café Beneficiado Grão Cru. **Diário oficial da união**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 264, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chocolate e Chocolate Branco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 60, de 23 de novembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°. 269, de 22 de setembro de 2005a. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília, 2005.

CARVALHO, J. C. S.; ROMOFF, P.; LANNES, S. C. S. Improvement of nutritional and physicochemical properties of milk chocolates enriched with kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and grape (*Vitis vinifera*). **Food Science and Technology**, v. 38, p. 551-560, 2018.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. 4 ed. Curitiba: Ed. DA Champagnat, 2013. 531.p.

ERDEM, O.; GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M.; BERKTAS, I.; ERSAN, S.; TUNA, H. E.; KARADAG, A.; ÖZÇELİK, B.; GÜNES, G.; CUTTING, S. M. Development of a novel symbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber: optimization by response surface methodology. **Food Science and Technology**, v.56, p.187-193, 2014.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical **Manual Online**, 2005. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html> Acesso em 28/07/2014.

GONÇALVES, E. V.; LANNES, S. C. S. Chocolate rheology. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 845 – 851, 2010.

GLICERINA, V.; BALESTRA, F.; DALLA ROSA, M.; ROMANI, S. Modificações reológicas, texturais e calorimétricas de chocolate escuro durante o processo. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 173-179, 2013.

GLICERINA, V.; BALESTRA, F.; ROSA, M. D.; BERGENHSTÅL, B.; TORNBERG, E.; ROMANI, S. The Influence of Different Processing Stages on Particle Size, Microstructure, and Appearance of Dark Chocolate. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 1359-1365, 2014.

GUNARATNE, T. M.; VIEJO, C. G.; GUNARATNE, N. M.; TORRICO, D. D.; DUNSHEA, F. R.; FUENTES, S. Chocolate quality assessment based on chemical fingerprinting using near infra-red and machine learning modeling. **Foods**, v. 8, p. 426, 2019.

GUTIÉRREZ, T. J. State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 1313-1344, 2017.

HINNEH, M.; WALLE, D. V.; HAECK, J.; ABOTSI, E. E.; WINNE, A.; SAPUTRO, A. D.; MESSENS, K.; DURME, J. V.; AFOAKWA, E. O.; COOMAN, L.; DEWETTINCK, K. Aplicabilidade do melanger para refino de chocolate e misturador Stephan para conchagem como técnicas alternativas de produção de chocolate em pequena escala. **Journal of Food Engineering**, v. 253, p. 59-71, 2019.

IOCCC- INTERNATIONAL OFFICE OF COCOA, CHOCOLATE AND SUGAR CONFECTIONERY. Analytical Methods: 46 (2000) In: **Viscosity of Cocoa and Chocolate Products**. IOCCC, 2000.

KONAR, N. Influence of conching temperature and some bulk sweeteners on physical and rheological properties of prebiotic milk chocolate including containing inulin. **European Food Research and Technology**, v. 23, p. 135-143, 2013.

KONAR, N.; OZHAN, B.; DALABASMAZ, S.; POYRAZOGLU, E. S. Rheological and physical properties of inulin-containing milk chocolate prepared with different conditions. **CyTA-Journal of Food**, v. 12, p. 55-64, 2014.

KONAR, N.; TOKER, O. S.; OBA, S.; SAGDIC, O. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 35-44, 2016.

LEITE, P. B.; LANNES, S. C. S.; RODRIGUES, A. M.; SOARES, F. A. S. M.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Rheological study of chocolates made with different cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 192, 2013.

LONČAREVIĆ, I.; PAJIN, B.; FIŠTEŠ, A.; ŠAPONJAC, V. T.; PETROVIĆ, J.; JOVANOVIĆ, P.; VULIĆ, J.; ZARIĆ, D. Enrichment of white chocolate with blackberry juice encapsulate: Impact on physical properties, sensory characteristics and polyphenol content. **LWT- Food Science and Technology**, v. 92, p. 458-464, 2018.

MATISSEK, R.; SCHNEPEL, F.M.; STEINER, G. **Analisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones**. Zaragoza: Acribia, p. 416p, 1998.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31 p. 426-428, 1959.

OFFICIAL methods of analysis of the AOAC International - AOAC International Fruits and Fruit Products. Gaithersburg: Published by AOAC International. Cap. 37, 2010.

Official methods of analysis of the AOAC International. Soluble and Insoluble Dietary Fiber in foods - AOAC International. Method 991.43. Gaithersburg: Published by AOAC International, 1990.

PAJIN, B.; DOKIĆ, J. L.; ZARIĆ, D.; ŠORONJA-SIMOVIĆ, D.; LONČAREVIĆ, L.; NIKOLIĆ, L. Crystallization and rheological properties of soya milk chocolate produced in a ball mill. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 70-74, 2013.

PRAWIRA, M.; BARRINGER, S.A. Effects of conching time and ingredients on preference of milk chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 571-589, 2009.

PROSKY, L.; ASP, N. G.; SCHWEIZER, T. F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods products: interlaboratory study. **Journal Association of Analysis Chemistry**, v. 71, p. 1017-1023, 1988.

RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 357-369, 2007.

SCHUMACHER, A. B.; BRANDELLI, A.; MACEDO, F. C.; PIETA, L.; KLUG, T. V.; JONG, E. V. Chemical and sensory evaluation of dark chocolate with addition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Journal Food Science and Tecnology**, v. 47, p. 202–206, 2010.

SILVA, M. P.; TULINI, F. L.; MARINHO, J. F. U.; MAZZOCATO, M. C.; MARTINIS, E. C. P. de; LUCCAS, V.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BLC1: evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food Science and Technology**, v.75, p.640-647, 2017.

SON, Y.; CHOI, S.; YOO, K.; LEE, K.; LEE, S.; HWANG, I.; KIM, S. Anti-blooming effect of maltitol and tagatose as sugar substitutes for chocolate making. **Food Science and Technology**, v. 88, p. 87-94, 2018.

STORTZ, T. A.; MARANGONI, A. G. Heat resistant chocolate. **Trends Food Scienci Technology**, v. 22, p. 201–214, 2011.

TAN, J.; BALASUBRAMANIAN, B. M. Particle size measurements and scanning electron microscopy (SEM) of cocoa particles refined/conched by conical and cylindrical roller stone melangers. **Journal of Food Engineering**, v. 212, p. 146-153, 2017.

VISSOTTO, F., Z. Ingredientes e Aditivos. Processo Industrial de Fabricação de Chocolate. Campinas: Cereal Chocotec – ITAL, 2016.

