



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

HILANA SALETE SILVA OLIVEIRA NASCIMENTO

**MELHORIA DO AROMA DE CHOCOLATE, POR
TRATAMENTO ENZIMÁTICO, EM AMÊNDOAS DE
CACAU DE BAIXA QUALIDADE**

Feira de Santana, BA
2010

HILANA SALETE SILVA OLIVEIRA NASCIMENTO

**MELHORIA DO AROMA DE CHOCOLATE, POR
TRATAMENTO ENZIMÁTICO, EM AMÊNDOAS DE
CACAU DE BAIXA QUALIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto

Co-Orientador: Prof. Dr^a. Maria Gabriela Bello Koblitz

Feira de Santana, BA
2010

Dedico este trabalho a minha família que a todo momento esteve presente apoiando incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

A Deus a quem entreguei desde o início todos os meus sonhos. Ao meu filho Diogo Irving Oliveira Nascimento pelo imenso carinho e compreensão dedicados. Aos familiares e amigos que em todos os momentos apoiaram e compreenderam. Às amigas Marília Lôrdelo Cardoso e Bárbara Letícia da Costa Oliveira pelo apoio e companheirismo nesta caminhada. Aos professores Maria Gabriela Bello Koblitz, Aristóteles Góes Neto e Maria Eugênia Oliveira Mamede pelos preciosos ensinamentos e pela oportunidade concedida.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

RESUMO

O presente trabalho propõe uma metodologia enzimática para tratamento de amêndoas de cacau de baixa qualidade, conhecidas como ardósia, de modo a garantir a formação de precursores de sabor do chocolate. De acordo com o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau (Instrução Normativa nº 57 do MAPA), ardósias são as amêndoas não fermentadas, de coloração cinzento-escuro ou roxo, com embrião branco ou marfim e que podem se apresentar compactas. Também são caracterizadas como ardósias, as amêndoas mal fermentadas bem como aquelas provenientes de frutos verdes fermentadas ou não. A produção enzimática dos precursores de sabor irá proporcionar uma melhor qualidade a estas amêndoas, geralmente responsáveis pela baixa qualidade do *liquor* produzido. Para tanto foram testadas proteases e carboxipeptidases de diferentes fontes, sob diversas condições de tratamento. A avaliação dos tratamentos foi feita através de análise química (eficiência de hidrólise) e de análise sensorial do material tratado, em comparação com amêndoas de boa qualidade. Os resultados mostram que é possível, através do uso de enzima microbiana, gerar, nas amêndoas de baixa qualidade, a mistura de compostos que irá liberar, após a torrefação, o sabor característico de chocolate. Entretanto, torna-se necessária a otimização das condições do tratamento enzimático para obter melhores resultados e assim estabelecer uma metodologia a ser levada para indústria de manufatura do cacau e do chocolate.

Palavras-chave: Cacau. Sabor. Chocolate. Proteases. Qualidade.

ABSTRACT

This paper proposes a method for enzymatic treatment of poor quality cocoa almonds, known as "slate", to ensure the formation of precursors of chocolate *flavour*. According to the Technical Regulation of Cocoa Almond (Instrução Normativa nº 57 do MAPA), slate are unfermented almonds of dark gray or purple color, with white or ivory embryo and that can present compact. Poorly fermented almonds and those from unripe cocoa, fermented or not, are also characterized as slate. The enzymatic production of precursors *flavour* will provide a better quality of these almonds, usually responsible for the low quality of liquor produced. Were tested for both protease and carboxipeptidases from different sources under various conditions of treatment. The evaluation of the treatments was done by chemical analysis (efficiency of hydrolysis) and sensory analysis of the material treated, compared with good quality almonds. The results show it is possible, through the use of microbial enzyme, generating in the poor quality almonds, the mixture of compounds that will release, after roasting, the characteristic *flavour* of chocolate. However, it is necessary to optimize the conditions of enzyme treatment to obtain better results and thus establish a methodology to be taken to industry for manufacturing of cocoa and chocolate.

Keywords: Cocoa. *Flavour*. Chocolate. Proteases. Quality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	BENEFICIAMENTO DE CACAU	12
2.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FORMAÇÃO DE <i>FLAVOUR</i> DE CHOCOLATE	18
2.3	CONSTITUINTES QUÍMICOS DO SABOR DO CACAU	23
2.4	ANÁLISE SENSORIAL	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	OBTENÇÃO, SELEÇÃO E PREPARO DAS AMÊNDOAS	34
3.2	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
3.3	TRATAMENTO ENZIMÁTICO	36
3.4	TORREFAÇÃO	37
3.5	ANÁLISE SENSORIAL	37
3.6	AValiação DA EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE	40
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	41
4.2	ANÁLISE SENSORIAL	42
4.3	AValiação DA EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE	52
5	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

As amêndoas de cacau, matéria prima para produção de chocolate, são as sementes fermentadas e secas dos frutos de *Theobroma cacao*. Esta árvore, nativa da região amazônica, já era cultivada pelas civilizações pré-colombianas ao norte da América do Sul e por toda América Central quando seus frutos foram levados para a Europa, em 1528, e seu consumo se difundiu pelo mundo. Hoje, o cultivo do cacau se espalha ao redor do globo, ao longo do equador (ROHAN, 1964). Para fins de esclarecimento, é importante destacar que o termo sementes deve ser utilizado quando o fruto ainda possui um embrião vivo e, portanto pode ser germinado. A denominação amêndoas, por sua vez, é utilizada a partir do momento que se tem a morte do germen (com as transformações provocadas pela fermentação) e conseqüente perda da capacidade de germinação.

O Brasil já participou ativamente como exportador de cacau, sendo esta cultura uma importante fonte de divisas para o país. Entretanto, foi verificado um acentuado decréscimo na produção brasileira de cacau entre os anos de 1990 e 2002. Isso ocorreu principalmente devido à alta incidência da vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que ataca o cacau ainda no pé e destrói o fruto. Outro problema recorrente para o escoamento do cacau é a baixa qualidade das amêndoas produzidas, em função do reduzido controle associado à redução do tempo de fermentação e secagem.

O cacau é uma árvore tropical, cultivada em temperaturas acima de 20°C durante todo o ano. O fruto aparece na árvore de quatro a seis meses após a floração e quando maduro consiste em uma casca relativamente grossa que contém cerca de 30 a 40 sementes submergidas em uma polpa mucilaginosa com 80% de umidade e 15% de monossacarídeos (ROHAN, 1964; OETTERER, 2006).

O valor comercial do cacau se apóia nas características de derretimento apresentadas por sua gordura, cuja faixa de temperatura de fusão, muito estreita e próxima da temperatura do corpo humano, proporciona a quem a prova uma sensação bucal única. Mas também no sabor, muito apreciado, que é desenvolvido nas sementes devidamente processadas: o *flavour* de chocolate. As sementes naturais, extraídas do fruto maduro do cacau, não possuem qualquer sabor de chocolate. Na verdade, elas são extremamente amargas e adstringentes. Para que o desejado *flavour* se desenvolva, as

sementes devem passar por um processo de cura que envolve uma etapa de fermentação e secagem e que leva à formação dos precursores de sabor. Estes, quando as amêndoas são torradas, sofrem uma série de degradações térmicas que levam à formação do sabor (BECKETT, 1994).

A questão de a fermentação da polpa de cacau (que resulta em grandes quantidades de leveduras e bactérias produtoras de ácido acético) ser essencial para o desenvolvimento do sabor de chocolate foi repetidamente discutida por vários autores. Howat *et. al.*(1957; 1960), Rohan (1958) e outros pesquisadores alegam que amêndoas frescas lavadas com soluções acéticas e depois deixadas imersas em polpa esterilizada podem adquirir sabor de chocolate após a torrefação. Por outro lado, Aquarone *et. al.* (2001), ao repetir esses trabalhos, constataram que o sabor típico de chocolate aparece, mas sem atingir a qualidade daquele observado em amêndoas processadas por microrganismos. Assim, concluíram que a fermentação da polpa resulta em desenvolvimento de microrganismos que fornecem enzimas necessárias para a obtenção final do sabor de chocolate. Atualmente sabe-se que reações que levam à formação de precursores de sabor são levadas a cabo por enzimas endógenas da própria semente do cacau e que a fermentação tem como principal consequência o abaixamento do pH, favorecendo a ação destas enzimas.

Um problema recorrente na indústria de chocolate é a baixa qualidade das amêndoas de cacau. Uma vez que o processo de fermentação e secagem é feito ainda nas fazendas, sem qualquer controle de processo, uma porcentagem significativa das sementes de cada batelada não sofre as alterações necessárias (principalmente a acidificação do pH e aumento da temperatura) para que as reações enzimáticas se processem de forma satisfatória. Como consequência, uma porção importante das amêndoas a serem torradas não irá desenvolver o sabor característico, o que leva à perda de qualidade do chocolate produzido. Infelizmente, embora este problema seja conhecido há bastante tempo, verificou-se no Brasil muito pouca alteração nos processos de fermentação utilizados, o que leva a indústria processadora de cacau a buscar soluções alternativas a serem aplicadas depois do pré-processamento no campo.

Uma possibilidade de remediar este problema é a aplicação de enzimas exógenas comerciais, de padrão de atividade semelhante àsquelas nativas do cacau, sobre as amêndoas de cacau de baixa qualidade. Sob condições controladas, estas enzimas devem hidrolisar as proteínas presentes nas amêndoas, liberando os precursores de sabor que não foram produzidos ao longo do período de fermentação. Desta forma seria

possível uniformizar a qualidade do cacau produzido, garantindo a qualidade do chocolate a ser obtido.

Este trabalho teve por finalidade testar a aplicação de enzimas proteolíticas de origem microbiana, animal e vegetal (extraídas das sementes de cacau) sobre amêndoas de cacau de baixa qualidade, conhecidas como ardósia, com o objetivo de produzir os precursores de sabor desejados para a produção de chocolate de qualidade. De acordo com o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau (Instrução Normativa nº 57 do MAPA), ardósias são as amêndoas não fermentadas, de coloração cinzento-escuro ou roxa, com embrião branco ou marfim e que podem se apresentar compactas. Também são caracterizadas como ardósias, as amêndoas mal fermentadas bem como aquelas provenientes de frutos verdes fermentadas ou não.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BENEFICIAMENTO DE CACAU

Do início do século XIX até o final dos anos 1970 vivemos “os tempos modernos do cacau”, marcados por três grandes transformações técnicas: em 1828, Van Houten obteve pó de cacau desengordurado; em 1847, Fry passou a comercializar chocolate em tablete, e Peter inventou o chocolate ao leite em 1876. Estas foram as únicas inovações que merecem destaque, de modo que a revolução da indústria de cacau é atual. Vários dogmas que eram considerados inatacáveis há alguns anos estão sendo questionados. Assim é interessante acompanhar a elaboração atual do cacau desde a plantação até o produto final (PONTILLON, 2009). Um diagrama de blocos simplificado do beneficiamento de cacau é apresentado na Figura 1.

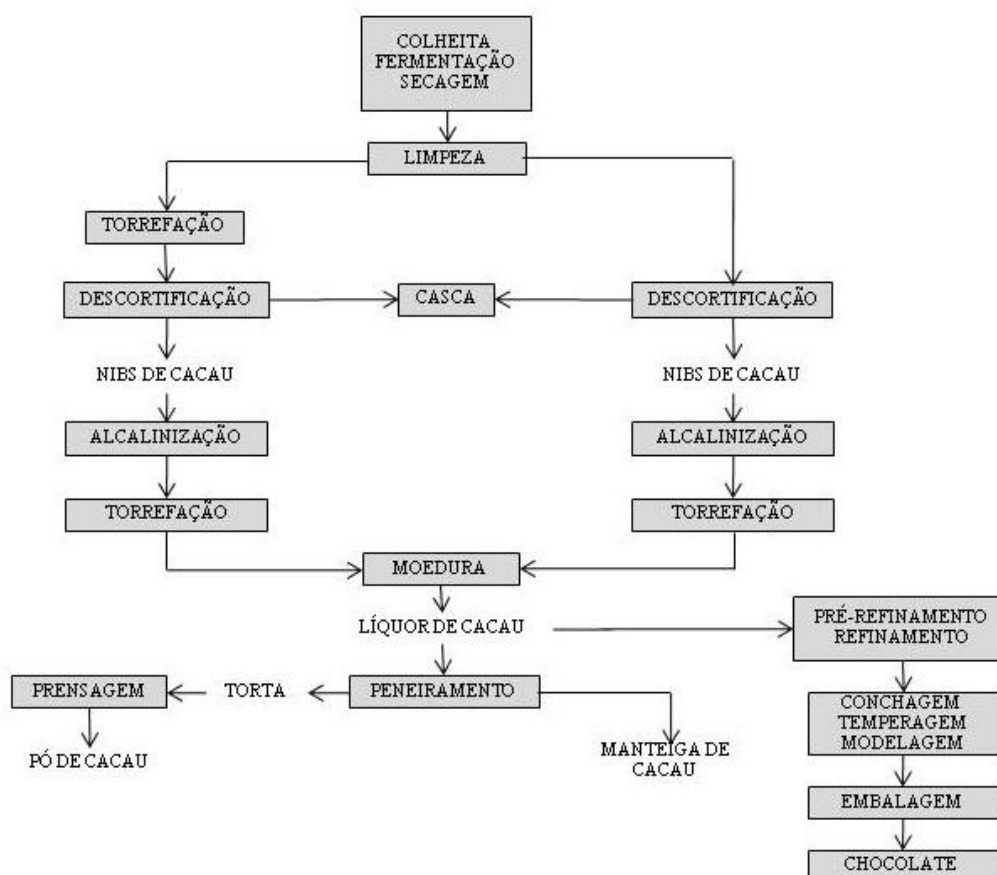


Figura 1: Etapas do beneficiamento do cacau
Fonte: Adaptado de PEREGO *et al.*, 2004 e PONTILLON, 2009

As sementes de cacau recém-colhidas possuem cor púrpura (mais comum) ou branca – a depender da variedade plantada –, sabor amargo e odor adstringente, não tendo qualquer valor como alimento. Somente após a chamada “cura” é que o cacau poderá ser um produto de valor para a indústria e exportável. Aí adquire cor marrom característica, sabor típico de cacau e qualidade boa ou má, estreitamente dependentes da cura. Inicialmente os frutos são colhidos com podões (Figura 2), sendo amontoados no chão para serem abertos com facões (Figura 3). A casca é, então, separada e o material interno (formado de sementes e polpa) é levado à cura. Esta consiste de duas etapas. A primeira delas é a fermentação. Essa etapa facilita a separação da polpa da semente além de proporcionar a ocorrência de uma série de reações químicas. A segunda etapa é a secagem. Aí o cacau atinge a umidade necessária para o armazenamento; reações químicas concomitantes estabilizam a cor marrom característica (OETTERER, 2006).



Figura 2: Colheita do cacau

Fonte:<http://img1.photographersdirect.com/img/2293/wm/pd1077050.jpg>



Figura 3: Corte do fruto

Fonte:<http://revistapesquisa.fapesp.br/imgsite/%28195%29.jpg>

Na etapa de fermentação as sementes revestidas de polpa são empilhadas aos montões ou em caixas. No sistema de montões, método mais primitivo, são utilizados de 10 kg a 2 t, sendo essa massa revolvida com varas de bambu, de tempos em tempos (Figura 4). No sistema de caixas de madeira ou cochos, o fundo das caixas é perfurado e os lotes são de 200 kg a 1,5 t, com cerca de 1 m de altura. A massa é transferida de uma caixa para outra com pás de madeira, em um total de três caixas (Figura 5). Durante o processo de fermentação, a massa de cacau é coberta com sacos de juta ou folhas de

bananeira para reduzir as perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial (OETTERER, 2006; PONTILLON, 2009).



