



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



Área de concentração: Ciência de Alimentos

INFLUÊNCIA DOS ÍNDICES DE FERMENTAÇÃO DAS AMÊNDOAS NAS
CARACTERÍSTICAS DE CHOCOLATES COM ELEVADO TEOR DE CACAU

Autor: Raphael Patury Lins
Orientadora: Prof^ª. DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
FEVEREIRO DE 2023

RAPHAEL PATURY LINS

**INFLUÊNCIA DOS ÍNDICES DE FERMENTAÇÃO DAS AMÊNDOAS NAS
CARACTERÍSTICAS DE CHOCOLATES COM ELEVADO TEOR DE CACAU**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção de Título de Mestre junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

Orientadora Prof.^a DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Coorientadores: Prof.^o. DSc. Leandro Soares Santos

DSc. Grazielly de Jesus Silva

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
FEVEREIRO DE 2023

633.74
L733i

Lins, Raphael Patury.

Influência dos índices de fermentação das amêndoas nas características de chocolates com elevado teor de cacau. / Raphael Patury Lins. – Itapetinga-BA: UESB, 2023.

76f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção de Título de Mestre junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Área de Concentração: Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e coorientação do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos e D. Sc. Grazielly de Jesus Silva.

1. Amêndoas de cacau - Fermentação. 2. Amêndoas de cacau - Qualidade. 3. Chocolates – Teor de cacau - Análises. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. III. Santos, Leandro Soares. IV. Silva, Grazielly de Jesus. V. Título.

CDD(21): 633.74

Catlogação na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Chocolates - Análise sensorial
2. Chocolates - Processamento
3. *Theobroma cacao*

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO


Título: “INFLUÊNCIA DOS ÍNDICES DE FERMENTAÇÃO DAS AMÊNDOAS NAS CARACTERÍSTICAS DE CHOCOLATES COM ELEVADO TEOR DE CACAU.”


Autor (a): RAPHAEL PATURY LINS

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Sibelli Passini Barbosa Ferrão

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


Prof.^a Dr.^a Gabrielle Cardoso Reis Fontan
UESB


Prof.^a Dr.^a Larissa Kaully Rosa Silva
Membro Externo - UFOB


Prof.^a Dr.^a Sibelli Passini Barbosa Ferrão
Orientadora - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 27 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram de forma significativa para a conclusão deste trabalho de dissertação. Esta jornada acadêmica foi desafiadora e gratificante, e não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de muitos.

Primeiramente, quero agradecer à minha esposa Ariela, que sempre esteve ao meu lado, apoiando-me em todas as etapas, eu dedico um agradecimento especial. Suas palavras de incentivo, amor incondicional e compreensão foram meu alicerce durante os momentos desafiadores.

À minha amada filha, Melina, por ser minha fonte inesgotável de incentivo e determinação ao longo desta jornada. As idas e vindas, as noites em que tive que me afastar para estudar, as horas de pesquisa solitária e os momentos de ansiedade foram todos amenizados pela certeza de que estava fazendo isso não apenas por mim, mas também por você. Sua presença em minha vida deu um propósito mais profundo a cada passo que dei nesta jornada.

Aos meus queridos pais Augusto e Amália, que com amor e gratidão profundos, agradeço por serem minha base sólida, sempre presentes, oferecendo segurança incondicional e apoio inabalável em todos os momentos da minha vida. Vocês são a inspiração de minha vida.

À toda equipe do Grupo de Estudos em Leite (GEL), em especial a Josane Cardim e Rebeca Vieira, obrigado por compartilharem suas ideias, experiências e apoio. Suas discussões e debates enriqueceram minha pesquisa e meu crescimento acadêmico.

A meu amigo Silas por sua generosidade em abrir as portas de sua casa. As ideias e risadas compartilhadas, bem como nossa parceria duradoura, são verdadeiros tesouros que guardo com grande estima. Em especial também a minha amiga Charline por todo companheirismo, ensinamentos e incentivos em todos os momentos.

À minha professora/orientadora, Sibelli Passini, pela orientação, paciência e apoio ao longo deste processo. Obrigado pela confiança, sou imensamente grato por sua orientação.

Agradeço também aos professores e funcionários da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade de formação acadêmica.

Às pessoas que participaram da pesquisa, seja como participantes voluntários e meus julgadores pela dedicação à realização das análises sensoriais, sua contribuição foi inestimável para este estudo.

Agradeço também a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A toda minha família e amigos, que sempre foram os maiores apoiadores e torcedores pelo meu sucesso. Sua constante presença e encorajamento foram fundamentais para mim e sou imensamente grato por tê-los em minha vida.

Muito obrigado a todos!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Cacau	11
2.2. Fermentação das amêndoas de cacau.....	13
2.3. Chocolate	16
2.4. Processamento do chocolate	19
2.5. Compostos bioativos.....	21
2.6. Capacidade antioxidante	23
2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
2.8. Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR).....	27
2.9. Análise sensorial de chocolate	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Obtenção e caracterização física das amêndoas de cacau.....	31
4.2. Produção do chocolate	33
4.3. Caracterização dos nibs e chocolates	34
4.3.1. Caracterização físico-química e composição química	34
4.3.2. Determinação dos compostos fenólicos totais	35
4.3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante - Ensaio de eliminação de radicais (DPPH).....	35

4.3.4. Quantificação de Teobromina, Cafeína, Epicatequina e Catequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	36
4.3.5. Determinação de Taninos Condensados – método Vanilina.....	37
4.3.6. Análise de Espectroscopia no infravermelho médio (MIR).....	37
4.3.7. Análises microbiológicas	37
4.3.8. Análise Sensorial.....	38
4.3.8.1. Perfil Descritivo Otimizado – PDO	38
4.3.8.2. Aceitação e Intenção de Compra.....	40
4.3.9. Delineamento experimental e Análise Estatística	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Caracterização física das amêndoas de cacau	42
5.2. Composição e parâmetros físico-químicos dos nibs de cacau e chocolates produzidos	42
5.3. Teor de compostos bioativos e antioxidante dos nibs de cacau e chocolates produzidos	46
5.4. Espectroscopia de Infravermelho Médio (MIR).....	54
5.5. Análise microbiológica dos chocolates.....	56
5.6. Análise Sensorial dos Chocolates.....	56
5.6.1 Aceitação e Intenção de Compra.....	56
5.6.2 Perfil Descritivo Otimizado (PDO).....	59
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais variedades de cacau.....	12
Figura 2. Cochos de madeira para fermentação do cacau.	14
Figura 3. Estufas solares com mesa de tela para secagem das amêndoas de cacau.	16
Figura 4. Fluxograma do processamento do chocolate	19
Figura 5. Estrutura dos flavonoides catequina e epicatequina.	22
Figura 6. Estrutura química das Metilxantinas.....	23
Figura 7. Cochos de madeira Putumuju para fermentação das amêndoas de cacau.....	31
Figura 8. Processo de fermentação das amêndoas de cacau. (A) Fase anaeróbica, (B) Fase acética e (C) Secagem em barcaças solares.....	32
Figura 9. Prova de Corte realizada na tábua de classificação para amêndoas de cacau. (A) Índice de fermentação 90%, (B) Índice de fermentação (70%) e (C) Índice de fermentação (50%)..	42
Figura 11. Cromatograma geral obtido por CLAE dos compostos bioativos dos chocolates elaboradas a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação (A). cromatograma referente a teobromina (B) e cafeína (C).	51
Figura 12. Espectros de absorção na região do infravermelho médio dos nibs produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.....	54
Figura 13. Espectros de absorção na região do infravermelho médio dos chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.....	55
Figura 16. Mapa sensorial dos chocolates produzidos a partir de amêndoas de cacau com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Termos descritores, definições e materiais de referência.	39
Tabela 2. Valores médios (\pm DP) de composição química e parâmetros físicos dos nibs produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.	43
Tabela 3. Valores médios (\pm DP) da composição química e características físicas dos chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.	45
Tabela 4. Valores médios (\pm DP) de fenólicos totais, atividade antioxidante, teobromina, cafeína, catequina, epicatequina dos nibs produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.	48
Tabela 5. Valores médios (\pm DP) para fenólicos totais, atividade antioxidante, teobromina, cafeína, catequina, epicatequina dos chocolates produzidos com amêndoas de diferentes índices de fermentação.	52
Tabela 6. Valores médios (\pm DP) para as notas obtidas no teste de aceitação dos chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).	56
Tabela 7. Valores médios (\pm DP) para as notas obtidas no Perfil Descritivo Otimizado para os chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).	60

RESUMO

LINS, R.P. **Influência dos índices de fermentação das amêndoas nas características de chocolates com elevado teor de cacau.** Itapetinga, BA: UESB, 2023. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos). *

O consumo de chocolate com alto teor de cacau tem se tornado cada vez mais popular em todo mundo. Esse fenômeno pode ser explicado por vários fatores, sendo alguns deles o potencial impacto positivo na saúde além de seu sabor intenso e amargo, que pode ser mais apreciado por muitas pessoas do que o sabor do chocolate comum. É obtido de amêndoas de cacau sendo cada vez mais reconhecido como um alimento funcional ou nutracêutico, relacionados à presença de compostos fenólicos nas amêndoas, no entanto seus teores são diminuídos durante o processamento. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a influência do índice de fermentação de amêndoas de cacau da variedade Forasteiro (Pará/Parazinho) sobre as características físicas, químicas, nutricionais e sensoriais de chocolate. As amêndoas foram obtidas de acordo com índices de fermentação próximos a 50%, 70% e 90%. Foram realizadas análises nos nibs e chocolates produzidos com o objetivo de avaliar os teores de umidade, gordura, proteínas, resíduo mineral fixo, acidez, pH, açúcares totais e redutores. Além disso, foram quantificados os compostos bioativos teobromina, cafeína, catequina e epicatequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), bem como o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH). Avaliou-se também os perfis espectroscópicos das amostras de nibs e chocolate por Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR). As formulações dos chocolates foram também avaliadas em relação aos padrões microbiológicos, perfil sensorial por perfil descritivo otimizado (PDO) e teste de aceitação e intenção de compra. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Em relação aos compostos bioativos e fenólicos totais, observou-se uma diminuição desses constituintes à medida que se aumentou o índice de fermentação das amêndoas utilizadas para produção dos nibs e chocolates. A utilização de amêndoas de cacau com índices de fermentação menores, em torno de 50%, apresentou uma boa aceitação e intenção de compra, demonstrando ser uma alternativa quando se deseja produzir derivados do cacau com maiores conteúdos de substâncias bioativas e funcionais, sem grandes prejuízos em relação as características de adstringência e amargor relacionados a esses compostos.

Palavras-chave: Compostos bioativos, análise sensorial, *Theobroma cacao*, nibs de cacau.

ABSTRACT

LINS, R.P. **Influence of fermentation index of cocoa beans on characteristics of high cocoa content chocolates.** Itapetinga, BA: UESB, 2023. Dissertation. (Master in Food Engineering and Science, Area of Concentration in Food Science). *

The consumption of high-cocoa chocolate has become increasingly popular worldwide. This phenomenon can be explained by various factors, including its potential positive impact on health, as well as its intense and bitter flavor, which can be appreciated by many people more than the taste of ordinary chocolate. It is obtained from cocoa beans and is increasingly recognized as a functional food or nutraceutical, related to the presence of phenolic compounds in the beans, although their levels are reduced during processing. In this context, the objective was to evaluate the influence of the fermentation index of Forastero cocoa beans (Pará/Parazinho variety) on the physical, chemical, nutritional, and sensory characteristics of chocolate. The beans were obtained according to fermentation indexes close to 50%, 70%, and 90%. Analyses were carried out on the nibs and chocolates produced to evaluate the contents of moisture, fat, protein, fixed mineral residue, acidity, pH, total and reducing sugars. In addition, the bioactive compounds theobromine, caffeine, catechin, and epicatechin were quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), as well as the total phenolic compounds and antioxidant activity (DPPH). The spectroscopic profiles of the nibs and chocolate samples were also evaluated by Mid-Infrared Spectroscopy (MIR). The chocolate formulations were also evaluated in relation to microbiological standards, sensory profile by Optimized Descriptive Profile (ODP), and acceptance and purchase intent test. The data obtained were subjected to analysis of variance and Tukey's test at the 5% significance level. Regarding the bioactive and total phenolic compounds, a decrease in these constituents was observed as the fermentation index of the beans used for the production of nibs and chocolates increased. The use of cocoa beans with lower fermentation indexes, around 50%, showed good acceptance and purchase intent, demonstrating to be an alternative when it is desired to produce cocoa derivatives with higher contents of bioactive and functional substances, without significant losses in relation to the astringency and bitterness characteristics related to these compounds.

Keywords: bioactive compounds, sensory analysis, *Theobroma cacao*, *Cocoa Nibs*.

1. INTRODUÇÃO

O chocolate é um alimento muito apreciado e consumido em várias partes do mundo, por pessoas de todas as classes e idades e caracteriza-se pelo seu sabor e alto valor energético, sendo obtido através do processamento da amêndoa de cacau (*Theobroma cacao* L.) com adição de outros ingredientes como açúcar, manteiga de cacau, leite (dependendo do tipo de chocolate) e lecitina (KRUSZEWSKI; OBIEDZIŃSKI, 2018).

Devido à presença de antioxidantes naturais em sua composição, as amêndoas de cacau são alvo de diversas pesquisas científicas relacionadas aos seus potenciais efeitos benéficos à saúde cardiovascular, proteção antioxidante e auxílio no equilíbrio do colesterol (GONZÁLEZ-BARRIO *et al.*, 2020; PEREZ; LOPEZ-YERENA; VALLVERDÚ-QUERALT, 2021). As propriedades pró-saúde estão diretamente relacionadas à presença de compostos fenólicos (epicatequina e catequina) e metilxantinas como teobromina e cafeína, presentes nas amêndoas de cacau e que são responsáveis pelos sabores amargo e adstringente da amêndoa no chocolate (URBAŃSKA; KOWALSKA, 2019; MCCLURE; HOPFER; GRÜN, 2022).

Durante o processamento da amêndoa de cacau ocorrem inúmeras transformações para a produção do chocolate que envolvem as etapas de pré-processamento (colheita, fermentação e secagem) e o processamento tecnológico como torrefação, refino, conchagem e temperagem (BARIŠIĆ *et al.*, 2019b). A fermentação e secagem são etapas críticas que determinam a qualidade da amêndoa de cacau e o desenvolvimento de precursores de sabor e aroma do chocolate (ESCOBAR *et al.*, 2021). Por outro lado, a formação desejável do sabor e aroma referente com as notas características de chocolate está relacionada com a diminuição do teor de compostos fenólicos totais e metilxantinas durante essas fases (FEBRIANTO; ZHU, 2022; MAN *et al.*, 2005).

O processo de fermentação promove uma redução de 30% no teor de polifenóis nas primeiras 48 h, podendo atingir níveis de até 90% ao final do processo (EFRAIM *et al.*, 2010), enquanto que na etapa de secagem ocorrerá o escurecimento dos cotilédones como resultado das reações de oxidação e catálise realizadas pela polifenoloxidase (MORA-ENCALADA *et al.*, 2021). Após anos de investigação, foi estabelecido que a cadeia produtiva do chocolate impacta diretamente no aroma e sabor final do produto, sendo influenciado por fatores como origem geográfica das amêndoas de cacau, o armazenamento pós-colheita, o processo fermentativo, a secagem, a torrefação e a conchagem (AFOAKWA *et al.*, 2008; EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; HINNEH *et al.*, 2018). No entanto a utilização de amêndoas de cacau com diferentes índices de fermentação para produção de chocolates é pouco explorada, apesar

do impacto que a composição química das amêndoas pode ter na característica sensorial do chocolate.

As amêndoas de cacau não fermentadas ou subfermentadas já apresentam alguns compostos voláteis de aroma e sabor e um maior teor de compostos bioativos relacionados aos compostos não voláteis (BRITTO DE ANDRADE *et al.*, 2021). Essas substâncias apresentam uma série de benefícios para saúde humana e por isso muitos consumidores estão em busca de derivados do cacau que mantenham esses constituintes nos produtos que venham ser consumidos, o que tem despertado o interesse pela indústria alimentícia em mantê-los durante o processamento dos derivados do cacau, como o chocolate (EFRAIM *et al.*, 2010; LONČAREVIĆ *et al.*, 2018). A utilização de amêndoas de cacau com menores índices de fermentação pode conferir propriedades sensoriais únicas e desejáveis, com um sabor mais adstringente e amargo, além de preservar uma maior concentração de compostos antioxidantes, como os polifenóis, e o conteúdo de metilxantinas. Essas características sensoriais específicas podem contribuir para a complexidade do sabor do chocolate, proporcionando uma experiência gustativa diferenciada e de alta qualidade para os consumidores.

A análise da concentração desses compostos pode ser realizada através de diversos métodos laboratoriais. O ensaio DPPH (difenil-1picril-hidrazila) é um método comumente utilizado para medir a atividade antioxidante de compostos por ser rápido, sensível e acessível, sendo amplamente utilizado na avaliação de amêndoas de cacau e chocolate (DEUS *et al.*, 2021b). A espectrofotometria é um método que mede a absorção de luz em comprimentos de onda específicos para quantificar a presença de compostos antioxidantes específicos, como os fenólicos totais. Para avaliar os compostos bioativo presentes em amostras e quantificar suas concentrações a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é comumente utilizada pois permite a separação de componentes semelhantes em misturas complexas. É a técnica mais utilizada na determinação de flavonóides e metilxantinas presentes nas amêndoas de cacau e chocolates. Portanto, esses métodos podem ser combinados para obter uma avaliação mais completa dos compostos antioxidantes, polifenóis e metilxantinas presentes em amostras de amêndoas de cacau e chocolates (JÚNIOR *et al.*, 2020).

Assim, torna-se essencial avaliar os efeitos do uso de amêndoas com índices de fermentação distintos na produção de chocolate, a fim de avaliar a preservação dos compostos bioativos durante todo o processo produtivo, além do impacto nas características sensoriais de chocolates com alto teor de cacau.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cacau

O cacau tem uma longa história relacionada com a evolução da sociedade e economia humana. O nome latino do gênero *Theobroma*, significando o “alimento dos Deuses”, revela a importância dada ao longo da história, ao cacau e ao seu produto final mais conhecido, o chocolate (SARBU; CSUTAK, 2019).

O cacauzeiro é uma planta nativa das florestas tropicais das Américas, que cresce em regiões com altas temperaturas e alta pluviosidade em todo o mundo. Pertence à família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L., sendo uma planta encontrada no continente Sul Americano, que em condições naturais pode ultrapassar os cem anos. Possui uma altura em média de 6 a 8m, e para um bom crescimento necessita de sombreamento adequado (SILVA; GRIMALDI; GONÇALVES, 2017).

O cacau é uma *commodity* importante para alguns países localizados em regiões tropicais. O Brasil figurava entre os três maiores países produtores de cacau e produzia mais de 400 mil toneladas anuais até meados da década de 1980, quando uma doença chamada vassoura de bruxa surgiu principalmente na região sul do Estado da Bahia e reduziu aproximadamente 53% a produção de cacau no país (MOREIRA *et al.*, 2018). Atualmente o Brasil ocupa o sétimo lugar como maior produtor mundial, produzindo cerca de 265 mil toneladas (Brainer, 2021).

Em geral, as principais variedades de cacau são: Forastero, Criollo, Trinitário e ainda uma variedade chamada Nacional que cresce no Equador (Figura 1), seus frutos têm aproximadamente 12 a 30cm de comprimento, apresentam características alongadas, o seu tamanho varia conforme a espécie, variedade, solo, clima e qualidade da árvore (AFOAKWA *et al.*, 2011). São compostos por 30 a 40 sementes recobertas por uma polpa branca mucilaginosa e pesam entre 300g e 600g. Por ser uma variedade altamente resistente a condições climáticas severas e a doenças, 95% da produção mundial de cacau vem do grupo Forastero e suas variedades de híbridos (FIGUEROA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Esta variedade é classificada como cacau “comum” e apresenta como principal característica o forte sabor de cacau, enquanto que o Criollo e Trinitário são classificados como cacau “fino”, caracterizado por notas frutadas e florais (TIGRERO-VACA *et al.*, 2022).



Figura 1. Principais variedades de cacau

Fonte: <https://static.wixstatic.com>

As amêndoas do cacau Forasteiro, como toda amêndoa de cacau, possuem compostos não voláteis como polifenóis, cafeína e teobromina que são conhecidos por atribuir características de amargor e adstringência aos seus derivados, e por possuírem uma alta concentração desses compostos, podem mascarar alguns sabores finos do cacau. Por outro lado, esses compostos podem contribuir para uma boa saúde mental e proteção cardiovascular (ZUMAETA *et al.*, 2022).

Além dos nutrientes essenciais como carboidratos, gorduras, proteínas, peptídeos e aminoácidos ácidos, as amêndoas também são ricas em compostos bioativos, como metilxantinas (teobromina e cafeína) e polifenóis, que compreendem principalmente catequinas e epicatequinas, glicosídeos de flavonóis, antocianinas e procianidinas, bem como ácidos fenólicos (ácido gálico). Cerca de 15% do peso seco das amêndoas são compostos por polifenóis, que podem sofrer alterações ou degradação parcial durante o processamento (RIMBACH *et al.*, 2009; ŻYŻELEWICZ *et al.*, 2018). Segundo Reis *et al.* (2020), alguns fatores como a origem de procedência, variedade do fruto, grau de fermentação e secagem, condições de armazenamento e métodos analíticos utilizados podem afetar diretamente a composição química das amêndoas de cacau, o aroma e a coloração, sendo essas características diretamente ligadas à qualidade deste produto e conseqüentemente dos seus derivados.