ANEXO I

FICHA DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA – CHOCOLATE COM CASCA DE CAFÉ

Nome: _____ Data: ____/____/____

Sexo: () Feminino () Masculino Idade: _____

Você está recebendo amostras de chocolate com adição de casca de café. Por favor, prove as amostras e avalie o quanto você gostou ou desgostou das mesmas em relação à APARÊNCIA, AROMA, TEXTURA, SABOR e IMPRESSÃO GLOBAL. Entre as avaliações deguste o biscoito e enxague a boca com água. Para cada amostra coloque a nota referente aos atributos conforme a escala abaixo:

- (9) Gostei MUITÍSSIMO
- (8) Gostei Muito
- (7) Gostei Moderadamente
- (6) Gostei Ligeiramente
- (5) Indiferente (Nem gostei / nem desgostei)
- (4) Desgostei Ligeiramente
- (3) Desgostei Moderadamente
- (2) Desgostei Muito
- (1) Desgostei MUITÍSSIMO

Código da amostra	Atributos				
	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	Impressão global

Por favor, com relação à intenção de compra, você:

- (5) Decididamente eu compraria
- (4) Provavelmente eu compraria
- (3) Talvez sim / Talvez não
- (2) Provavelmente eu não compraria
- (1) Decididamente eu não compraria

Checagem de tudo que se aplica (*Check-All-That-Apply* (CATA))

Aroma	Sabor	Textura
(.....) Fraco de Chocolate	() Pouco amargo	() Pouco Duro
() Forte de Chocolate	() Muito amargo	() Muito Duro
() Fraco de Casca de café	() Pouco doce	() Pouco Arenoso
() Forte de Casca de café	() Muito doce	() Muito Arenoso
() Fraco de Doce	() Pouco Adstringente	() Pouco Cremoso
() Forte de Doce	() Muito Adstringente	() Muito Cremoso
	() Pouco Ácido	
	() Muito Ácido	
	() Fraco de Casca de café	
	() Forte de Casca de café	
	() Residual forte	
	() Residual fraco	

Capítulo VI

III Etapa

**INVESTIGAÇÃO DE FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EM CHOCOLATES ESCUROS
ADICIONADOS DE FARINHA DE CASCA DE CAFÉ (*Coffea arábica* L.)**

Resumo

Constituintes bioativos presentes em folhas, caules, cascas e sementes, subprodutos de baixo custo, podem ser utilizados em formulações de chocolates com intuito de aumentar as propriedades antioxidantes e contribuir em efeitos benéficos à saúde humana. Objetivou-se explorar a incorporação da farinha da casca de café (FCC) em formulações de chocolate escuro e avaliar o efeito desta adição na composição dos constituintes bioativos. Determinou-se, nos chocolates adicionados da FCC nas concentrações de 0,0%; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10,0%, os teores de fenólicos totais, flavonoides totais, capacidade antioxidante bem como os constituintes bioativos individuais por CLAE. Verificou-se que a adição de até 10% da FCC nos chocolates não foi suficiente para promover aumento significativo nos conteúdos de fenólicos e flavonoides totais, porém detectou-se aumento na capacidade antioxidante nas formulações de chocolate, o que permite garantir que a FCC acrescentou em constituintes bioativos com elevada capacidade antioxidante. A quantificação dos teores de constituintes bioativos individuais constatou que o aumento na capacidade antioxidante foi atribuído à presença dos constituintes bioativos da cafeína (77,68%) e teobromina (15,28%), justificando a importância do aproveitamento da adição da FCC nas formulações de chocolates estudadas. Assim, estudos devem ser estimulados quanto à utilização desse subproduto.

Palavras-chave: Constituintes fenólicos, capacidade antioxidante, CLAE, sustentabilidade.

1. Introdução

Compostos bioativos provenientes da dieta podem trazer benefícios à saúde por apresentarem ação antioxidante, sendo capaz de reverter quadros de estresse oxidativo em patologias, além de possuírem ação contra agentes microbianos (CASTRO et al., 2018; GRZESIK et al., 2018). Isso tem atraído a atenção da comunidade científica e da indústria alimentícia para o desenvolvimento dos “alimentos funcionais” ou alimentos ricos em um ou mais compostos bioativos que apresentam efeitos positivos na saúde (VIJAYALAXMI et al., 2015; RUI et al., 2017).

As sementes de cacau não fermentadas são ricas em constituintes bioativos (alcaloides e polifenóis) caracterizados como antioxidantes naturais. Os polifenóis mais abundantes nas sementes de cacau são proantocianidinas (58%), flavanóis (37%) e antocianinas (4%) (DI MATTIA et al., 2017). Do grupo de alcaloides, o mais representado é a teobromina (2 - 3%), enquanto a cafeína e a teofilina são encontradas em baixo conteúdo (APROTOSOAIIE et al.,

2015). As sementes de cacau cruas passam por diferentes processos antes de serem incluídas em formulação de chocolate, as etapas de fermentação, secagem, torrefação e moagem, contribuem para o conteúdo químico e bioativo do produto (DI MATTIA et al., 2017; TODOROVIC et al., 2015).

Durante o pré-processamento das sementes de cacau, que inclui as etapas de fermentação e secagem para obtenção das amêndoas, ocorrem perdas significativas nos constituintes fenólicos, sendo apontadas reduções de até 75% no teor de epicatequinas (ALBERTINI et al., 2015). Porém, nessas etapas também são formados precursores de sabor, como aminoácidos livres e açúcares redutores, que darão origem aos produtos da reação de Maillard e degradação de Strecker, principais responsáveis pelo perfil de sabor, através de aquecimento na etapa de torração durante o processamento das amêndoas para a obtenção de liquor de cacau (AFOAKWA et al., 2008).

Na fabricação do chocolate, que emprega a massa de cacau como principal ingrediente, a conchagem é uma etapa com reconhecida importância na melhoria de sabor e textura do produto, na qual ocorrem eliminação de voláteis como ácido acético, redução da umidade e interação de componentes. Porém, também ocorre perda e alteração no perfil de compostos fenólicos, com estudo menos explorado (DI MATTIA et al., 2014; BORDIGA et al., 2015).