Figura 4: Fermentação do cacau – sistema de montões
Fonte: http://www.tava.com.au/res/processing_07ferment_heap.jpg



Figura 5: Fermentação do cacau – sistema de cochos
Fonte: <http://www2.dpi.qld.gov.au/images/4678.jpg>

A fase inicial da fermentação é anaeróbica. Há multiplicação de leveduras que convertem os açúcares da polpa a etanol. Ocorre desintegração da mesma e desprendimento de um exsudado. As leveduras, que fermentaram todo o açúcar da polpa, passam a usar o próprio álcool etílico produzido como fonte de carbono. Por outro lado, o álcool produzido inibe o crescimento das mesmas e ocorre autólise das células das leveduras havendo liberação das enzimas importantes para promover o sabor e típico. Dentre as leveduras presentes as principais espécies são *Saccharomyces cerevisiae* e a *Candida krusei*, predominantes na Bahia (OETTERER, 2006). Estudos realizados com o gênero *Saccharomyces* isolado de caixas de processamento em Uruçuca, Bahia, demonstraram ser possível obter produtos de excelente qualidade com essa levedura (LEVANON e MARTELLI, 1964; LEVANON e ROSSETINI, 1965). Luna e Jimenez (1968-69), observaram que, quando se usa a levedura *Candida tropicalis*, isolada de cascas de maçã, consegue-se qualidade superior de cacau. Estudos realizados por Thompson *et al.* (2001) e Schwan e Wheals (2004), constataram o crescimento de *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Kluyveromyces*. Também foi observado crescimento de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*) e acéticas (*Acetobacter* e *Gluconobacter* spp.). Investigando a ecologia microbiana de cacau originário da Indonésia, Ardhana e Fleet (2003) encontraram como principais espécies *Penicillium citrinum*, *Kloeckera*

apis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter pasteurianus*.

Com a conversão dos açúcares a etanol, produz-se as condições aeróbicas iniciais necessárias para o crescimento de bactérias que oxidam o etanol a ácido acético e posteriormente a CO₂ (dióxido de carbono) e água. Isso produz mais calor e aumenta a temperatura, durante as primeiras 24 horas, para aproximadamente 40°C. A partir do segundo dia até o final do processo realiza-se o revolvimento das amêndoas em intervalos regulares. Dessa forma evita-se que a temperatura ultrapasse 45°C, o que poderia ocasionar a inativação das enzimas presentes. Além disso, esses movimentos permitem a aeração da massa e melhor uniformidade da fermentação. A segunda fase da fermentação é aeróbica e ocorre via acetobactérias presentes por contaminação natural e que também produzem ácido acético. Este se difunde no tegumento que envolve as amêndoas tornando-o permeável e possibilitando a ação das enzimas. Ao final do processo, as amêndoas apresentam coloração marrom intensa e aroma agradável de vinagre (OETTERER, 2006).

Depois de três a sete dias, dependendo do local, das variedades e da qualidade almejada, a fermentação é considerada suficiente e se passa a fase de secagem. Vale destacar que o efeito primário da fermentação é aniquilar o embrião sob efeito de calor e, sobretudo, fabricar ácido acético; segue-se certa degradação das paredes celulares ocasionando a migração de enzimas que, por sua vez, entram em contato com os produtos sensíveis. Ocorrem então os efeitos secundários, que interessam ao produtor de chocolate. Certos polifenóis se hidrolisam, em particular as antocianinas, gerando de início compostos incolores, que assumirão a cor marrom característica do chocolate ao serem oxidados. As proteínas se hidrolisam em peptídeos e em aminoácidos livres. Tais compostos não possuem o gosto do cacau ou do chocolate, mas são os principais responsáveis pelo aparecimento desses sabores quando as amêndoas são torradas; por essa razão, são denominados “precursores do sabor” (PONTILLON, 2009).

Ao início da fermentação, Gálvez *et al.* (2007) determinou conteúdo de umidade das amêndoas de 76,6% e valor de pH de 4,00. Após 144 h, o valor de pH atingiu 4,48 e a umidade foi reduzida a 69,3%. Durante o monitoramento da fermentação a temperatura alcançou o valor máximo de 51°C depois de 48 h. Após a abertura das amêndoas foram encontrados valores de 56,6 mg.g⁻¹ matéria seca para glicose e 88,8 mg.g⁻¹ matéria seca para frutose.

A secagem natural, ou secagem solar, consiste em estender o cacau fermentado em áreas cimentadas ou assoalhadas, bandejas, plásticos ou no próprio solo (PONTILLON, 2009). Um método bastante utilizado é a secagem feita em barcaças (Figura 6). Estas são construções típicas constituídas por um lastro de madeira erguido sobre pilares de alvenaria, e uma cobertura que desliza sobre trilhos. A cobertura, geralmente feita de chapas de alumínio corrugado ou de zinco, é afastada para expor as amêndoas ao sol e, quando fechada, protege contra chuva, sereno e calor excessivo. As amêndoas são espalhadas sobre o lastro da barcaça em uma camada uniforme com cerca de 5 cm de espessura. O revolvimento constante é feito com um rodo de madeira, principalmente no início da secagem, a fim de evitar aglomerados. O processo mais utilizado é a pré-secagem ao sol complementada com aquecimento artificial, via estufas aquecidas por combustão de lenha ou gás liquefeito e/ou energia solar (OETTERER, 2006).



Figura 6: Secagem do cacau

Fonte: <http://www.barcacapousada.com.br/imagens/barcaca.jpg>

A umidade do produto acabado é avaliada pelo tato e, sobretudo, pelo som das amêndoas agitadas na mão. A secagem natural apresenta a vantagem de ser progressiva e gratuita em energia mas possui o inconveniente de ser demorada e exigir grande mão de obra, particularmente quando é efetuada na estação chuvosa, algo que é muito comum. A secagem artificial é usada, então, como substituto ou complemento. Se bem conduzida, essa secagem propicia excelentes resultados, mas pode gerar dois tipos de defeitos. Em primeiro lugar, caso o cacau entre em contato com gases de combustão, assumirá um desagradável gosto de fumaça. Em segundo lugar, se a secagem for realizada de forma muito brusca, haverá o ressecamento externo do cacau – a camada seca se forma de modo muito rápido, perde a permeabilidade e a umidade interna tem dificuldade para sair, quando, aparentemente, o ácido acético não é bem eliminado, o

que gera um cacau de sabor ácido. O mesmo fenômeno ocorre quando da secagem natural se os raios de sol forem muito intensos (PONTILLON, 2009).

Durante a secagem, as enzimas presentes atuam no interior da amêndoa e promovem as reações químicas de cura, estabilizando o sabor, e a cor característicos do chocolate, com acidez reduzida. A temperatura da secagem é importante na qualidade final das amêndoas. O ideal está na faixa de 35 a 40 °C, porque é ótima para as enzimas. O uso de temperaturas mais baixas ou mais altas leva à perda na qualidade, pois as enzimas agem mais lentamente ou são destruídas. Além disso, a secagem tem que durar um certo tempo para a ação enzimática ocorrer. O período ótimo é de 4 a 5 dias, com umidade final de cerca de 7% (OETTERER, 2006).

A indústria recebe as amêndoas que deverão sofrer a manufatura, ou seja, a retirada do tegumento e do germe para obtenção de “nibs” – amêndoas descascadas e trituradas – que é a matéria-prima para a fabricação da massa de cacau, manteiga de cacau, cacau em pó e, finalmente, chocolate. Após as operações preliminares, que consistem em limpeza para eliminar impurezas e, eventualmente, calibragem para classificar as amêndoas por categoria de tamanho homogêneo, a indústria tem duas opções: torrefação e em seguida descortificação – remoção do tegumento das amêndoas – ou o inverso. No primeiro caso (que se inicia com a torrefação), a descortificação é mais fácil uma vez que a casca fica bem descolada do grão; mas, por outro lado, a homogeneidade da torrefação é dificultada pelo tamanho relativamente grande da amêndoa (cerca de 22 mm de comprimento por 8 mm de espessura). No segundo método, corre-se o risco de enriquecer os nibs com pedaços de casca que restaram, mas a torrefação é mais homogênea (PONTILLON, 2009).

A torrefação consiste de um tratamento térmico das amêndoas de cacau com ar quente, a uma temperatura entre 110 e 140°C; maiores valores de temperatura podem provocar um efeito de super torrefação, com a conseqüente formação de gosto de queimado e perda das características intrínsecas de cacau (DROUDEN *et al.* 1996 apud PEREGO *et al.*, 2004). As condições operacionais mudam em resposta às necessidades do processo e da planta; o processo de torrefação pode ser realizado sob diferentes perfis de tempo-temperatura com obtenção de diferentes resultados. A otimização de ambos, temperatura e tempo, é essencial para a obtenção de elevada qualidade de sabor nos produtos finais (SANAGI *et al.*, 1997 apud PEREGO *et al.*, 1999). A importância da torrefação na tecnologia de produção de chocolate está associada aos seguintes fatores: redução da umidade de 5-6% para 2% com perda de cerca de 6% em relação ao

peso total; formação do *flavour* e redução da microbiota bacteriana presente na matéria-prima durante o processo fermentativo e o armazenamento (PEREGO *et al.*, 1999 apud PEREGO *et al.*, 2004). Outro objetivo da torrefação é secar suficientemente os nibs, permitindo assim que possam ser moídos (PONTILLON, 2009). O efeito do calor nos precursores do *flavour* de chocolate, presentes no cacau após a fermentação e secagem, é de catalisador, liberando o sabor característico do chocolate (OETTERER, 2006).

A etapa que segue-se à torrefação é a trituração. Esta permite a separação da casca por peneiragem, ventilação e sucção. As amêndoas manufaturadas (torradas e trituradas) passam por uma moagem e o produto, denominado massa de cacau – um líquido denso também chamado de *liquor* - será a matéria prima para a produção da manteiga de cacau, do cacau em pó (matéria-prima para os achocolatados) e do chocolate, conforme tratamento que receber. Ao passar por prensas hidráulicas, extrai-se boa parte da manteiga de cacau presente na massa. A torta restante dessa prensagem passa por moinhos que a pulverizam e produzem o cacau em pó. (OETTERER, 2006)

2.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FORMAÇÃO DE *FLAVOUR* DE CHOCOLATE

O mais notável atributo do chocolate é o seu sabor único. A combinação e o equilíbrio dos numerosos compostos que contribuem para o *flavour* final dependem de diversos fatores dentre os quais estão genética, condições ambientais, condições de colheita e de processamento. Essa complexidade é evidente quando se considera que, ainda hoje, este *flavour* tão desejável não foi reproduzido pela indústria química (REINECCIUS, 2006).

De acordo com Beckett (1994), uma vez que a fruta é colhida, iniciam-se vários mecanismos bioquímicos que contribuem para formação dos precursores de sabor de chocolate. Embora o processo de fermentação facilite a remoção da polpa mucilaginosa e impeça a germinação das amêndoas de cacau, resulta, principalmente, no desenvolvimento dos precursores de sabor necessários. Entretanto, é importante que as amêndoas tenham atingido adequado grau de maturidade. Caso contrário, nenhum processamento pode produzir o *flavour* pretendido. Estudos ainda mostram que, antes da fermentação, ocorrem mudanças estruturais ocasionadas pela hidrólise de proteínas presentes nas amêndoas de cacau resultando na produção de uma reserva de peptídeos, sendo estes possíveis precursores de sabor.

A atividade enzimática, em amêndoas de cacau, durante a fermentação, é conhecida e estudada pelo menos desde a segunda metade do século XX. Entretanto, as primeiras enzimas reconhecidas estavam ligadas às alterações de coloração e à perda de adstringência, sendo principalmente da classe das oxidases (polifenol oxidase, peroxidase). Entre as hidrolases, foram estudadas inicialmente, as carboidrases (amilases e β -glicosidases) e lipases. Em 1964 era conhecida a habilidade de sementes moídas de cacau de coagular o leite (atividade proteolítica), porém até a próxima década as proteases presentes nas amêndoas ainda não haviam sido extraídas, isoladas e caracterizadas. Estudos mais conclusivos a respeito da formação de precursores de sabor em amêndoas de cacau datam principalmente das décadas de 80 e 90 e foram conduzidos por grupos de pesquisa na Suíça e na Alemanha, em cooperação com grupos da Malásia. Atualmente acredita-se que as seguintes enzimas tenham importância capital na formação de *flavour* de chocolate das amêndoas de cacau:

- a. endoproteases e exopeptidases – envolvidas na geração de peptídeos e aminoácidos livres considerados os principais precursores de sabor;
- b. invertase e glicosidases – responsáveis pela liberação de açúcares redutores indispensáveis à formação do sabor durante a torrefação. Glicosidases atuam ainda na desglicosilação de compostos terpênicos ou fenólicos (linalol, antocianinas, por ex.) interferindo na geração de sabor e na cor;
- c. polifenol oxidase – responsável pela oxidação de compostos fenólicos tendo como consequência o fim da adstringência e redução do amargor (HANSEN *et al.*, 1998; LOPEZ e DIMICK, 1991).

Proteases (EC 3.4), também conhecidas como peptidases ou proteinases, são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases. Elas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem ainda apresentar atividade sobre ligações éster e amida. Todas as proteases apresentam um certo grau de especificidade de substrato, em geral relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a eles. São enzimas classificadas basicamente de acordo com dois critérios: seu modo de ação e a natureza química do seu sítio ativo. De acordo com o modo de ação são divididas em exopeptidases, que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, e endopeptidases, que agem nas ligações no interior da cadeia protéica. Dentre as exopeptidases encontram-se as carboxipeptidases. Estas, de importância para o cacau, são proteases que agem na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica; liberando aminoácidos livres ou dipeptídios. As

endopeptidases, por sua vez, são normalmente classificadas pela natureza química de seu sítio ativo e por seu mecanismo de ação em quatro grupos distintos, dentre os quais encontram-se as proteases aspárticas, também de interesse na formação do sabor em cacau. Estas contêm ácido aspártico em seu sítio ativo. Em geral apresentam maior atividade em valores de pH ácido e têm maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos (KOBBLITZ, 2008).

Durante a fermentação de cacau a proteólise catalisada por endoproteases aspárticas e carboxipeptidases origina oligopeptídeos e aminoácidos. As endoproteases aspárticas lisam proteínas, preferencialmente nos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, para produzir oligopeptídeos que têm resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em suas extremidades finais. As carboxipeptidases têm a importante função de converter oligopeptídeos hidrofóbicos em precursores de sabor de cacau: oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos livres hidrofóbicos, os quais são requeridos para formação dos componentes de sabor de cacau típicos na presença de açúcares redutores, durante a torrefação (VOIGT *et al.*, 1994a upud MISNAWI *et al.*, 2002).