A avaliação da qualidade é normalmente realizada pelos produtores de cacau, incluindo a classificação por peso (número de amêndoas em 100g), determinação da umidade e o teste de

corde, que consiste na inspeção visual de 300 amêndoas após a exposição do cotilédone pelo corte longitudinal. Este teste identifica o nível de amêndoas defeituosas (mofadas, infestadas, germinadas ou achatadas) e fornece informações sobre o índice de fermentação observando as quantidades das amêndoas totalmente marrons, parcialmente marrons e violetas (BECKETT, 2009; HASHIMOTO *et al.*, 2018).

2.2. Fermentação das amêndoas de cacau

Um atributo de qualidade importante do cacau é o perfil de sabor. Essa característica depende fortemente do processamento pós-colheita, isto é, fermentação e secagem a que a semente é submetida na sua origem. As amêndoas de cacau sem fermentar não desenvolvem nenhum sabor característico de chocolate durante a fabricação porque não contém os precursores necessários. Além disso, é caracterizado por um amargor e adstringência elevados. A fermentação resulta na formação dos precursores do sabor do chocolate, bem como na redução desse caráter amargo e adstringente (KRÄHMER *et al.*, 2015).

As amêndoas de cacau não fermentadas desenvolvem pouco sabor de cacau e chocolate quando torradas, enquanto as amêndoas excessivamente fermentadas produzem sabores indesejáveis (AFOAKWA *et al.*, 2008). Importantes componentes ativos de sabor são produzidos durante a fermentação. Esses sabores característicos são explicados pela presença de alguns componentes na sua composição. Os compostos responsáveis pelo sabor amargo são a teobromina e a cafeína. A nota ácida é outro atributo de sabor típico e deve-se principalmente ao ácido láctico e acético formados durante o processo, enquanto que a adstringência é atribuída aos compostos fenólicos presentes no cacau (KADOW *et al.*, 2013; KRÄHMER *et al.*, 2015; KONGOR *et al.*, 2016).

O processo de fermentação ocorre na amêndoa envolvida pela polpa, onde é naturalmente inoculada com microrganismos presentes nas superfícies dos frutos do cacau, folhas de bananeiras, insetos, equipamentos agrícolas e mãos de trabalhadores, que circundam o ambiente, sendo principalmente leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético, responsáveis pelo processo (PAPALEXANDRATOU *et al.*, 2019; DÍAZ-MUÑOZ *et al.*, 2023).

A fermentação pode ser realizada utilizando diferentes recipientes como caixas de madeira, sacos de juta ou caixas plásticas, sendo o método usualmente utilizado nas fazendas de cacau a fermentação em cochos de madeira (Figura 2), onde nas primeiras 48 horas folhas de bananeira são colocadas sobre a massa de cacau com o objetivo de eliminar as perdas de calor.

Além disso o período do processo de fermentação pode variar dependendo do material genético, da época do ano, da metodologia empregada e do índice de fermentação que se deseja atingir. A concentração de polifenóis presentes nas sementes de cacau também influencia o tempo de fermentação, visto que espécies com maiores concentrações, como o Forasteiro, levam de 5 a 7 dias enquanto que em variedades de cacau Criollo o tempo de fermentação é de 2 a 3 dias (CASTRO-ALAYO *et al.*, 2019).

A fase inicial da fermentação do cacau é dominada por leveduras e bactérias lácticas, que se desenvolvem em ambiente rico em açúcar e ácido (EFRAIM *et al.*, 2010; CRAFTACK *et al.*, 2014). O alto teor de açúcares presente na polpa, seu baixo valor de pH (em torno de 3,6) e o baixo teor de oxigênio favorecem um ambiente anaeróbico, permitindo o desenvolvimento de leveduras que vão atuar inicialmente nesse processo (SARBU; CSUTAK, 2019).



Figura 2. Cochos de madeira para fermentação do cacau.

Fonte: Acervo do autor, 2022

Nessa fase, as enzimas pectinolínicas produzidas por essas leveduras, quebram a viscosidade da polpa ocasionando um aumento da drenagem com consequente penetração de oxigênio na massa fermentada. Em paralelo, as bactérias lácticas crescem e consomem o ácido cítrico da polpa fresca, diminuindo o pH e produzindo ácido lático, ácido acético, etanol e CO₂ (BARIŠIĆ *et al.*, 2019). Quanto mais oxigênio é colocado na massa através do revolvimento periódico para homogeneização, mais as bactérias ácido acéticas oxidam o etanol em ácido acético, podendo oxidar mais ácido lático e ácido acético em CO₂ e água, sendo que o

metabolismo dessas bactérias é altamente exotérmico, aumentando a temperatura da massa a níveis superiores a 45° C (PAPALEXANDRATOU *et al.*, 2019).

Entre o segundo e terceiro dia de fermentação, as altas concentrações de etanol e ácido acético absorvido pelos cotilédones, em combinação com o aumento da temperatura ocasiona a morte do gérmen, inviabilizando o poder germinativo das sementes (ZUMAETA *et al.*, 2022). A morte e o rompimento das células permitem a interação desses diferentes compostos, iniciando várias reações enzimáticas indispensáveis para a formação de precursores de sabor e aroma (AFOAKWA *et al.*, 2012; JOHN *et al.*, 2019). Há diminuição da concentração de compostos fenólicos pela atividade das gérmen e glicosidasas, sofrendo reações de oxidação, complexações com proteínas, formação de quinonas, que por sua vez sofrem condensação covalente com grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras, ocasionando a diminuição do amargor e da adstringência (EFRAIM *et al.*, 2010; BARIŠIĆ *et al.*, 2019; CASTRO-ALAYO *et al.*, 2019).

Mudanças bioquímicas complexas que ocorrem na etapa de beneficiamento para obtenção das amêndoas geram perdas significativas nos compostos fenólicos totais. Os principais compostos fenólicos monoméricos são a catequina e epicatequina. A epicatequina é encontrada em altas concentrações no início da fermentação, representando 35% do total de flavan-3-óis e pode chegar a ter uma redução de até 90% ao final dela (SEPTIANTI; SALENGKE; LANGKONG, 2020; GIL *et al.*, 2021a). Prolongar o processo de fermentação leva à diminuição da concentração de catequina, favorecendo o sabor do cacau fermentado, sendo essa redução mais evidente no cacau Criollo do que em outras variedades (URBAŃSKA *et al.*, 2019).

Maiores teores de metilxantinas como teobromina e cafeína são encontrados em amêndoas sem fermentação (FEBRIANTO; ZHU, 2022). Esses compostos são encontrados em diferentes partes da amêndoa e durante a fermentação tendem a diminuir migrando para a película. Após o quarto dia de fermentação a cafeína é reduzida em 50% e devido à perda da umidade bem como a dissolução dos compostos celulares, continua diminuindo durante o processo, sendo a teobromina biodegradada, induzida pela fermentação, reduzindo o seu teor e contribuindo para melhoria sensorial do cacau e seus derivados (JÚNIOR *et al.*, 2020; SEPTIANTI; SALENGKE; LANGKONG, 2020).

Os valores baixos de pH durante a fermentação ativam enzimas proteolíticas, endoprotease aspártica e carboxipeptidase, que hidrolisam proteínas de armazenamento em aminoácidos livres e peptídeos, compostos que juntamente com os açúcares redutores serão

utilizados para a reação de Maillard durante a secagem e torrefação das amêndoas (DEUS *et al.*, 2021a). O teor de açúcares redutores constituídos principalmente por frutose e glicose durante a fermentação são provenientes da quebra enzimática dos oligossacarídeos (CHAGAS *et al.*, 2021). A sacarose é diminuída e convertida em glicose e frutose durante a fermentação pela ação da invertase endógena, sendo sua alta concentração um indicador de baixa fermentação da amêndoa (MEGIAS-PEREZ *et al.*, 2020).

Após a fermentação, o cacau ainda possui muita água e ácidos que precisam ser removidos, fazendo-se necessária a etapa de secagem (Figura 3). Durante a secagem, reações químicas de “cura” acontecem sob a influência de enzimas presentes no interior das amêndoas, estabilizando a cor, o aroma e o sabor característicos (PAPALEXANDRATOU *et al.*, 2019). Reações de oxidação e condensação acontecem e formam-se flavofenos, taninos condensados insolúveis em água, de cor marrom a violeta que serão responsáveis pelas cores características da amêndoa fermentada (AGUS; MOHAMAD; HUSSAIN, 2018).



Figura 3. Estufas solares com mesa de tela para secagem das amêndoas de cacau.

Fonte: Acervo do autor, 2022

Essas mudanças no perfil de sabor acompanham uma mudança de coloração que varia de roxo pálido (não fermentado) para marrom (totalmente fermentado). O chocolate é processado a partir das amêndoas de cacau após terem passado pelas etapas de beneficiamento. O seu sabor é influenciado por vários fatores como: a variedade do cacau, condições ambientais de crescimento dos cacaueiros, as etapas dos processos de beneficiamento das sementes pós-colheita e as etapas de processamento industrial (GUTIÉRREZ, 2017).

2.3. Chocolate

O chocolate é um alimento milenar, onde era frequentemente consumido como uma bebida produzida a partir das amêndoas de cacau torradas, moídas e aquecidas em água, junto com algumas especiarias como pimenta e canela, para que o sabor amargo das amêndoas fosse mascarado (FANTON *et al.*, 2021). Era considerado um alimento valioso e apenas para a

nobreza, consumido por adultos do sexo masculino, exclusivamente governantes, sacerdotes e guerreiros. Ao longo dos anos, o chocolate passou a ser utilizado na culinária, assim como na medicina, e espalhou-se por todo o mundo (CADBY; ARAKI, 2022). Civilizações antigas como os astecas, consumiam o chocolate como um remédio valioso para prevenção de várias doenças. O chocolate possui efeitos positivos relacionados ao aumento da longevidade geral, do apetite sexual e da fertilidade, sendo esses benefícios relacionados à presença do cacau no chocolate (SAMANTA *et al.*, 2022).

A legislação brasileira define o chocolate como 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) de sólidos totais de cacau (BRASIL, 2005). É um alimento muito consumido em todo o mundo, e nos últimos 20 anos, pesquisas mostraram que o chocolate com alto teor de cacau podem ter um efeito benéfico na saúde humana devido ao alto teor de polifenóis, sendo reconhecido como um alimento funcional (DELGADO *et al.*, 2018; MARTIN; RAMOS, 2021; PETYAEV; BASHMAKOV, 2017). Devido às suas características sensoriais, bem como à presença de compostos fenólicos nesse produto, cada vez mais a busca por chocolates intensos (70% ou mais de sólidos de cacau) ou seja, com maior teor de cacau, tem aumentado (REIS *et al.*, 2020).

Com o crescente movimento mundial de chocolates “bean to bar”, os produtores de amêndoas buscam cada vez mais a qualidade visto que o conceito desse movimento envolve a produção de chocolates a partir de amêndoas especiais, poucos ingredientes e pequenos lotes de produção sendo uma oportunidade para agregação de valor inclusive para pequenos produtores. A alta popularidade desses tipos de chocolate está relacionada a todas as suas propriedades sensoriais, texturais únicas e benefícios à saúde, sendo amplamente consumido e apreciado mundialmente (SANTANDER MUÑOZ *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2023).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoins e Balas a produção de chocolates no Brasil apresentou um aumento significativo de 35,9%, atingindo a marca de 693 mil toneladas no primeiro semestre de 2021. Além disso, o consumo desse produto também apresentou um crescimento notável no mesmo período, em comparação ao ano anterior (ABICAB, 2022). Esse crescimento pode estar relacionado ao fato de que o chocolate passou a ser considerado um alimento funcional, ganhando cada vez mais espaço no segmento do mercado. O consumo de chocolate proporciona uma alta carga energética relacionada à manteiga de cacau e ao açúcar; promove sensações de prazer provenientes de substâncias como anandamina e o triptofano (precursor da serotonina); sensação de bem estar modulada pela liberação de neurotransmissores como dopamina, serotonina e endorfina; estímulos cerebrais

pela presença de alcalóides como teobromina, feniletilamina e cafeína e considerável atividade antioxidantes pela presença de flavonóides (epicatequina, catequina e procianidinas) (SILVA *et al.*, 2023).

Os principais compostos que apresentam atividade antioxidante nas amêndoas do cacau são os polifenóis e os flavonoides. Uma vez que o chocolate intenso apresenta alto teor desses constituintes, valores que chegam a ser cinco vezes maiores do que no chocolate ao leite e branco, ele é considerado uma melhor opção de consumo (FANTON *et al.*, 2021). O consumo regular de chocolate intenso está relacionado com a ocorrência da diminuição de pressão alta, demonstrando efeitos positivos no controle do aparecimento de doenças cardiovasculares (GRASSIA *et al.*, 2019; SAMANTA *et al.*, 2022). Dessa forma, os flavonoides do cacau tendem a aumentar os níveis de óxido nítrico (NO) nos vasos sanguíneos, resultando em um aumento do fluxo de circulação no interior das artérias, melhorando a função do sistema endotelial vascular e a função plaquetária (NOGUEIRA *et al.*, 2022).

As metilxantinas, cafeína e teobromina são outros compostos bioativos presentes no chocolate. A eles foram relacionadas a atividade psicoativa, alteração da função cognitiva e ações neuropsicológicas como aprendizado e memória (CRICHTON; ELIAS; ALKERWI, 2016). Além disso, o consumo de chocolate pode resultar em euforia, associada à substância anandamida, um canabinóide endógeno presente naturalmente no cérebro humano, capaz de agir em receptores canabinóides, promovendo um estado eufórico de maior sensibilidade e analgesia (KEEN, 2001).

Consumir chocolate pode trazer um conforto psicológico devido a estimulação da produção de serotonina, um neurotransmissor capaz de gerar efeitos antidepressivos. Existem evidências que o consumo de chocolate intenso promove a redução de sintomas depressivos clinicamente relevantes (JACKSON *et al.*, 2019).

A química por trás da produção de chocolate é muito complexa devido ao grande número de compostos e processos envolvidos. As mudanças mais intensas ocorrem durante a fermentação, a torrefação da amêndoa de cacau e a conchagem do chocolate. Devido à influência das reações químicas e seus produtos na composição físico-química e nas características sensoriais, principalmente de sabor e aroma do chocolate, esses processos são cada dia mais estudados (BARIŠIĆ *et al.*, 2019).

2.4. Processamento do chocolate

O processo mais tradicional de produção de chocolate, utilizado no presente estudo, ocorre por sistema descontínuo de batelada utilizando melangeur, demonstrado na Figura 4. Assim que as amêndoas de cacau fermentadas e secas chegam à indústria, elas são submetidas à etapa de limpeza e seleção para remoção de sujidades. Após isso as amêndoas passam pela etapa de torrefação, responsável pela redução do teor de umidade (de 8% para 1-5%), por reações de transformações dos compostos bioativos como os polifenóis (reações de oxidação, condensação e complexação), pela redução e destruição da carga microbiológica e suas formas vegetativas e ainda facilita a evaporação de ácidos voláteis (principalmente o ácido acético) e compostos indesejáveis (ZYŻELEWICZ et al., 2016; MUÑOZ et al., 2020b).

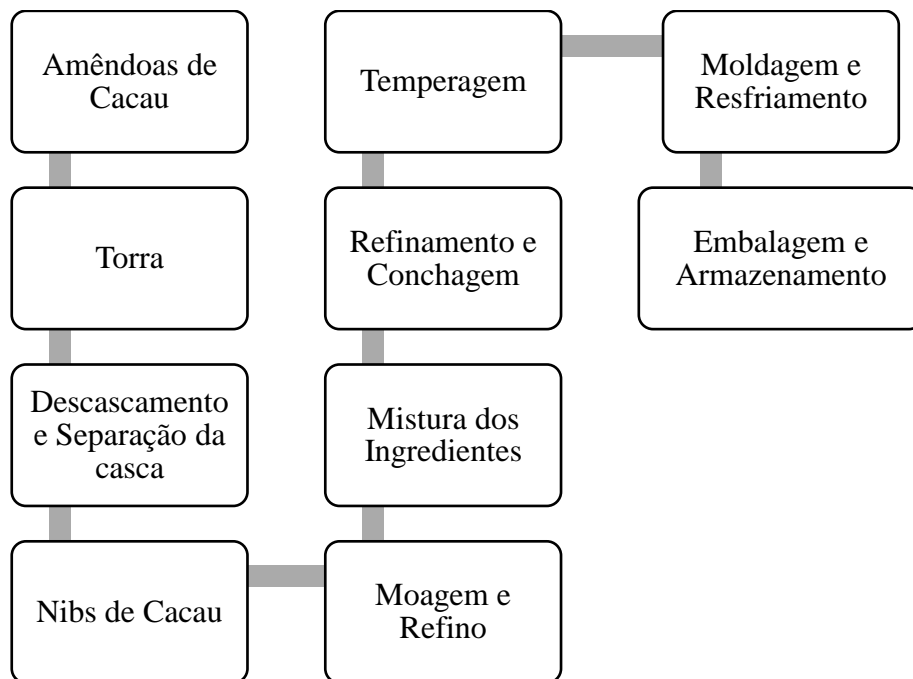


Figura 4. Fluxograma do processamento do chocolate

Fonte: Adaptado de HINNEH et al., 2019.

Além disso, a torrefação é considerada uma etapa fundamental na formação de sabor do chocolate, já que por meio desse aquecimento a reação de Maillard é favorecida, onde alguns precursores químicos formados durante a fermentação (aminoácidos, peptídeos e açúcares redutores) participarão dessas reações não enzimáticas de escurecimento e serão responsáveis pelo sabor e a cor marrom característica do chocolate. Alguns compostos voláteis dos grupos pirazinas, carbonilas, hidrocarbonetos, cetonas, furanos, fenóis e outros compostos heterocíclicos também são produzidos nessa fase do processamento, por interações com

diferentes compostos oxigenados formados (BRAGA et al., 2018; BARIŠIĆ et al., 2019). Após a torra, as amêndoas são descascadas e trituradas, obtendo o produto conhecido como Nibs.

A etapa de mistura consiste em homogeneizar os ingredientes nas proporções determinadas da formulação até a obtenção de uma massa uniforme. Para atingir o tamanho de partícula adequado no produto final, tornando-os imperceptíveis na boca durante a degustação, é necessário que seja feito o refino dessa massa, onde 90% das partículas devem atingir dimensões em torno de 20 μ . O refino tem como objetivo tornar a pasta de cacau mais lisa e deixá-la sem grânulos (GUTIÉRREZ, 2017). Os parâmetros da massa que mais influenciam a viscosidade aparente do chocolate são a umidade, a distribuição do tamanho de partícula e o conteúdo de gordura (COHEN; LUCCAS; JACKIX, 2004; FOWLER, 2009).

Na etapa de conchagem, as partículas sólidas são revestidas pela gordura e os compostos indesejáveis formados na fermentação das sementes de cacau, entre eles o ácido acético, serão volatilizados. Essa etapa ainda é importante para homogeneizar os ingredientes, sendo necessário o cisalhamento da massa, a agitação e aquecimento entre 50°C e 70°C, dependendo do produto final. A viscosidade ideal é alcançada, o excesso de umidade é removido e a cor desejada é desenvolvida. O tempo de conchagem está relacionado com melhorias nas características sensoriais do chocolate como textura, fluidez, sabor e aroma, através da agitação constante. nesse processo ocorre a redução do tamanho das partículas solidas, a evaporação e oxidação de substâncias voláteis indesejáveis, além da formação de emulsões mais estáveis e uniformes. No método tradicional, esta etapa pode levar de 8 a 96 horas, dependendo do tipo de produto e do equipamento utilizado (BECKETT, 2009).

A têmpera é um processo de mexer a massa do cacau por algumas horas, combinado com o aumento e redução da temperatura, atingindo 48°C e 28°C respectivamente. O objetivo desse processo é obter uma forma estável de gordura cristalina (V), de forma que o chocolate seja estável (GUTIÉRREZ, 2017). O controle desse processo é importante para a qualidade do produto sendo que o chocolate temperado deve apresentar aspecto brilhante, cor uniforme e sabor suave (URBAŃSKA *et al.*, 2019).

Após o término da temperagem a massa de chocolate é transferida para a moldagem, onde o chocolate líquido é depositado em moldes, que passam por uma mesa vibratória para evitar a formação de bolhas de ar em sua superfície, e logo após seguem para o resfriamento sob temperatura de refrigeração até a fase gordurosa atingir um grau de cristalização adequado. Na sequência o produto segue para as etapas de desmoldagem e embalagem (COHEN; LUCCAS; JACKIX, 2004).

2.5. Compostos bioativos

Sabe-se que as amêndoas de cacau e o chocolate intenso (70% ou mais de sólidos de cacau) possuem polifenóis como principais constituintes e que seu consumo tem sido associado a efeitos benéficos para a saúde. Esses constituintes exercem atividades antioxidantes e antiinflamatórias e em particular, os polifenóis do cacau induzem a liberação de óxido nítrico (NO) por meio da ativação da síntese endotelial que por sua vez, é responsável pela vasodilatação e efeitos cardioprotetores (MAGRONE; RUSSO; JIRILLO, 2017).

O cacau e seus derivados são ricos em polifenóis, compostos associados à prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, processos carcinogênicos e doenças neurodegenerativas, além de trazer benefícios ao sistema nervoso, a função visual e a pele (GONZÁLEZ-BARRIO et al., 2020; FEBRIANTO; WANG; ZHU., 2021b). Os polifenóis são metabólitos secundários e estão relacionados como os principais compostos responsáveis pelo amargor e adstringência nas amêndoas de cacau e no chocolate.