Assim, estudos têm sido realizados com intuito de reinventar o chocolate através de desenvolvimento inovadores, concebidos para preservar os componentes bioativos benéficos do cacau, além de contemplar maior gama de constituintes no produto final. Sim et al., (2016) adicionaram ao chocolate o pó o pericarpo de mangostão (*Garcinia mangostana* L.) e verificaram que sua adição expandiu significativamente o perfil bioativo e o teor total de fenólicos (13% em chocolates escuros e 50% em chocolates compostos) em comparação com suas contrapartes simples, sem afetar as qualidades sensoriais.

Carvalho e Lannes (2018) ao adicionarem couve e uva liofilizada em chocolates, verificaram modificações nas características físicas, nutricionais e físico-químicas, pois os chocolates lácteos enriquecidos apresentaram maiores valores de fibras alimentares e conteúdo mineral, o que melhorou a qualidade nutricional do produto quando comparado aos chocolates simples. Muhammed et al. (2018) em estudo forneceram um novo método para melhorar as propriedades nutricionais do chocolate, empregando nanopartículas coloidais liofilizadas feitas de uma combinação de goma-laca, goma xantana e extrato de canela.

Dessa forma, a adição da farinha de casca de café torna-se mais uma opção para agregar maior valor nutricional ao chocolate além de poder ter a capacidade de elevar a composição de constituintes fenólicos e capacidade antioxidante considerando os comprovados efeitos. Murthy e Naidu (2012) reportaram em seus estudos que os resíduos de café (polpa, casca, tegumento e

borra) são ricos em nutrientes e compostos orgânicos como cafeína, taninos e polifenóis, e que seus extratos podem apresentar boa atividade antioxidante.

Esquivel e Jiménez (2012) e Del Castillo et al. (2018) determinaram que a casca de café possui alto conteúdo em carboidratos (35–85%), fibras solúveis (30,8%), minerais (3–11%) e proteínas (5–11%), sendo também rica de fitoquímicos como taninos (5–9%) e cianidinas (20%) constituintes importantes para as indústrias alimentícia. Considerando a sua composição química e as aplicações propostas, a casca de café tem um grande potencial como ingrediente alimentar e como fonte natural de nutrientes e constituintes bioativos.

Diante do exposto, observa-se crescente o número de publicações utilizando ingredientes não convencionais na elaboração de chocolates como, folhas de framboesa (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2012), folhas de urtiga (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015), pericarpo de mangostão (SIM et al., 2016), amora (LONČAREVIĆ et al., 2018), amora preta (GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN et al., 2016), gengibre e canela (ALBAK e TEKIN 2014), sendo adicionados como material em pó seco, extrato ou na forma encapsulada. Destaca-se que este é o primeiro estudo utilizando a farinha de casca de café, fonte de fitoquímicos bioativos e características funcionais, em formulações de chocolate como ingrediente não convencional ainda não explorado. Ademais, possibilitará um nobre destino das cascas de café até então, negligenciada pela cadeia produtiva.

Assim sendo, objetivou-se com o presente estudo explorar a incorporação da farinha da casca de café (FCC), resíduo agrícola de baixo custo e com comprovado conteúdo bioativo, em formulações de chocolate e avaliar o efeito desta adição na composição dos constituintes bioativos. A partir destes estudos vislumbra-se um amplo campo de investigações como alternativa a novos ingredientes não convencionais para indústria de chocolate. Além de atender nichos apreciadores por alimentos com apelo funcional.

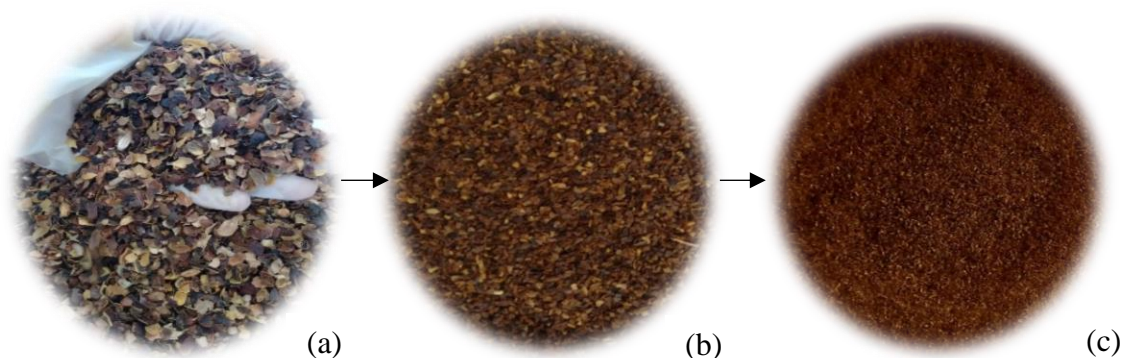
2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Itapetinga-BA. As formulações de chocolates foram produzidas no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados, as análises de fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante foram realizadas no laboratório do Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL) e a análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada no Laboratório de Métodos de Separações Químicas (LABMESC). Na condução do experimento foram realizadas três repetições, utilizadas em cada uma das análises.

2.1. Obtenção da casca de café

Foram utilizadas cascas de café da espécie *Coffea arabica L.*, produzidos com manejo orgânico na Fazenda Floresta - Povoado de Pau Ferrado, município de Ibicoara-BA, localizada na região da Chapada Diamantina, meridional 13°, 24', 50,7" latitude Sul e 41°, 17', 7,4" longitude oeste de Greenwich e altitude aproximada de 1.027 m acima do nível do mar. A precipitação mínima anual é de 1.179 mm e máxima anual de 1.868mm, sendo o maior nível encontrado de outubro a março (FAZENDA FLORESTA, 2012). As cascas de café previamente secas, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey (Solab, SL-031, Brasil), peneiradas para redução da granulometria das partículas em 60 mm e obtenção da farinha (Figura 1).

Figura 1. Cascas de café secas (a) e trituradas no moinho de facas (b) e farinha de casca de café com granulometria de 60 mm (c).



Fonte: próprio autor.

3.1. Processamento das formulações de chocolate

As formulações de chocolate foram previamente padronização em função do teor de sólidos de cacau (massa e manteiga de cacau) em 55% e lecitina de soja 0,4%. O teor de açúcar variou em função da adição de farinha de casca de café, testadas nas concentrações de 0,0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0%, conforme demonstrado na (Tabela 1).

Tabela 1. Formulação utilizada para produção dos chocolates 55% (sólidos totais de cacau) com adição da farinha de casca de café (FCC).