Misnawi *et al.* (2002) estudaram os efeitos da incubação ou ativação (45 °C em shaker orbital a 150 rpm) de enzimas-chave remanescentes, principalmente endoprotease aspártica, carboxipeptidase e invertase, em amêndoas de cacau secas não fermentadas e parcialmente fermentadas (2 dias), no desenvolvimento dos precursores de sabor. De acordo com esse estudo, a incubação realizada produziu um significativo aumento na formação de compostos ácidos, hidrofóbicos e aminoácidos totais livres. Segundo estes autores, o tratamento possivelmente ativou as proteases remanescentes em amêndoas de cacau não fermentadas resultando no acúmulo de aminoácidos livres; entretanto, ao fim da incubação, a concentração destes aminoácidos não atingiu os valores encontrados em amêndoas de cacau bem fermentadas. Para as amêndoas parcialmente fermentadas, em contrapartida, houve formação continuada, de modo que a concentração de aminoácidos livres e hidrofóbicos alcançou os valores das amêndoas bem fermentadas após 24 h de incubação. Esse fato pode confirmar a teoria defendida por Aquarone *et al.* (2001) que a fermentação da polpa resulta em desenvolvimento de microorganismos que fornecem enzimas necessárias para a obtenção final do sabor de chocolate. Ainda de acordo com Misnawi *et al.* (2002), os peptídeos encontrados no pó de cacau desengordurado de amêndoas não fermentadas e parcialmente fermentadas foram bastante similares aos padrões de amêndoas bem fermentadas após a incubação. A atividade enzimática remanescente em amêndoas de cacau secas não fermentadas e

parcialmente fermentadas foi suficiente para realizar reações enzimáticas durante a incubação. A atividade de protease (remanescente em amêndoas de cacau parcialmente fermentadas e secas) foi relativamente alta: 31 e 16% da atividade original para endoprotease aspártica e carboxipeptidase, respectivamente.

Hansen *et al* (1998) estudaram a atividade de diversas enzimas ao longo do período de fermentação. Endoproteases apresentaram pH ótimo bastante ácido (3,0) e não foram significativamente inativadas após 4 dias de fermentação. Entretanto, carboxipeptidases apresentaram pH ótimo de atuação em torno de 6,0, o que explica a não formação de sabor em polpa cuja fermentação tem pH inicial muito ácido. Isso é bastante comum em fermentações no Brasil que, ao contrário do que acontece em outras regiões produtoras, apresenta uma fase de fermentação alcoólica bastante curta, sendo a fermentação acética mais rápida e predominante (LOPEZ e DIMICK, 1991).

Embora a conversão de sacarose para glicose e frutose fosse gradual ao longo de toda a fermentação, a atividade de invertase só pode ser medida até o segundo dia de teste. Uma vez que não houve indícios de transporte de açúcares da polpa para as sementes durante o período, os autores acreditam que a atividade enzimática tenha permanecido, em níveis não detectáveis pelos métodos utilizados. Foi encontrada atividade de β -galactosidase, α -arabinosidase e α -manosidase. Todas as glicosidases estudadas foram resistentes ao processo de fermentação permanecendo ativas inclusive nas amêndoas secas. A atividade de polifenol-oxidase foi bastante afetada pela fermentação, ficando reduzida a 5% da inicial, após apenas um dia de teste. Os autores acreditam que parte da oxidação de fenólicos que ocorre ao longo da fermentação seja não-enzimática (HANSEN *et al.*, 1998).

De acordo com Lopez e Dimick (1991), a qualidade e a intensidade do *flavour* de chocolate é determinada inicialmente por fatores genéticos, intrínsecos à variedade ou cultivar produzidos. Assim, pode-se dizer que uma matéria prima de melhor qualidade pode ser facilmente desperdiçada por processamento inadequado, mas nem mesmo o melhor processamento pode produzir um chocolate superior a partir de matéria prima inferior. Para verificar se as diferenças de qualidade entre variedades de cacau são devidas à diferenças de atividade enzimática nas amêndoas, Hansen *et al* (2000) conduziram um experimento no qual as atividades das enzimas-chave de sementes não fermentadas de 10 diferentes variedades foram comparadas. Algumas importantes conclusões puderam ser levantadas: o cultivar com maior atividade das enzimas proteolíticas testadas apresentava também alto potencial para sabor de chocolate e o que

apresentava menor atividade para estas enzimas tinha baixo potencial para o sabor. Porém esta relação não foi linear para todos os cultivares testados. Alguns deles, com alto potencial para formação de sabor apresentaram baixa atividade de proteases. Para as outras enzimas testadas não parece haver qualquer correlação entre a atividade enzimática e o potencial para desenvolver sabor de chocolate. Uma observação importante foi que os mesmos cultivares, produzidos em diferentes regiões (Malásia e Peru) apresentaram significativa diferença de atividade enzimática.

O estudo acima mencionado poderia levar à conclusão de que não apenas a atividade enzimática (principalmente proteolítica), mas também a composição das proteínas dos cotilédones seriam variáveis de cultivar para cultivar, o que levaria à produção de melhores precursores de sabor por um do que por outro. Para verificar esta possibilidade, Amin *et al* (2002) estudaram a composição dos oligopeptídeos gerados pela ação de endopeptidases em 6 diferentes cultivares de cacau. Para isso, a fração protéica das amêndoas foi extraída de sementes desengorduradas e submetida à autólise em condições controladas. Os peptídeos formados foram extraídos e separados por HPLC. Não foi possível verificar diferenças significativas entre as misturas de oligopeptídeos produzidas pelos diferentes cultivares o que indica que não apenas as proteínas hidrolisadas são bastante semelhantes, mas também a especificidade das endoproteases de cada cultivar é, se não idêntica, pelo menos muito parecida.

A respeito de tratamento enzimático de amêndoas de cacau de baixa qualidade constam na literatura especializada muito poucos trabalhos. Estes se dedicaram apenas à aplicação de polifenol-oxidases exógenas com o objetivo de reduzir o teor de polifenóis totais, de taninos e de antocianinas que interferem significativamente no amargor, adstringência e na cor das amêndoas (Lima *et al.*, 2001; Brito *et al.* 2002). Vale ressaltar que em ambos os trabalhos citados a aplicação de enzimas exógenas foi considerada benéfica para a qualidade do cacau em teste. Tratamentos de amêndoas pelo uso de proteases não foram encontrados na literatura.

Voigt *et al.* (1994a) estudaram o tratamento de globulinas extraídas de sementes de cacau não fermentadas com proteases extraídas das próprias sementes e com carboxipeptidase A de suínos. A proteína hidrolisada, quando adicionada de açúcares redutores e de manteiga de cacau desodorizada e aquecida a 120°C, por 10 minutos, produziu aroma identificado como característico de chocolate pela maioria dos julgadores. Com base nos resultados obtidos, o mesmo grupo de pesquisa (VOIGT *et al.*, 1994b), buscou produzir aroma de chocolate a partir de hidrolisados de diferentes

fontes protéicas (coco, nozes e sementes de girassol) aplicando as proteases extraídas das sementes de cacau. Nenhuma das fontes utilizadas apresentou potencial para produção do aroma desejado.

2.3 CONSTITUENTES QUÍMICOS DO SABOR DO CACAU

Uma das mais importantes e complexas reações que envolvem a formação do *flavour* é a reação de Maillard que ocorre em uma larga faixa de temperatura (100-150 °C) para os vários modelos de sistemas alimentícios (PORTE *et al.*, 2007). Esta reação é responsável por alguns dos mais prazerosos *flavours* conhecidos pelo homem. Falando de modo geral, a reação de Maillard é uma reação entre carbonilas e aminas. Geralmente, as carbonilas em alimentos são açúcares redutores, enquanto aminas podem vir de aminoácidos ou proteínas. Os principais produtos finais da reação de Maillard são melanoidinas e outros compostos não voláteis. Entretanto, mais de 3500 compostos voláteis têm sido atribuídos a esta reação. Mas, se por um lado estes voláteis representam a menor porção (em massa) dos produtos da reação, por outro eles são os principais contribuintes para o *flavour* de alimentos. Reineccius *et al.* (1972), por exemplo, mostraram que enquanto 1,3 g (por 100 g de amêndoas) de açúcares redutores e aminoácidos totais foram perdidos durante a torrefação de amêndoas de cacau, apenas 0,9 mg de pirazinas foram formadas. Ou seja, apenas cerca de 0,07% dos reagentes foram transformados em pirazinas enquanto o restante originou outros produtos. São, estes produtos minoritários que dão a maior contribuição para o *flavour* (REINECCIUS, 2006).

A reação de Maillard é geralmente dividida em três estágios. O estágio inicial começa com uma condensação entre um grupo amino e um açúcar redutor, levando a uma N-glicosilamina, no caso do açúcar ser uma aldose, que sofre um rearranjo e forma o chamado produto Amadori (ou Heyns se o açúcar redutor for uma cetose). O estágio intermediário inicia-se a partir dos produtos Amadori/Heyns, levando a produtos da fragmentação do açúcar e havendo liberação de um grupo amino. No estágio final ocorrem reações de desidratação, fragmentação, ciclização e polimerização em que grupos amino participam novamente. Especialmente em relação a formação de *flavour*, a chamada degradação de Strecker é de extrema importância. Nela aminoácidos são degradados ocasionando desaminação e descarboxilação. As várias reações possíveis tomam lugar a depender das condições de temperatura, pH e natureza dos reagentes (por

exemplo tipo de açúcar, aminoácido ou proteína). Uma visão geral é dada na Figura 7. Deve-se notar que no caso de proteínas e peptídeos o grupo amino reativo é o da lisina, uma vez que os grupos α -amino estão comprometidos na ligação peptídica e portanto não disponíveis nem para reação de Maillard nem para degradação de Strecker. Isso resulta em um comportamento diferente dos aminoácidos se comparados a proteínas e peptídeos. É importante destacar que a maioria das pesquisas na área de formação de *flavour* pela reação de Maillard considera misturas de açúcar e aminoácidos livres, e dificilmente considera misturas açúcar-proteína ou açúcar-peptídeo. Com proteínas e peptídeos, e na ausência de aminoácidos livres, a reação de Strecker não pode acontecer, e isto tem conseqüências para a geração de *flavour* (van BOEKEL, 2006).

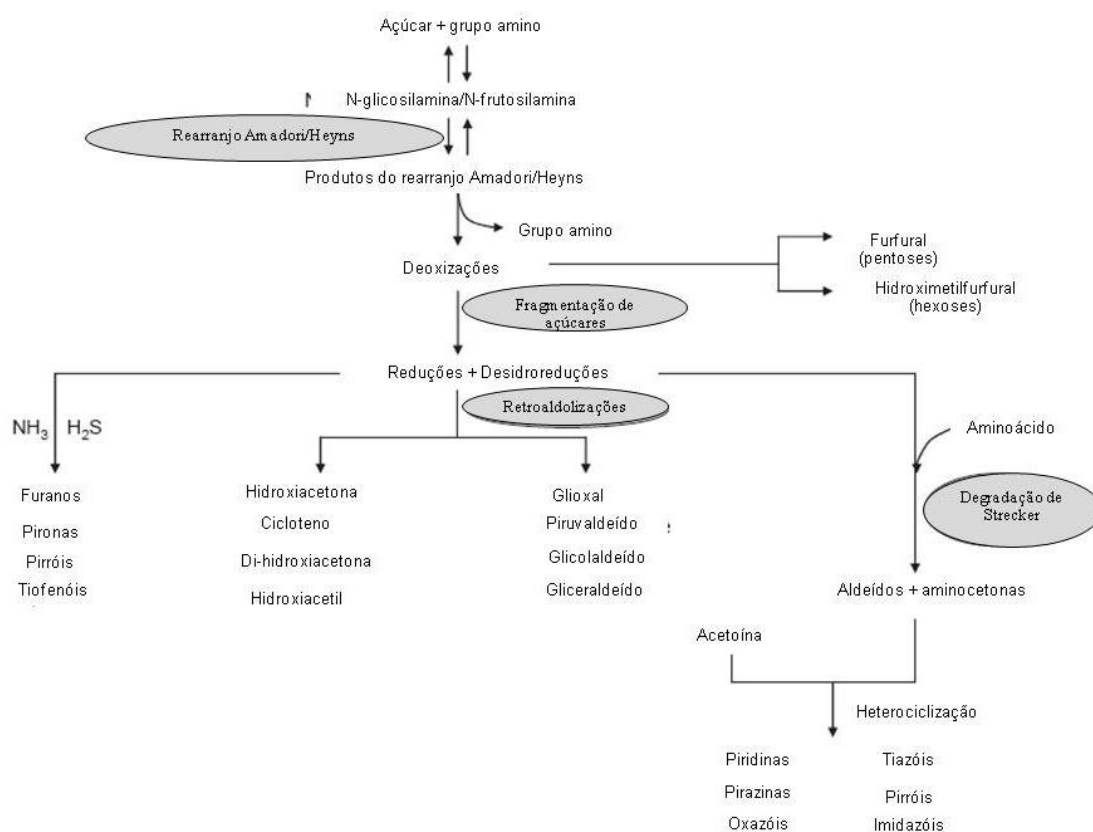


Figura 7: Visão geral da reação de Maillard

Fonte: van BOEKEL, 2006.

Na Figura 8 tem-se uma visão mais específica da formação do *flavour* de cacau, que se desenvolve durante a torrefação das amêndoas fermentadas. Os sabores surgem a partir dos precursores criados durante a fermentação. As reações que os produzem são do tipo Maillard. Essas reações são condensações de funções aminas com funções cetonas/hexonas dos açúcares. Os aldeídos podem se condensar, sendo que a condensação do fenilacetaldeído (proveniente da fenilalanina) com o isovaleraldeído

(proveniente da leucina) gera o 5-metil-3-fenil-2-hexanal, que tem o sabor do chocolate. Além disso, as cetonaminas se condensam para gerar pirazinas (PONTILLON, 2009).

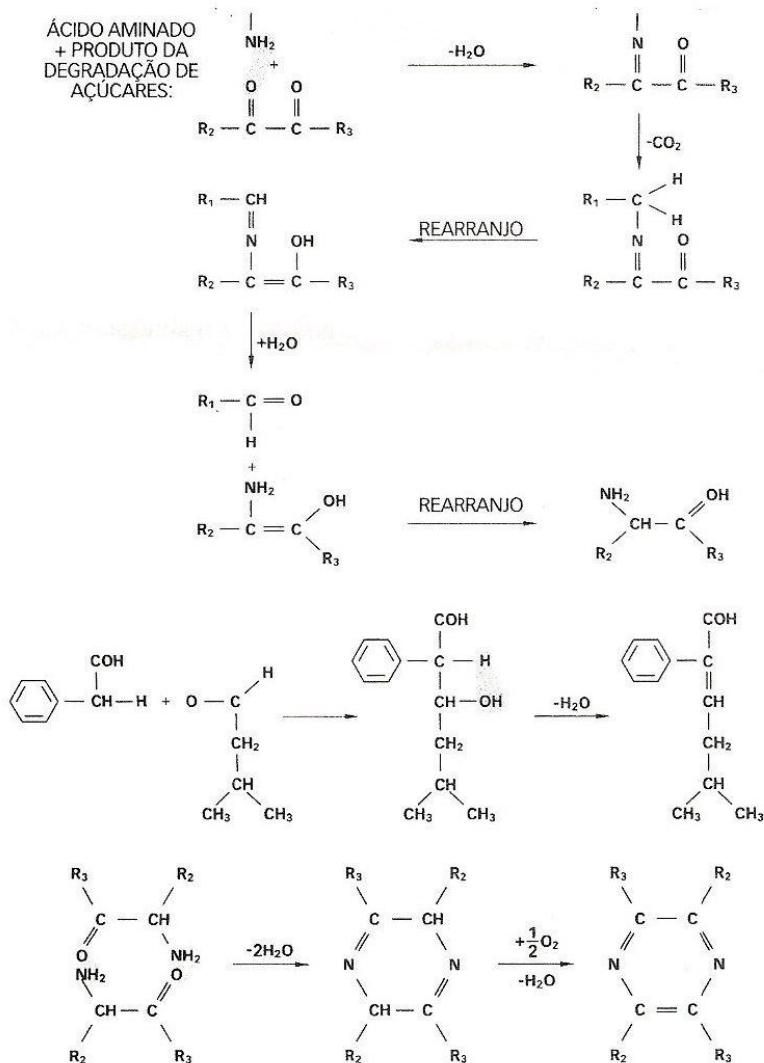


Figura 8: Visão geral da formação do *flavour* de cacau

Fonte: van BOEKEL, 2006.