Os polifenóis constituem um dos mais numerosos e mais distribuídos grupos de compostos do reino vegetal. Podem ser divididos em muitas classes, dependendo de sua estrutura básica, sendo os flavonóides uma das mais importantes. Dentre eles a (-) –epicatequina é o principal flavanol presente nas amêndoas de cacau, com um percentual de 35%, já outros grupos como (+) -catequina, (+) -galocatequina e (-) -epigalocatequina estariam em menores quantidades (MARIE; BERAU; ROBINSON, 2021).

Quando se observa a natureza química, os flavonóides do cacau são flavan-3-óis, e devido a isso são frequentemente chamados de flavonóides. Dependendo de sua estrutura, os flavonóides são ainda categorizados como catequina, epicatequina (Figura 5) e oligômeros de proantocianidina. As proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros de alto peso molecular que têm como precursores unidades monoméricas de flavan-3-óis (catequinas e epicatequinas) em união com flavan-3,4-dióis ou leucoantocianidinas (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011).

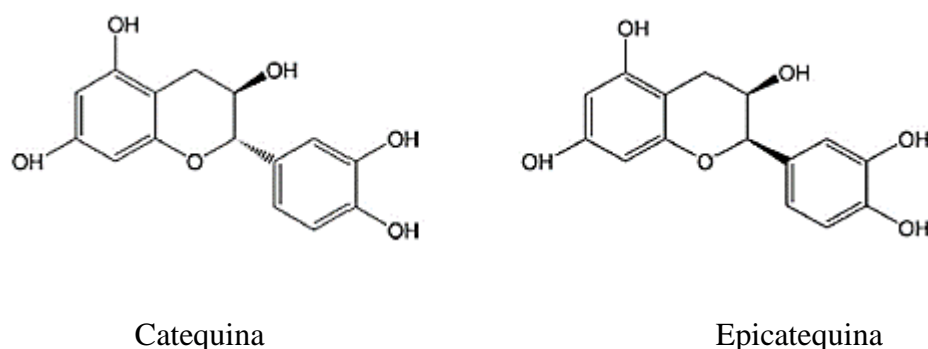


Figura 5. Estrutura dos flavonoides catequina e epicatequina.

Fonte: CAÑAS et al., 2022

Enquanto as catequinas e antocianinas constituem cerca de 37 e 4%, respectivamente, as proantocianidinas constituem mais de 50% do conteúdo total de flavonóides nas amêndoas de cacau (PETYAEV; BASHMAKOV, 2017). São encontradas em grandes concentrações e também apresentam potente atividade antioxidante, reduzem a concentração de espécies reativas de oxigênio e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade.

O cacau possui uma composição com mais de 500 compostos, dentre os quais merecem destaque também as metilxantinas. Em relação aos teores de teobromina e cafeína em amêndoas de cacau, eles constituem cerca de 4% e 0,2% do peso seco, respectivamente. Esse conteúdo é diretamente influenciado pelo processo de fermentação e depende da variedade genética do cacau. As amêndoas de cacau sem fermentar geralmente contêm teobromina ligada aos taninos e no processo de fermentação o ácido acético hidrolisa essas ligações e parte da teobromina é liberada. A teobromina livre então se difunde na película da amêndoa (BARIŠIĆ *et al.*, 2019).

A teobromina e a cafeína (Figura 6) são associadas ao gosto amargo nas amêndoas de cacau e chocolate. A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um composto muito encontrado principalmente em chás, cafés, produtos de cacau e bebidas à base de cola. Seus efeitos fisiológicos na saúde humana incluem estimulação do sistema nervoso central, dos músculos cardíacos, do sistema respiratório e da secreção de ácido gástrico, além de possuir características antioxidantes (FEBRIANTO; ZHU, 2022). A teobromina (3,7-dimetilxantina), metilxantina mais abundante encontrada em produtos de cacau, tem ação diurética, relaxante da musculatura lisa, estimulante do miocárdio e vasodilatador (SMIT, 2011). Dependendo da variedade da amêndoa de cacau, o conteúdo de teobromina varia, sendo as variedades do grupo Forasteiro as contêm maiores quantidades desse composto (ARIYANTI *et al.*, 2022).

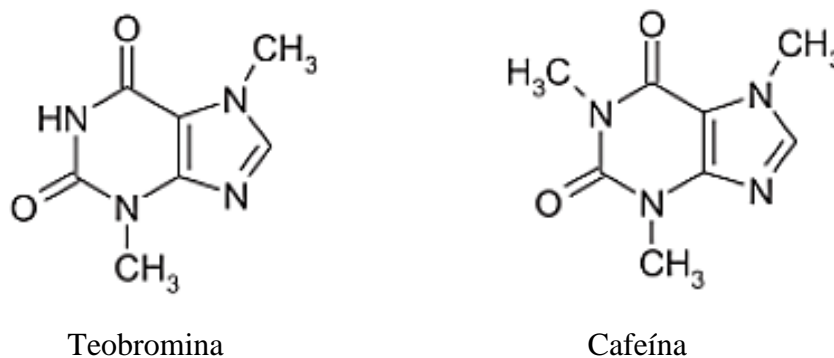


Figura 6. Estrutura química das Metilxantinas

Fonte: CAÑAS et al., 2022

Apesar da variedade do cacaveiro determinar o conteúdo inicial dos compostos bioativos, existem diferenças nas concentrações destes nas amêndoas e na massa de cacau que são utilizadas para produção do chocolate e no produto final, uma vez que as etapas de produção levam a perdas significativas de compostos biologicamente ativos do cacau, que é desejável sob o ponto de vista do sabor, uma vez que a diminuição da sensação de adstringência e amargor está relacionada com diminuição desses compostos (TODOROVIC *et al.*, 2015a). Por outro lado, a manutenção dessas substâncias tanto nas amêndoas, quanto no chocolate, é de grande interesse industrial na medida em que se busca aliar sabor e saúde em um produto.

2.6. Capacidade antioxidante

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as principais causas de morte em todo mundo estão relacionadas às doenças não transmissíveis, sendo responsáveis por quase 41 milhões de mortes em 2020. As doenças não transmissíveis que trazem mais mortes foram as doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes (GIL *et al.*, 2021b). Alguns compostos de origem vegetal apresentam estratégias atraentes para combater alguns dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e aparecimento dessas doenças, pois contém diversos fitoquímicos e micronutrientes que demonstram diferentes atividades biológicas no combate ao estresse oxidativo e regulação da resposta inflamatória (WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011).

O *Theobroma cacao* L. demonstra-se como um bom exemplar de material vegetal com potencial para intervenção na capacidade antioxidante devido às grandes quantidades de compostos fenólicos presentes em suas amêndoas. Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da reação de oxidação com a inibição de radicais livres e complexação de metais por exemplo. Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes, onde a primeira tem a capacidade de bloquear a iniciação da oxidação e possuem atividade enzimática removendo

espécies reativas ao oxigênio, e na segunda classe estão as moléculas que interagem com espécies radiculares e são consumidas durante a reação mas não tem a ação enzimática (MUDENUTI *et al.*, 2021).

Os antioxidantes também podem ser classificados de acordo com a sua polaridade, hidrossolúveis ou lipossolúveis, bem como em relação ao seu mecanismo, através de transferência de átomos de hidrogênio (TAH), transferência de elétrons simples (TES) e a capacidade de quelar metais de transição. De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes ainda podem ser classificados como primários ou secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Os antioxidantes secundários (antioxidantes preventivos), agem retardando a taxa de iniciação da cadeia, quebrando os hidróxidos (GRANATO *et al.*, 2018).

Em razão dos efeitos benéficos à saúde, os polifenóis, ou compostos fenólicos, têm sido largamente estudados, pois apresentam uma eficaz atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres, fornecendo proteção contra danos ao DNA das células. As espécies reativas de oxigênio (ERO) têm papel importante em muitos processos biológicos, dentre essas ERO's se incluem o radical hidróxido ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (1O_2) (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011).

Várias funções fisiológicas, incluindo atividades antioxidantes e antimutagênicas, foram atribuídas aos polifenóis. Esses compostos podem atuar como antioxidantes “secundários” em um processo de quelação ao inibir a oxidação sem interagir diretamente com espécies oxidativas. Teobromina e cafeína (metilxantinas) e os principais grupos de polifenóis ((+) epicatequina, (+) catequinas, antocianinas e dímeros de proantocianidinas) são encontrados no cacau e nos produtos derivados e tem sido descritos como importante papel na preservação da saúde humana (BATISTA *et al.*, 2016). Os antioxidantes secundários são os inibidores de oxigênio singlete, decompositores de peróxido que produzem espécies quelantes de metais, enzimas oxidativas, inibidores ou absorvedores de radiação UV.

Por serem importantes fontes de compostos fenólicos, as amêndoas de cacau apresentam um grande potencial para capacidade antioxidante. Em um estudo realizado por Mudenuiti *et al.* (2022), os autores concluem que o uso de nibs de cacau tem um grande potencial de uso como fontes naturais de antioxidantes solúveis e insolúveis na indústria de alimentos e/ou para fins culinários. Todorovic *et al.* (2015) ao analisarem o conteúdo de compostos biologicamente

ativos em produtos de cacau, bem como sua capacidade antioxidante, afirmam que os chocolates são boas fontes de antioxidantes dietéticos e metilxantinas, que podem ter efeitos benéficos na saúde humana. Outros estudos citam que as maiores quedas na atividade antioxidante e anti-radical estão associadas à redução do conteúdo de polifenóis que ocorre durante a fermentação das amêndoas de cacau (E SILVA *et al.*, 2019; BUENO *et al.*, 2021a; FEBRIANTO; ZHU, 2022).

O processamento pós-colheita, como fermentação e torra, é conhecido por afetar as concentrações de polifenol e metilxantina e a atividade antioxidante dos grãos do cacau, influenciando assim a qualidade do produto final. Durante a torrefação, o binômio tempo e temperatura afetam a estabilidade dos compostos fenólicos, bem como as características do sabor resultante nos seus derivados (BATISTA *et al.*, 2016).

Dentre as principais técnicas utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante de materiais biológicos, permitindo o estudo e a seleção de substâncias de interesse pode-se destacar o método de sequestro de radicais livres, como o DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. O ensaio DPPH• tornou-se um método muito popular, uma vez que o ensaio DPPH• apresenta-se como uma técnica rápida e sensível que envolve compostos cromógenos como forma de simular espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e necessita de um espectrofotômetro com leitura na região do visível para sua realização (ARNAO, 2000). Esses ensaios são baseados no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta quando há adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Esse método baseia-se em mecanismos de reação de Transferência de um Elétron (Single Electron Transfer – SET) e Transferência de Átomo de Hidrogênio (Hydrogen Atom Transfer – HAT) de um composto antioxidante para um oxidante (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das principais técnicas utilizadas na determinação de compostos bioativos presentes no cacau e chocolate como flavonoides e metilxantinas. A CLAE permite realizar análises quantitativas e separações de uma variedade de compostos constituintes em diversos tipos de amostras, sendo realizada em escala de tempo curto, apresentando alta resolução, eficiência e boa detectabilidade. (MUDENUTI *et al.*, 2018; ŽUVELA *et al.*, 2019).

O sistema é composto pelo reservatório da fase móvel, a bomba de alta pressão que movimenta a fase móvel pela coluna com vazão constante, o injetor de amostra que pode ser automático ou manual, a coluna cromatográfica que pode ser carregada com um número infinito

de compostos (tornando a técnica versátil), o detector, que também podem ser vários, e o registrador, que é o computador que processa os dados (ASSIS, 2015).

A fase estacionária é imiscível com a fase móvel e essas duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra sejam distribuídos de forma diferente entre si. Os componentes que são mais fortemente ligados na fase estacionária se movem muito lentamente no fluxo da fase móvel, e os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária se movem mais rapidamente, e, portanto, essa seletividade na retenção dos componentes da amostra resulta em diferentes migrações dos compostos de interesse permitindo a identificação qualitativa e quantitativa dos analitos (DA SILVA, 2019).

A CLAE pode ser aplicada na indústria farmacêutica, análises ambientais, aplicações na indústria alimentar, médica, biomédica, áreas de ciências, entre outras. Além disso, tem sido utilizada na quantificação da bioatividade de compostos fenólicos presentes no cacau e chocolate, onde se inclui a determinação de flavonoides e metilxantinas, e dessa forma oferece grande contribuição na compreensão dos efeitos do processamento dos derivados do cacau (NATSUME et al., 2000; TODOROVIC et al., 2015a; ŽUVELA et al., 2019; AFOAKWAH, 2020).

Nesse sentido, analisando o crescente consumo de chocolates finos e artesanais, Nascimento et al. (2020) utilizaram a CLAE empregando técnicas de análises estatísticas multivariadas para otimizar a separação dos compostos bioativos como teobromina, cafeína, catequina e epicatequina, bem como classificar amostras desses tipos de chocolates de acordo com as concentrações desses compostos bioativos. O método otimizado e validado foi aplicado em 22 amostras diferentes de chocolates artesanais contendo diferentes teores de sólidos de cacau e demonstrou precisão, exatidão e limites adequados para detecção e quantificação desses compostos.

Em outro estudo, foi utilizado a CLAE para separação de séries homólogas de proantocianidinas oligoméricas em diferentes estágios do processamento de chocolate avaliando simultaneamente a capacidade antioxidante através de ensaio NP-HPLC-DPPH em relação ao grau de polimerização dessas substâncias (PEDAN *et al.*, 2017a). Os autores concluíram que a pesquisa contribui para o entendimento da influência das diferentes etapas do processamento do chocolate no conteúdo e composição de proantocianidinas oligoméricas e na atividade antioxidante, além de fornecer informações importantes sobre as etapas que mais promovem perdas desses constituintes.

2.8. Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é baseado na vibração dos grupos funcionais presentes na amostra quando exposta à radiação infravermelha. Dependendo da quantidade de absorção e do padrão de ligação, os picos que variam de largo a estreito, alto ou baixo, serão formados no grande comprimento de onda da região do infravermelho. Esta técnica produz gráficos com os dados espectrais resultantes e tem sido muito utilizada para a avaliação de adulteração em vários produtos alimentícios, como manteiga de cacau e chocolate e para determinar a qualidade das amêndoas de cacau (BATISTA *et al.*, 2016).

É uma técnica muito utilizada principalmente em centros de pesquisa, sendo não destrutivo e de custo reduzido com reagentes e tempo para obtenção de resultados precisos, podendo ser empregada em pequenas quantidades de produtos sólidos, líquidos ou concentrados de analitos, sem a necessidade de reagentes adicionais ou processos preparativos. A espectroscopia de infravermelho é uma alternativa interessante para esses tipos de análises (HU *et al.*, 2016).

Análises de atividade antioxidante do cacau e dos chocolates são frequentemente investigadas por técnicas convencionais como cromatografia líquida e métodos de sequestro de radicais *in vitro*. Contudo, a Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR) tem sido utilizada com sucesso para a quantificação de componentes bioativos em alimentos, bem como para investigar compostos de interesse em produtos alimentícios (DEUS *et al.*, 2021b).

Batista *et al.* (2016) buscaram quantificar e prever a capacidade antioxidante, o teor de fenólicos totais e as concentrações de catequinas de chocolates ao leite e amargos por MIR, bem como prever a capacidade antioxidante total e os compostos fenólicos totais de três variedades de cacau e de chocolates produzidos a partir de fermentações espontâneas e inoculadas e concluíram que a análise permitiu uma avaliação confiável desses parâmetros em curto prazo.

2.9. Análise sensorial de chocolate

Os estudos e avaliações relacionados ao sabor dos alimentos podem ser vistos como um processo de coleta de dados que são usados para medir, interpretar respostas comportamentais e analisar alimentos, baseado nos cinco sentidos, a audição, visão, paladar, olfato e tato, onde

os consumidores são utilizados como instrumentos na medição dos parâmetros de qualidade alimentar (PIERACCI *et al.*, 2021).

A aferição da qualidade do chocolate segundo os seus atributos sensoriais é da grande importância para a indústria alimentícia. Marcas comerciais que já estão inseridas no mercado são constantemente avaliadas por técnicas sensoriais, visando obter respostas sobre as preferências, questionamentos e novos gostos dos consumidores, já que os hábitos populacionais se modificam constantemente (CINAR *et al.*, 2022).

A análise sensorial é uma área importante na indústria alimentícia, podendo ser usada em diversas áreas como para avaliar e melhorar a qualidade do produto, fornecer informações para tomada de decisões, determinar prazos de validade, testar sabor de novas receitas ou modificá-las, comparar novos produtos com a concorrência e dentre outras (YORISKA; PRASEPTIANGGA; KHASANAH, 2019).

Por meio de algumas técnicas sensoriais existentes é possível desvendar o vasto número de sensações percebidas no consumo do chocolate. Os métodos sensoriais podem ser classificados em: discriminativos, descritivos e afetivos. Os métodos descritivos são aplicados com o objetivo de se obter a caracterização qualitativa e quantitativa das amostras e traçar seu perfil sensorial. São obtidos dados quantitativos através da avaliação de cada aspecto qualitativo pelos julgadores por meio da utilização de uma escala de intensidade. A utilização desses métodos permite determinar quais atributos sensoriais são relevantes para a aceitação podendo ainda indicar sensorialmente em que os produtos se diferenciam um do outro (MEDINA-MENDOZA *et al.*, 2021).

Entre eles destaca-se a Análise Descritiva Quantitativa, um poderoso instrumento capaz de obter descrições de características qualitativas e quantitativas da percepção humana. A análise sensorial descritiva destaca-se como a mais abrangente, flexível e útil em relação aos métodos sensoriais, levantando informações detalhadas a respeito de todos os atributos que compõem um alimento (SILVA *et al.*, 2013).

Contudo, é uma metodologia que exige longos períodos de execução para obtenção dos resultados e finalização da técnica, uma vez que se faz necessário um treinamento intensivo dos julgadores, o que pode tornar um fator limitante para sua utilização na prática industrial (AGUIAR; MELO; OLIVEIRA, 2019). A indústria por diversas vezes abre mão dessa ferramenta valiosa para obtenção de informações sobre o perfil sensorial de seus produtos alimentícios e algumas pesquisas têm buscado alternativas aos métodos descritivos

convencionais com a finalidade de reduzir o tempo para obtenção das características sensoriais dos alimentos (SILVA *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o Perfil Descritivo Otimizado (PDO) se destaca entre os métodos alternativos por possibilitar a obtenção de dados quantitativos dos atributos que se deseja avaliar nos alimentos em um período de tempo menor. O objetivo dessa metodologia é suprir a necessidade de análises descritivas rápidas, onde os julgadores classificados como semi-treinados podem proporcionar acuidade sensorial mesmo sem receber treinamentos (SILVA *et al.*, 2012).

Já as metodologias de testes afetivos avaliam a preferência e aceitação de produtos por provadores não treinados que expressam respostas positivas ou negativas ao consumir o alimento. Tais testes são utilizados para otimizar processamentos, formulações e custos, tornando os produtos mais competitivos no mercado (DUTCOSKY, 2019).

Os testes de aceitação são usados quando se deseja avaliar se os consumidores gostam ou desgostam do produto. Para obtenção dos resultados geralmente utilizam-se escalas hedônicas que podem ser balanceadas ou não balanceadas, com maior utilização das escalas balanceadas. Nelas os consumidores expressam a aceitação pelo produto, de acordo com alguns atributos estabelecidos (a exemplo da aparência, aroma, sabor, textura e impressão global) por meio de opiniões que variam entre os termos "gostei extremamente" e "desgostei extremamente", podendo ser montadas em cinco, sete e nove pontos, com predominância da escala de nove pontos, pois descreve de forma simples e completa as percepções dos consumidores (EFRAIM *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do índice de fermentação das amêndoas em características físicas, químicas, sensoriais, espectroscópicas e cromatográficas de nibs e chocolates 70%.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as amêndoas de cacau através da prova de corte;
- Elaborar chocolates com 70% de massa de cacau, produzidos a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação (valores próximos a 50%, 70% e 90%);
- Caracterizar os nibs de cacau e os chocolates por meio de análises físicas e químicas;
- Quantificar o teor de teobromina, cafeína, catequina e epicatequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nos nibs de cacau e chocolates produzidos;
- Avaliar a capacidade antioxidante pelo método DPPH/EC 50 dos nibs e chocolates;
- Analisar os comportamentos espectrais dos nibs e chocolates por meio da Análise do Infravermelho Médio (MIR);
- Analisar o perfil sensorial dos chocolates por meio do Perfil Descritivo Otimizado (PDO), aceitação e intenção de compra;
- Avaliar a melhor formulação considerando os parâmetros de qualidade avaliados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e caracterização física das amêndoas de cacau

As amêndoas de cacau Forasteiro (Pará/Parazinho) foram obtidas na Fazenda Probidade (Agrícola Condurú LTDA, Ilhéus, BA, Brasil), localizada na região Sul da Bahia ($14^{\circ}23'17.2''S$ $39^{\circ}19'48.4''W$), com área total de cacau de 260 ha, cultivados em sistema Cabruca. As amostras de cacau foram obtidas através do processo de fermentação realizado em cochos de madeira Putumuju com dimensões de 0,70 m x 0,70 m x 70 m e furos de drenagem inferior e lateral (Figura 7).



Figura 7. Cochos de madeira Putumuju para fermentação das amêndoas de cacau.