Ingredientes	F1	F2	F3	F4	F5
Massa de cacau	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0
Manteiga de cacau	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Açúcar refinado	44,6	42,1	39,6	37,1	34,6
Lecitina de soja	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Farinha de casca de café	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Total	100	100	100	100	100

F1= formulação com 0% de casca de café; F2= formulação com 2,5% de casca de café; F3= formulação com 5,0% de casca de café; F4= formulação com 7,5% de casca de café; F5= formulação com 10,0% de casca de café. Valores em porcentagem (%).

As formulações de chocolates escuro foram produzidas um moinho de pedra (Melanger Spectra 11, EUA) a temperatura média de $(57 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$, sendo nesta, realizada as etapas de conchagem e refino (Figura 2). Foram adicionados a massa de cacau e homogeneizada por 1 hora. Sequencialmente, misturou-se lentamente, o açúcar, a farinha de casca de café e parte da manteiga de cacau. A mistura dos ingredientes foi mantida sob agitação por 21 horas. Posteriormente, foram adicionadas a quantidade remanescente da manteiga de cacau. Finalmente, adicionou-se a lecitina, 30 minutos antes de finalizar a elaboração dos chocolates, totalizando assim, 24 horas de processamento.

Figura 2. Ilustração das etapas de moagem, mistura, conchagem e refino na Melanger Spectra 11.





Fonte: próprio autor.

Após o processo de mistura, refino e conchagem, o chocolate foi conduzido para o processo de temperagem em temperadeira (Finamac, Mini Chocomachine, São Paulo, Brasil) (Figura 3), o chocolate permaneceu por 30 min a 45 °C na temperadeira sob constante agitação, após isso, foi resfriado até atingir uma temperatura de 30 °C, para posterior moldagem em formas de acrílico.

Figura 3. Temperadeira utilizada no processo de temperagem do chocolate.



Fonte: próprio autor.

As formas passaram por vibração manual para evitar formação de bolhas de ar na superfície dos chocolates. Em seguida, foram refrigerados à temperatura de 4 °C. Após resfriados, os chocolates foram embalados com papel chumbo (Figura 4) e armazenados em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) para posterior análises.

Figura 4. Chocolates após processo de moldagem e embalagem.



Fonte: próprio autor.

2.2. Determinação dos constituintes fenólicos totais e individuais das formulações de chocolate

2.2.1. Determinação de Constituintes Fenólicos Totais (CFT)

Determinaram-se os CFT de acordo com a ISO 14502-1: (2005), utilizando-se o reagente de Folin-Ciocauteau. O ensaio fundamenta-se na redução dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela), por agentes redutores (constituintes fenólicos), originando os chamados complexos molibdênio-tungstênio de coloração azul. Assim, a alteração na coloração permite determinar a concentração das substâncias redutoras.

Para quantificação utilizou-se uma curva analítica de ácido gálico nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,09 mg. mL⁻¹. Os coeficientes de determinações das curvas analíticas não foram inferiores a 0,9992. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG). 100 g⁻¹ de amostra.

2.2.2. Determinação dos Constituintes Bioativos Individuais (CBI)

2.2.2.1. Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos das formulações de chocolate, pesou-se em tubos de ensaio aproximadamente 0,04 g de cada amostra e adicionou-se 5 mL de solução extratora (85 % água

ultrapura acidificada com 0,3 % de ácido acético, e 15 % metanol). A extração foi realizada em banho ultrassônico onde os tubos de ensaio permaneceram por 15 min. Na sequência, os tubos foram colocados em banho maria a 60°C por 10 min e, logo após, as amostras foram centrifugadas em centrífuga (Hethich, universal 320R, Alemanha) com rotação de 3000 g por 15 mi. Os extratos foram filtrados em filtros estéreis de 0,22 µm.

2.2.2.2. Identificação e quantificação compostos fenólicos e metilxantinas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para realizar a análise cromatográfica o gradiente composto da fase móvel foi estabelecido como: A (metanol) e B (água ultrapura acidificada com 0,3% de ácido acético). A coluna (Shim-Pack Prep-ODS (H) (octadecilsilano) de 25 cm e 4,6 mm) foi mantida a 30°C e com vazão de 0,5 mL.min⁻¹.

Um gradiente de eluição foi empregado para a separação dos compostos de interesse: 0-9 min, 95% de B; 9-12,5 min, 75% de B; 12,5-13,5 min, 5% de B; 13,5-28 min, 95% de B. O tempo total para separação dos compostos for de 28 min. A detecção foi realizada em 280 nm com injeção de 20 uL (RISNER, 2008).

Os alcaloides xantínicos (cafeína e teobromina) e compostos fenólicos majoritários do cacau ((+) -catequina e (-) -epicatequina) foram quantificados por meio do cromatografo (Shimadzu, DGU-20A5R, Japão).

2.3. Determinação de Flavonoides totais

Determinou-se de acordo com Sakanaka et al. (2005). A mistura reacional foi constituída 0,50 mL do extrato da amostra ou solução padrão, 2,50 mL de água destilada, seguido pela adição de 0,15 mL de uma solução de nitrito de sódio a 5%. Sequencialmente, após 6 min, foram adicionados 0,30 mL da solução de cloreto de alumínio a 10%, a mistura foi deixada repouso por mais 5 minutos. Por fim, foram adicionados 1,00 mL de hidróxido de sódio 1 M e 0,55 mL de água destilada, completando o volume para 5 mL. A absorbância foi medida imediatamente a 510 nm, utilizando um espectrofotômetro (UV-1800, Schimadzu, Japão). Os resultados foram expressos em mg catequina.100g⁻¹ de amostra.

2.4. Capacidade antioxidante das formulações de chocolate

2.4.1. Método do radical 2,2' – azino – bis – 3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfônico (ABTS)

Determinou-se a capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+} de acordo com RE et al. (1999). Previamente o radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da mistura reacional da solução aquosa de ABTS a 7 mM em 2,45 mM de persulfato de potássio, manteve-se essa mistura ao abrigo da luz, a temperatura ambiente por 16 horas. A solução radicalar foi diluída em etanol até obter uma leitura de absorvância $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. O ensaio baseia-se na redução do radical ABTS^{•+} de coloração azul-esverdeado, relativamente estável, por antioxidantes, resultando em um produto incolor oxidado ABTS.

As amostras com diferentes concentrações foram adicionadas à solução do ABTS^{•+} e após 6 min a absorvância foi medida em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão). Os resultados foram expressos em Concentração Efetiva média (CE₅₀), a partir da porcentagem de inibição do ABTS. A partir da porcentagem de inibição do ABTS das diferentes concentrações dos extratos, foram construídos os gráficos de dispersão, plotando-se no eixo Y a porcentagem de inibição e no eixo X as concentrações dos extratos (mg. mL⁻¹). Para calcular o CE₅₀ utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de Y por 50 para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do radical ABTS.