A qualidade do *flavour* de chocolate em geral depende da origem de cacau entre outros fatores; tem sido demonstrado que amêndoas de diferentes origens têm características distintas. A formação do *flavour* é particularmente relevante durante o processo de torrefação, devido às transformações químicas que têm lugar no torrefador (POWELL, 1983 upud PEREGO *et al.*, 2004).

As pirazinas e seus derivados são os compostos de maior importância para o sabor do chocolate. Os principais constituintes de sabor do cacau são listados na Tabela 1 (BELITZ *et al.*, 2004).

Tabela 1: Compostos odorantes do cacau

Composto	Qualidade do odor
3-metilbutanal	maltado
etil 2-metilbutanona	frutado
hexanal	verde
desconhecido	frutado, ceroso
2-metoxi-3-isopropilpirazina	terra
(E)-2-Octenal	gorduroso, terra
desconhecido	sebo
2-etil-3,5-dimetilpirazina	terra, torrado
2,3-dietil-5-metilpirazina	terra, torrado
(E)-2-Nonenal	sebo, verde
desconhecido	pungente, grama
desconhecido	doce, ceroso
fenilacetaldéido	mel
(Z)-4-Heptanal	biscoito
δ -Octenolactona	doce, coco
δ -Decalactona	doce, pêssego

Fonte: adaptado de BELITZ *et al.*, 2004

Mais de 500 compostos têm sido identificados em amêndoas de cacau torradas. Pirazinas, compostos nitrogenados heterocíclicos caracterizados por baixo peso molecular e alta volatilidade, são as substâncias dominantes (cerca de 20% de todos os flavorizantes), seguidas por ésteres (13%), hidrocarbonetos (13%) e ácidos (11%). A maioria desses compostos pode ser encontrada em amêndoas cruas, por exemplo tetrametilpirazina derivada da fermentação enzimática, enquanto outros podem ser formados durante o processo industrial de produção de chocolate e cacau refinado. A principal rota de formação de pirazinas é através da degradação de Strecker. As metilpirazinas, em particular, são muito importantes para o sabor de cacau em função de seus fortes atributos sensoriais (FEENEY *et al.*, 1975; SANAGI *et al.*, 1997; HUMBERT e SANDRA, 1985 upud PEREGO *et al.*, 2004).

Perego *et al.* (2004), encontrou altas concentrações de metilpirazina para amostras de cacau de diferentes origens (4,98 ppm para Equador, 9,91 ppm para Granada e 13,91 ppm para Gana).

Estudos de Misnawi e Jamilah (2004) mostraram que 2,5-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina e 2,3,5,6-tetrametilpirazina foram as pirazinas obtidas em quantidade significativa após a torrefação.

Reineccius *et al.* (1972), acompanharam a formação de algumas pirazinas durante a torrefação de amêndoas de cacau de diferentes regiões, com diferentes graus de fermentação. Em amêndoas de Gana a formação de pirazinas foi rápida durante os 30 minutos iniciais da torrefação, a 150°C. Entre 30 e 50 minutos de torrefação a formação de pirazinas passou a ser mais lenta, indicando queda da concentração de precursores. Dos 50 aos 90 minutos de torrefação a sua concentração permaneceu constante. Em amêndoas não fermentadas, a geração de pirazinas foi menor. A torrefação durante 30 minutos a 150°C favoreceu a maior produção de pirazinas gerando uma concentração final de 710µg/100g de cacau. Estes autores descobriram que as amêndoas fermentadas já continham uma certa concentração de pirazinas. Esta conclusão foi confirmada mais tarde por Zak *et al.* (1988).

A concentração de pirazinas foi investigada em cacau após fermentação por 10 dias e torrefação em temperaturas de 50-200°C por 30 minutos. As pirazinas foram extraídas e analisadas por destilação e extração simultânea (SDE) e cromatografia gasosa (GC). Foram detectadas: monometilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, trimetilpirazina e a tetrametilpirazina. Nestas condições operacionais foi observado um rápido aumento na concentração de tetrametilpirazina, até o sexto dia de fermentação ($\cong 195 \mu\text{g}/100\text{g}$ de cacau). Após este período a concentração de pirazinas declinou chegando a 100µg/100g de cacau. Durante o período de torrefação de 100-200°C por 30 min. foi observada uma alta concentração de tetrametilpirazina ($\cong 400 \mu\text{g}/100\text{g}$ de cacau) a 150°C, este resultado também foi observado em 20 min. de torrefação em escala industrial (HASHIN e CHAVERON, 1994).

Parâmetros como tempo e temperatura de torrefação foram estudados para avaliar o perfil de compostos voláteis de nibs de cacau. O sabor do cacau após a torrefação é caracterizado por alcoóis, éteres, grupos furanos, tiazóis, pironas, ácidos, ésteres, aldeídos, iminas, aminas, pirazinas e pirróis Os compostos voláteis foram

isolados por destilação e extração simultânea (SDE). O tempo (5-65 min.) e a temperatura (110-170°C) de torrefação foram utilizados como parâmetros. Por esta metodologia foram detectados compostos como: tetrametilpirazina, trimetilpirazina, acetato de fenietila, acetato de isoamila, acetato de 3-metilbutil, fenilacetaldeído, benzaldeído e 2-feniletanol. A porcentagem de área relativa às pirazinas aumentou à medida que a temperatura utilizada foi aumentada. A porcentagem de área relativa aos ésteres foi alta quando foi utilizado até 65 min. e temperaturas de 110-120°C. Em relação aos fenóis, a porcentagem de área diminuiu em temperaturas de 160-170°C por períodos de 45-65min. de torrefação (JINAP *et al.* 1998).

Jinap *et al.* (2004) isolaram as pirazinas de liquor de cacau com diferentes concentrações de polifenóis por destilação e extração simultânea (SDE), utilizando um aparato Lickens e Nickerson (SCHULTZ *et al.* 1977). O método foi eficiente para separação de 3 pirazinas (dimetilpirazina, trimetilpirazina e tetrametilpirazina).

No presente, há escassas informações sobre o perfil de aminoácidos de amêndoas de cacau e o efeito da origem e do processamento industrial em suas concentrações. Adeyeye, *et.al.* (2009), demonstrou que o nível de proteínas em amêndoas de cacau fermentadas (15,2 g/100 g) foi 10,4% maior que o nível de proteínas de amêndoas não fermentadas (13,6 g/100 g). Isso pode ser um indicativo de possível lise celular da microbiota fermentativa. No mesmo trabalho foi verificado que as concentrações de aminoácidos foram variavelmente distribuídas entre as amêndoas fermentadas e não fermentadas, sendo o ácido glutâmico o encontrado em maior concentração tanto nas amêndoas fermentadas (153 mg/g) como naquelas não fermentadas (128mg/g). A segunda posição foi ocupada pelo ácido aspártico. Cistina foi o de menor concentração. Em relação à concentração de aminoácidos essenciais, as amêndoas de cacau fermentadas foram mais ricas do que as não fermentadas.

2.4 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é uma ciência através da qual é possível medir, analisar e interpretar as reações produzidas pelas características dos alimentos e materiais, como elas são percebidas pelos órgãos da visão, olfato, gosto, tato e audição (INSTITUTE FOOD TECHNOLOGY, 1957 apud SILVA, 2001).

A preocupação do homem em relação à percepção de aromas e sabores é bem documentada e data dos anos 300 a.C., quando os gregos compilaram um tratado sobre aromas (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002). Testes sensoriais têm sido conduzidos por um longo tempo; desde que o homem começou a avaliar a boa e má qualidade dos alimentos, água, armas, construções e todas as coisas que podem ser usadas e consumidas. O aumento do comércio inspirou o desenvolvimento de testes sensoriais mais formais. Com o tempo, métodos ritualísticos de avaliação de qualidade de vinhos, chás, café e outros foram desenvolvidos, alguns dos quais sobrevivem até os dias de hoje. A história da análise sensorial foi baseada nos esforços, em tempos de guerra, para alcançar a aceitação dos alimentos pelos soldados do exército dos EUA. A maior contribuição para o desenvolvimento dos testes sensoriais foi realizada pelo Departamento de Ciências de Alimentos na Universidade da Califórnia em Davis (Food Science Department at the University of California at Davis). Recentemente, cientistas têm desenvolvido testes sensoriais como uma metodologia formalizada, estruturada e codificada. Além disso, continuam a desenvolver novos métodos e refinar os já existentes (MEILGAARD *et al.*, 2007).

O homem tem habilidade natural para comparar, diferenciar e quantificar os atributos sensoriais e a análise sensorial utiliza-se dessa habilidade para avaliar alimentos e bebidas, empregando a metodologia apropriada aos objetivos de estudo e tratamentos estatísticos dos dados (FERREIRA *et al.*, 2000 apud MEDEIROS e LANNES, 2009).

A análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos. Para isto é preciso que haja entre as partes, indivíduos e produtos, contato e interação. O estímulo é medido por processos físicos e químicos e as sensações por efeitos psicológicos. As sensações produzidas podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado. Nesta avaliação, os indivíduos, por meio dos próprios órgãos sensórios, numa percepção somatosensorial, utilizam os sentidos da visão, olfato, audição, tato e gosto (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004). Dessa forma é possível determinar diferenças, caracterizar e medir atributos sensoriais dos produtos ou determinar se as diferenças nos produtos são detectadas e aceitas ou não pelo consumidor. Trata-se, portanto, de uma ciência que possui um vasto campo de aplicação, que abrange desde a pesquisa e

desenvolvimento de novos produtos, reformulação dos produtos já estabelecidos no mercado, estudo de vida de prateleira, determinação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, identificação das preferências dos consumidores e otimização e melhoria de qualidade (FARIA e YOTSUYANAGI, 2002; SILVA, 2001).

A análise sensorial de confiança está baseada na habilidade do analista sensorial para otimização de quatro fatores que governam uma medida:

- 1) definição do problema: o que será medido deve ser precisamente definido; tão importante quanto isso é nas ciências “exatas”, é muito mais nas sensações e sentimentos.
- 2) *design* do teste: este deve não apenas não permitir a subjetividade e conhecimento de informações que possam influenciar julgadores, como também minimizar a quantidade de testes requeridos para produzir a acurácia desejada dos resultados.
- 3) instrumentação: os julgadores devem ser selecionados e treinados para fornecer uma boa reprodutibilidade; o analista deve trabalhar com eles até que conheça suas sensitividades e tendências em determinadas situações.
- 4) interpretação dos resultados: usando estatística, o analista tira aquelas conclusões que são garantidas pelos resultados.

Além desses fatores deve-se considerar que julgadores, como instrumentos de medida, são completamente variáveis ao longo do tempo; muito variáveis entre eles mesmos; e altamente influenciáveis. Para superar adequadamente esses fatores é necessário que as medidas sejam repetidas, que os julgadores sejam suficientes (20 – 50, em geral), e que o analista sensorial respeite as muitas regras e pilares que governam as atitudes do painel (MEILGAARD *et al.*, 2007).

Diversos métodos de avaliação podem ser empregados a depender dos objetivos pretendidos. A Figura 8 é uma representação esquemática e simplificada dos principais métodos utilizados na análise sensorial e seus respectivos objetivos.



Figura 8: Representação esquemática dos principais testes sensoriais

Fonte: http://www.beefpoint.com.br/bn/hotsites/sgs/images/grafico_analise_sensorial.jpg

Os testes sensoriais discriminativos ou de diferença são considerados métodos objetivos que medem atributos específicos pela discriminação simples, indicando por comparações, se existem ou não diferenças estatísticas entre amostras. Os testes discriminativos ou de diferença mais empregados em análise sensorial são o triangular, duo-trio, ordenação, comparação pareada e diferença do controle. Métodos afetivos, por sua vez, são aqueles nos quais o julgador expressa seu estado emocional ou reação afetiva ao escolher um produto pelo outro. É a forma usual de se medir a opinião de um grande número de pessoas com respeito a suas preferências, gostos e opiniões. Os julgadores não precisam ser treinados, bastando ser consumidores freqüentes do produto em avaliação. Já os métodos descritivos são aqueles que descrevem os componentes ou parâmetros sensoriais e medem a intensidade em que são percebidos. Trata-se, portanto, de uma técnica sensorial na qual os atributos de um produto são identificados e quantificados por julgadores treinados especificamente para este propósito. Vale destacar que testes sensoriais exigem cuidados na padronização do preparo e apresentação das amostras e na formação da equipe sensorial. Todas as amostras devem ser codificadas com números aleatórios de três dígitos, casualizadas e apresentadas à equipe pré-selecionada e treinada. Os testes devem ser conduzidos em cabines individualizadas com controle das condições ambientais, tais como: iluminação, temperatura, ausência de sons ou ruídos e livre de odores estranhos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004).

Dentre os testes utilizados para verificação da percepção de um determinado aroma estão os testes de diferença do controle e ordenação. O teste de diferença do controle é indicado quando se deseja verificar se existe diferença entre uma amostra controle (ou padrão) e uma ou mais amostras-teste e, ao mesmo tempo, estimar o grau de diferença existente. Todas as amostras são avaliadas quanto às diferenças em relação ao controle. Normalmente é um teste direcionado à avaliação de um único atributo. Em geral são utilizadas equipes de 20 a 50 julgadores. A cada julgador é apresentado o controle e as amostras codificadas, sendo este orientado a avaliar cada uma das amostras comparando-as com o controle e definir, na escala, o grau de diferença entre cada amostra e o padrão. O teste de ordenação, por sua vez, é indicado quando se deseja comparar várias amostras em relação a um determinado atributo sensorial ou em relação à preferência. Este teste permite a ordenação das amostras segundo uma escala de intensidade do atributo de interesse, resultando em indicação numérica das diferenças entre as amostras, não sendo possível, entretanto, quantificar o grau de diferença ou preferência entre as amostras. Assim, tanto as amostras consecutivas que apresentem grande diferença como aquelas com leve diferença estarão separadas somente por uma unidade de ordenação. Para o teste de ordenação-preferência sugere-se o mínimo de 30 julgadores. Cada julgador recebe três ou mais amostras e é solicitado a ordená-las em ordem crescente ou decrescente da intensidade de um determinado produto ou da preferência (SILVA, 2001; FARIA e YOTSUYANAGI, 2002; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004; MEILGAARD *et al.*, 2007).

Perego *et al.* (2004) reportou que amêndoas de cacau de diferentes origens mostraram diferentes características de *flavour*. Amêndoas provenientes de Granada e Equador foram significativamente ($p < 0.05$) preferidas em relação àquelas originárias de Gana. O estudo mostrou uma tendência similar entre a concentração de pirazinas e a preferência em relação ao *flavour* do produto.

De acordo com Misnawi *et al.* (2004), a presença de polifenóis no liquor de cacau durante a torrefação prejudicou os atributos de *flavour*, viscosidade e aumentou a adstringência e o amargor do liquor resultante mas não influenciou a acidez, nem os aromas floral/frutal, verde /cru e terroso. A variação do tempo de torrefação, de 15 a 45 min a 120 °C, afetou significativamente o *flavour* de cacau mas não afetou as demais propriedades sensoriais.