Fonte: Acervo do autor, 2022

Para a fase anaeróbica da fermentação foram utilizadas folhas de bananeira para revestir os cochos lateral e superiormente. Na fase de fermentação acética, as folhas foram retiradas e a caixa de fermentação foi coberta com uma tampa de madeira Putumuju. O processo de revolvimento da massa foi realizado de acordo com a metodologia preconizada pela CEPLAC, com um primeiro revolvimento após 48 horas. Os revolvimentos subsequentes foram realizados a cada 24 horas até o final do processo de fermentação que teve duração de 6 dias. Em seguida a fermentação as amostras de cacau foram secas em barcaças solares com lastro de madeira e cobertura de zinco, onde a massa de cacau pós-fermentação foi constantemente aerada manualmente por um período de 13 dias (Figura 8).



Figura 8. Processo de fermentação das amêndoas de cacau. (A) Fase anaeróbica, (B) Fase acética e (C) Secagem em barcaças solares.

Fonte: Acervo do autor, 2022.

Após selecionar os lotes, as amêndoas de cacau passaram por um classificador de amêndoas Metalfen (CLMFEN 1000/01, Jesuítas, PR, Brasil), onde foram separadas em três granulometrias segundo a *Federation of Cocoa Commerce* (FCC) através do “Bean Count”, ou seja, pelo número de amêndoas em 100g. As amêndoas foram agrupadas em tamanhos que segundo o FCC podem ser divididas em até 4 tipos (amêndoas padrão <101, amêndoas médias 101 a 110, amêndoas pequenas 111 a 120 e amêndoas muito pequenas >120). A coleta das amostras para a classificação seguiu o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau (Brasil, 2008) onde foi feita a caracterização física das mesmas por meio da prova de corte observando atributos internos relacionados ao grau de fermentação, como: coloração marrom, parcialmente marrom ou violácea (visualmente), além de aspectos para defeitos como mofo (visualmente), fumaça (odor característico), danos causados por insetos, aspecto ardósia e germinação.

4.2. Produção do chocolate

As amêndoas com os diferentes índices de fermentação obtidas após classificação e seleção através da Prova de Corte foram torradas separadamente em um Forno com exaustor (Proservice, Itabuna, Brasil) a uma temperatura de 100°C durante 1 hora realizando revolvimentos a cada 20 minutos afim de uniformizar o processo. Em seguida, as amêndoas torradas foram trituradas e descascadas em equipamento Transformix (Proservice, Itabuna, Brasil) para a remoção da casca e do gérmen originando os nibs de cacau. Foram produzidos 1,5kg de chocolates com 70% de massa de cacau para cada tratamento. Os ingredientes foram pesados e transferidos para um equipamento de multifunções, Melanger (Spectra 11, Coimbatore, TN, Índia), com capacidade para processamento de 4,5kg de chocolate. As formulações dos chocolates foram constituídas de 61% de nibs de cacau, 29,6% de açúcar (União, Araquari, SC, Brasil), 9% de manteiga de cacau desodorizada (Barry Callebaut, Ilhéus, BA, Brasil) e 0,4% de lecitina de soja (Adicel Ind. e Com. LTDA, Belo Horizonte, MG).

O nibs de cacau foi adicionado ao equipamento juntamente com 6,75g da manteiga de cacau (Barry Callebaut, Ilhéus, BA, Brasil) e após 2 horas, 222g do açúcar (União, Araquari, SC, Brasil). Após 5 horas de processamento foram adicionados 128,25g da manteiga de cacau e 222g do açúcar. A lecitina de soja (Adicel Ind. e Com. LTDA, Belo Horizonte, MG) foi adicionada aproximadamente 2 horas antes da finalização da conchagem que teve como tempo total de processo de 24 horas. Neste equipamento foram realizadas as operações de mistura dos ingredientes, refino e conchagem.

Após 24 horas, a massa conchada a 60°C foi avaliada para tamanho médio das partículas, caracterizado por meio da utilização de um micrômetro digital (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão), com escala de 0µm a 25µm, onde se fundiu uma pequena parte da amostra de chocolate em placa de metal e misturou-se a uma gota de óleo mineral para leitura direta no equipamento (SILVA, 2015).

Em seguida a massa de chocolate foi conduzida para o processo de temperagem, em Temperadeira Mini Chocomachine (Finamac, São Paulo, Brasil), onde permaneceu por 40 minutos em constante agitação a 45°C e em seguida foi realizado o resfriamento até 31°C. A massa obtida da têmpera foi transferida para formas de acrílico para moldagem dos chocolates e submetidas à vibração para a retirada de bolhas de ar da massa. Essas formas foram resfriadas a 5°C por 4 horas e após essa refrigeração, os chocolates foram embalados em papel laminado (Cromus Embalagens Ind. E Com. Ltda., Mauá, São Paulo) e armazenados sob temperatura de 5°C até o momento das análises.

4.3. Caracterização dos nibs e chocolates

4.3.1. Caracterização físico-química e composição química

A caracterização físico-química e composição química foram realizadas nas amostras de nibs de cacau e nos chocolates produzidos. A determinação do pH foi realizada por meio de pHmetro digital (modelo Q400AS, 32 QUIMIS, Diadema, São Paulo) previamente calibrado através da leitura de soluções tampão com pH7 e pH4. Após a calibração foram utilizados 10g da amostra macerada em 100mL de água destilada, até obtenção de uma mistura homogênea, realizando-se em seguida a leitura direta no pHâmetro (IAL,2008).

A acidez titulável foi determinada por meio do método potenciométrico, utilizando-se 10g da amostra previamente macerada em 100mL de água destilada em um medidor de pH digital (modelo HI8314) utilizando-se o titulante NaOH 0,1M (Êxodo Científica, São Paulo), de acordo com o IAL (2008).

A composição química foi determinada por procedimentos padrões (AOAC, 2016). A umidade foi determinada em estufa a 105°C, por 12 horas ou até atingir peso constante (AOAC 931.04). Pelos métodos Soxlet (AOAC 963.15) e Kjeldahl (AOAC 970.22), os teores de gordura e proteína foram determinados, respectivamente. O teor de cinzas foi determinado por incineração das amostras em mufla a 550°C (AOAC 972.15). Todas as análises foram realizadas nos nibs e chocolates para as três repetições, em triplicata.

Foi utilizado o método do DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo) para quantificação de açúcar redutor. Foram pesadas 0,2g das amostras e adicionadas 10mL de água destilada e agitadas em vórtex por dois minutos. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos em centrífuga (High Speed Brushless Centrifuge, MPW-30, Varsóvia, Polônia). Coletou-se o sobrenadante para realização do teste DNS, onde foi pipetado 1mL dos extratos e adicionado 1mL do reagente DNS, logo em seguida foram aquecidos em banho maria (modelo 314/2, Nova Ética, Piracicaba, São Paulo) a 100°C por 5 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos e seguiram para a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu UV – 1800, Duisburg, Germany) a 540nm, após o aparelho ter sido zerado com água destilada (branco).

O açúcar total foi determinado pipetando-se 2mL do sobrenadante obtido anteriormente, e adicionou-se 2,0 mL de HCl 2N (Neon Comercial, Suzano, São Paulo) em tubos que foram aquecidos em banho maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida ao aquecimento, a amostra foi

resfriada em banho de gelo e acrescentou-se 2,0mL de NaOH 2N (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo). Por fim, foi realizado o teste de DNS (CECCHI, 2003).

4.3.2. Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais dos nibs e dos chocolates foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu. A extração dos compostos fenólicos foi realizada em solvente aquoso, adaptado de LEE et al. (2003). Foram pesados 0,2g de cada amostra e adicionados 10mL de água destilada a 40°C (chocolate) e 100°C (nibs) para diluição das amostras. Uma alíquota de 0,5mL foi transferida para um balão volumétrico de 10mL, e em seguida transferidas para tubos de ensaio, adicionando-se 2,5mL do reagente Folin-Ciocalteu 10% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo). A mistura foi mantida em repouso por 8 minutos, e após este período foram adicionados 2mL de carbonato de sódio 4% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo). Após a incubação por 2 horas à 25°C e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV – 1800, Duisburg, Germany) a 773 nm (chocolate) e 740 nm (nibs), por se tratar de amostras diferentes e de composição diferente. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalentes de epicatequina (mg).

4.3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante - Ensaio de eliminação de radicais (DPPH)

A capacidade antioxidante por ensaio de eliminação de radicais foi determinada utilizando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazilil (DPPH) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) pelo método de Molyneux (2004). Para o preparo dos extratos, diluiu-se 0,2g das amostras de nibs e chocolates em 10mL de água destilada a 40°C e 100°C, respectivamente. Em seguida 100µL do extrato das amostras foram transferidos para tubos de ensaio contendo 3,9mL da solução etanólica (Etanol – álcool absoluto 99,8%) do radical DPPH (0,004%). As misturas foram armazenadas ao abrigo da luz por 30 minutos em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). A capacidade de eliminação de radicais livres foi então avaliada medindo a absorbância a 517nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV – 1800, Duisburg, Germany). O mesmo procedimento foi realizado com etanol (Êxodo Científica, São Paulo) substituindo a amostra, considerado branco.

4.3.4. Quantificação de Teobromina, Cafeína, Epicatequina e Catequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a obtenção de cromatogramas e quantificação de teobromina, cafeína, catequina e epicatequina dos nibs e chocolates. Inicialmente as amostras dos nibs e dos chocolates foram pesadas aproximadamente 0,02 g de cada amostra, adicionados 5 mL de solução extratora (85% H₂O, acidificado com 0,3% de ácido acético, e 15% Metanol) (Êxodo Científica, São Paulo) em tubos de ensaio e mantidos sob agitação por 15 minutos em banho ultrassônico (Sanders medical, SoniClean 6, Brasil). Posteriormente, os tubos foram colocados em banho termostático (Tecnal, Te-2005, Piracicaba, Brasil) a 60°C por 10 minutos e centrifugados (SP Labor, Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a 3000g por 15 minutos para separação. O extrato foi filtrado com filtros estéreis (Filtrilo, Colombo, Paraná) de 0,22 µm. Utilizou-se o método de acordo com Jolic et al. (2011) para a análise de CLAE. Os extratos filtrados foram separados em coluna RP-LC (Zorbax SB-C18, 4,6 mm ID x 250 mm, 5µm e coluna de guarda Zorbax SB-C 18, 4,6 mm ID x 12,5 mm, 5 µm) usando um sistema HP Agilent 1260 Infinity II. A fase móvel consistiu em 2,5% de ácido acético (Êxodo Científica, São Paulo) (solvente A) e acetonitrila (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo) (solvente B) a uma taxa de fluxo de 1mL/min. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0–13 min 3% do solvente B, 13–18 min 9% de B, 18–25 min 11% de B, 25–45 min 18% de B, 45–50 min 30% de B e em 50 min 3 % de B. As curvas de calibração dos padrões foram preparadas diluindo os padrões (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) de estoque com a solução extratora (85% H₂O, acidificado com 0,3% de ácido acético, e 15% Metanol) (Êxodo Científica, São Paulo), sendo composta por oito pontos (1 a 128µg/ml) de (-) -epicatequina, (+) -catequina, cafeína e teobromina. Os cromatogramas foram registrados a 274 e 280nm e a identificação dos compostos de interesse foi obtida comparando seus espectros de UV e tempos de retenção dos picos separados com os tempos de retenção dos padrões.

Os compostos fenólicos identificados foram quantificados pelo método do padrão externo, sendo a quantificação baseada na área do pico. As curvas de calibração dos padrões foram preparadas diluindo os padrões (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) de estoque com a solução extratora (85% H₂O, acidificado com 0,3% de ácido acético, e 15% Metanol) (Êxodo Científica, São Paulo), sendo composta por oito pontos (1 a 128µg/ml) de (-) -epicatequina, (+) -catequina, cafeína e teobromina.

4.3.5. Determinação de Taninos Condensados – método Vanilina

A determinação de taninos condensados foi realizada através do método da vanilina utilizando a metodologia proposta por Tiitto-Julkunem (1985). As amostras de nibs e chocolate foram pesadas (5g) para a preparação do extrato, em seguida foram adicionados 30mL de solução de acetona (Êxodo Científica, São Paulo) a 80%. Essa mistura permaneceu sob agitação por 20 minutos e logo após foi filtrada em papel filtro (Filtrilo, 36 Colombo, Paraná). O processo de adição de 30mL de acetona a 80% foi repetido por mais duas vezes. Os extratos resultantes tiveram o volume final ajustado para 100mL. Para a realização da análise adicionou-se em tubo de ensaio (revestido com papel alumínio) 0,5mL do extrato, 3mL de solução metanólica de vanilina (Zara Lab, Juiz de Fora, Minas Gerais) a 4%, agitou-se em vórtex essa mistura e adicionou-se 1,5mL de ácido clorídrico concentrado (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo), a mistura foi agitada novamente e em seguida permaneceu em repouso por 20 minutos. A absorbância das amostras foi lida a um comprimento de onda de 500nm em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q898UV2, Diadema, São Paulo). Os resultados foram expressos em mg de catequina por 100g de amostra em base seca.

4.3.6. Análise de Espectroscopia no infravermelho médio (MIR)

As amostras de nibs e dos chocolates foram analisadas por MIR, e os espectros obtidos em equipamento FTIR-ATR com célula de reflectância total atenuada (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Aproximadamente 0,5g das amostras foram colocadas individualmente sobre o compartimento do acessório onde incidem os raios na faixa do infravermelho (cristal de diamante). Todas as repetições de cada amostra foram avaliadas na região espectral com número de onda de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , 64 scans de varredura na amostra e leitura através do cristal de diamante, sendo obtidos os espectros no modo de absorbância. A análise foi realizada em temperatura ambiente sendo que entre cada digitalização foi realizada uma leitura sem amostra na superfície do diamante coletando-se o branco. Após a obtenção dos espectros, os dados foram organizados numericamente em planilhas, os quais foram manipulados por meio do Microsoft Office Excel 2016®.

4.3.7. Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas para presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Salmonella sp*, cumprindo as exigências da resolução - RDC Nº 331 (Brasil, 2019).

4.3.8. Análise Sensorial

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), BA, Brasil, sendo aprovado sob o número de parecer 5.481.027.

4.3.8.1. Perfil Descritivo Otimizado – PDO

O Perfil Descritivo Otimizado (PDO) proposto por (SILVA *et al.*, 2013) foi utilizado para caracterizar sensorialmente os chocolates produzidos. Através da aplicação de um questionário estruturado recrutou-se 60 consumidores de chocolate afim de avaliar a disponibilidade de tempo do julgador em realizar testes sensoriais, condições de saúde, hábitos alimentares, experiência prévia e não utilização de medicamentos que poderiam interferir nas análises.

Os julgadores foram pré-selecionados por meio do teste de Diferença Triangular, com o objetivo de avaliar a capacidade de discriminar amostras. Para a realização desta, foram utilizados chocolates com teores de 60% e 70% de cacau, servidos de forma aleatória. realizando-se quatro repetições, sendo selecionado o julgador que acertou no mínimo 75% dos testes (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006). O teste foi conduzido em cabine individual com chocolates codificados com números aleatórios de três dígitos servidos juntamente com água a temperatura ambiente e biscoito tipo água e sal para que os provadores utilizassem entre as avaliações das amostras.

Após a pré-seleção dos julgadores foi realizado o desenvolvimento da terminologia descritiva utilizando o método de Rede com apresentação de uma lista prévia. Os tratamentos foram oferecidos aos julgadores e após avaliações os atributos foram listados e discutidos em mesa redonda para definição do conceito dos termos descritivos e padronização dos materiais de referência (fraco ou ausente / forte). Uma equipe de 18 julgadores participou de sessões de familiarização com os termos descritores e seus respectivos materiais de referência (Tabela 1).

Tabela 1. Termos descritores, definições e materiais de referência.

ATRIBUTOS	DEFINIÇÕES	MATERIAIS DE REFERÊNCIA
APARÊNCIA		
Brilho	Capacidade da amostra de refletir a luz.	Fraco: Formulação 70% cacau cru Forte: Formulação 70% cacau cru untada com óleo de Soja
Cor Marrom	Cor marrom característica de chocolate/ Intensidade da cor marrom.	Fraco: Nestlé® Classic ao leite Forte: Neugebauer® intense 70% cacau
AROMA		
Aroma de chocolate	Aroma característico de chocolate (remete às amêndoas de cacau torradas e quebradas – nibs)	Fraco: Nestlé® Classic ao leite Forte: Callebaut® Cocoa nibs
TEXTURA		
<i>Snap</i>	Barulho ao quebrar o chocolate. A quebra é firme e o som é alto e claro? Ou é um som baixinho e abafado? O chocolate não quebra, apenas dobra e não tem som.	Fraco: Formulação 50% ao leite de búfala. Forte: Neugebauer® intense 70% cacau
Dureza	Força necessária para quebrar o alimento com os dentes incisivos (mordida).	Fraco: Formulação 40% cacau cru Forte: Neugebauer® intense 70% cacau
Arenosidade	Que tem aspecto de areia (presença de pequenas partículas na boca ao degustar o chocolate).	Ausente: Formulação 70% alta fermentação Forte: formulação 40% cacau cru
SABOR		
Gosto doce	Sensação do gosto básico provocado pela sacarose. Descreve chocolates com altas concentrações de sacarose.	Fraco: Chocolate Mattez 70% Forte: Formulação 50% Torrado
Gosto ácido	Sensação provocada pela degustação de soluções aquosas da maioria das substâncias ácidas (ácido cítrico, ácido acético, dentre outros).	Fraco: Neugebauer® intense 70% cacau Forte: Formulação 70% baixa fermentação
Gosto amargo	Gosto amargo característico do Nibs (amêndoa de cacau torrada e triturada), com permanência na boca após deglutir o chocolate.	Fraco: Formulação 70% torrado Forte: Callebaut® Cocoa nibs
Adstringente	Sensação de boca seca e/ou aspereza na língua na qual aumenta a produção de saliva; por exemplo banana verde, alguns vinhos.	Fraco: Formulação 50% cacau cru Forte: Formulação 70% baixa fermentação
Sabor de chocolate	Sabor característico de chocolate intenso proveniente de amêndoas de cacau que foram bem fermentadas e torradas.	Fraco: Neugebauer® meio amargo 40% de cacau Forte: Chocolate Maltez 70%

Na avaliação final das amostras de chocolates foi utilizado o protocolo atributo por atributo onde em cada sessão apenas um atributo foi avaliado. Em cada sessão de avaliação o

jugador recebeu as três formulações de chocolates aleatorizadas e codificadas com números de três dígitos e os materiais de referência do atributo avaliado. O julgador foi orientado a comparar os chocolates com os materiais de referência antes de marcar a intensidade na escala de avaliação sensorial utilizando uma ficha de escala não estruturada de 9cm. As análises foram conduzidas em cabines individuais, sob luz branca e temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Foram realizadas três repetições da avaliação por julgador totalizando 33 sessões para avaliação de todos os atributos. A análise foi conduzida segundo o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), de forma que todos os julgadores avaliaram todas as formulações.

4.3.8.2. Aceitação e Intenção de Compra

Os testes de aceitação e intenção de compra foram realizados com 120 consumidores não treinados em única sessão. As amostras de chocolates dos diferentes tratamentos foram codificadas com números aleatórios de três dígitos e servidas aleatorizadas em cabines individuais iluminadas por luz branca, onde os julgadores avaliaram os atributos de aparência, aroma, textura, sabor e impressão global (IG), utilizando uma escala estruturada de nove pontos, onde o valor 1 correspondeu a “desgostei muitíssimo” e o valor 9 a “gostei muitíssimo”. Em seguida, os mesmos julgadores indicaram por meio de uma escala de atitude de 5 pontos o grau de Intenção de Compra do produto (STONE; SIDEL, 2004).

4.3.9. Delineamento experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado para a produção e análise dos dados de composição química e propriedades físico-químicas do chocolate foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e três tratamentos (50%, 70% e 90% de índice de fermentação das amêndoas). Os dados obtidos dos resultados das medidas analíticas dos nibs e dos chocolates foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey utilizando o programa SAS® OnDemand for Academics (Copyright © 2022 SAS Institute Inc. All Rights Reserved) para avaliar a diferença significativa das médias entre os tratamentos a 5% de significância. Os dados foram apresentados como média \pm DP (desvio padrão).

Os espectros obtidos através da análise do infravermelho médio (MIR) foram organizados em dados numéricos e tratados por meio do Microsoft Office Excel 2010 ® sendo plotado seus respectivos gráficos no programa SigmaPlot for Windows, Version 14.0.

Para obter os escores sensoriais, o intervalo que compreende o extremo esquerdo da escala e a marca feita pelo julgador foi medida com uma régua e os resultados foram analisados por meio da Análise de Componentes Principais (ACP) utilizando o programa SAS®

OnDemand for Academics (Copyright © 2022 SAS Institute Inc. All Rights Reserved) para obtenção do mapa sensorial. Os dados também foram analisados usando a ANOVA e teste de Tukey ao nível de significância de 5% para comparar o efeito dos tratamentos em relação a cada atributo sensorial individual, ao teste de aceitação e intenção de compra dos julgadores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização física das amêndoas de cacau

A partir da análise realizada, verificou-se que as amêndoas classificadas como pequenas apresentaram um índice de fermentação de até 50%, com repetições variando entre 48%, 47% e 50%. Já para as amêndoas de tamanho padrão e médio foram selecionadas aquelas com valores próximos a 70%, com repetições de 67%, 68% e 70% e acima de 90% com repetições de 94%, 95% e 97% (Figura 9). Os percentuais de amêndoas mofadas, germinadas e ardósia foram de 0%, sendo classificadas em cacau Tipo I (Brasil, 2008). Foram então selecionadas três amostragens dessas amêndoas, totalizando 9Kg por tratamento, 3Kg por repetição.