2.4.2. Inibição da oxidação acoplada do β-caroteno e ácido linoleico

Utilizou-se o sistema modelo do beta-caroteno e ácido linoleico, adotando o procedimento proposto por Marco (1968) modificado por Miller (1971). Este método utiliza o ácido linoléico, monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e o β-caroteno. Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β-caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico, ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico.

A mistura reacional foi constituída de 0,2 mL de amostra em diferentes concentrações e 5 mL de solução β-caroteno (1 mg de β-caroteno diluído em 10 mL de clorofórmio foi misturado a 20 mg de ácido linoléico e 200 mg do emulsificante Tween 20, após obtenção de uma solução homogênea, o clorofórmio foi removido da mistura em evaporador rotativo a 50 °C, em seguida adicionou-se 50 mL de água destilada sob vigorosa agitação). A mistura foi incubada a 50 °C durante 120 min, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 470nm em intervalos de tempo de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em porcentagem de capacidade antioxidante (CA%).

2.4.3. Ensaio do poder redutor relativo (PRR)

Determinou-se o PRR das amostras por meio da metodologia descrita por Oyaizu (1988). O ensaio fundamenta-se na capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe (III)/ ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], à forma ferrosa, Fe (II), em meio ácido para manter a solubilidade do ferro. Observando-se assim, a mudança da coloração amarela (Fe^{3+} /ferrocianeto) para tons de verde ou azul Fe (II).

A mistura reacional foi constituída de 1 mL de amostra e diferentes concentrações, 2,5 mL de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL da solução de ferricianeto de potássio na concentração de 1 g. 100g⁻¹. A mistura foi incubada a 100 °C por 20 min. Posteriormente, foi adicionado 2,5 mL da solução aquosa de ácido tricloroacético a 10 g.100 mL⁻¹, seguido de centrifugação a 1000 x g. Transferiu-se 2,5 mL dessa mistura para outros tubos de ensaio, e adicionou-se 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1 g.100 mL⁻¹, e agitou-se. O tubo branco foi preparado nas mesmas condições, excetuando-se a amostra. A partir das absorvâncias das diferentes concentrações dos extratos, foram construídos os gráficos de dispersão, plotando-se no eixo Y as absorvâncias e no eixo X as concentrações dos extratos (mg. mL⁻¹). Os resultados foram expressos em Concentração Efetiva média (CE₅₀). Para calcular o CE₅₀ utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de Y por 50 para obter a concentração de extrato com capacidade de reduzir 50% do complexo Fe (III)/ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]. A absorvância foi lida em 700 nm.

2.5. Delineamento experimental

O experimento seguiu um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com cinco tratamentos (0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% de adição da farinha de casca de café) em três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de regressão em função dos tratamentos à 5% de significância. Os modelos matemáticos foram escolhidos de acordo com os efeitos significativos do modelo proposto ($p < 0,05$), falta de ajustamento não significativa ($p > 0,05$) e coeficientes de determinação (R^2) em relação ao SQTRAT que foram capazes de explicar a variação total por meio da regressão ajustada. Todas as análises foram realizadas por meio do pacote estatístico *Statistical Analysis System® versão 9.0*.

3. Resultados e discussão

3.1. Constituintes fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e capacidade antioxidante (CA) das formulações de chocolate com adição da farinha de casca de café (FCC).

A influência da adição da FCC na composição de constituintes fenólicos totais, flavonoides totais e capacidade antioxidantes das formulações de chocolate, foi modelada estatisticamente. Para os conteúdos de CFT (2.543,29 mg de EAG. 100g⁻¹) e FT (621094 mg de catequina. 100g⁻¹) não houve modelo de regressão linear ou quadrático significativo ($p > 0,05$), indicando que até a porcentagem de 10% da FCC adicionado ao chocolate não foi o suficiente para promover aumento significativo na composição desses constituintes.

Apesar de não apresentar diferença na composição de CFT e FT entre as formulações de chocolate, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$), na capacidade antioxidante em todos métodos avaliados para investigar o efeito da adição da FCC. Pelo método do radical ABTS a adição da FCC nas formulações de chocolate, aumentou em até 15,73% a capacidade antioxidante, já para os ensaios β -caroteno e poder redutor o aumento foi de 70% e 6,97%, respectivamente.