Lopez e McDonald (1981) estabeleceram uma lista de atributos para o sabor do chocolate. O sabor básico desta classe de descritores consiste de “sub-sabores”

essenciais e características do chocolate. Alguns exemplos são: a adstringência e o sabor amargo. Tanino, nozes e ácido/frutal e torrado são desenvolvidos durante o processamento. Os sabores auxiliares, componentes do chocolate básico ou sabores acentuados (realçam o sabor do chocolate) foram citados como de ácido torrado, caramelo, frutal, mel, nozes, uva-passa, *toffee* e *fudge*. Os sabores estranhos (*off-flavours*) foram citados como de planta, pão, terra/mofo, alcalino, peixe, remédio, óleo e fumaça.

Urbanski (1992) através da análise descritiva quantitativa (ADQ) levantou atributos para o sabor do chocolate. Aldeídos e cetonas foram associados a sabores e aromas “frutais” e “florais”. O fenilacetaldeído, o isovaleraldeído, o isopentanal e um certo número de pirazinas foram relacionados com o sabor típico de chocolate. O trimetil tiazol foi associado ao sabor de cacau. As pirazinas bicíclicas são conhecidas por contribuírem para o sabor de “queimado”, “torrado” e “grelhado”. Neste trabalho também foi verificada a influência do clima e da fermentação sobre o sabor do cacau. Amêndoas de diferentes origens (Costa do Marfim, Brasil, Equador, Malásia, Java, Caracas e Sanchez), torradas sob as mesmas condições (140°C por 30 minutos), desenvolveram sabores distintos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO, SELEÇÃO E PREPARO DAS AMÊNDOAS

As amêndoas testadas foram doadas por empresas do ramo de cacau da cidade de Ilhéus – BA. Foram obtidos pacotes contendo 1000g de amêndoas fermentadas e secas (curadas) classificadas, visualmente, em dois grupos: amêndoas de baixa qualidade e amêndoas de boa qualidade (a serem usadas como padrão de formação de sabor durante a torrefação). Vale destacar que esta classificação foi realizada pelas empresas fornecedoras das amêndoas.

Os dois grupos de amêndoas foram limpos (separação de embrião, tegumento e radícula, caso necessário) e os cotilédones foram armazenados a temperatura ambiente até o momento da moagem.

Para obtenção de sementes não fermentadas (extração de enzimas), foram doados por produtores de Ilhéus - BA, frutos frescos de cacau. Destes foi extraída a polpa e as sementes foram lavadas para remoção da mucilagem e da casca. Estas foram armazenadas a -18°C até o momento da extração.

Os três grupos de amêndoas obtidos (amêndoas de boa qualidade, baixa qualidade e não fermentadas) foram moídos à mão até a obtenção de um pó fino que foi armazenado a -18°C , até o momento da utilização.

3.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Neste experimento foram testadas, para fins de comparação, enzimas de origem animal – pepsina suína (endoprotease aspártica) e carboxipeptidase A de suíno –; enzima microbiana contendo endo e exopeptidases e as enzimas vegetais extraídas do cacau – endoprotease e carboxipeptidase contidas no extrato bruto das sementes não fermentadas. Foi realizada a determinação da atividade destas enzimas no intuito de determinar a quantidade de enzima a ser aplicada em cada teste em unidades de atividade. Todas as determinações foram conduzidas em triplicata. O preparo das soluções utilizadas está descrito no ANEXO 2.

3.2.1 Atividade de endoprotease

Alíquotas de 1mL de solução a 1% de albumina de soro bovino em tampão citrato-fosfato (pH = 3,5) foram adicionadas de 0,5mL de solução enzimática. Foram utilizadas três soluções enzimáticas a saber: pepsina (10 mg/mL), enzima microbiana (0,5 mL) e cacau (1 mg de pó obtido dos frutos frescos de cacau). A reação foi conduzida em banho de aquecimento a 45°C por 30 minutos e paralisada por adição de 0,5mL de ácido tricloroacético (TCA) a 25%. O produto da reação foi centrifugado a 10000 rpm (9030 x g) por 15 minutos e o sobrenadante foi submetido à leitura de absorbância em espectrofotômetro a 280nm. Por fim determinou-se a atividade enzimática considerando-se uma unidade de atividade (u.a.) como sendo a quantidade de enzima necessária para elevar a leitura em 0,001 unidades em relação ao branco. Este foi preparado pela adição de 1mL de solução de albumina 1%, 0,5 mL de TCA 25% e 0,5 mL da respectiva solução enzimática, recebendo o mesmo tratamento que as demais amostras.

É importante mencionar que, em alguns casos, foi necessária uma segunda centrifugação à mesma velocidade, por 5 minutos pelo fato dos sobrenadantes não encontrarem-se devidamente límpidos após a primeira centrifugação.

3.2.2 Atividade de Carboxipeptidase

Alíquotas de cada uma das soluções enzimáticas (1mL de enzima microbiana, 1 mg de cacau) foram adicionadas de 0,98mL de tampão citrato-fosfato (pH = 6,8) e de 0,02 mL de Pepstatina (inibidor de endoprotease). Essa mistura foi levada a banho de gelo por 1 hora. Após o tempo de reação, alíquotas de 0,06mL do preparado enzimático foram adicionadas de 0,04mL de substrato sintético Z-Phe-Leu 5 μ M e 0,9mL de tampão citrato-fosfato (pH = 6,8). A reação foi conduzida em banho de aquecimento a 45°C por 3 horas e paralisada por adição de 0,2mL de TCA 25%. O produto da reação foi centrifugado a 10000 rpm (9030 x g) por 15 minutos. Algumas vezes foi necessária uma segunda centrifugação a mesma velocidade por 10 min para a obtenção de sobrenadante devidamente límpido. Alíquotas de 0,5mL do sobrenadante foram adicionadas de 1,5mL de Ninhidrina e levadas a banho de ebulição por 10 minutos seguido de banho de gelo. Após agitação vigorosa em vórtex, a mistura foi submetida à leitura de absorbância em espectrofotômetro a 570nm. A atividade enzimática foi

determinada considerando-se uma unidade de atividade (u.a.) como sendo a quantidade de enzima necessária para elevar a leitura em 0,001 unidades em relação ao branco. Este foi preparado pela adição de 0,06 mL de água destilada, 0,04 mL do substrato sintético Z-Phe-Leu 5 μ M e 0,9mL de tampão citrato-fosfato (pH = 6,8) e submetido ao mesmo tratamento usado para as amostras. Vale destacar que não foi feita a determinação de atividade de carboxipeptidase para a enzima animal (Carboxipeptidase A de suíno - Sigma), seguindo-se a determinação do fabricante. Isso em função da pequena quantidade de enzima disponível e custo elevado da mesma.

3.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Alíquotas de 60g do pó obtido da moagem das amêndoas de cacau de baixa qualidade foram pesadas em frascos de 250 mL e adicionadas de 120 mL de água. O pH do meio foi então ajustado para 3,5 utilizando ácido acético. Em seguida os frascos foram levados a banho de agitação e adicionados da protease aspártica em quantidade equivalente a 22000 u.a. Os frascos foram incubados a 50°C por 8 horas sendo levados a banho de gelo após o tempo de reação. Seus conteúdos tiveram o pH novamente ajustado (pH=7,5, ajustado com solução NaOH 10N) e houve adição das respectivas carboxipeptidases. Nova incubação (36°C por 8 horas) teve início.

Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicata obedecendo ao esquema apresentado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: 1ª etapa do tratamento enzimático

TRATAMENTO	TIPO DE ENZIMA	QUANTIDADE DE ENZIMA	pH DO MEIO	TEMPERATURA
T1	Enzima animal	22000 u.a	3,5	50°C
T2	Enzima vegetal	22000 u.a	3,5	50°C
T3	Enzima microbiana	22000 u.a	3,5	50°C

Enzima animal: pepsina suína. Enzima vegetal: pó de cacau. Enzima microbiana: Flavorzyme®.

Tabela 3: 2ª etapa do tratamento enzimático

TRATAMENTO	TIPO DE ENZIMA	QUANTIDADE DE ENZIMA	pH DO MEIO	TEMPERATURA
T1	Enzima animal	22000 u.a	7,5	36°
T2	Enzima vegetal	22000 u.a	7,5	36°
T3	Enzima microbiana	22000 u.a	7,5	36°

Enzima animal: carboxipeptidase A de pâncreas bovino. Enzima vegetal: pó de cacau. Enzima microbiana: Flavorzyme®.

As condições de pH e temperatura utilizadas foram estabelecidas com base em dados apresentados no estudo de Voigt *et. al.* (1994a).

O material resultante do tratamento enzimático foi seco em estufa de circulação de ar a 50°C por 5 horas e armazenado em congelador até o momento da torrefação.

3.4 TORREFAÇÃO

Momentos antes da análise sensorial, o material tratado e seco foi distribuído em bandejas de alumínio, em camadas de 2 a 3 milímetros de espessura. Estas foram levadas a estufa, previamente aquecida a 120°C, por 12 minutos. As condições de temperatura e tempo utilizadas foram estabelecidas com base em dados apresentados por Voigt *et. al.* (1994a).

Para a obtenção dos padrões partiu-se de amêndoas de cacau de boa qualidade e amêndoas de cacau de baixa qualidade não submetidas a tratamento enzimático e secagem. O pó obtido através da moagem dessas amêndoas passou diretamente para a etapa de torrefação. Obteve-se, desta forma, material com *flavour* de chocolate bem desenvolvido (PB) e pouco desenvolvido (PR), respectivamente, que serviram como padrão para as análises químicas e sensoriais. Vale destacar que como os padrões não passaram pelas etapas de tratamento enzimático e secagem, conseqüentemente não foram submetidos às variações de pH e temperatura pelas quais as amostras teste passaram. Isso possivelmente ocasionou diferenças que podem ter interferido nos resultados obtidos.

3.5 ANÁLISE SENSORIAL

Foram avaliadas sensorialmente, em relação ao *flavour* de chocolate, amostras de pó de cacau enzimaticamente tratado. Todos os testes foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial da UEFS (Universidade Estadual de Feira de Santana). Vale destacar ainda que todos os testes sensoriais foram conduzidos com todas as replicatas obtidas após o tratamento enzimático.

3.5.1 Teste de Diferença do Controle

Inicialmente o Teste de Diferença do Controle foi realizado com 25 julgadores, com amostras de pó de cacau. A equipe de julgadores foi composta por alunos e professores do curso de Engenharia de Alimentos da UEFS. Essas análises prévias tiveram o objetivo de treinar os julgadores, além de selecionar aqueles que apresentassem boa reprodutibilidade e estivessem em consenso com os demais, bem como verificar a ocorrência de melhoria no *flavour*. Foram, então, realizados testes de diferença do controle, nos quais os 20 julgadores previamente selecionados receberam uma amostra padrão ou controle especificada com a letra P e quatro amostras codificadas, sendo uma delas a própria amostra padrão. Cada julgador foi orientado a avaliar (“cheirar”) as amostras comparando com o padrão e indicando o grau de diferença entre as amostras codificadas e o controle. Para isso foi utilizada uma escala específica (Figura 9).

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA											
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia											
Nome _____	Data: ____/____/____										
<p>Você está recebendo uma amostra Padrão (P) e quatro amostras codificadas. Por favor, avalie as amostras da esquerda para a direita (começando pelo Padrão) marcando, na escala, abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em relação ao aroma de chocolate, da amostra padrão.</p>											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>Grau de Diferença</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-----</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>-----</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>-----</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>-----</td> <td>-----</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	Grau de Diferença	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0 – nenhuma diferença 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - extremamente diferente
Amostra	Grau de Diferença										
-----	-----										
-----	-----										
-----	-----										
-----	-----										
Comentários: _____											

Figura 9: Ficha para aplicação de Teste de Diferença do Controle

No primeiro teste, as seis amostras de pó de cacau tratado (T1, T2 e T3 / T1', T2' e T3' / T1'', T2'' e T3'' – provenientes dos tratamentos enzimáticos descritos no item 3.3) foram avaliadas utilizando-se a amostra composta de amêndoas de cacau de boa qualidade (PB) como controle.

Na segunda etapa, as mesmas amostras teste ((T1, T2 e T3 / T1', T2' e T3' / T1'', T2'' e T3'')) foram comparadas à amostra composta por amêndoas de cacau de baixa qualidade (PR) (amostra controle).

As avaliações de *flavour* foram conduzidas em cabines individuais. As amostras foram apresentadas em copos descartáveis de polietileno branco de 50mL de capacidade, cobertos com papel alumínio, codificados com números de três algarismos. A forma de apresentação foi a monádica, com duas amostras por sessão, num total de duas sessões por dia.

A partir de dados obtidos através desse teste, foi possível identificar os tratamentos que mais se aproximaram – em relação ao *flavour* – do pó de cacau obtido das amêndoas de boa qualidade.

3.5.2 Teste de Ordenação-Preferência

Foi realizado um Teste de ordenação-preferência no qual 40 julgadores receberam quatro amostras codificadas e foram orientados a ordená-las conforme a preferência, em relação ao *flavour* de chocolate (Figura 10). Esse teste foi realizado em dois blocos. No primeira dia os julgadores avaliaram um conjunto composto por três amostras teste (T1, T2 e T3) e pela amostra PB. As análises foram conduzidas em cabines individuais. No segundo dia manteve-se a amostra padrão - PB e introduziu-se as demais amostras teste (T1'', T2'' e T3''). As amostras foram apresentadas, de forma monádica, em copos descartáveis de polietileno branco de 50mL de capacidade, cobertos com papel alumínio, codificados com números de três algarismos.


		UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA Programa de Pós-graduação em Biotecnologia	
Nome _____		Data: ___/___/___	
Avalie as amostras, da esquerda para direita, em relação ao aroma de chocolate, e ordene-as em ordem crescente conforme a sua preferência.			
+ preferida		_____	_____
		- preferida	
Comentários: _____ _____			

Figura 10: Ficha para aplicação de Teste de Ordenação-Preferência

3.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE

Alíquotas de 0,5g (em triplicata) de cada tratamento sofreram extração com 5mL de uma mistura contendo TCA, acetato de sódio e ácido acético. O produto da extração foi analisado pelo método colorimétrico de Lowry, modificado por Murthy et. al. (1997) para quantificação dos aminoácidos livres e pequenos peptídeos formados durante o processo enzimático. Para realização das devidas comparações esta análise também foi conduzida com amêndoas de cacau de boa qualidade e de baixa qualidade.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos através das análises química e sensorial foram exportados para o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2007) e submetidos à análise de variância ANOVA. Para a análise sensorial aplicou-se o teste de Dunnet para comparação das médias das amostras ao nível de 5% e 1%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Através da metodologia descrita anteriormente (item 3.2), utilizando-se três repetições, obteve-se as médias de atividade enzimática dispostas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Médias de atividade enzimática de protease.

TIPO DE ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
Microbiana	14.680 u.a/mL
Animal	7.550.666,60 u.a/g
Vegetal	15.457,75 u.a/g

Enzima microbiana: Flavorzyme®. Enzima animal: pepsina suína e carboxipeptidase A de pâncreas bovino. Enzima vegetal: pó de cacau.

Tabela 5: Médias de atividade enzimática de carboxipeptidase.

TIPO DE ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
Microbiana	872.391,06 u.a/mL
Animal	55 u.a/mL
Vegetal	2.509.000,10 u.a/g

* Atividade enzimática fornecida pelo fabricante.
Enzima microbiana: Flavorzyme®. Enzima animal: pepsina suína e carboxipeptidase A de pâncreas bovino. Enzima vegetal: pó de cacau.

Com os dados obtidos verificou-se que todas as enzimas apresentaram boa atividade, podendo, portanto, proporcionar os resultados esperados no tratamento enzimático.