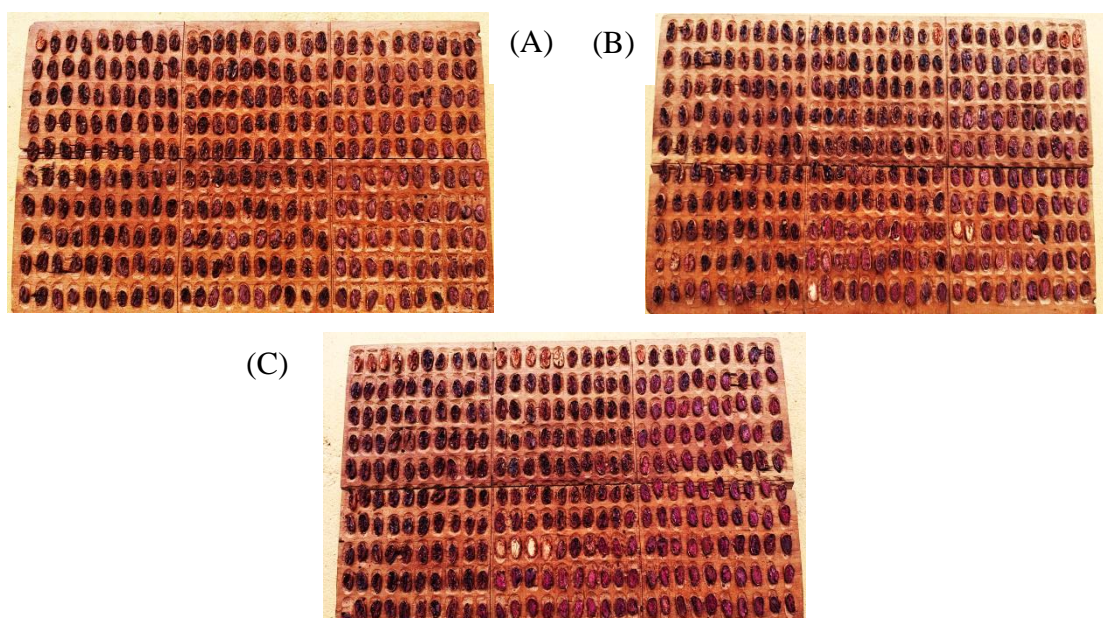


Figura 9. Prova de Corte realizada na tábua de classificação para amêndoas de cacau. (A) Índice de fermentação 90%, (B) Índice de fermentação (70%) e (C) Índice de fermentação (50%).

Fonte: Acervo do autor, 2022

5.2. Composição e parâmetros físico-químicos dos nibs de cacau e chocolates produzidos

A Tabela 2 mostra a composição das diferentes amostras de nibs de cacau Forasteiro (Pará/Parazinho) de acordo com o índice de fermentação.

Tabela 2. Valores médios (\pm DP) de composição química e parâmetros físicos dos nibs produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.

Variáveis	Nibs		
	Amêndoas 50%	Amêndoas 70%	Amêndoas 90%
Umidade (%)	3,81 \pm 0,30 ^a	4,01 \pm 0,18 ^a	3,38 \pm 0,21 ^a
Cinzas (%)	2,27 \pm 0,07 ^a	2,33 \pm 0,08 ^a	2,30 \pm 0,03 ^a
Gordura (%)	36,38 \pm 0,48 ^a	38,69 \pm 0,31 ^b	41,91 \pm 0,83 ^c
Proteína (%)	16,20 \pm 0,08 ^a	16,01 \pm 0,13 ^a	15,71 \pm 0,20 ^b
pH	4,85 \pm 0,06 ^a	4,93 \pm 0,11 ^a	4,89 \pm 0,14 ^a
Acidez (meqNaOH/100g)	7,6 \pm 0,05 ^a	8,0 \pm 0,01 ^a	8,5 \pm 0,01 ^a
Açúcar Total (%)	14,97 \pm 0,21 ^a	13,25 \pm 0,34 ^{ab}	11,82 \pm 1,12 ^b
Açúcar Redutor (%)	0,39 \pm 0,06 ^a	0,71 \pm 0,11 ^b	0,82 \pm 0,05 ^c

^{a,b,c} Resultados seguidos de mesma letra em linha não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Para todos os índices de fermentação o principal nutriente presente nos nibs de cacau em relação a quantidade foi a gordura (36,38 – 41,91%), seguido de proteínas (15,71% - 16,20%), apresentando diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$) para os parâmetros umidade, cinzas, pH e acidez.

O teor de proteína foi menor nos nibs produzidos com amêndoas que possuíam um índice de fermentação maior que 90%. Essa redução se deve ao processo de clivagem proteolítica, induzida pelo processo fermentativo. A degradação da proteína é desencadeada quando subprodutos da fermentação microbiana como etanol, ácido lático e principalmente o ácido acético penetram no cotilédone da amêndoa ativando enzimas proteolíticas juntamente com reações inespecíficas de clivagem de proteínas (D'SOUZA *et al.*, 2018; MILLENA *et al.*, 2023).

Para o teor de gordura, observou-se um aumento significativo nos nibs produzidos a partir de amêndoas mais fermentadas. Os valores médios variaram de 36,38% nos nibs produzidos com amêndoas de baixa fermentação para 41,91% nos nibs produzidos com amêndoas de alta fermentação. A fermentação leva a modificações como o aumento da temperatura, a formação de álcool, a acidificação das amêndoas e modificações das atividades enzimáticas que podem levar à degradação de lipídeos, quebra enzimática, hidrólise ou

oxidações com modificações dos teores da gordura durante a fermentação (SERVENT *et al.*, 2018).

A acidez de amêndoas de cacau aumenta durante o processo de fermentação onde os ácidos orgânicos se difundem no interior dos grãos e podem permanecer mesmo depois da etapa de secagem, em contrapartida, dependendo do tempo do processo de secagem e da torra a concentração de ácido acético tende a diminuir e conseqüentemente a acidez total (NURHAYATI; APRIYANTO, 2021; PENIDO *et al.*, 2021). Os valores médios da acidez total no presente estudo variaram de 7,6, 8,0 e 8,5 meqNaOH/100g e o pH 4,85, 4,93 e 4,89 para os nibs produzidos com amêndoas de baixo, médio e alto índice de fermentação, não apresentando diferenças significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Valores próximos foram relatados quando se avaliou o tempo de armazenamento de amêndoas de cacau por 3, 7 e 10 dias e torradas, onde a acidez variou entre 10,2 meqNaOH/100g, 7,0 meqNaOH/100g e 6,0 meqNaOH/100g, respectivamente e o pH 5,31, 5,79 e 5,86, resultados esses acima dos encontrados neste estudo (ERIC OFOSU-ANSAH *et al.*, 2013).

Os valores de açúcar total apresentaram variação significativa ($P > 0,05$) entre os nibs produzidos a partir de amêndoas com baixo e alto índice de fermentação, cujo os valores foram de 14,97% e 11,82%. Os nibs produzidos a partir de amêndoas com fermentação intermediária o valor médio de 13,25% não apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Já para os índices de açúcar redutor onde os valores foram de 0,39% para baixa fermentação, 0,71% para média fermentação e 0,82% para alta fermentação, houve diferença significativa entre todos os tratamentos. Durante o processo de fermentação, o teor de açúcares redutores, constituído principalmente de frutose e glicose é proveniente da quebra enzimática de oligossacarídeos. A sacarose é o dissacarídeo encontrado e sua alta concentração indica uma baixa fermentação. A concentração da sacarose nas amêndoas de cacau tendem a diminuir durante a fermentação devido à ação da invertase endógena no cotilédone, como consequência, a sacarose é convertida em glicose e frutose (MEGIAS-PEREZ *et al.*, 2020; ZUMAETA *et al.*, 2022).

Além da fermentação, o processo de torra que antecede a produção de nibs exerce influência na maioria dos parâmetros analisados, levando a uma redução desses compostos principalmente nos teores de proteínas relacionado à reação de Maillard, assim como o envolvimento do açúcar redutor reagindo com aminoácidos livres e com as próprias proteínas para formar precursores do sabor, bem como os teores de açúcar total, acidez e umidade pela volatilização do ácido acético e água (AFOAKWA *et al.*, 2008; ERIC OFOSU-ANSAH *et al.*, 2013).

Para as amostras de chocolates observou-se que não houve diferença significativa para os parâmetros umidade, cinzas, pH e acidez total entre as amostras (Tabela 3). Independente dos tratamentos utilizados, os chocolates avaliados apresentaram valores de umidade (2,0%, 1,91% e 1,89%) e cinzas (1,44%, 1,47% e 1,51%) dentro dos limites máximos de 3% e 2,5%, respectivamente, estando de acordo com o que a legislação estabelece para esses parâmetros (Brasil, 2008). Os valores para acidez foram de 7,0 meqNaOH/100g, 6,0 meqNaOH/100g e 6,2 meqNaOH/100g, enquanto para o pH observou-se valores de 5,27, 5,24 e 5,18 de acordo com o índice de fermentação das amêndoas utilizadas para a produção.

Tabela 3. Valores médios (\pm DP) da composição química e características físicas dos chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.

Variáveis	Chocolates		
	Amêndoas 50%	Amêndoas 70%	Amêndoas 90%
Umidade (%)	2,0 \pm 0,15 ^a	1,91 \pm 0,06 ^a	1,89 \pm 0,12 ^a
Cinzas (%)	1,44 \pm 0,02 ^a	1,47 \pm 0,04 ^a	1,51 \pm 0,02 ^a
Gordura (%)	47,61 \pm 0,004 ^a	49,45 \pm 0,01 ^a	49,81 \pm 0,003 ^a
Proteína (%)	10,18 \pm 0,20 ^a	9,95 \pm 0,16 ^b	9,80 \pm 0,11 ^b
pH	5,27 \pm 0,06 ^a	5,24 \pm 0,13 ^a	5,18 \pm 0,04 ^a
Acidez (meqNaOH/100g)	7,0 \pm 0,005 ^a	6,0 \pm 0,009 ^a	6,2 \pm 0,005 ^a
Açúcar Total (%)	32,24 \pm 0,45 ^a	30,25 \pm 0,72 ^b	30,21 \pm 1,12 ^b
Açúcar Redutor (%)	4,75 \pm 0,15 ^a	5,28 \pm 0,64 ^a	6,0 \pm 0,34 ^b

^{a,b,c} Resultados seguidos de mesma letra em linha não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

De acordo com os resultados, observou-se que a umidade teve um percentual de redução de 51,74% em relação as médias dos três tratamentos após a produção do chocolate, a acidez reduziu 79,12% e o pH teve um aumento de 6,95% nos chocolates em relação aos nibs utilizados para cada formulação.

Esse efeito está relacionada ao processo de conchagem, que é uma importante etapa para desenvolvimento do sabor e textura final no chocolate, promovendo a eliminação de ácidos voláteis, remoção de umidade e contribuindo para o aumento do pH para valores em torno de 5,70, valor considerado bom para chocolates, uma vez que pH baixo pode estar relacionado a teores elevados de ácidos orgânicos como o acético que afetam negativamente o sabor final (AFOAKWA *et al.*, 2008).

O teor de gordura das amostras foi de 47,61%, 49,45% e 49,81% para os chocolates produzidos com amêndoas de baixa, média e alta fermentação não apresentando diferenças significativas. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Birtea et al. (2020), em que o teor de gordura de chocolates com 70% de sólidos de cacau variou entre 40,12% a 45,81%. Calva-Estrada et al. (2020) ao avaliarem chocolates com percentuais de massa de cacau variando de 60 a 100%, a porcentagem de gordura total nas amostras variou entre 32,71% e 57,90%, sendo que para o chocolate 70%, o teor de gordura foi inferior ao desse estudo alcançando o valor de 39,26%.

Nos chocolates produzidos com amêndoas de baixa fermentação o valor de proteínas foi de 10,18%, significativamente maior em relação aos demais tratamentos, enquanto que nos chocolates produzidos com amêndoas de média e alta fermentação os teores foram de 9,95% e 9,80%, não se diferindo entre si (Quando comparados os teores médios de proteínas dos nibs em relação aos chocolates, o percentual de redução foi de 62,42%).

As proteínas são macromoléculas importantes nas amêndoas de cacau porque contribuem para o desenvolvimento do sabor, principalmente durante a torra através da reação de Maillard. As diferenças entre os precursores de aroma relacionados ao cacau e os perfis de proteína foram determinados para amêndoas de cacau de diferentes híbridos no Brasil e demonstrado que há perdas destes compostos durante a fase de conchagem (TOKER; PALABIYIK; KONAR, 2019).

5.3. Teor de compostos bioativos e antioxidante dos nibs de cacau e chocolates produzidos

Foram obtidos cromatogramas relacionados aos compostos bioativos de interesse: teobromina, cafeína, catequina e epicatequinas por CLAE. A partir dos cromatogramas das amostras de nibs produzidos com amêndoas de diferentes índices de fermentação, foi possível verificar visualmente a redução da área dos picos dos compostos (Figura 9), sendo confirmadas nas posteriores análises estatísticas.

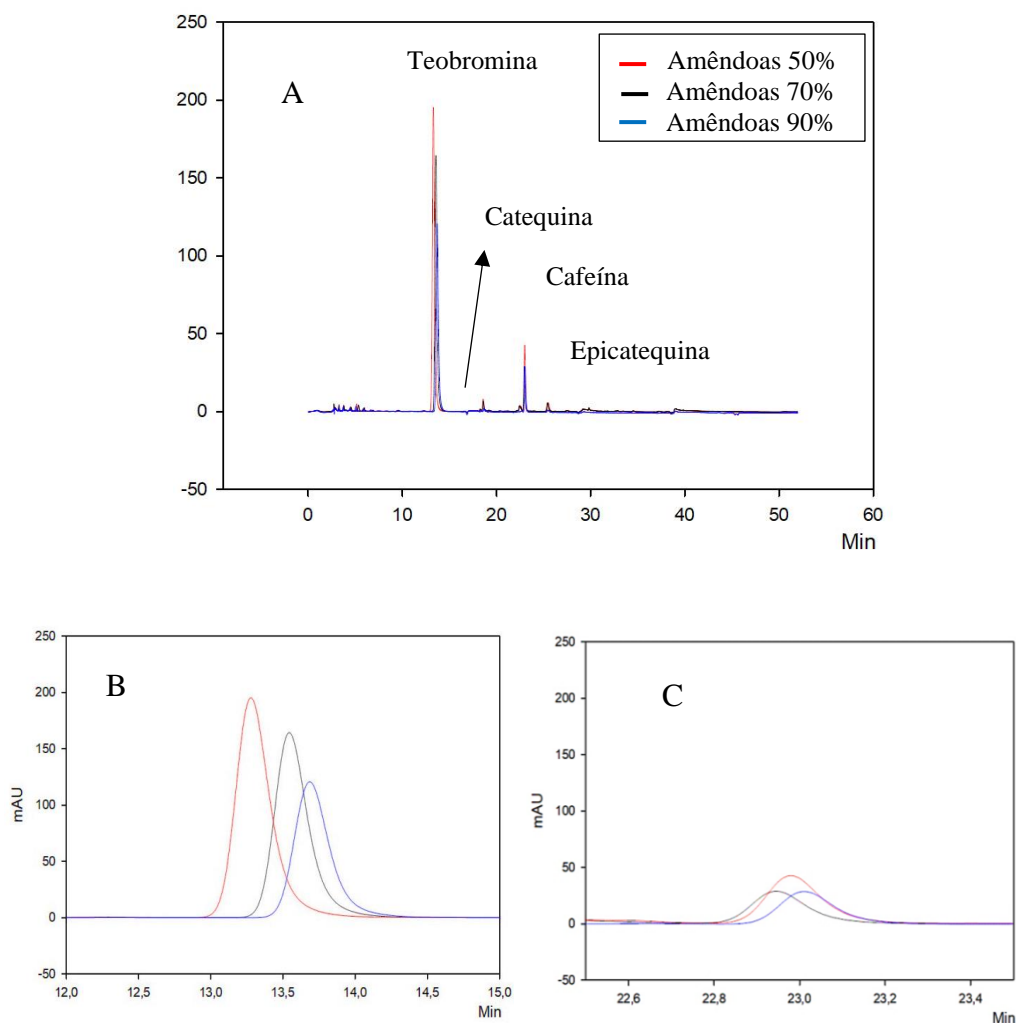


Figura 10. Cromatograma geral obtido por CLAE dos compostos bioativos dos nibs elaboradas a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação (A). cromatograma referente a teobromina (B) e cafeína (C).

A Tabela 4 apresenta os teores de compostos fenólicos totais, epicatequina, catequina, atividade antioxidantes DPPH e metilxantinas (teobromina e cafeína) dos nibs. Os constituintes antioxidantes são nutrientes importantes nos alimentos pois podem levar a uma diminuição ou até mesmo inibição da oxidação lipídica. A capacidade antioxidante (DPPH) dos nibs foi encontrada entre 45,02% e 53,52%.

Os nibs produzidos com amêndoas com maior índice de fermentação demonstraram uma menor capacidade antioxidante, 45,02% ($P < 0,05$), em comparação aos produzidos com amêndoas de menor índice de fermentação (53,52%), porém não apresentou diferença estatística em relação aos nibs produzidos com amêndoas de fermentação intermediária, 48,95%. A atividade antioxidante está relacionada ao conteúdo de polifenóis, onde os fenóis

monoméricos, principalmente epicatequina e catequina, são os principais compostos que auxiliam para essa atividade (CHAGAS *et al.*, 2021).

Tabela 4. Valores médios (\pm DP) de fenólicos totais, atividade antioxidante, teobromina, cafeína, catequina, epicatequina dos nibs produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.

Variáveis	Nibs		
	Amêndoas 50%	Amêndoas 70%	Amêndoas 90%
Fenólicos Totais (mg GAE/100g)	1898,92 \pm 123,6 ^a	1601,08 \pm 101,2 ^b	1322,53 \pm 10,9 ^c
Atividade Antioxidante DPPH (%)	53,52 \pm 3,9 ^a	48,95 \pm 2,25 ^{ab}	45,02 \pm 2,62 ^b
Teobromina (mg/100g)	2644,24 \pm 150,6 ^a	2377,27 \pm 29,68 ^a	2011,02 \pm 195,7 ^b
Cafeína (mg/100g)	201,02 \pm 17,16 ^a	146,21 \pm 15,95 ^b	126,92 \pm 4,9 ^b
Catequina (mg/100g)	39,14 \pm 32,4 ^a	32,39 \pm 23,0 ^b	25,48 \pm 26,8 ^c
Epicatequina (mg/100g)	196,90 \pm 6,32 ^a	159,54 \pm 20,9 ^{ab}	81,82 \pm 71,4 ^b
Taninos Condensados (mg/100g)	16361,1 \pm 703,9 ^a	12176,4 \pm 598,2 ^{ab}	11236,9 \pm 461,4 ^b

^{a,b,c} Resultados seguidos de mesma letra em linha não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Agus, Mohamad e Hussain (2018) avaliaram a atividade antioxidante por DPPH e encontraram valores de 92,29% em amêndoas de cacau não fermentadas, 41,85% para amêndoas de cacau fermentadas não torradas e 51,65% em amêndoas de cacau fermentadas e torradas.

O principal composto bioativo encontrado nas amêndoas de cacau é a teobromina. Considerando todas as amostras, o teor de teobromina nos nibs apresentou uma média de 2344,17 mg/100g, sendo os nibs produzidos com amêndoas de maior índice de fermentação (2011,02 mg/100g) significativamente ($P < 0,05$) menor que os demais tratamentos. Valores semelhantes de teobromina foram observados em 26 variedades de amêndoas de cacau fermentadas variando entre 979 mg/100g e 2438 mg/100g (RAMOS-ESCUADERO *et al.*, 2021).

Assim como a teobromina, a cafeína é um composto abundante nas amêndoas de cacau e estão relacionadas ao sabor amargo. Neste estudo, o teor de cafeína nas amostras de nibs produzidos com amêndoas de menor índice de fermentação foi de 201,02 mg/100g. Esse valor foi significativamente maior ($P < 0,05$) em relação aos outros tratamentos, cujo os valores foram de 146,21 mg/100g para os nibs produzidos a partir de amêndoas com índice de fermentação próximo a 70% e 126,92 mg/100g para os nibs produzidos a partir de amêndoas com índice de fermentação de 90%, onde entre eles não houve diferença significativa a um nível de 5% de confiança.

Amêndoas com menores índices de fermentação apresentam maiores teores de teobromina e cafeína. Durante o processo de fermentação as metilxantinas estão distribuídas em diferentes partes da amêndoa e são exsudadas para a película apresentando tendência à diminuição (JÚNIOR *et al.*, 2020). A alta temperatura do processo de fermentação e a abertura do cotilédone gera uma redução da cafeína em até 50% devido à perda de umidade e lixiviação de compostos celulares, ao mesmo tempo em que a teobromina é biodegradada e dissolvida no líquido formado, saindo das amêndoas pela película reduzindo o seu teor. As metilxantinas contribuem para a melhoria sensorial dos produtos e seu teor está relacionado ao tempo de fermentação e da variedade do cacau (MAN *et al.*, 2005; FEBRIANTO; ZHU, 2022).

As concentrações de catequina nas amostras de nibs variaram de 25,48 mg/100g a 39,14 mg/100g (Tabela 4). Os nibs produzidos com amêndoas de maior índice de fermentação apresentaram menores concentrações (25,48 mg/100g), se diferenciando das amostras de nibs produzidas com menor índice de fermentação (39,14 mg/100g) e das amostras de nibs produzidos com amêndoas de fermentação intermediária (32,39mg/100g). A maior concentração de epicatequina (196,90 mg/100g) foi observada nos nibs produzidos com amêndoas de menor índice de fermentação. Esse valor foi significativamente ($P < 0,05$) maior quando comparado as amostras de nibs produzidas com amêndoas de maior índice de fermentação, 81,82mg/100g, porém não houve diferença significativa em relação as amostras de nibs produzidas a partir de amêndoas com índice de fermentação intermediária (159,54 mg/100g).