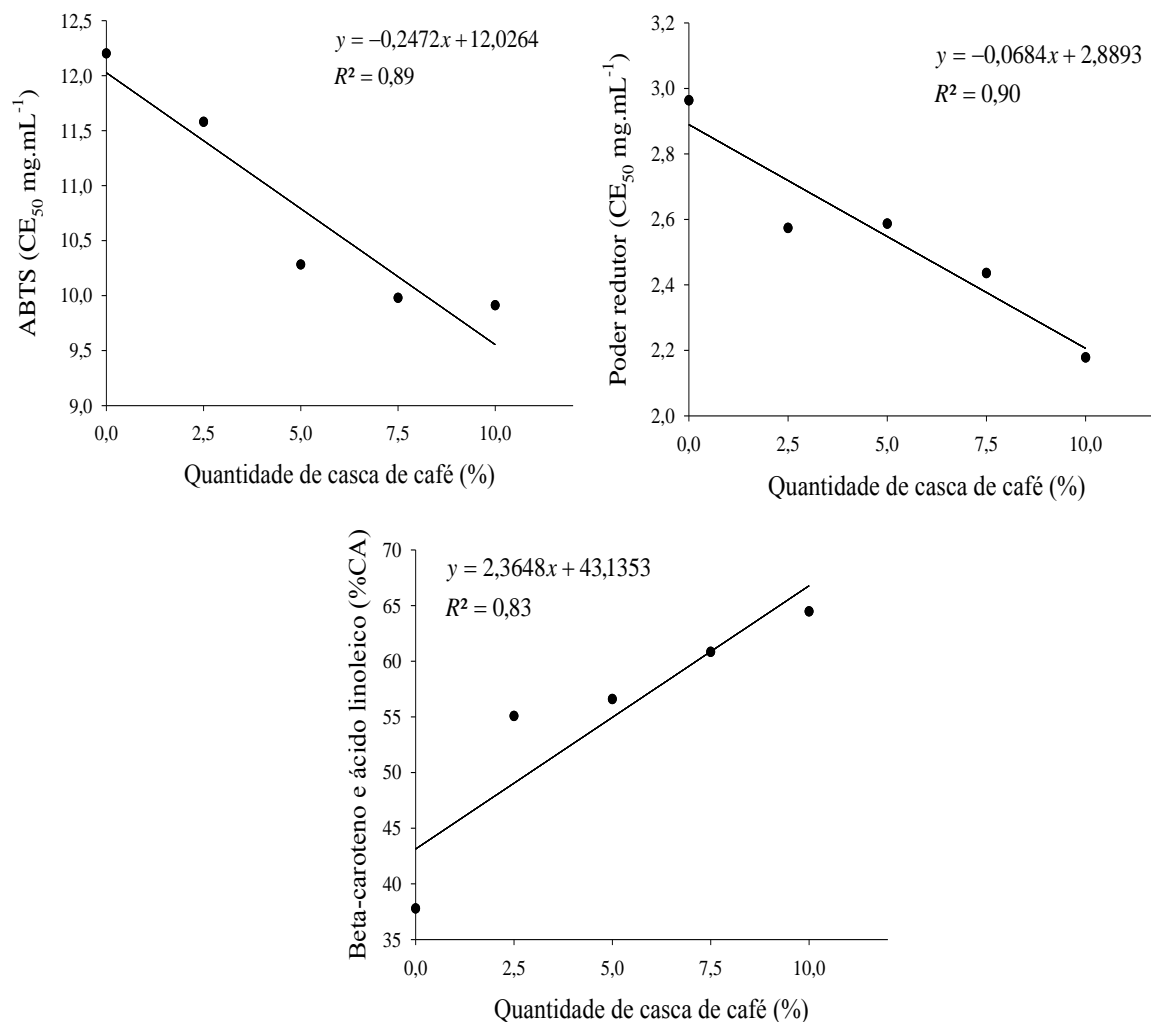
Observou-se um comportamento linear decrescente para as análises de ABTS⁺⁺ e poder redutor, a medida em que foi sendo adicionada a FCC os resultados foram diminuindo (Figura 5). Quanto menor os valores de resultados expressos por CE₅₀, melhor capacidade antioxidante, pois indicam que menores concentrações de amostra podem ser utilizadas para inibir 50% da ação do radical durante oxidação.

O ensaio de Inibição da oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico apresentou comportamento linear crescente (Figura 5), tal comportamento se deve ao fato de que os resultados foram expressos em capacidade antioxidante. Assim, percebe-se melhora na CA das formulações de chocolate a medida em que aumentou a porcentagem de farinha da casca de café adicionada.

Portanto, verificou-se que em todos os métodos testados (radical ABTS⁺⁺, PRR e β -caroteno e ácido linoleico) para avaliar a capacidade antioxidante das formulações de chocolate, a adição da FCC interferiu de forma positiva. Observa-se que apesar do conteúdo de constituintes fenólicos e flavonoides totais não apresentarem diferenças significativas entre as formulações de chocolate, a capacidade antioxidante das amostras foi maior quando se adicionou a FCC. Provavelmente, durante a produção dos chocolates ocorreram perdas de

alguns constituintes fenólicos e com adição da FCC obteve-se acréscimos de outros compostos que apresentam maior capacidade antioxidante.

Figura 5. Capacidade antioxidante das formulações de chocolate adicionados da FCC.



Yanagimoto et al. (2004) destacaram que a capacidade antioxidante do café está associada principalmente à presença de cafeína, trigonelina, ácido cafeico, produtos da reação de Maillard, de compostos voláteis (furanos e pirróis) e de compostos polifenólicos (ácido clorogênico e flavonoides). Tais constituintes estão presentes no café e, portanto, também na casca de café, e assim, podem agregar em maior funcionalidade ao chocolate.

3.2. Identificação e quantificação dos Constituintes Bioativos Individuais (CBI) por CLAE

Os CBI foram identificados e quantificados por meio da avaliação cromatográfica. Tal análise foi realizada com intuito de verificar o possível aumento na presença de constituintes bioativos do chocolate por meio da adição da FCC. Assim, na Figura 6, estão apresentados os cromatogramas das amostras de chocolate com 0% e 10% de casca farinha de café.

Observa-se que na formulação com 10% de casca de café ocorreu surgimento de novos picos relacionados à agregação de CBI presentes na casca de café. A casca de café possui além da cafeína outros constituintes bioativos como ácido clorogênico, ácido cafeico, taninos entre outros (BAQUETA et al., 2017).