Com base nos dados obtidos através da determinação de atividade enzimática, bem como dados disponíveis na literatura, estabeleceu-se que, inicialmente, o nível de atividade utilizado seria 22000 u.a.

Conhecendo-se as atividades enzimáticas foi possível determinar as alíquotas de enzimas a serem utilizadas para obtenção do nível de atividade desejado (22000 u.a), as quais encontram-se dispostas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Alíquotas utilizadas na 1ª etapa do tratamento enzimático.

TIPO DE ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
Microbiana	0,6 mL
Animal	0,0016 g
Vegetal	2 g

Enzima microbiana: Flavorzyme®. Enzima animal: pepsina suína e carboxipeptidase A de pâncreas bovino. Enzima vegetal: pó de cacau.

Tabela 7: Alíquotas utilizadas na 2ª etapa do tratamento enzimático.

TIPO DE ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
Microbiana	1,2 mL solução 1:100
Animal	0,2 mL
Vegetal	0,0014 g

Enzima microbiana: Flavorzyme®. Enzima animal: pepsina suína e carboxipeptidase A de pâncreas bovino. Enzima vegetal: pó de cacau.

4.2 ANÁLISE SENSORIAL

4.2.1 Teste de Diferença do Controle

Os resultados estatísticos para o primeiro teste – amostra padrão composta por pó de cacau obtido de amêndoas de boa qualidade – foram calculados pela Análise de Variância – ANOVA e estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8: Notas obtidas no Teste de Diferença do Controle para PB.

AMOSTRA T1			AMOSTRA T2			AMOSTRA T3			AMOSTRA PB		
JULG.	REP.	NOTA	JULG.	REP.	NOTA	JULG.	REP.	NOTA	JULG.	REP.	NOTA
1	1	6	1	1	9	1	1	8	1	1	0
1	2	3	1	2	6	1	2	6	1	2	1
1	3	6	1	3	4	1	3	3	1	3	0
2	1	4	2	1	9	2	1	8	2	1	0
2	2	1	2	2	9	2	2	8	2	2	0
2	3	8	2	3	8	2	3	1	2	3	0
3	1	6	3	1	5	3	1	1	3	1	2
3	2	2	3	2	5	3	2	7	3	2	0
3	3	9	3	3	9	3	3	7	3	3	0
4	1	9	4	1	1	4	1	2	4	1	5
4	2	5	4	2	9	4	2	8	4	2	0
4	3	6	4	3	8	4	3	3	4	3	0
5	1	8	5	1	9	5	1	8	5	1	0
5	2	7	5	2	9	5	2	7	5	2	0
5	3	9	5	3	9	5	3	5	5	3	0
6	1	5	6	1	7	6	1	6	6	1	4
6	2	4	6	2	5	6	2	5	6	2	2
6	3	5	6	3	7	6	3	6	6	3	3
7	1	9	7	1	1	7	1	2	7	1	5
7	2	7	7	2	8	7	2	3	7	2	2
7	3	8	7	3	9	7	3	5	7	3	1
8	1	5	8	1	3	8	1	1	8	1	2
8	2	3	8	2	5	8	2	5	8	2	0
8	3	5	8	3	6	8	3	3	8	3	0
9	1	9	9	1	5	9	1	3	9	1	5
9	2	3	9	2	5	9	2	5	9	2	4
9	3	4	9	3	6	9	3	3	9	3	2
10	1	5	10	1	1	10	1	0	10	1	2
10	2	1	10	2	2	10	2	4	10	2	0
10	3	7	10	3	8	10	3	6	10	3	0
11	1	7	11	1	9	11	1	8	11	1	4
11	2	3	11	2	8	11	2	5	11	2	1
11	3	7	11	3	9	11	3	3	11	3	1
12	1	3	12	1	7	12	1	4	12	1	1
12	2	4	12	2	8	12	2	7	12	2	0
12	3	4	12	3	5	12	3	3	12	3	0
13	1	2	13	1	9	13	1	7	13	1	1
13	2	0	13	2	5	13	2	2	13	2	1
13	3	2	13	3	7	13	3	3	13	3	1
14	1	4	14	1	8	14	1	4	14	1	3
14	2	2	14	2	8	14	2	1	14	2	3
14	3	5	14	3	9	14	3	3	14	3	1
15	1	2	15	1	6	15	1	4	15	1	1
15	2	3	15	2	5	15	2	4	15	2	0
15	3	5	15	3	9	15	3	6	15	3	1
16	1	4	16	1	2	16	1	5	16	1	7
16	2	6	16	2	7	16	2	7	16	2	3
16	3	4	16	3	5	16	3	5	16	3	2
17	1	2	17	1	9	17	1	8	17	1	0
17	2	9	17	2	9	17	2	5	17	2	0
17	3	6	17	3	6	17	3	4	17	3	0
18	1	3	18	1	5	18	1	4	18	1	1
18	2	3	18	2	5	18	2	3	18	2	0
18	3	6	18	3	7	18	3	5	18	3	3
19	1	5	19	1	8	19	1	8	19	1	2
19	2	8	19	2	9	19	2	8	19	2	2
19	3	9	19	3	9	19	3	8	19	3	0
20	1	4	20	1	8	20	1	5	20	1	2
20	2	3	20	2	5	20	2	4	20	2	1
20	3	5	20	3	6	20	3	2	20	3	1

PB: amostra padrão composta por pó de amêndoas de cacau de boa qualidade. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Tabela 9: Médias obtidas pela análise sensorial.
Teste de Diferença do Controle com PB.

TIPO DE ENZIMA	MÉDIA
P	1,38 ^c
T1	4,98 ^b
T2	6,65 ^a
T3	4,73 ^b

P: amostra padrão. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.
Letras diferentes representam amostras significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10: Resultados estatísticos calculados pela ANOVA.
Teste de Diferença do Controle com PB.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F (CALC.)	F (5%)	F (1%)
AMOSTRA	3	292,24	97,41	58,68	2,83	4,28
PROVADOR	19	56,68	2,98	1,80		
ERRO	57	94,68	1,66			
TOTAL	79	443,60				

Pela observação da Tabela ANOVA é possível verificar que o valor de F calculado para fonte de variação amostra (58,68), é cerca de 20 vezes maior que o valor de F tabelado a 5% (2,83), e aproximadamente 14 vezes maior que o valor de F tabelado a 1%. Sendo assim, conclui-se que há diferença significativa entre pelo menos duas amostras tanto ao nível de significância de 5% como ao nível de 1%. Aplicou-se, então o Teste de Dunnett (Tabela 11). Este teste fornece a mínima diferença significativa (MDS) para que duas amostras possam ser consideradas significativamente diferentes. Se a diferença entre as amostras for maior ou igual a MDS, são consideradas significativamente diferentes ao nível de probabilidade testado. Por outro lado, observa-se que o valor de F calculado para a fonte de variação provador (1,80) é menor que o valor de F tabelado tanto a 5% (2,83) quanto a 1% (4,28) de significância. Esse é um ótimo resultado pois indica que não há diferença significativa entre os 20 julgamentos realizados. Ou seja, proporções semelhantes da escala sensorial foram utilizadas para expressar julgamentos semelhantes.

Tabela 11: Teste de Dunnett. PB.

MDS	T1 – P	T2 – P	T3 – P	T2 – T1	T3 – T1	T2 – T3
0,91	3,60	5,27	3,35	1,67	0,25	1,92

P: amostra padrão. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Pela Tabela 11 observa-se que todas as amostras diferem significativamente do padrão a um nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Isso porque os valores das diferenças entre as médias das amostras T1, T2 e T3 e o padrão (P) – 3,60; 5,27; 3,35 – são maiores que o valor de MDS (0,91). Baseado nisso conclui-se que nenhum dos tratamentos testados foi capaz de atingir a qualidade desejada em relação ao *flavour* de chocolate, embora de modo geral tenha sido possível obter uma melhora de cerca de 50% no *flavour* de chocolate das amêndoas de baixa qualidade (Tabelas 9 e 11). Da mesma forma, verificou-se que as amostras T1 e T2, bem como as amostras T2 e T3 diferiram significativamente entre si ao nível de erro de 5% de probabilidade já que os valores das diferenças entre as médias de T1 e T2 (1,67) e T2 e T3 (1,92) são maiores que o valor de MDS (0,91). Isso significa que, o *flavour* de chocolate obtido através do uso de enzima vegetal (T2) é estatisticamente diferente daqueles obtidos com enzima animal (T1) e microbiana (T3). Entretanto, não há diferença estatística entre os *flavours* de chocolate obtidos nestes últimos tratamentos. Este resultado é extremamente favorável já que assim é possível adotar o uso da enzima microbiana. Isso porque esta possui custo menos elevado que a animal além de fornecimento em quantidades apreciáveis o que a torna muito mais viável para aplicação industrial.

Pela Tabela 9 pode-se observar ainda que, considerando que na escala sensorial utilizada a nota 0 equivale a “nenhuma diferença” e a nota 9 equivale a “extremamente diferente”, o tratamento com enzima microbiana (T3 – média: 4,73) foi o que mais se aproximou do padrão (P – média: 1,38) sendo, portanto, o mais próximo da qualidade desejada em termos de *flavour* de chocolate. Por outro lado, embora fosse esperado que o tratamento com enzima vegetal (T2) proporcionasse o melhor resultado para *flavour* de chocolate, este foi o que menos se aproximou do padrão (T2 – média: 6,65). Esse fato pode ser um indicativo de que, assim como é defendido por Aquarone *et. al.* (2001), a fermentação da polpa resulta em desenvolvimento de microorganismos que fornecem enzimas necessárias para a obtenção final do sabor de chocolate.

Os resultados estatísticos para o segundo teste – amostra padrão composta por pó de cacau obtido de amêndoas de baixa qualidade – foram calculados pela Análise de Variância – ANOVA e estão apresentados nas Tabelas 12, 13 e 14.

Tabela 12: Notas obtidas no Teste de Diferença do Controle para PR.

AMOSTRA T1			AMOSTRA T2			AMOSTRA T3			AMOSTRA PR		
JULG.	REP.	NOTA	JULG.	REP.	NOTA	JULG.	REP.	NOTA	JULG.	REP.	NOTA
1	1	2	1	1	7	1	1	7	1	1	0
1	2	3	1	2	5	1	2	6	1	2	0
1	3	4	1	3	2	1	3	6	1	3	1
2	1	4	2	1	9	2	1	8	2	1	0
2	2	1	2	2	9	2	2	7	2	2	0
2	3	8	2	3	9	2	3	1	2	3	0
3	1	4	3	1	7	3	1	1	3	1	1
3	2	2	3	2	5	3	2	3	3	2	0
3	3	9	3	3	9	3	3	7	3	3	0
4	1	1	4	1	9	4	1	1	4	1	5
4	2	7	4	2	8	4	2	6	4	2	0
4	3	6	4	3	8	4	3	3	4	3	0
5	1	8	5	1	9	5	1	7	5	1	0
5	2	5	5	2	9	5	2	9	5	2	1
5	3	9	5	3	9	5	3	4	5	3	1
6	1	4	6	1	7	6	1	6	6	1	5
6	2	4	6	2	5	6	2	5	6	2	3
6	3	5	6	3	7	6	3	6	6	3	3
7	1	6	7	1	8	7	1	3	7	1	1
7	2	4	7	2	7	7	2	5	7	2	0
7	3	8	7	3	9	7	3	7	7	3	3
8	1	2	8	1	6	8	1	4	8	1	1
8	2	3	8	2	5	8	2	5	8	2	2
8	3	6	8	3	5	8	3	3	8	3	1
9	1	5	9	1	6	9	1	5	9	1	1
9	2	1	9	2	3	9	2	3	9	2	1
9	3	3	9	3	6	9	3	4	9	3	0
10	1	4	10	1	6	10	1	1	10	1	0
10	2	1	10	2	5	10	2	2	10	2	0
10	3	5	10	3	7	10	3	4	10	3	0
11	1	5	11	1	8	11	1	3	11	1	1
11	2	2	11	2	9	11	2	7	11	2	1
11	3	7	11	3	9	11	3	3	11	3	1
12	1	4	12	1	8	12	1	6	12	1	1
12	2	5	12	2	6	12	2	6	12	2	3
12	3	6	12	3	8	12	3	5	12	3	3
13	1	2	13	1	7	13	1	6	13	1	1
13	2	3	13	2	4	13	2	4	13	2	0
13	3	4	13	3	6	13	3	8	13	3	1
14	1	9	14	1	9	14	1	9	14	1	5
14	2	2	14	2	6	14	2	5	14	2	0
14	3	3	14	3	9	14	3	5	14	3	0
15	1	3	15	1	6	15	1	2	15	1	1
15	2	3	15	2	5	15	2	2	15	2	0
15	3	4	15	3	7	15	3	6	15	3	2
16	1	4	16	1	6	16	1	5	16	1	3
16	2	3	16	2	7	16	2	6	16	2	0
16	3	5	16	3	7	16	3	6	16	3	3
17	1	1	17	1	8	17	1	4	17	1	0
17	2	1	17	2	8	17	2	4	17	2	2
17	3	5	17	3	6	17	3	4	17	3	0
18	1	5	18	1	7	18	1	6	18	1	4
18	2	3	18	2	5	18	2	3	18	2	0
18	3	7	18	3	6	18	3	4	18	3	2
19	1	6	19	1	7	19	1	8	19	1	2
19	2	4	19	2	8	19	2	9	19	2	1
19	3	8	19	3	9	19	3	9	19	3	1
20	1	3	20	1	8	20	1	5	20	1	0
20	2	2	20	2	4	20	2	3	20	2	5
20	3	4	20	3	5	20	3	2	20	3	1

PR: amostra padrão composta por pó de amêndoas de cacau de baixa qualidade. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Tabela 13: Médias obtidas pela análise sensorial. Teste de Diferença do Controle com PR.

TIPO DE ENZIMA	MÉDIA
P	1,23 ^c
T1	4,28 ^b
T2	6,90 ^a
T3	4,90 ^b

P: amostra padrão. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Letras diferentes representam amostras significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 14: Resultados estatísticos calculados pela ANOVA. Teste de Diferença do Controle com PR.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F (CALC.)	F (5%)	F (1%)
AMOSTRA	3	330,49	110,16	98,36	2,83	4,28
PROVADOR	19	59,25	3,12	2,78		
ERRO	57	63,88	1,12			
TOTAL	79	453,62				

Pela observação da Tabela ANOVA pode-se verificar que o valor de F calculado para a fonte de variação amostra (98,36), é quase 35 vezes maior que o valor de F tabelado (2,83), ao nível de significância de 5% e 23 vezes maior que F tabelado a 1%. Sendo assim, conclui-se que há diferença significativa entre os *flavours* de chocolate obtidos em pelo menos duas amostras. Aplicou-se, então o Teste de Dunnett no intuito de saber quais amostras diferem entre si (Tabela 15). Diferentemente, verifica-se que o valor de F calculado para a fonte de variação provador (2,78) é menor que o valor de F tabelado tanto a 5% (2,83) quanto a 1% (4,28) de significância. Isso é excelente uma vez que indica que não há diferença significativa entre os 20 julgadores. Ou seja, proporções semelhantes da escala sensorial foram utilizadas para expressar julgamentos semelhantes.

Tabela 15: Teste de Dunnett. Padrão ruim.