Catequina e epicatequina são os principais compostos fenólicos monoméricos presentes no cacau. Eles são degradados durante a fermentação pela ação da polifenoloxidasas (PPOs) que tem sua atividade aumentada devido à diminuição do pH, às condições ligeiramente ácidas e pelas temperaturas elevadas na massa em fermentação (FEBRIANTO; WANG; ZHU, 2021; ZUMAETA *et al.*, 2022). O teor de taninos condensados nos nibs de cacau foi de

16361,1 mg/100g, 12176,4 mg/100g e 11237,9 mg/100g, apresentando diferença significativa entre as amostras de nibs produzidas com amêndoas menos fermentada e mais fermentada. Portanto, quanto mais prolongado o processo fermentativo, maior a redução desses metabólitos. Hernández-hernández et al. (2021) ao avaliarem amêndoas de cacau fermentadas encontraram valores para catequina de 42 mg/100g a 602 mg/100g e para epicatequina de 616 mg/100g a 5,157 mg/100g. Resultados semelhantes foram observados por Plaza *et al.* (2017) que relataram as médias de epicatequina (163 mg/100g) maiores do que o de catequina (78 mg/100g) em amostras de cacau em pó.

O teor de fenólicos totais das diferentes amostras variou entre 1322,53 mg GAE/100g e 1898,22 mg GAE/100g. Os resultados indicaram que o teor de fenólicos totais das amostras de nibs produzidos a partir de amêndoas que apresentaram um maior grau de fermentação foi significativamente ($P < 0,05$) menor dentre os tratamentos (1322,53 mg GAE/100g), seguido das amêndoas com índice de fermentação intermediário (1601,08 mg GAE/100g). A maior concentração de fenólicos totais foi observada nas amêndoas que tinham um menor índice de fermentação (1898,92 mg/100g). As amêndoas de cacau possuem altas concentrações de compostos fenólicos que ao longo do processo fermentativo podem ser eliminados das amêndoas de cacau por lixiviação com o exsudado da fermentação ou pela atividade da polifenoloxidase, podendo ser facilmente percebido pelo aspecto marrom das amêndoas bem fermentadas (BRITO *et al.*, 2017).

A partir dos cromatogramas relacionados aos compostos bioativos de interesses: teobromina, cafeína, catequina e epicatequinas através da análise por CLAE dos chocolates produzidos com amêndoas de diferentes índices de fermentação, verificou-se visualmente a redução da área dos picos dos compostos em relação às amostras de chocolates produzidas com amêndoas de diferentes índices de fermentação (Figura 9).

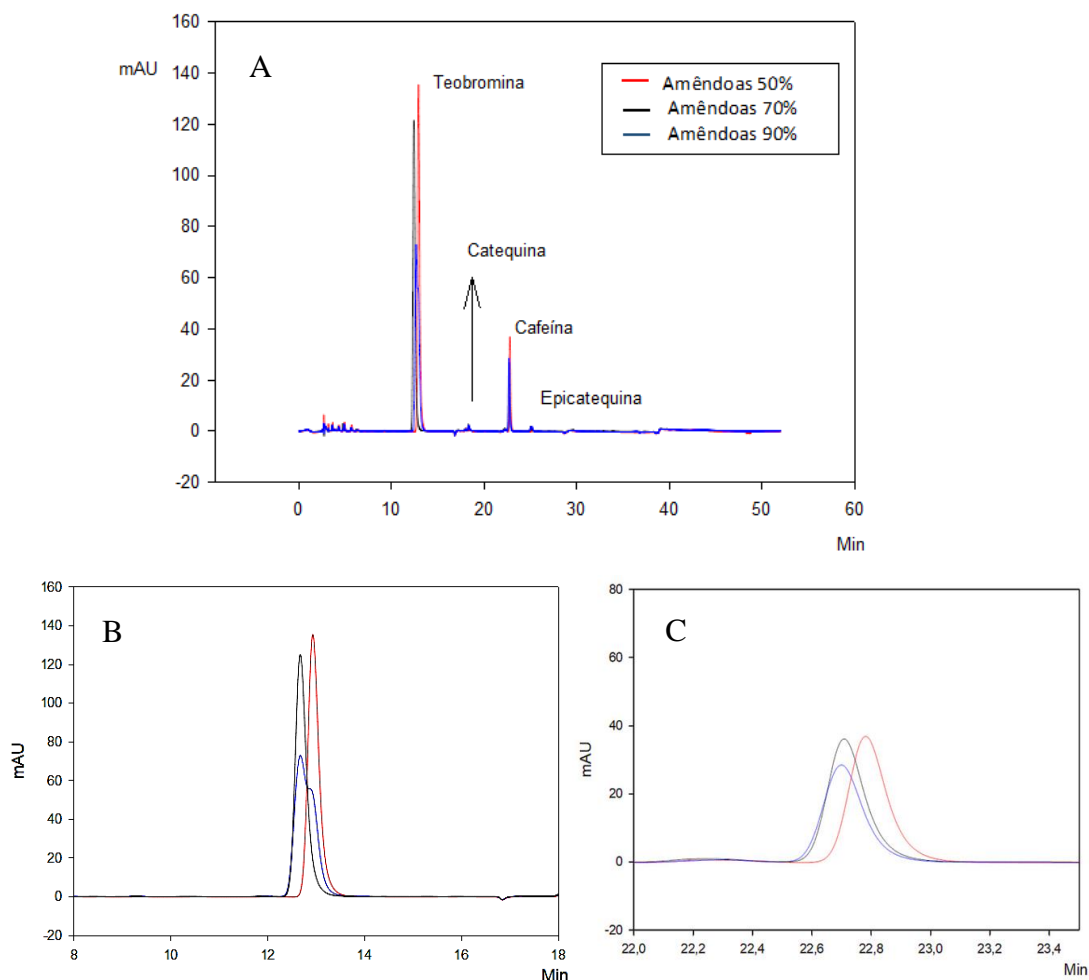


Figura 11. Cromatograma geral obtido por CLAE dos compostos bioativos dos chocolates elaboradas a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação (A). cromatograma referente a teobromina (B) e cafeína (C).

O efeito da utilização de amêndoas com diferentes índices de fermentação no teor de compostos fenólicos totais, epicatequina, catequina e nas metilxantinas (teobromina e cafeína) da formulação dos chocolates são demonstrados na Tabela 5.

A análise de fenólicos totais dos chocolates desenvolvidos demonstra que à medida que se aumentou o índice de fermentação das amêndoas de cacau ocorreu uma diminuição destes compostos que são responsáveis por diversos benefícios para a saúde do consumidor. Foi observada diferença significativa entre as amostras de chocolates produzidas com amêndoas de menor índice de fermentação daquelas produzidas com maior índice de fermentação. O teor de fenólicos totais variou de 605,5 mg no chocolate produzido com amêndoas que apresentaram um índice de fermentação acima de 90% para 1687,85 mg/100g daqueles produzidos a partir de amêndoas menos fermentadas (índice próximo a 50%).

Urbańska e Kowalska (2019) ao avaliarem o conteúdo total de fenólicos em chocolates elaborados a partir de amêndoas de várias partes do mundo, observaram uma variação de 910 mg/100g em chocolates produzidos a partir de amêndoas torradas da Venezuela a 4055 mg/100g em chocolates produzidos com amêndoas torradas da Colômbia.

Resultados semelhantes a este trabalho foram relatados ao analisar chocolates intensos elaborados a partir de três genótipos de cacau (Criolo, Trinitário e Forasteiro/Nacional) e quatro origens geográficas variadas (Amazonia, Venezuela, México e Equador), onde foram estudadas cinco amostras comerciais com teor de cacau entre 60% a 100% e o resultado variou entre 894 mg/100g a 2117 mg/100g para o teor de fenólicos totais (CALVA-ESTRADA *et al.*, 2020). Os autores observaram que a amostra que apresentou menor teor de fenólicos foi a de maior percentual de massa de cacau na formulação, observando que independente do teor da massa de cacau em chocolates intensos, a qualidade da amêndoa, a origem e a variedade genética afetam o teor de polifenóis nos chocolates.

Tabela 5. Valores médios (\pm DP) para fenólicos totais, atividade antioxidante, teobromina, cafeína, catequina, epicatequina dos chocolates produzidos com amêndoas de diferentes índices de fermentação.

Chocolates			
Variáveis	Amêndoas 50%	Amêndoas 70%	Amêndoas 90%
Fenólicos Totais (mg GAE/100g)	1387,23 \pm 292,4 ^a	985,36 \pm 116,0 ^{ab}	726,79 \pm 77,1 ^b
Atividade Antioxidante DPPH (%)	48,58 \pm 1,17 ^a	47,77 \pm 0,96 ^a	45,89 \pm 4,68 ^a
Teobromina (mg/100g)	1821,32 \pm 6,07 ^a	1628,47 \pm 59,21 ^{ab}	1420,41 \pm 153,8 ^b
Cafeína (mg/100g)	138,10 \pm 0,25 ^a	132,21 \pm 3,42 ^{ab}	122,62 \pm 7,23 ^b
Catequina (mg/100g)	20,34 \pm 3,2 ^a	17,56 \pm 4,5 ^b	13,68 \pm 7,1 ^c
Epicatequina (mg/100g)	103,88 \pm 13,4 ^a	54,79 \pm 5,38 ^b	29,50 \pm 6,3 ^b
Taninos condensados (mg/100g)	7067,13 \pm 519,4 ^a	6088,22 \pm 170,8 ^{ab}	5376,29 \pm 513,7 ^b

^{a,b,c} Resultados seguidos de mesma letra em linha não diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05)

Teobromina e cafeína são mais estáveis durante o processamento do cacau comparado com os compostos fenólicos. A quantificação de teobromina e cafeína também demonstrou valores diferentes nos chocolates estudados. Os maiores teores desses compostos foram encontrados nos chocolates produzidos com amêndoas de menores índices de fermentação.

Esses resultados demonstram que à medida que se aumentou o índice de fermentação das amêndoas utilizadas na formulação ocorreu uma diminuição da concentração de teobromina e cafeína nos chocolates produzidos, visto que durante todo o processamento ocorrem perdas significativas em decorrência de altas temperaturas (RAMOS-ESCUADERO *et al.*, 2021). A média da concentração de teobromina e cafeína dos chocolates variou de 1420,41mg/100g a 1821,32mg/100g e 122,62mg/100g a 138,10mg/100g, respectivamente.

Grassia *et al.* (2019) ao avaliarem o perfil nutricional e alguns benefícios para saúde de três amostras de amêndoas de cacau de diferentes origens e cinco amostras de produtos de cacau (Criollo) com diferentes porcentagens de sólidos de cacau (70% a 100%) observaram que não houve diferença significativa para o conteúdo de teobromina e cafeína nas amostras de amêndoas de cacau nos chocolates produzidos com essas amêndoas, onde o teor desses compostos foi de 1490mg/100g para teobromina e 48mg/100g para cafeína, valores semelhantes ao encontrado no presente estudo. Estes resultados são superiores aos encontrados por Żyżelewicz *et al.* (2018) que observaram concentrações de teobromina variando entre 671 mg/100g a 944 mg/100g e para cafeína 90 mg/100g a 119 mg/100g, valores esses, mais próximos ao deste estudo.

Apesar das diferenças em relação aos compostos fenólicos totais e demais constituintes, a atividade antioxidante DDPH das amostras de chocolate não foi afetada e não houve diferenças significativas, apresentando valores de 48,58%, 47,77% e 45,89% para os tratamentos. Observando-se os flavonóides catequina e epicatequina, nota-se que ambos apresentaram concentrações diferentes de acordo com o índice de fermentação das amêndoas visto que são degradados pela ação da enzima polifenoloxidase.

O teor de catequina variou em média de 13,68 mg/100g nos chocolates produzidos com amêndoas mais fermentadas para 20,34 mg/100g em chocolates produzidos com amêndoas menos fermentadas (Tabela 5). O mesmo comportamento foi observado para a epicatequina, onde nos chocolates produzidos com amêndoas menos fermentadas o valor de 103,88 mg/100g foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos, cujo valores atingiram 54,79 mg/100g para os chocolates produzidos com amêndoas de índice de fermentação intermediária e 29,5 mg/100g nos chocolates produzidos com amêndoas mais fermentadas.

Decréscimos nos níveis de catequina e epicatequina foram observados em amêndoas fermentadas em comparação a amêndoas não fermentadas e essas perdas foram relacionadas à duração do processo de fermentação (FARIA, 2019). O teor de taninos condensados nos chocolates foi de 7067,13 mg/100g, 6088,22 mg/100g, 5376,29 mg/100g, apresentando diferença significativa entre as amostras produzidas com amêndoas menos fermentada e mais fermentada, demonstrando uma redução considerável em relação aos nibs utilizados para a produção. O monitoramento do conteúdo de epicatequina e catequina em um processo combinado de moagem e conchagem revelou que esses compostos na maior parte em condições de torra aplicada anteriormente, não apresentavam diferenças significativas, mas em alguns casos, os monômeros mostravam diminuição durante o estágio de processamento simultâneo de moagem e conchagem, podendo estar associado à degradação de procianidinas (ZYŻELEWICZ *et al.*, 2018).

5.4. Espectroscopia de Infravermelho Médio (MIR)

Para fins de análise comparativa dos perfis espectroscópicos dos nibs produzidos a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação, as amostras foram analisadas por MIR e os espectros estão demonstrados na Figura 10.

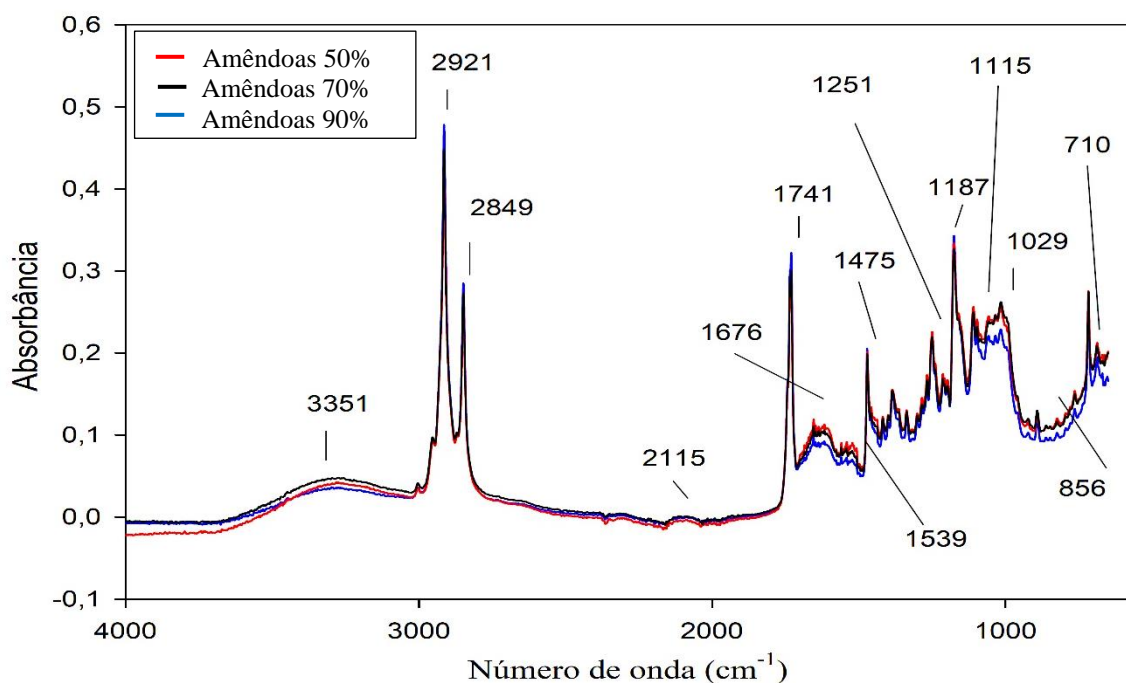


Figura 12. Espectros de absorção na região do infravermelho médio dos nibs produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.

A visualização dos espectros dos nibs confirmou a ocorrência das vibrações de diferentes grupos funcionais com propriedades estruturais de diferentes substâncias. Observou-se a formação de 14 bandas onde os números de ondas 3351cm^{-1} (O-H), 2921cm^{-1} , 2849cm^{-1} (C-H) associados à lipídios, 1676cm^{-1} (C=O) associado às proteínas e 1475cm^{-1} , 1115cm^{-1} , 856cm^{-1} (C-H, C-OH) associados aos grupos fenólicos. Foi possível observar as diferentes intensidades dessas bandas que revelou a existência de diminuição da intensidade em relação aos tratamentos.

Os espectros das amostras de chocolates apresentaram comportamentos semelhantes (Figuras 11), também se diferenciando apenas nas intensidades das bandas. Pode-se observar nos espectros obtidos 19 diferentes bandas, sendo a intensidade das bandas entre 1734cm^{-1} correspondente a grupos de triglicerídeos, associado as ligações entre C-O (MAN et al., 2005). As bandas de 3327cm^{-1} a 3556cm^{-1} indicam vibrações entre O-H, apontando a presença de compostos fenólicos. Entre a região de 1150cm^{-1} e 650cm^{-1} percebe-se uma maior absorção provocada por grupos de macromoléculas como carboidratos e lipídeos (DEUS et al., 2021b).

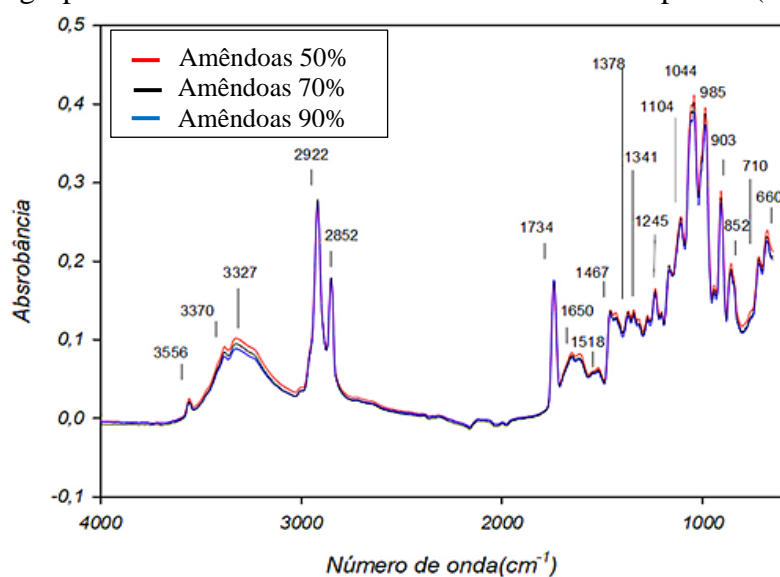


Figura 13. Espectros de absorção na região do infravermelho médio dos chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação.

A utilização de amêndoas com diferentes índices de fermentação influencia no teor de compostos dos chocolates podendo ser visualmente observado nas intensidades das vibrações das bandas, onde os números de onda 3327cm^{-1} (O-H), 2922cm^{-1} , 2852cm^{-1} (C-H) associados a lipídeos praticamente se sobrepõem, como visto nas outras análises de composição realizadas, da mesma forma no comprimento de onda 1650cm^{-1} (C=O) associado à proteína. Já em 1518cm^{-1} , 1178cm^{-1} , 852cm^{-1} (C-H, C-OH) associados aos compostos fenólicos, podemos observar diferenças nas intensidades das bandas. A comparação dos espectros dos chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação revelou que essa variável

leva a uma diminuição da intensidade de algumas bandas à medida em que se aumenta esse índice principalmente na região entre 3356cm^{-1} a 3530cm^{-1} , 2922cm^{-1} a 2905cm^{-1} , 1104cm^{-1} a 980cm^{-1} associadas ao anel aromático que fazem parte dos compostos fenólicos, estando de acordo com os resultados encontrados para análise de composição química, físico-químicas e análises cromatográficas.

5.5. Análise microbiológica dos chocolates

Brasil (2019) estabelece uma tolerância de 10NMP/g para Coliformes a 45°C , ausência de *Salmonella sp* / 25g e 1 UFC / g para *Staphylococcus aureus*. As análises microbiológicas para todas as formulações de chocolate apresentaram-se dentro dos padrões legais vigentes.

5.6. Análise Sensorial dos Chocolates

5.6.1 Aceitação e Intenção de Compra

Para que o alimento produza satisfação ao consumidor é necessário além da qualidade nutricional que ele apresente um equilíbrio dos diferentes parâmetros sensoriais. Na Tabela 6 encontram-se as médias e o desvio padrão para os atributos sensoriais de aparência, aroma, textura, sabor e impressão global. Analisando os dados, pode-se concluir que os tratamentos não influenciaram a preferência dos julgadores relacionado a aparência e a textura dos chocolates produzidos a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação.

Tabela 6. Valores médios (\pm DP) para as notas obtidas no teste de aceitação dos chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).