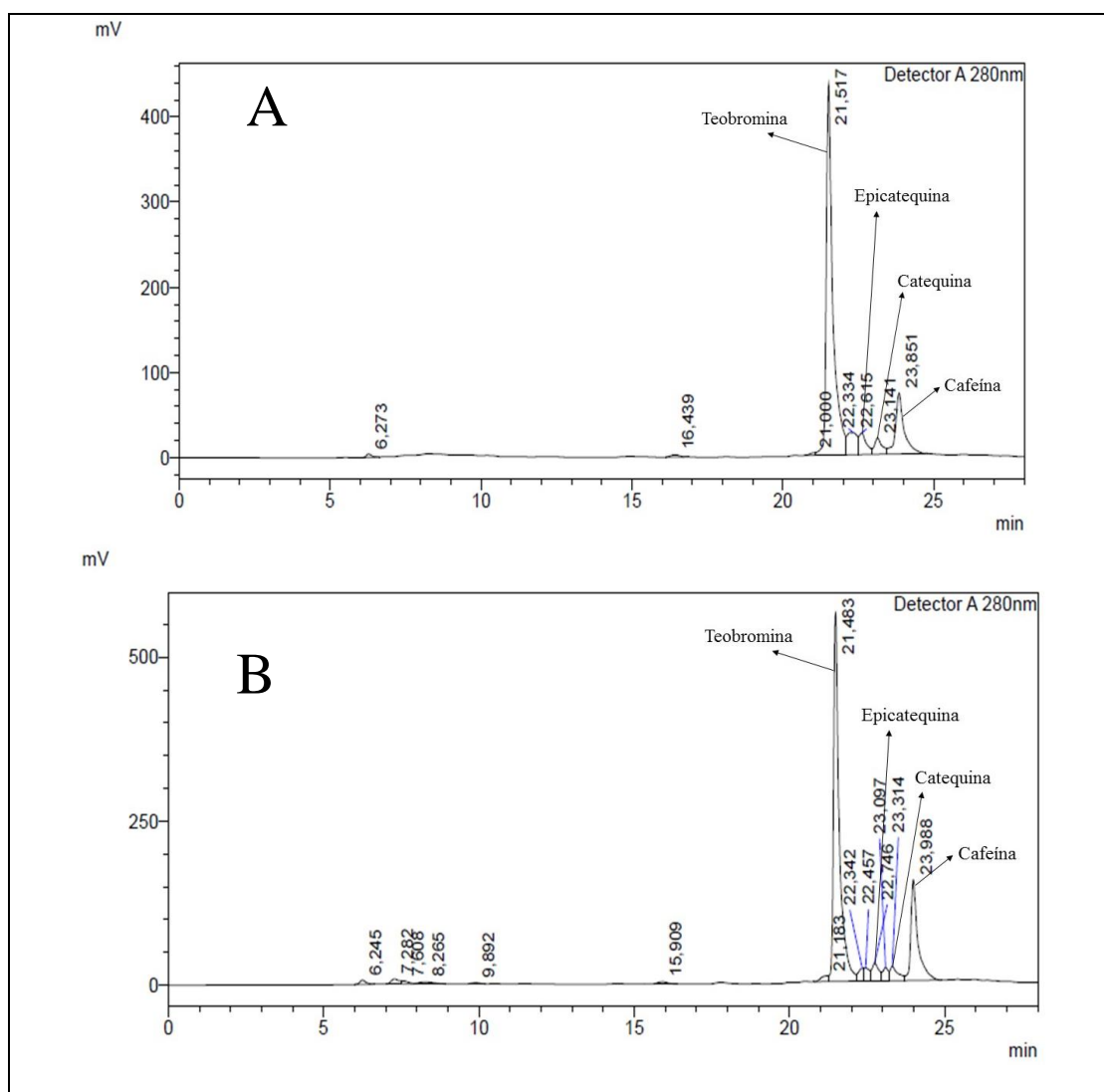
Além do surgimento de novos picos, nota-se também o aumento nas concentrações de teobromina e cafeína (Figura 6), principais constituintes identificados nas formulações de chocolate com 0% da FCC. Estes resultados justificam a melhora na capacidade antioxidante dos chocolates adicionados da FCC pois, estudos têm demonstrado que a cafeína é eficiente em captar radicais hidroxila e metoxila apresentando, portanto, elevada capacidade antioxidante (LEÓN-CARMONA e GLANO, 2012).

Os picos dos constituintes bioativos identificados (teobromina, catequina, epicatequina e cafeína) foram quantificados com intuito de investigar se adição da casca de café influenciou de forma significativa no aumento destes compostos nas formulações de chocolate.

Os flavonoides quantificados (catequina (88,19 mg. 100g⁻¹) e epicatequina (246,35 mg. 100g⁻¹)) não apresentaram modelo de regressão linear ou quadrático significativo ($p > 0,05$), portanto a adição da farinha da casca de café não acrescentou em aumento na composição destes constituintes.

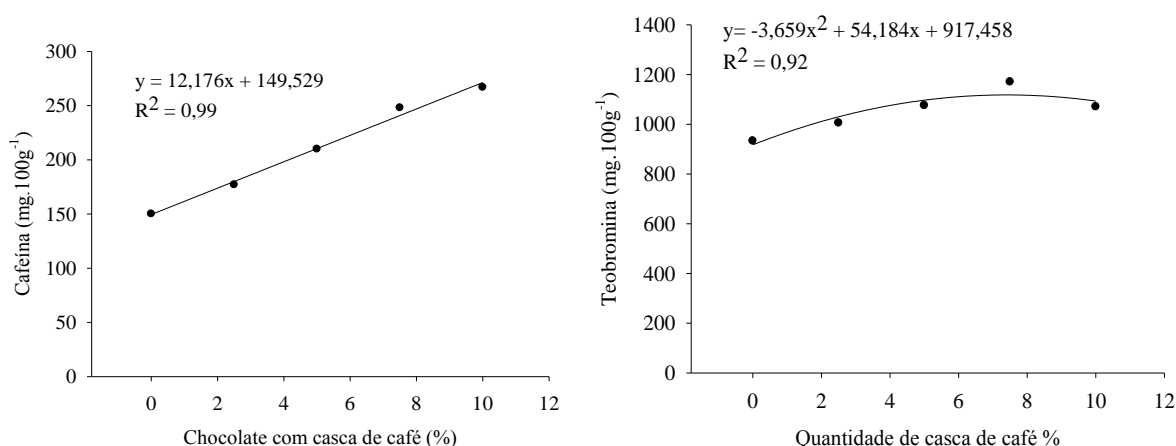
Resultados não significativos para a catequina também foram observados por Martini et al. (2018) ao avaliar o perfil fenólico de formulações de chocolate amargo e chocolate amargo enriquecido com folhas de chá verde e Sakura ou açafrão em pó. Os autores encontraram resultados próximos aos identificados no trabalho em questão, 166,57-50,93 mg. 100g⁻¹ e 66,20-71,13 mg. 100g⁻¹, respectivamente.

Figura 6. Cromatogramas representativo da identificação de constituintes fenólicos individuais nas formulações de chocolate. (A) chocolate com 0% da FCC, (B) chocolate com 10% da FCC.



Os resultados das metilxantinas (teobromina e cafeína) apresentaram modelo significativo ($p < 0,05$) entre as formulações de chocolate. Verificou-se comportamento linear para composição de cafeína e quadrático para teobromina (Figura 7). Aumento na composição de cafeína era esperado pois segundo Baqueta et al. (2017) as cascas de café são ricas em ácido clorogênico, cafeína e taninos. Dessa forma evidenciou um aumento expressivo da cafeína com 77,68% a mais em seu conteúdo na formulação de chocolate, já a teobromina apresentou aumento de 15,28%.

Figura 7. Cafeína e Teobromina quantificada nas formulações de chocolate adicionados de casca de café por meio da CLAE.



4. Conclusão

A adição de farinha de casca de café (FCC) nas formulações de chocolate (55% sólidos totais de cacau), resultou em aumento no conteúdo de constituintes bioativos nas formulações estudadas. Tais resultados foram confirmados pelo aumento da capacidade antioxidante entre as formulações a medida em que se aumenta a concentrações da FCC. Pelo método do radical ABTS a adição da FCC nas formulações de chocolate, aumentou em até 15,73% a capacidade antioxidante, já para os ensaios da oxidação do β -caroteno e ácido linoleico e poder redutor o aumento de 70% e 6,97%, respectivamente.