MDS	T1 – P	T2 – P	T3 – P	T2 – T1	T3 – T1	T2 – T3
0,75	3,05	5,67	3,67	2,62	0,62	2,00

P: amostra padrão. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Pelos dados acima observa-se que todas as amostras diferem significativamente do padrão a um nível de 5% de significância, uma vez que as diferenças entre as médias (3,05; 5,67; 3,67) foram maiores que o valor de MDS (0,75). Isso indica que, embora nenhum dos tratamentos tenha se igualado a PB (*flavour* de chocolate desejável), também não foram considerados iguais a PR (pouco *flavour* de chocolate). Pela observação das Tabelas 9 e 13, conclui-se que, de modo geral, as médias obtidas pelas amostras nos dois testes de diferença do controle permaneceram em torno da nota 5 da escala sensorial. Isso é um indicativo de que os tratamentos enzimáticos não foram tão bons ao ponto de se igualarem ao padrão bom nem tão ruins ao ponto de serem considerados iguais ao padrão ruim para *flavour* de chocolate. Confirmando os resultados obtidos pelo teste anterior, os tratamentos enzimáticos realizados proporcionaram uma melhora de aproximadamente 50% no *flavour* de chocolate das amêndoas de cacau de baixa qualidade.

Foi verificado ainda que a amostra T2 diferiu significativamente das amostras T1 e T3. Ou seja, o *flavour* de chocolate obtido pelo uso de enzima vegetal (T2) apresentou diferença significativa em relação ao *flavour* obtido tanto pelo uso de enzima animal (T1) como pelo uso de enzima microbiana (T3). Por outro lado, não houve diferença estatística entre as amostras T1 e T3, ou seja, os *flavours* de chocolate obtidos através do uso de enzimas animal (T1) e microbiana (T3) foram iguais ao nível de probabilidade testado (5%).

Pela alta média obtida pela amostra T2 (enzima vegetal) pode-se considerar este tratamento como sendo o de pior resultado, já que foi o que menos se aproximou do padrão ideal para *flavour* de chocolate. Da mesma forma que no teste anterior, isso pode ser um indicativo de que, assim como é defendido por Aquarone *et. al.*(2001), a fermentação da polpa resulta em desenvolvimento de microorganismos que fornecem enzimas necessárias para a obtenção final do sabor de chocolate.

É importante destacar que de posse de todos os resultados foi realizada uma análise estatística para verificar a capacidade de discriminação das amostras, bem como a reprodutibilidade dos 20 julgadores. Desse modo foi possível obter indicativos da confiabilidade dos resultados acima apresentados. Os dados estatísticos obtidos estão apresentados no ANEXO 1 e mostram que, de modo geral, os julgadores apresentaram boa capacidade de discriminação das amostras e boa repetibilidade indicando que os resultados acima apresentados são confiáveis. Ou seja, nas três replicatas os julgadores

discriminaram as amostras, sendo que a variação de seus julgamentos nas três análises conduzidas encontram-se dentro de uma probabilidade de erro aceitável, tendo portanto boa reprodutibilidade de resultados.

Vale destacar que a respeito de tratamento enzimático de amêndoas de cacau de baixa qualidade constam na literatura especializada muito poucos trabalhos. Estes se dedicaram apenas à aplicação de polifenol-oxidases exógenas com o objetivo de reduzir o teor de polifenóis totais, de taninos e de antocianinas que interferem significativamente no amargor, adstringência e na cor das amêndoas (Lima *et al.*, 2001; Brito *et al.* 2002). Como através dos resultados aqui apresentados observou-se uma melhora do *flavour* das amêndoas de cacau de baixa qualidade após o tratamento enzimático pode-se dizer que este trabalho está em conformidade com Lima *et al.*, 2001 e Brito *et al.*, 2002 que consideraram a aplicação de enzimas exógenas benéfica para a qualidade do cacau em teste.

Voigt *et al.* (1994a) estudaram o tratamento de globulinas extraídas de sementes de cacau não fermentadas com proteases extraídas das próprias sementes e com carboxipeptidase A de suínos. A proteína hidrolisada, quando adicionada de açúcares redutores e de manteiga de cacau desodorizada e aquecida a 120°C, por 10 minutos, produziu aroma identificado como característico de chocolate pela maioria dos julgadores, o que também está em conformidade com os nossos resultados, já que, através do tratamento enzimático realizado, foi possível melhorar o *flavour* das amêndoas de cacau de baixa qualidade tornando-o mais característico de chocolate.

4.2.2 Teste de Ordenação-Preferência

Os resultados do teste de ordenação-preferência foram calculados e estão expressos nas Tabelas 16, 17 e 18. A Tabela de Newell e MacFarlane foi consultada, ao nível de significância de 5%, para obtenção do valor crítico. Este valor deve ser comparado com os módulos das diferenças entre as somas das ordens obtidas nos testes. Se essa diferença for maior ou igual ao valor crítico encontrado conclui-se que há preferência entre as amostras ao nível de significância testado.

Tabela 16: Teste de Ordenação-Preferência.

JULG.	T1	T2	T3	PB	JULG.	T1	T2	T3	PB
1	2	4	3	1	41	3	4	1	2
2	3	4	2	1	42	1	2	3	4
3	3	4	2	1	43	3	2	4	1
4	2	3	4	1	44	2	1	3	4
5	2	4	3	1	45	2	3	4	1
6	2	4	3	1	46	2	1	4	3
7	2	4	1	3	47	4	3	2	1
8	4	1	2	3	48	4	1	3	2
9	4	3	1	2	49	4	3	2	1
10	4	1	2	3	50	4	3	2	1
11	2	4	3	1	51	4	3	3	1
12	2	4	3	1	52	4	3	2	1
13	1	4	2	3	53	3	2	1	4
14	2	4	3	1	54	3	4	2	1
15	2	4	3	1	55	3	4	2	1
16	1	3	2	4	56	3	4	2	1
17	4	3	1	2	57	3	4	2	1
18	4	3	1	2	58	3	4	1	2
19	4	3	2	1	59	3	1	2	4
20	3	4	2	1	60	3	1	2	4
21	3	4	1	2	61	3	4	2	1
22	1	4	3	2	62	3	4	2	1
23	3	4	2	1	63	3	4	2	1
24	3	4	2	1	64	3	1	2	4
25	2	3	1	4	65	2	4	3	1
26	2	4	3	1	66	2	1	3	4
27	1	2	3	4	67	2	4	3	1
28	2	4	1	3	68	3	4	2	1
29	2	4	1	3	69	4	3	2	1
30	2	4	3	1	70	3	4	2	1
31	2	4	3	1	71	2	4	1	3
32	3	4	2	1	72	4	3	2	1
33	2	3	4	1	73	2	1	3	4
34	3	4	1	2	74	4	3	1	2
35	2	4	3	1	75	3	4	2	1
36	2	4	3	1	76	4	3	1	2
37	2	4	3	1	77	1	2	4	3
38	2	4	3	1	78	1	2	4	3
39	1	4	3	2	79	2	3	4	1
40	2	4	3	1	80	2	1	4	3

PB: amostra padrão composta por pó de amêndoas de cacau de boa qualidade. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Tabela 17: Somatório das ordens obtidas pelo Teste de ordenação-preferência

TRATAMENTO	Σ DAS ORDENS
P	147
T1	209
T2	256
T3	189

P: amostra padrão. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Tabela 18: Teste de ordenação-preferência.

Valor crítico	$\Sigma T1 - \Sigma P$	$\Sigma T2 - \Sigma P$	$\Sigma T3 - \Sigma P$	$\Sigma T2 - \Sigma T3$	$\Sigma T1 - \Sigma T3$	$\Sigma T2 - \Sigma T1$
42	62	109	42	67	20	47

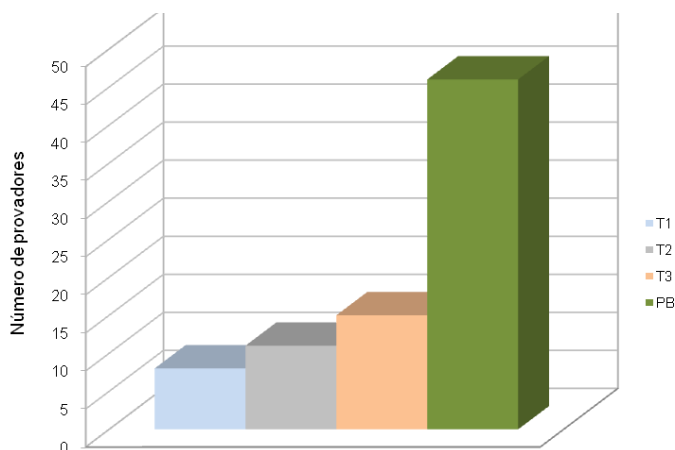
P: amostra padrão. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Na Tabela 18 observa-se que os módulos das diferenças entre as somas das ordens das amostras T1 / T2 / T3 e o padrão (62, 109 e 42) foram maiores ou iguais ao valor crítico (42), indicando que há diferença significativa, em relação à preferência quanto ao *flavour* de chocolate a um nível de 5% de significância. Isso significa que a amostra padrão foi preferida em relação às amostras T1 (enzima animal), T2 (enzima vegetal) e T3 (enzima microbiana) no que diz respeito a *flavour* de chocolate. Entretanto, é importante destacar que entre todos os tratamentos, aquele no qual foi utilizado enzima microbiana (T3) foi o que mais se aproximou do padrão já que o somatório das ordens obtido para esta amostra (42) é igual ao valor crítico (42). Ou seja, por muito pouco a amostra T3 não foi considerada igual ao padrão no teste de ordenação preferência. Vale destacar que cerca de 18% dos julgadores indicaram a amostra T3 (enzima microbiana) como sendo a preferida em relação ao *flavour* de chocolate (Gráfico 1).

Considerando que na escala sensorial utilizada a posição 1 equivale a “mais preferida” e a posição 4 equivale a “menos preferida”, entende-se que a amostra que obtém menor somatório das ordens é a mais preferida pelos julgadores. Dessa forma, conclui-se que o padrão foi a amostra mais preferida seguida pelos tratamentos com enzima microbiana (T3), enzima animal (T1) e enzima vegetal (T2), respectivamente (Gráfico 1). Novamente o tratamento com enzima vegetal (T2) aparece como sendo o de pior resultado, ou seja, foi o que mais se distanciou do *flavour* de chocolate desejado. Isso não era esperado e este pode ser um indicativo de que a microbiota fermentativa é necessária para o desenvolvimento do sabor final de chocolate, conforme hipótese defendida por Aquarone *et. al.* (2001).

Não houve diferença estatística, em relação a preferência, entre as amostras T1 (enzima animal) e T3 (enzima microbiana). Como já foi dito anteriormente, esse resultado é muito favorável já que pode-se optar pela utilização da enzima microbiana cujo custo e disponibilidade são melhores em relação a enzima animal.

Gráfico 1: Teste de Ordenação-Preferência. Número de julgadores conforme a preferência.



PB: amostra padrão composta por pó de amêndoas de cacau de boa qualidade.. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

4.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE

Os resultados estatísticos para a avaliação da eficiência de hidrólise foram calculados pela ANOVA e estão apresentados nas Tabelas 19, 20 e 21. Foi elaborada uma curva padrão de albumina (ANEXO 3).

Tabela 19: Concentrações de peptídeos obtidas pelo método de Lowry.

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	CONC. DE PEPTÍDEOS (mg/mL)
T1	1	1,981
T1	2	2,074
T1	3	1,851
T1	4	1,906
T2	1	1,813
T2	2	2,074
T2	3	1,869
T2	4	1,990
T3	1	1,720
T3	2	1,711
T3	3	2,092
T3	4	1,897
BF	1	1,841
BF	2	1,878
BF	3	1,860
BF	4	1,823
MF	1	1,800
MF	2	1,812
MF	3	1,845
MF	4	1,830

BF: amêndoas de cacau de boa qualidade. MF: amêndoas de cacau de baixa qualidade. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

Tabela 20: Médias obtidas para avaliação da eficiência de hidrólise.

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE PEPTÍDEOS
BF	1,851 ^a
MF	1,822 ^a
T1	1,953 ^a
T2	1,937 ^a
T3	1,855 ^a

BF: amêndoas de cacau de boa qualidade. MF: amêndoas de cacau de baixa qualidade. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.

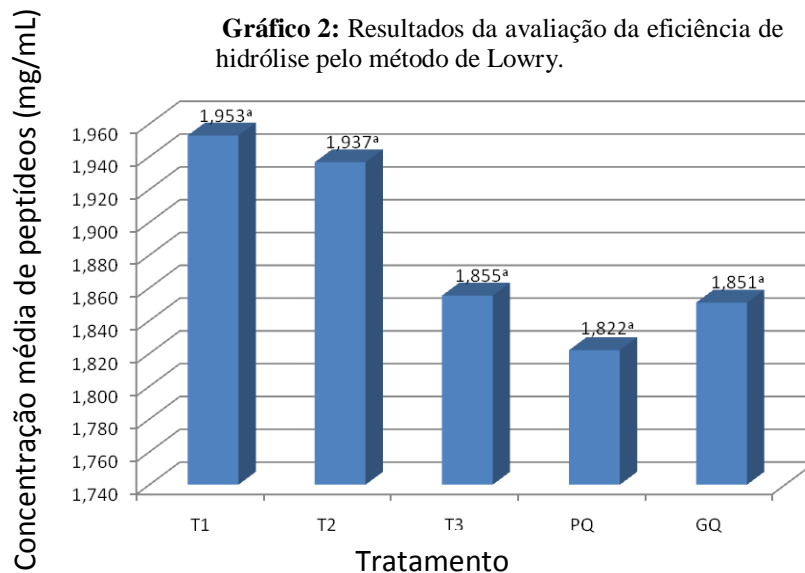
Letras iguais representam amostras estatisticamente iguais ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21: Resultados estatísticos calculados pela ANOVA para Avaliação da eficiência de hidrólise.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F (CALC.)	F (5%)
TRATAMENTO	4	0,053	0,013	1,18	3,06
ERRO	15	0,169	0,011		
TOTAL	19	0,222			

Pela observação da Tabela ANOVA verifica-se que o valor de F calculado (1,18), é menor que o valor de F tabelado (3,06), ao nível de 5% de probabilidade. Isso indica que não há diferença estatística significativa entre os tratamentos, em relação à hidrólise. Por outro lado, verificou-se anteriormente que há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, em relação ao *flavour* de chocolate. Isso indica que, provavelmente, apesar de haver atividade proteolítica quantitativamente igual em todos os tratamentos (Gráfico 2), o padrão de atividade das enzimas testadas é diferente. Ou seja, as enzimas utilizadas hidrolisam as proteínas presentes em igual proporção, mas em posições diferentes gerando, conseqüentemente, peptídeos diferentes. Somente alguns desses peptídeos são os precursores desejados e, após a torrefação, levam à formação do *flavour* de chocolate. Vale destacar que era esperado que a atividade proteolítica fosse quantitativamente igual em todas as amostras uma vez que em cada tratamento foi adicionada a mesma quantidade de enzimas em unidades de atividade. Por outro lado era esperado que fossem obtidos melhores resultados no tratamento com enzima vegetal uma vez que estas são as enzimas que agem no processo natural. Esse fato pode ser um indicativo de que a microbiota fermentativa é essencial para a

formação do sabor final de chocolate, o que está de acordo com a hipótese defendida por Aquarone *et. al.* (2001).



BF: amêndoas de cacau de boa qualidade. MF: amêndoas de cacau de baixa qualidade. T1: tratamento com enzima animal. T2: tratamento com enzima vegetal. T3: tratamento com enzima microbiana.
Letras iguais representam amostras estatisticamente iguais ao nível de 5% de probabilidade.

Verificou-se que também não houve diferença estatística entre a concentração de peptídeos e aminoácidos livres presentes nas amêndoas de cacau de baixa qualidade (MF) e naquelas de boa qualidade (BF). Isso significa que, em termos quantitativos elas são consideradas estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância. Provavelmente, há formação de outros peptídeos que não são precursores de sabor de chocolate. Ou seja, há uma diferença qualitativa e não quantitativa.