Atributos Sensoriais	Chocolates		
	C50	C70	C90
Aparência	8,3 + 0,87 ^a	8,31 + 0,86 ^a	8,4 + 0,79 ^a
Aroma	7,5 + 1,15 ^a	7,6 + 1,17 ^{ab}	8,0+ 1,04 ^b
Textura	7,8 + 1,11 ^a	8,0 + 0,96 ^a	8,1 + 0,84 ^a
Sabor	6,6 + 1,53 ^a	7,4 + 1,51 ^b	8,0+ 0,99 ^c
Impressão Global	7,1 + 1,16 ^a	7,6 + 1,12 ^b	8,0 + 0,81 ^c

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam haver diferença significativa entre os resultados segundo o teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Quando avaliado o atributo aparência, observou-se médias de 8,3 para os chocolates produzidos com amêndoas de baixa fermentação (C50), 8,1 para chocolates produzidos com amêndoas de média fermentação (C70) e 8,4 para chocolates produzidos com amêndoas de alta fermentação (C90). Já as médias alcançadas para o atributo textura foram de 7,8, 8,0 e 8,1 para os chocolates com baixa, média e alta fermentação. Provavelmente o fato dos chocolates possuírem a mesma formulação e com o mesmo percentual de sólidos de cacau, incluindo manteiga de cacau, fez com que para esses atributos, ambos fossem considerados iguais para os julgadores. Esses escores demonstram que para esses atributos todas as amostras apresentaram boa aceitabilidade obtendo notas definidas pelo termo “gostei muito” na escala.

Os escores para o atributo aroma variaram entre “gostei muito”, com média de 8,0 para chocolates C90 e “gostei moderadamente” com média de 7,6 para os chocolates C70 e 7,5 para os chocolates C50, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos que utilizaram C90 e C50. Da mesma forma, houve diferença significativa para o atributo sabor em relação a todos os tratamentos, onde os chocolates utilizando amêndoas de alta fermentação apresentaram média de 8,0, os chocolates produzidos com amêndoas de média fermentação média de 7,4 e o chocolate com amêndoas de baixa fermentação com média de 6,6 variando entre os termos “gostei muito”, “gostei moderadamente” e “gostei ligeiramente”. A relação entre a utilização de amêndoas menos fermentadas para produção de chocolate parece ter uma relação significativa ($p < 0,05$) em relação aos atributos aroma e sabor com a aceitação sensorial desse produto.

As amostras de chocolates elaboradas com amêndoas que apresentavam menores índices de fermentação, tiveram escores menores para a aceitação do consumidor, possivelmente devido à presença de sabores amargos e adstringentes causados pelos maiores teores de compostos fenólicos associados à essas amêndoas (PIERACCI *et al.*, 2021). Por outro lado, altas pontuações de aceitação foram obtidas nas amostras de chocolates produzidos com amêndoas de cacau com índice de fermentação superior a 90%. Na avaliação global, a melhor aceitação foi para as amostras C90, alcançando escores de 8,0 correspondendo ao termo “gostei muito”, com diferença significativa entre as amostras.

Em relação a intenção de compra (Figura 12), onde foi utilizada uma escala de cinco pontos variando entre os escores 1 “decididamente não compraria”, 2 “provavelmente não compraria”, 3 “talvez sim/talvez não compraria”, 4 “provavelmente compraria” e 5 “decididamente compraria”, as amostras de chocolates C90 demonstraram uma maior intenção de compra, apresentando uma média de 4,28 correspondendo ao termo “provavelmente

compraria”, as amostras de chocolates C70 com média 3,87 e as amostras de chocolates C50 apresentaram pontuação menor, correspondendo ao termo hedônico “talvez sim / talvez não” compraria, com média de 3,2.

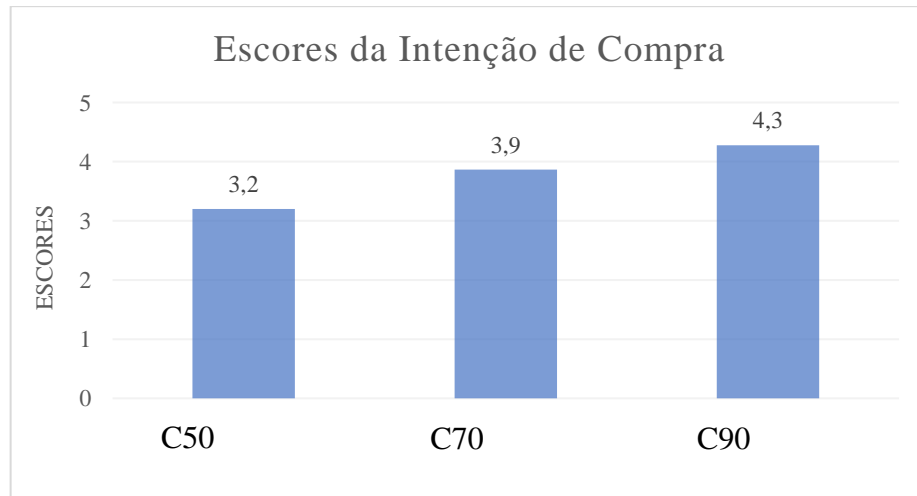


Figura 14. Intenção de compra para os chocolates produzidos a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).

O percentual da intenção de compra (Figura 13) foi considerada adequada para todas as amostras, onde, 90,48% dos julgadores demonstraram uma aceitação positiva, atribuindo notas que variaram entre os termos “certamente compraria” ou “possivelmente compraria” para as amostras dos chocolates com alta fermentação.

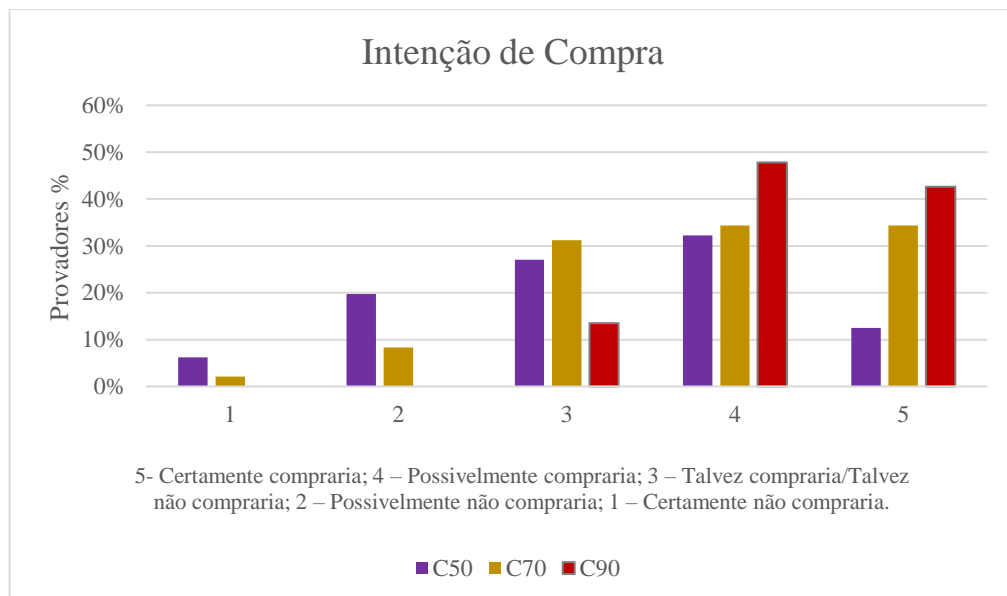


Figura 15. Porcentagens para intenção de compra dos chocolates produzidos a partir de amêndoas com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).

Os resultados indicaram que 46,8% dos participantes manifestaram intenção de compra para as amostras de chocolates produzidos com amêndoas de baixa fermentação sendo que 12,48% afirmaram que “certamente comprariam” e 34,32% que “possivelmente comprariam”. Tais resultados indicam que chocolates produzidos a partir de amêndoas com menor índice de fermentação podem apresentar qualidades sensoriais aceitáveis além de serem mais funcionais devido à maior concentração de compostos bioativos presentes.

5.6.2 Perfil Descritivo Otimizado (PDO)

Na comparação dos chocolates produzidos a partir de amêndoas de cacau com diferentes índices de fermentação pelo teste de Tukey, verificou-se que os atributos brilho, snap, dureza, arenosidade e gosto doce não apresentaram diferenças significativas entre as amostras. Por se tratar da mesma formulação para os chocolates e o mesmo processamento tecnológico de produção, os tratamentos não afetaram a percepção dos julgadores em relação a esses atributos.

Os chocolates produzidos a partir de amêndoas com maiores índices de fermentação (C90), apresentaram maiores intensidades para os atributos sabor de chocolate e aroma de chocolate, apresentando diferença significativa em relação aos demais tratamentos. A intensidade de sabor de chocolate variou de 6,81 (C50), 7,62 (C70) e 8,01 (C90) e para aroma de chocolate a variação foi de 5,68 (C50), 6,61 (C70) e 7,21 (C90), se correlacionando com as análises de constituintes que demonstraram que com o aumento do índice de fermentação ocorre uma redução de compostos como polifenóis e metilxantinas que estão relacionados com esses atributos, além disso, o índice de fermentação da amêndoa de cacau é essencial para formação do sabor e aroma característico de chocolate, pois nessa etapa, componentes endógenos como proteínas e carboidratos são metabolizados em compostos mais simples conhecidos como precursores de sabor (ESCOBAR *et al.*, 2021).

A percepção de intensidade aumentou em relação ao gosto ácido, gosto amargo e adstringência quando se utilizou amêndoas com menores índices de fermentação na produção dos chocolates. Chocolates com maiores teores de compostos fenólicos e metilxantinas como teobromina e cafeína apresentam maiores intensidades de adstringência e amargor, respectivamente. De acordo com as análises desses constituintes, as amostras de chocolate C50 apresentaram maiores conteúdo desses compostos, o que leva a uma maior percepção de intensidade desses atributos. Para adstringência as amostras variaram de 7,34 (C50), 6,82 (C70) e 6,01 (C90) apresentando diferenças significativas para todos os tratamentos.

Tabela 7. Valores médios (\pm DP) para as notas obtidas no Perfil Descritivo Otimizado para os chocolates produzidos com amêndoas com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).

Características	CHOCOLATES		
	C50	C70	C90
Cor Marrom	6,58 \pm 0,36 ^a	7,21 \pm 0,49 ^b	7,51 \pm 0,41 ^b
Brilho	1,81 \pm 0,60 ^a	1,95 \pm 0,60 ^a	2,32 \pm 1,64 ^a
Snap	7,19 \pm 0,50 ^a	7,63 \pm 0,54 ^a	7,20 \pm 0,23 ^a
Aroma de Chocolate	5,68 \pm 0,35 ^a	6,61 \pm 0,45 ^b	7,21 \pm 0,24 ^c
Dureza	7,19 \pm 0,50 ^a	7,63 \pm 0,54 ^a	7,21 \pm 0,23 ^a
Arenosidade	0,08 \pm 0,04 ^a	0,06 \pm 0,09 ^a	0,11 \pm 0,04 ^a
Gosto Doce	1,54 \pm 0,26 ^a	1,50 \pm 0,36 ^a	1,52 \pm 0,35 ^a
Gosto Ácido	7,00 \pm 0,49 ^a	6,65 \pm 0,49 ^{ab}	6,12 \pm 0,65 ^b
Gosto Amargo	6,86 \pm 0,27 ^a	6,38 \pm 0,35 ^b	5,91 \pm 0,49 ^c
Adstringente	7,34 \pm 0,43 ^a	6,82 \pm 0,46 ^b	6,01 \pm 0,38 ^c
Sabor de chocolate	6,81 \pm 0,44 ^a	7,62 \pm 0,27 ^b	8,01 \pm 0,17 ^c

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam haver diferença significativa entre os resultados segundo o teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Da mesma forma para a percepção do sabor amargo, onde as médias variaram significativamente para todos os tratamentos, os escores apresentaram valores de intensidade variando entre 6,86 (C50), 6,38 (C70) e 5,91 (C90). Para o gosto ácido, os chocolates C50 com média 7,0 obtiveram uma pontuação maior significativamente em relação as amostras C90 que apresentou média de 6,12, não apresentando diferença significativa para as amostras C70 (6,65).

Na Análise de Componentes Principais (ACP), a representação gráfica (Figura 14) obtida dos dados gerados pela equipe de avaliação, mostra que o primeiro componente principal explicou cerca de 92,54% da variação total dos dados (CP1; eixo X), enquanto que o segundo componente principal (CP2; eixo Y) explicou 7,46 da variação total e, portanto, apenas a primeira dimensão foi considerada para interpretação, separação e identificação.

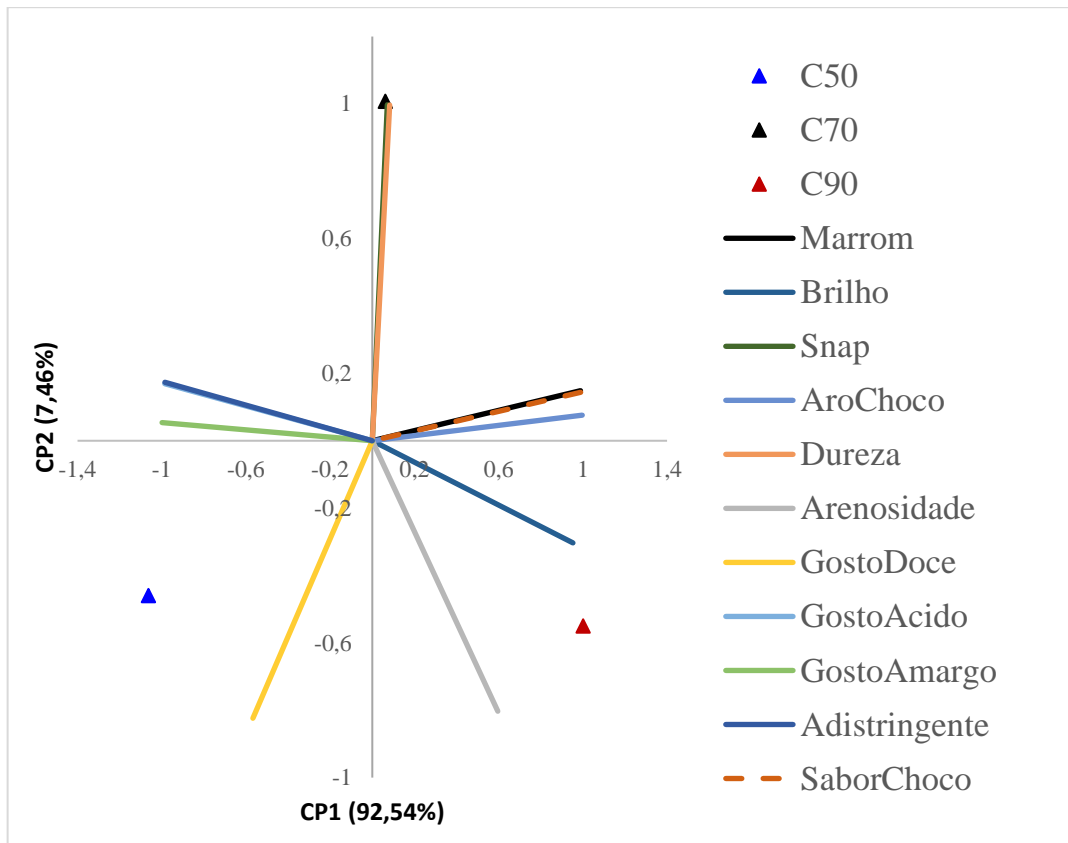


Figura 16. Mapa sensorial dos chocolates produzidos a partir de amêndoas de cacau com diferentes índices de fermentação. Baixa fermentação (C50), média fermentação (C70) e alta fermentação (C90).

*cor marrom (Marrom); aroma de chocolate (Arochoco); sabor de chocolate (Saborchoco).

Os atributos aroma de chocolate, sabor de chocolate e cor marrom se correlacionaram positivamente com o primeiro componente principal e foram determinados com maior intensidade para as formulações de chocolates que utilizaram amêndoas com maior índice de fermentação (C90). O gosto ácido, gosto amargo e adstringência apresentaram correlação negativa com o primeiro componente principal e, portanto, se apresentaram em maior intensidade nas amostras de chocolates que utilizaram amêndoas com baixo índice de fermentação (C50).

6. CONCLUSÕES

O estudo sugere que a utilização de amêndoas de cacau com diferentes índices de fermentação pode afetar significativamente os teores de compostos fenólicos totais, taninos condensados, epicatequina, catequina e metilxantinas (teobromina e cafeína) em chocolates e nibs produzidos a partir dessas amêndoas.

Se a intenção for produzir um chocolate "fino", é recomendado utilizar amêndoas com maiores índices de fermentação, uma vez que isso pode levar a um produto com características sensoriais superiores, o que é importante para atender a um mercado exigente.

No entanto, se a intenção for atender a uma população maior, as amêndoas com menores índices de fermentação podem ser mais apropriadas, já que requerem um menor tempo e custo de processamento, tornando o processo mais viável financeiramente. Além disso, essas amêndoas também apresentaram maiores teores de compostos bioativos, que estão relacionados a efeitos benéficos à saúde.

A escolha das amêndoas de cacau para produção de chocolates e nibs deve ser baseada nos objetivos específicos de cada caso, considerando tanto aspectos sensoriais quanto nutricionais e financeiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Effects of particle size distribution and composition on rheological properties of dark chocolate. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 6, p. 1259–1268, 2008.

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, n. 9, p. 840–857, 2008.

AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; BUDU, A. S.; TAKRAMA, J.; SAALIA, F. K. Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 7, p. 755–764, 2011.

AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; BUDU, A. S.; TAKRAMA, J.; SAALIA, F. K. Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 127–133, 2012.

AFOAKWAH, E. Analyzing Flavonoids in Chocolate-based Beverages. **Kean Quest**, v. 3, n. 1, p. 22, 2020.

AGUIAR, L. A. de; MELO, L.; OLIVEIRA, L. de L. de. Validation of rapid descriptive sensory methods against conventional descriptive analyses: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2535–2552, 2019.

AGUS, B. A. P.; MOHAMAD, N. N.; HUSSAIN, N. Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 4, p. 2581–2589, 2018.

ARIYANTI, M.; ROSNIATI, R.; YUMAS, M.; WAHYUNI, W. Theobromine Content of Non Fermented Cacao Powder With Steam Roasting Related With Health. **AIP Conference Proceedings**, v. 2578, n. November, p. 02004, 2022.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 11, p. 419–421, 2000.

ASSIS, D. C. S. de. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR UPLC/MS-MS PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM MÚSCULO DE FRANGOS DE CORTE APÓS TRATAMENTO. p. 1–72, 2015.

BARIŠIĆ, V.; KOPJAR, M.; JOZINOVIĆ, A.; FLANJAK, I.; AČKAR, Đ.; MILIČEVIĆ, B.; ŠUBARIĆ, D.; JOKIĆ, S.; BABIĆ, J. The chemistry behind chocolate production. **Molecules**, v. 24, n. 17, 2019.

BATISTA, N. N.; DE ANDRADE, D. P.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v. 90, p. 313–319, 2016.

BECKETT, S. T. **Non-Conventional Machines and Processes**. [s.l: s.n.] 732 p.

BIRTEA, A.-I.; AVRĂMUȘ, A.; IVĂNIȘ, D.-P.; SOFIA, G.; POPESCU, A. C.; VELCIOV, A.B. Determination of proximate composition for some dark chocolate types. v. 26, n. 4, p. 343–346, 2020.

BRAGA, S. C. G. N.; OLIVEIRA, L. F.; HASHIMOTO, J. C.; GAMA, M. R.; EFRAIM, P.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Study of volatile profile in cocoa nibs, cocoa liquor and chocolate on production process using GC × GC-QMS. **Microchemical Journal**, v. 141, n. March, p. 353–361, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-Instrução Normativa n° 38, de 23 de jun. de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. Diário Oficial da União, Brasília, 30 jun. 2008.

BRITO, B. de N. do C.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. da S.; GLORIA, M. B. A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 228, p. 484–490, 2017.

BRITTO DE ANDRADE, A.; LINS DA CRUZ, M.; ANTONIA DE SOUZA OLIVEIRA, F.; SOARES, S. E.; DRUZIAN, J. I.; RADOMILLE DE SANTANA, L. R.; OLIVEIRA DE SOUZA, C.; DA SILVA BISPO, E. Influence of under-fermented cocoa mass in chocolate production: Sensory acceptance and volatile profile characterization during the processing. **Lwt**, v. 149, n. June, p. 112048, 2021.

CADBY, Jeana; ARAKI, Tetsuya. The recent rise of craft chocolate in Japan: A 2019 snapshot. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, p. 100273, 2022.

CALVA-ESTRADA, S. J.; UTRILLA-VÁZQUEZ, M.; VALLEJO-CARDONA, A.; ROBLERO-PÉREZ, D. B.; LUGO-CERVANTES, E. Thermal properties and volatile compounds profile of commercial dark-chocolates from different genotypes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from Latin America. **Food Research International**, v. 136, n. August 2019, 2020.

CAÑAS, S.; REBOLLO-HERNANZ, M.; BRAOJOS, C.; BENÍTEZ, V.; FERRERAS-CHARRO, R.; DUEÑAS, M.; AGUILERA, Y.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. Gastrointestinal fate of phenolic compounds and amino derivatives from the cocoa shell: An in vitro and in silico approach. **Food Research International**, v. 162, 2022.

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, n. 1, 2019.

CHAGAS, G. C. A.; FERREIRA, N. R.; GLORIA, M. B. A.; MARTINS, L. H. da S.; LOPES, A. S. Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. **Food Chemistry**, v. 338, p. 127834, 2021.

CHAGAS JUNIOR, G. C. A.; FERREIRA, N. R.; GLORIA, M. B. A.; MARTINS, L. H. da S.; LOPES, A. S. Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. **Food Chemistry**, v. 338, n. August 2020, p. 127834, 2021.

CHE MAN, Y. B.; SYAHARIZA, Z. A.; MIRGHANI, M. E. S.; JINAP, S.; BAKAR, J. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 815–819, 2005.