Constata-se a partir dos resultados observados por CLAE, um aumento significativo ($p < 0,05$) na composição das metilxantinas (teobromina 15,28% e cafeína 77,68%), resultando assim, na agregação de constituintes bioativos nas formulações de chocolate.

Assim, abre-se um a amplo campo de investigação na cadeia produtiva do café, a qual tem negligenciado quanto a utilização desse subproduto como ingrediente alimentício, bem como em formulações de chocolate, nicho até então, ainda não explorado.

Agradecimentos

Os autores gostariam de externar sua gratidão pelo apoio financeiro fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, Termo de outorga DTE004/2016 e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB pela concessão da bolsa de doutorado.

Referências

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 840-857, 2008.

ALBAK, F.; TEKIN, A.R. The effect of addition of ingredients on physical properties of dark chocolate during conching. **Journal of Food Science and Technology**, v. 1, p. 51-59, 2014.

APROTOSOAIÉ, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 73-91, 2015.

ALBERTINI, B.; SCHOUBBEN, A.; GUARNACCIA, D.; PINELLI, F.; DELLA VECCHIA, M.; RICCI, M.; BLASI, P. Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 9948-9953, 2015.

BAQUETA, M. R.; SILVA, J. T. P.; MOREIRA, T. F. M.; CANESIN, E. A.; GONÇALVES, O. H.; SANTOS, A. R.; COQUEIRO, A.; JUNIOR, B. D.; LEIMANN, F. V. Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal casca de café. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, p. 68-89, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – anvisa. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**. 2002.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; BENKOVIĆ, M.; KARLOVIĆ, S.; HEČIMOVIĆ, I.; JEŽEK, D.; BAUMAN, I. Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties, **Food Research International**. v. 48, p. 820-830, 2012.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; DURGO, K.; VOJVODIĆ, A.; BUŠIĆ, A. Nettle (*Urtica dioica* L.) extracts as functional ingredients for production of chocolates with improved bioactive composition and sensory properties, **Journal of Food Science and Technology**. v. 52, p. 7723-7734, 2015.

BORDIGA, M.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J. D.; MAZZA, G.; ARLORIO, M. Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: Antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 840-848, 2015.

CARVALHO, J. C. S.; ROMOFF, P.; LANNES, S. C. S. Improvement of nutritional and physicochemical properties of milk chocolates enriched with kale (*Brassica oleracea* var. acephala) and grape (*Vitis vinifera*). **Food Science and Technology**, v. 38, p. 551-560, 2018.

CASTRO, A. C. C. M.; ODA, F. B.; ALMEIDA-CINCOTTO, M. G. J.; DAVANÇO, M. G.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; CICARELLI, R. M. B.; PECCININI, R. G.; ZOCCOLO, G. J.; RIBEIRO, P. R. V.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B.; SANTOS, A. G. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48-57, 2018.

DEL CASTILLO, M. D.; FERNANDEZ-GOMEZ, B.; MARTINEZ-SAEZ, N.; IRIONDO-DEHOND, A.; MESA, M. D. (2018). **Coffee by-products**. In A. Farah (Ed.). *Coffee: Chemistry, quality and health implications*. Oxfordshire: Royal Society of Chemistry.

DI MATTIA, C.D.; SACCHETTI, G.; MASTROCOLA, D.; SERAFINI, M. From Cocoa to Chocolate: The Impact of Processing on *In Vitro* Antioxidant Activity and the Effects of Chocolate on Antioxidant Markers In Vivo. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1207, 2017.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. Functional properties of coffee and coffee byproducts. **Food Research International**, v. 46, p. 488-495, 2012.

GRZESIK, M.; NAPARŁO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, p. 480-492, 2018.

GULTEKIN-OZGUVEN, M.; KARADAG, A.; DUMAN, S.; OZKAL, B.; OZCELİK, B. fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessibility studies. **Food Chemistry**, v. 201, p. 205-212, 2016.

ISO, 2005. ISO14502-1: 2005 Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1. Content of total polyphenols in tea-colorimetric method using Folin–Ciocalteu reagent. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland.

LEÓN-CARMONA, J. R.; GALANO, A. free radical scavenging activity of caffeine's metabolites. **International Journal of Quantum Chemistry**. 2012, v. 112, p. 3472–3478, 2012.

LONČAREVIĆ, I.; PAJIN, B.; FIŠTEŠ, A.; ŠAPONJAC, V. T.; PETROVIĆ, J.; JOVANOVIĆ, P.; VULIĆ, J.; ZARIĆ, D. Enrichment of white chocolate with blackberry juice encapsulate: Impact on physical properties, sensory characteristics and polyphenol content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p 458-464, 2018.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594- 598, 1968.

MARTINI, S.; CONTE, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Comprehensive evaluation of phenolic profile in dark chocolate and dark chocolate enriched with Sakura green tea leaves or turmeric powder. **Food Research International**, v. 112, p. 1-16, 2018.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MUHAMMAD, D. R. A.; SAPUTRO, A. D.; ROTTIERS, H.; WALLE, D. V.; DEWETTINCK, K. Physicochemical properties and antioxidant activities of chocolates enriched with engineered cinnamon nanoparticles. **European food research and technology**, v. 244, p. 1185-1202, 2018.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 897-903, 2012.

- MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 66, p. 45-58, 2012.
- OYAIZU, M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, v. 35, p. 771-775, 1988.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- RISNER, C. H. Simultaneous Determination of Theobromine, (+)-Catechin, Caffeine, and (-)-Epicatechin in Standard Reference Material Baking Chocolate 2384, Cocoa, Cocoa Beans, and Cocoa Butter. *Journal of Chromatographic Science*, v. 46, p. 892-899, 2008.
- RUI, L.; XIE, M.; HU, B.; ZHOU, L.; SAEEDUDDIN, M.; ZENG X. Enhanced solubility and antioxidant activity of chlorogenic acid-chitosan conjugates due to the conjugation of chitosan with chlorogenic acid. *Carbohydr Polym*, v. 170, p. 206-216, 2017.
- SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, v. 89, p. 569-575, 2005.
- SIM, S. Y. J.; FORDE, C. G.; HENRY, C. J. Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. *Food Chemistry*, v. 200, p. 46-54, 2016.
- TODOROVIC, V.; RAJDOCIC REDOVNIKOVIC, I.; TODOROVIC, Z.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M.; SOBAJIC, S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal Food Composition Analysis*, v. 41, p. 137-143, 2015.
- VIJAYALAXMI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, p. 2761-2769, 2015.
- YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 592-596, 2004.