5 CONCLUSÃO

Pelo Teste de Diferença do Controle, ao nível de significância de 5 %, todos os tratamentos enzimáticos foram significativamente diferentes tanto das amêndoas de cacau de boa qualidade como daquelas de baixa qualidade, em relação ao *flavour* de chocolate.

O tratamento com enzima vegetal (T2) foi o de pior resultado. No Teste de Diferença do Controle apresentou-se mais distante das amêndoas de cacau de boa qualidade já que obteve a maior média (Tabela 7), em relação ao *flavour* de chocolate. Além disso, no Teste de Preferência, este tratamento foi o menos preferido entre os julgadores (Gráfico 1).

Os tratamentos com enzima animal (T1) e enzima microbiana (T3) apresentaram melhores resultados não havendo diferença estatística entre eles. No Teste de Diferença do Controle obtiveram menores médias e, portanto, mais semelhança com amêndoas de cacau de boa qualidade, em relação ao *flavour* de chocolate. No Teste de Preferência não houve diferença estatística nem entre os dois tratamentos nem entre T3 e o padrão. Este é um resultado favorável, pois dessa forma pode-se adotar o uso da enzima microbiana já que esta possui custo menos elevado além de fornecimento em quantidades apreciáveis e, conseqüentemente, torna-se mais viável para aplicação industrial. Além disso, o fato de ter havido diferença em relação ao padrão ruim significa que o objetivo proposto está sendo alcançado.

Embora, de forma geral, haja diferença estatística significativa entre os tratamentos em relação ao *flavour* de chocolate, não há diferença, em termos quantitativos, em relação à atividade proteolítica das enzimas testadas. Isso pode ser um indicativo de que as mesmas possuem diferentes padrões de atividade, gerando peptídeos diferentes, que só em alguns casos levam à formação do *flavour* de chocolate.

É possível, portanto, através do uso de uma endoprotease aspártica seguido pela aplicação de uma carboxipeptidase (exopeptidase), gerar, nas amêndoas de cacau de baixa qualidade, a mistura de compostos que irá liberar, após a torrefação, o *flavour* característico de chocolate. É necessária, entretanto, a otimização das condições do tratamento enzimático, no intuito de obter melhores resultados e assim estabelecer uma metodologia a ser levada para a indústria de manufatura do cacau e do chocolate. Isso possibilitará a obtenção de chocolate de melhor qualidade, mesmo a partir de amêndoas mal processadas no campo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os tratamentos que mais se aproximaram, em relação ao *flavour*, do pó de cacau obtido das amêndoas de boa qualidade passarão por processo de otimização e novos testes sensoriais serão conduzidos. Estas etapas serão repetidas até a obtenção de pelo menos uma amostra que se aproxime satisfatoriamente do padrão para *flavour* de chocolate.

Seria interessante a condução de novos estudos dentre os quais podemos destacar:

- classificação das amostras por meio de prova de corte no intuito de promover melhor padronização de amostras boas e ruins;
- análises químicas incluindo análise dos peptídeos e aminoácidos formados;
- elaboração de chocolate a partir das amêndoas tratadas no intuito de realizar a análise sensorial completa.

REFERÊNCIAS

Adeyeye, E. I., et al. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. *Food Chemistry* (2009), doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.127

Amim, I.; Jinap, S.; Jamilah, B.; Harikishna, K.; Biehl, B. Oligopeptide patterns produced from *Theobroma cacao* L. of various genetic origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82 (2002): 733-737.

Ardhana, M. M., Fleet, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology* 86 (2003) 87– 99.

Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A. **Biotecnologia industrial**. Sao Paulo: E. Blucher, 2001. vol. 4. ISBN 8521202814.

Beckett, S.T. et. al. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. Second Edition. 1994.

Belitz, H.-D; Grosch, W. *Food chemistry*. 3. ed Berlin; New York: Springer Verlag, c2004. 774 p.

de Brito, E.S.; Garcia, N.H.P.; Amâncio, A.C. Effect of poliphenol oxidase and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 22(1): 45-48. 2002.

Drouden, M., Fabry, I. and Gopel, G., 1996. **Technology for Sweet: Chocolate** (Drouden & Fabry), Vol I, pp 27–29.

Faria, E. V. de; Yotsuyanagi, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. Campinas, SP: ITAL, LAFISE, 2002.

Feeney, R.E., Blankenharn, G. Dixon, H.B.F., 1975, *Adv Protein Chem*, 29: 136–204.

Ferreira, D. F. **SISVAR Versão 5.0**. Departamento de Ciências Exatas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Ferreira, V. L. P. et al. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. Campinas: SBCTA, 2000. P. 1-6. (Manual: Série Qualidade).

Gálvez *et al.* Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology* 114 (2007) 124–130.

Hansen, C.E.; del Olmo, M.; Burri, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77 (1998): 273-281.

Hansen, C.E.; Mañez, A.; Burri, C.; Bousbaine, A. Comparison of enzyme activities involved in flavour precursors formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90 (2000): 1193-1198.

Hashim, I.; Chaveron, H. Extraction and determination of methylpyrazines in cocoa beans using coupled steam distillation-microdistillator. *Food Research International*. 27 (1994): 537-544.

Howat, G. R.; Powell, B. D.; Wood, G. A R. Experiments on cocoa drying and fermentation in West Africa. *Trop. Agric., Trinidad*. 34: 249.1957.

Howat, G. R.; Powell, B. D.; Wood, G. A R. The preparation of Amelonado Cocoa. In the conferencia Interamericana del Cocoa Palmira-Colômbia. 1958. Editado pelo Ministério de Agricultura. Bogotá Colombia. 1960. P. 486.

Humbert, B. and Sandra, P., 1985, LC-GC, 5(12): 1035–1037.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de Alimentos**. São Paulo, 2004.

Jinap, S.; van Rosli, W.I.; Russly, A.R.; Nurdin, L.M. Effect of roasting time and temperature on volatile components profile during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science and Food Agriculture*. 77 (1998): 441-448.

Jinap, M.S.; Jamilah, B.; Nazamid, S. Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry*. 85 (2004): 73-80.

Koblitz, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Levanon, Y. & Martelli, H. L. Antigenic Properties of non-fermented and fermented cocoa beans. *Bioch. Biol. Sper.*, Pádua, . 3:3, 1964.

Levanon, Y. & Rossetini, S. M. O. A laboratory study of farm processing of cocoa beans for industrial use. *J. Food Sci.*, Chicago, 30: 719, 1965.

Lima, E.D.P.A.; Pastore, G.M.; Barbery, S.D.F.; Garcia, N.H.P.; de Brito, E.S.; Lima, C.A.A. Obtenção e utilização de enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha madura no melhoramento do sabor de cacau. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23(3): 709-713. 2001.

Lopez, A.P.; Dimick, P.S. Cap. 25: Enzymes involved in cocoa curing págs. 211-236. In: *Food Enzymology* Vol.2. Elsevier Applied Science. 1991.

Lopez, A.S.; McDonald, C.R. A definition of descriptors to be used for the quantification of chocolate flavours in organoleptic testing. *Revista Theobroma*. 11: 209-217. 1981.

Luna, A. F. & Jimenez, S. Fermentação de cacau com cultivos puros de levedura, *Informe técnico* – CEPEC, Bahia, 1968-69, p.163.

Meilgaard, Morten; Civille, Gail Vance; Carr, B. Thomas. **Sensory evaluation techniques**. 4. ed Boca Raton: Taylor & Francis, c2007. 448 p. ISBN 0849338395

Medeiros, M.L. e Lannes, S.C. S. (2009). Avaliação química de substitutos de cacau e estudo sensorial de achocolatados formulados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(2): 247 – 253.

Misnawi, S. J., Nazamid, S., Jamilah, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry* 78 (2002) 407 – 417.

Misnawi, S. J., Jamilah, B. e Nazamid, S. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Quality and Preference* 15 (2004) 403 – 409.

Murthy, M.V.R.; Padmanabhan, S.; Ramakrishna, M.; Losane, B.K. Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method. *Food Biotechnology*. 11: 1-23. 1997.

Oetterer, M.; Regitano-d'arce, M.A.B.; Spoto, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006 612 p.

Perego, P., Fabiano, B., Pastorino, R., Pagliotti, P.A. and Del Borghi, M., 1999, *Ricerche e Innovazioni nell'Industria Alimentare* (Chiriotti, Pinerolo), Vol IV, pp 797–803.

Perego, P., Fabiano, B., Cavicchioli, M. e Del borghi, M. (2004). Cocoa quality and processing: a study by solid-phase microextraction and gas chromatography analysis of methylpyrazines. *Food and Bioproducts Processing*, 84(C4): 291–297.

Pontillon, J. Do cacau ao tablete. *A Ciência na cozinha*, São Paulo, v. 1, p. 62 – 71, ago. 2009.

Porte, A., Rezende, C. M., Antunes, O. A. C. (2007). Produção de voláteis via sistemas modelo de Maillard usando glicose e l-aminoácidos sob diferentes condições

de pH. *Rev. Univ. Rural. Sér. Ci. Exatas e da Terra*, Seropédica, RJ, EDUR, vol. 26, n. 1-2, jan-dez, p. 12-32.

Powell, B.D., 1983, *Manuf Confect*, 9: 63–66.

Reineccius, G.A.; Andersen, D.A.; Kavanagh, T.E.; Keeney, P.G. Identification and quantification of the free sugars in Cocoa beans. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 20 (1972): 199-201.

Reineccius, Gary. **Flavor chemistry and technology**. 2. ed Boca Raton: Taylor & Francis, c2006. 489 p. ISBN 1566769337.

Rohan, T. A. Observation on the fermentation of West African amelonado cocoa. *Chocolate and Confectionary Alliance. Report of the Cocoa Conference 1957 Londres*. 1958, 203 p.

Rohan, T.H.; **El Beneficio del cacao bruto destinado al Mercado**. Roma, 1964.

Sanagi, M.M., Hung, W.P. and Md Yasir, S., 1997, *J Chromatogr A*, 785: 361–367.

Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R., Eggling, S. B., & Terranishi, R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 446–448.

Schwan, R.F., Wheals, A., Understanding the microbiology of cocoa bean fermentations in order to improve quality. *Crit. Food Sci. Nutr.* 44 (2004) 205 – 221.

Silva, M. A. A. P. **Métodos de Avaliação Sensorial dos Alimentos**. Campinas: FEA/UNICAMP, 2001.

Thompson, S.S., Miller, K.B., Lopez, A.S., 2001. Cocoa and coffee. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC, pp. 721–736.

Urbansky, J.J. Chocolate Flavor/Origins and Descriptions. The effects of process and bean source. *The Manufacturing Confectioner*. 9: 69-82. 1992.

van Boekel, M.A.J.S. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24 (2006) 230 – 233.

Voigt, J.; Biehl, B.; Heinrichs, H. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxipeptidase. *Food Chemistry*. 49: 173-180. 1994a.

Voigt, J.; Wrann, D.; Heinrichs, H.; Biehl, B. The proteolytic formation of essential cocoa-specific aroma precursors depends on particular chemical structures of the vicilin-class globulin of the cocoa seeds lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds. *Food Chemistry*, 51: 197-205. 1994b.

ANEXO 1 – Avaliação da Capacidade de discriminação e repetibilidade dos julgadores

Tabela com os p valores - padrão bom

Atributo	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
	0.0214	0.0645	0.1297	0.4127	0.0001	0.0002	0.1842	0.0885	0.5600	0.3800	0.0103	0.0035	0.0036	0.0033	0.0008	0.8022	0.0278	0.0002	0.0014	0.0074
NOTA	(0.2039)	(0.8921)	(0.3072)	(0.8584)	(0.7290)	(0.0027)	(0.7676)	(0.8179)	(0.4623)	(0.1717)	(0.0980)	(0.1947)	(0.0571)	(0.3790)	(0.0197)	(0.5060)	(0.5995)	(0.0007)	(0.5502)	(0.1847)
D	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
T	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0

J = julgadores

D = número de vezes em que o julgador não discriminou as amostras no nível de significância desejado ($p < 0,50$).

R = número de vezes em que o julgador não apresentou repetibilidade no nível de significância desejado ($p \geq 0,05$).

T = D + R.

Pela tabela acima se observa que para o padrão bom os julgadores J9 e não foram capazes de discriminar as amostras em uma das análises realizadas (0 5600 e 0 8022 > 0,50). Já os julgadores J6, J15 e J18 não apresentaram repetibilidade ao nível de significância desejado (0 0027; 0 0197 e 0 0007 < 0,05). Considerando-se, entretanto, o número total de julgadores conclui-se que a equipe apresentou bom desempenho ao nível de significância testado.

Tabela com os p valores - padrão ruim

Atributo	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
	0.0164	0.0487	0.0261	0.1127	0.0077	0.0143	0.0008	0.0584	0.0106	0.0031	0.0173	0.0069	0.0030	0.0073	0.0021	0.0058	0.0107	0.0161	0.0008	0.2884
NOTA	(0.7968)	(0.8830)	(0.0686)	(0.8067)	(0.9774)	(0.1072)	(0.0143)	(0.8424)	(0.0593)	(0.1021)	(0.8611)	(0.6232)	(0.1021)	(0.0070)	(0.0201)	(0.2884)	(0.8801)	(0.0236)	(0.3302)	(0.8091)
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
T	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0

J = julgadores

D = número de vezes em que o julgador não discriminou as amostras no nível de significância desejado ($p < 0,50$).

R = número de vezes em que o julgador não apresentou repetibilidade no nível de significância desejado ($p \geq 0,05$).

T = D + R.

Pela tabela acima se observa que para o padrão ruim todos os julgadores foram capazes de discriminar as amostras, ao nível de significância testado, em todas as análises realizadas. Já os julgadores J7, J14, J15 e J18 não apresentaram repetibilidade ao nível de significância desejado (0 0143; 0 0070; 0 0201 e 0 0236 < 0,05). Considerando-se, entretanto, o número total de julgadores conclui-se que a equipe apresentou bom desempenho ao nível de significância testado.

ANEXO 2 – Soluções utilizadas1) Tampão citrato-fosfato pH=3,5:

A: solução de ácido cítrico 0,1 M (19,21 g em 1000 mL)

B: solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M (71,7 g em 1000 mL)

Tampão: 35,9 mL da solução A + 14,1 mL da solução B

2) Solução de albumina 1%:

1g de albumina bovina em 100 ml de tampão citrato-fosfato pH=3,5

3) Solução de pepsina:

10 mg de pepsina em 10 mL de água

4) Tampão citrato-fosfato pH=6,8:

A: solução de ácido cítrico 0,1 M (19,21 g em 1000 ml)

B: solução de Fosfato de Sódio Dibásico 0,2 M (71,7 g em 1000 ml)

Tampão: 9,1 ml de A + 40,9 ml de B para 100 ml de água

5) Solução de pepstatina:

1mg de pepstatina em 1 ml de tampão citrato-fosfato pH=6,8

6) Substrato Z – Phe – leu:

51,56 g do substrato em 1 ML de tampão citrato-fosfato pH=6,8

7) Enzima microbiana:

1 ml de enzima microbiana + 0,98 ml de tampão citrato-fosfato pH=6,8 + 0,02 ml

pepstatina
↓
Banho de gelo / 1h

8) Enzima vegetal:

1 mg de enzima sólida + 0,98 ml de tampão citrato-fosfato pH=6,8 + 0,02 ml pepstatina

↓
Banho de gelo / 1h

ANEXO 3 – Curva Padrão de Albumina