COHEN, K. de O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M. de N. H. Revisão : Temperagem ou Pré-Cristalização do Chocolate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 1, p. 23–30, 2004.

CRAFACK, M.; KEUL, H.; ESKILDSEN, C. E.; PETERSEN, M. A.; SAERENS, S.; BLENNOW, A.; SKOVMAND-LARSEN, M.; SWIEGERS, J. H.; PETERSEN, G. B.; HEIMDAL, H.; NIELSEN, D. S. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, v. 63, p. 306–316, 2014.

CRICHTON, G. E.; ELIAS, M. F.; ALKERWI, A. Chocolate intake is associated with better cognitive function: The Maine-Syracuse Longitudinal Study. **Appetite**, v. 100, n. May 2016, p. 126–132, 2016.

D'SOUZA, R. N.; GRIMBS, A.; GRIMBS, S.; BEHREND, B.; CORNO, M.; ULLRICH, M. S.; KUHNERT, N. Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans. **Food Research International**, v. 109, n. February, p. 506–516, 2018.

DA SILVA, T. M. L. Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para pesquisa de enrofloxacin e ciprofloxacina em desetos de poedeiras. 2019.

DELGADO, J.; MANDUJANO, J.; REÁTEGUI, D.; ORDOÑEZ, E. Development of dark chocolate with fermented and non-fermented cacao nibs: total polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity and sensory evaluation. **Scientia Agropecuaria**, v. 9, n. 4, p. 543–550, 31 dez. 2018.

DEUS, V. L.; BISPO, E. S.; FRANCA, A. S.; GLORIA, M. B. A. Understanding amino acids and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 97, n. November 2020, p. 103776, 2021a.

DEUS, V. L.; RESENDE, L. M.; BISPO, E. S.; FRANCA, A. S.; GLORIA, M. B. A. FTIR and PLS-regression in the evaluation of bioactive amines, total phenolic compounds and antioxidant potential of dark chocolates. **Food Chemistry**, v. 357, n. April, p. 129754, 2021b.

DÍAZ-MUÑOZ, C.; VOORDE, D. Van De; TUENTER, E.; LEMARCQ, V.; WALLE, D. Van De; PEDRO, J.; MAIO, S. An in-depth multiphasic analysis of the chocolate production chain, from bean to bar, demonstrates the superiority of *Saccharomyces cerevisiae* over *Hanseniaspora opuntiae* as functional starter culture during cocoa fermentation. **Food Microbiology**, v. 109, p. 104115, 2023.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. [s.l.: s.n.]276 p.

EFRAIM, P.; BARRETO ALVES, A.; CALIL PEREIRA JARDIM, D. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 03, p. 181–201, 2011.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; CALIL, D.; JARDIM, P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 30, p. 142–150, 2010.

ERIC OFOSU-ANSAH; AGNES SIMPSON BUDU; HENRY MENSAH-BROWN; JEMMY FELIX TAKRAMA; EMMANUEL OHENE AFOAKWA. Changes in Nib Acidity, Proteolysis and Sugar Concentration as Influenced by Pod Storage and Roasting Conditions of Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 3, n. 12, 2013.

ESCOBAR, S.; SANTANDER, M.; ZULUAGA, M.; CHACÓN, I.; RODRÍGUEZ, J.; VAILLANT, F. Fine cocoa beans production: Tracking aroma precursors through a comprehensive analysis of flavor attributes formation. **Food Chemistry**, v. 365, 2021.

FANTON, S.; CARDOZO, ludmila F.; COMBET, E.; SHIELS, paul G.; STENVINKEL, P.; VIEIRA, I. oliveira; NARCISO, H. R.; MAFRA, D. The sweet side of dark chocolate for chronic kidney disease patients. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 15–26, 2021.

FARIA, F. R. DE. **Degradação de polifenóis e formação de compostos de sabor no processamento de chocolate a partir de amêndoas de cacau fermentadas e não fermentadas**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, São Paulo, 2019.

FEBRIANTO, N. A.; WANG, S.; ZHU, F. Chemical and biological properties of cocoa beans affected by processing: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–33, 2021.

FEBRIANTO, N. A.; ZHU, F. Composition of methylxanthines, polyphenols, key odorant volatiles and minerals in 22 cocoa beans obtained from different geographic origins. **Lwt**, v. 153, n. July 2021, p. 112395, 2022.

FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C.; MOTA-GUTIERREZ, J.; FERROCINO, I.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z. J.; GONZÁLEZ-RÍOS, O.; COCOLIN, L.; SUÁREZ-QUIROZ, M. L. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, n. April, p. 41–50, 2019.

FOWLER, M. S. **Cocoa Beans: From Tree to Factory**. [s.l: s.n.]10–47 p.

GIL, M.; URIBE, D.; GALLEGO, V.; BEDOYA, C.; ARANGO-VARELA, S. Traceability of polyphenols in cocoa during the postharvest and industrialization processes and their biological antioxidant potential. **Heliyon**, v. 7, n. 8, p. e07738, 2021a.

GIL, M.; URIBE, D.; GALLEGO, V.; BEDOYA, C.; ARANGO-VARELA, S. Traceability of polyphenols in cocoa during the postharvest and industrialization processes and their biological antioxidant potential. **Heliyon**, v. 7, n. 8, p. e07738, 2021b.

GONZÁLEZ-BARRIO, R.; NUÑEZ-GOMEZ, V.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; GARCÍA-ALONSO, F. J.; PERIAGO-CASTÓN, M. J. Improvement of the flavanol profile and the antioxidant capacity of chocolate using a phenolic rich cocoa powder. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2020.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; MIYASHITA, K.; CAMP, J. van; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S. B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, n. October 2017, p. 471–475, 2018.

GRASSIA, M.; SALVATORI, G.; ROBERTI, M.; PLANETA, D.; CINQUANTA, L. Polyphenols, methylxanthines, fatty acids and minerals in cocoa beans and cocoa products. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 3, p. 1721–1728, 2019.

GUTIÉRREZ, T. J. State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 6, p. 1313–1344, 2017.

HASHIMOTO, J. C.; LIMA, J. C.; CELEGHINI, R. M. S.; NOGUEIRA, A. B.; EFRAIM, P.; POPPI, R. J.; PALLONE, J. A. L. Quality Control of Commercial Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) by Near-infrared Spectroscopy. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1510–1517, 2018.

HINNEH, M.; SEMANHYIA, E.; VAN DE WALLE, D.; DE WINNE, A.; TZOMPA-SOSA, D. A.; SCALONE, G. L. L.; DE MEULENAER, B.; MESSENS, K.; VAN DURME, J.; AFOAKWA, E. O.; DE COOMAN, L.; DEWETTINCK, K. Assessing the influence of pod storage on sugar and free amino acid profiles and the implications on some Maillard reaction related flavor volatiles in Forastero cocoa beans. **Food Research International**, v. 111, p. 607–620, 2018.

HU, Y.; PAN, Z. J.; LIAO, W.; LI, J.; GRUGET, P.; KITTS, D. D.; LU, X. Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 202, p. 254–261, 2016.

JACKSON, S. E.; SMITH, L.; FIRTH, J.; GRABOVAC, I.; SOYSAL, P.; KOYANAGI, A.; HU, L.; STUBBS, B.; DEMURTAS, J.; VERONESE, N.; ZHU, X.; YANG, L. Is there a relationship between chocolate consumption and symptoms of depression? A cross-sectional survey of 13,626 US adults. **Depression and Anxiety**, v. 36, n. 10, p. 987–995, 2019.

JOHN, W. A.; BÖTTCHER, N. L.; ASSKAMP, M.; BERGOUNHOU, A.; KUMARI, N.; HO, P. W.; D'SOUZA, R. N.; NEVOIGT, E.; ULLRICH, M. S. Forcing fermentation: Profiling proteins, peptides and polyphenols in lab-scale cocoa bean fermentation. **Food Chemistry**, v. 278, p. 786–794, 2019.

JÚNIOR, P. C. G.; SANTOS, V. B. dos; LOPES, A. S.; SOUZA, J. P. I. de; PINA, J. R. S.; JÚNIOR, G. C. A. C.; MARINHO, P. S. B. Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation. **Food Control**, v. 108, p. 106887, 2020.

KADOW, D.; BOHLMANN, J.; PHILLIPS, W.; LIEBEREI, R. Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 86, n. 1, p. 90–98, 2013.

KEEN, C. L. Chocolate: Food as Medicine/Medicine as Food. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. September, p. 436S-439S, 2001.

KONGOR, J. E.; HINNEH, M.; DE WALLE, D. Van; AFOAKWA, E. O.; BOECKX, P.; DEWETTINCK, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. **Food Research International**, v. 82, p. 44–52, 2016.

KRÄHMER, A.; ENGEL, A.; KADOW, D.; ALI, N.; UMAHARAN, P.; KROH, L. W.; SCHULZ, H. Fast and neat - Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 181, p. 152–159, 2015.

KRUSZEWSKI, B.; OBIEDZIŃSKI, M. W. Multivariate analysis of essential elements in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. **Lwt**, v. 98, p. 113–123, 2018.

LONČAREVIĆ, I.; PAJIN, B.; FIŠTEŠ, A.; TUMBAS ŠAPONJAC, V.; 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**, v. 92, p. 458–464, 2018.

LOPES, U. V.; REIS MONTEIRO, W.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Brazilian Society of Plant Breeding. Printed in Brazil Cacao breeding in Bahia, Brazil-strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 73–81, 2011.

MAGRONE, T.; RUSSO, M. A.; JIRILLO, E. Cocoa and dark chocolate polyphenols: From biology to clinical applications. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, p. 1–13, 2017.

MAN, Y. B. C.; SYAHARIZA, Z. A.; MIRGHANI, M. E. S.; JINAP, S.; BAKAR, J. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 90, p. 815–819, 2005.

MARIE, J.; BEREAU, D.; ROBINSON, J. Benefits of Polyphenols and Methylxanthines from Cocoa. **Food**, v. 10, n. 9, p. 1–20, 2021.

MARTIN, M. Á.; RAMOS, S. Impact of cocoa flavanols on human health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 151, n. November 2020, 2021.

MCCLURE, A. P.; HOPFER, H.; GRÜN, I. U. Optimizing consumer acceptability of 100% chocolate through roasting treatments and effects on bitterness and other important sensory characteristics. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 167–174, 2022.

MEDINA-MENDOZA, M.; RODRIGUEZ-PÉREZ, R. J.; ROJAS-OCAMPO, E.; TORREJÓN-VALQUI, L.; FERNÁNDEZ-JERI, A. B.; IDROGO-VÁSQUEZ, G.; CAYO-COLCA, I. S.; CASTRO-ALAYO, E. M. Rheological, bioactive properties and sensory preferences of dark chocolates with partial incorporation of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. **Heliyon**, v. 7, n. 2, 2021.

MEGIAS-PEREZ, R.; MORENO-ZAMBRANO, M.; BEHRENDTS, B.; CORNO, M.; KUHNERT, N. Monitoring the changes in low molecular weight carbohydrates in cocoa beans during spontaneous fermentation: A chemometric and kinetic approach. **Food Research International**, v. 128, p. 108865, 2020.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. [s.l.: s.n.]

MILLENA, C. G.; BALONZO, A. R. R.; RENTOY, J. R.; RUIVIVAR, S. S.; BOBILES, S. C. Effect of fermentation stages on the nutritional and mineral bioavailability of cacao beans (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 115, p. 1–10, 2023.

MORA-ENCALADA, C.; QUEVEDO-GUERRERO, J.; ZHIMINAI CELA-CABRERA, J.; HERRERA-REYES, S.; MOROCHO-CASTILLO, A.; TORO4, J. L. Influencia De la Madurez de las Mazorcas de Cacao: Calidad Nutricional y Sensorial del Cultivar CCN-51. **Revista Bases de la Ciencia**, v. 6, n. 2, p. 27–40, 2021.

MOREIRA, I. M. da V.; VILELA, L. de F.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SCHWAN, R. F. Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. **Food Research International**, v. 109, n. 2017, p. 196–203, 2018.

MUDENUTI, N. V. de R.; CAMARGO, A. C.; ALENCAR, S. M. de; DANIELSKI, R.; SHAHIDI, F.; MADEIRA, T. B.; HIROOKA, E. Y.; SPINOSA, W. A.; GROSSMANN, M. V. E. Phenolics and alkaloids of raw cocoa nibs and husk: The role of soluble and insoluble-bound antioxidants. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101085, 2021.

MUDENUTI, N. V. de R.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; MADEIRA, T. B.; HIROOKA, E. Y.; GROSSMANN, M. V. E. Soluble and insoluble-bound fractions of phenolics and alkaloids and their antioxidant activities in raw and traditional chocolate: A comparative study. **Journal of Functional Foods**, v. 50, n. October, p. 164–171, 2018.

MUÑOZ, M. S.; CORTINA, J. R.; VAILLANT, F. E.; PARRA, S. E. An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1593–1613, 2020.

NASCIMENTO, M. M.; SANTOS, H. M.; COUTINHO, J. P.; SANTOS, A. G.; JESUS, R. M. De. Optimization of chromatographic separation and classification of artisanal and fine chocolate based on its bioactive compound content through multivariate statistical techniques. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104342, 2020.

NATSUME, M.; OSAKABE, N.; YAMAGISHI, M.; TAKIZAWA, T.; NAKAMURA, T.; MIYATAKE, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. Analyses of Polyphenols in Cacao Liquor, Cocoa, and Chocolate by Normal-Phase and Reversed-Phase HPLC. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 12, p. 2581–2587, 2000.

NOGUEIRA, L. D. P.; KNIBEL, M. P.; REGINA, M.; GONÇALVES, S.; FIRMINO, J.; NETO, N.; SANJULIANI, A. F. View this Special Issue Consumption of High-Polyphenol Dark Chocolate Academic Editor : Mario Fritsch Neves. v. 2012, p. 1–38, 2022.

NURHAYATI, N.; APRIYANTO, M. Sensory evaluation of chocolate bar production materials of dry cocoa seeds in various fermentation treatments. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 39, p. 58–62, 2021.

PAPALEXANDRATOU, Z.; KAASIK, K.; KAUFFMANN, L. V.; SKORSTENGAARD, A.; BOUILLON, G.; ESPENSEN, J. L.; HANSEN, L. H.; JAKOBSEN, R. R.; BLENNOW, A.; KRYCH, L.; CASTRO-MEJÍA, J. L.; NIELSEN, D. S. Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 304, p. 106–118, 2019.

PEDAN, V.; FISCHER, N.; BERNATH, K.; HÜHN, T.; ROHN, S. Determination of oligomeric proanthocyanidins and their antioxidant capacity from different chocolate manufacturing stages using the NP-HPLC-online-DPPH methodology. **Food Chemistry**, v. 214, p. 523–532, 2017a.

PEDAN, V.; FISCHER, N.; BERNATH, K.; HÜHN, T.; ROHN, S. Determination of oligomeric proanthocyanidins and their antioxidant capacity from different chocolate manufacturing stages using the NP-HPLC-online-DPPH methodology Vasilisa. **Food Chemistry**, v. 214, p. 523–532, 2017b.

PENIDO, F. C. L.; LOURENÇO, I. C. R.; SILVA, L. M. da; GARCIA, C. F.; REZENDE, F. A. G. G. Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Fatty Acid Profile of Cocoa Nibs. **International Journal of Research -GRANTHAALAYAH**, v. 9, n. 6, p. 168–176, 2021.

PEREZ, M.; LOPEZ-YERENA, A.; VALLVERDÚ-QUERALT, A. Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: a challenge for the chocolate industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 475–489, 2021.

PETYAEV, I. M.; BASHMAKOV, Y. K. Dark Chocolate: Opportunity for an Alliance between Medical Science and the Food Industry? **Frontiers in Nutrition**, v. 4, n. September, 2017.

PIERACCI, Y.; ASCRIZZI, R.; PISTELLI, L.; FLAMINI, G. Comparison of the chemical and sensorial evaluation of dark chocolate bars. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 21, p. 9964, 2021.

PLAZA, M.; OLIVEIRA, D.; NILSSON, A.; TURNER, C. Green and Efficient Extraction Method to Determine Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 8, p. 2677–2691, 2017.

RAMOS-ESCUADERO, F.; CASIMIRO-GONZALES, S.; FERNÁNDEZ-PRIOR, Á.; CANCINO CHÁVEZ, K.; GÓMEZ-MENDOZA, J.; FUENTE-CARMELINO, L. de la; MUÑOZ, A. M. Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **Lwt**, v. 147, n. January, 2021.

REIS, N. dos S.; MORAES, M. O. B. de; LINS, R. P.; SENA FILHO, E.; CARVALHO, E. A.; ROCHA, S. A. S. da; GONÇALVES, B. H. R. F.; MELLO, D. L. N.; MELO NETO, B. A. de. Produção de chocolate 70% massa de cacau enriquecido com óleo essencial das folhas de *Mentha Arvensis*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51107–51123, 2020.

RIMBACH, G.; MELCHIN, M.; MOEHRING, J.; WAGNER, A. E. Polyphenols from cocoa and vascular health - A critical review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 10, p. 4290–4309, 2009.

SALES, J. H.; CÂNDIDA, T. Efeito Da Temperatura Sobre a Amêndoa De Cacau: Secador Vertical. **Revista Gestão Inovação e Tecnologia**, v. 6, n. 3, p. 3437–3446, 2016.

SAMANTA, S.; SARKAR, T.; CHAKRABORTY, R.; REBEZOV, M.; AHARIATI, Mo. A.; THIRUVENGADAM, M.; RENGASAMY, K. R. Dark chocolate: An overview of its biological activity, processing, and fortification approaches. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 1916–1943, 2022.

SANTANDER MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ CORTINA, J.; VAILLANT, F. E.; ESCOBAR PARRA, S. An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1593–1613, 2020.

SARBU, I.; CSUTAK, O. **The microbiology of cocoa fermentation**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. 423–446 p.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SEPTIANTI, E.; SALENGKE; LANGKONG, J. Profile of bioactive compounds, antioxidant and aromatic component from several clones of cocoa beans during fermentation. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 575, n. 1, 2020.

SERVENT, A.; BOULANGER, R.; DAVRIEUX, F.; PINOT, M. N.; TARDAN, E.; FORESTIER-CHIRON, N.; HUE, C. Assessment of cocoa (*Theobroma cacao* L.) butter content and composition throughout fermentations. **Food Research International**, v. 107, n. November 2017, p. 675–682, 2018.

SILVA, R. de C. dos S. N. da; MINIM, V. P. R.; CARNEIRO, J. de D. S.; NASCIMENTO, M.; DELLA LUCIA, S. M.; MINIM, L. A. Quantitative sensory description using the Optimized Descriptive Profile: Comparison with conventional and alternative methods for evaluation of chocolate. **Food Quality and Preference**, v. 30, n. 2, p. 169–179, 2013.

SILVA, R. de C. dos S. N. da; MINIM, V. P. R.; SIMIQUELI, A. A.; MORAES, L. E. da S.; GOMIDE, A. I.; MINIM, L. A. Optimized Descriptive Profile: A rapid methodology for sensory description. **Food Quality and Preference**, v. 24, p. 190–200, 2012.

SILVA, T. L. T. da; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G. Temperature, time and fat composition effect on fat bloom formation in dark chocolate. **Food Structure**, v. 14, p. 68–75, 2017.

SILVA, G. D. J. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CHOCOLATE AO LEITE DE CABRA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MASSA DE CACAU. **Dissertação Mestrado**, v. 13, n. 3, p. 98, 2015.

SILVA, G. S.; DALA-PAULA, B. M.; BISPO, E. S.; GLORIA, M. B. A. Bioaccessibility of bioactive amines in dark chocolates made with different proportions of under-fermented and fermented cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 404, p. 134725, 2023.

SMIT, H. J. **Theobromine and the pharmacology of cocoa**. [s.l: s.n.]v. 200201–234 p.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. [s.l: s.n.]408 p.

TIGRERO-VACA, J.; MARIDUEÑA-ZAVALA, M. G.; LIAO, H. L.; PRADO-LINCE, M.; ZAMBRANO-VERA, C. S.; MONSERRATE-MAGGI, B.; CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. Microbial Diversity and Contribution to the Formation of Volatile Compounds during Fine-Flavor Cacao Bean Fermentation. **Foods**, v. 11, n. 7, 2022.

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, 2015a.

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.; PALABIYIK, I.; KONAR, N. Chocolate quality and conching. **Trends in Food Science and Technology**, v. 91, n. July, p. 446–453, 2019. Disponível em:

URBAŃSKA, B.; DEREWIKA, D.; LENART, A.; KOWALSKA, J. Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 10, p. 2101–2112, 2019.

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**, v. 8, n. 8, 2019.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International**, v. 44, 2011.

YORISKA, D. P.; PRASEPTIANGGA, D.; KHASANAH, L. U. Panelist acceptance level and characterization of physical and chemical properties on dark chocolate bar with addition of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) leaf essential oil. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 633, n. 1, 2019.

ZUMAETA, C. R.; ALAYO, E. M. C.; COLCA, I. S. C.; VÁSQUEZ, G. I.; ASTECKER, L. D. M. Metabolomics during the spontaneous fermentation in cocoa (*Theobroma cacao* L.): An exploratory review. **Food Research International**, v. 163, p. 112190, 2022.

ŽUVELA, P.; SKOCZYLAS, M.; JAY LIU, J.; BACZEK, T.; KALISZAN, R.; WONG, M. W.; BUSZEWSKI, B. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 6, p. 3674–3729, 2019.

ŻYŻELEWICZ, D.; BUDRYN, G.; ORACZ, J.; ANTOLAK, H.; KRĘGIEL, D.; KACZMARSKA, M. The effect on bioactive components and characteristics of chocolate by functionalization with raw cocoa beans. **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.