



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



HILANA SALETE SILVA OLIVEIRA NASCIMENTO

**ESTUDO DO EFEITO DE TRATAMENTO ENZIMÁTICO
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE
ARDÓSIA E SUA INFLUÊNCIA NO AROMA DE
CHOCOLATE**

Feira de Santana, BA

2015

HILANA SALETE SILVA OLIVEIRA NASCIMENTO

**ESTUDO DO EFEITO DE TRATAMENTO ENZIMÁTICO
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE
ARDÓSIA E SUA INFLUÊNCIA NO AROMA DE
CHOCOLATE**

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

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes-Neto

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Gabriella Bello Koblitz

Feira de Santana, BA

2015

Aos meus pais Henrique Brandão e
Iristelma Oliveira, os grandes responsáveis
por tudo que alcancei. Vocês representam a
força motriz que me impulsiona a galgar
horizontes inimagináveis.

“A essência do saber não está em somar verdades ou subtrair incertezas, mas sim em compartilhar o conhecimento compreendido.”

Diego Góes

AGRADECIMENTOS

A Deus a quem entreguei desde o início todos os meus sonhos.

Aos meus pais por sempre terem acreditado e cultivado em mim desde muito pequena a busca pelo conhecimento e realização pessoal e profissional.

À minha irmã Ryane pelo companheirismo e amizade que sempre acalentaram o meu coração e serviram de estímulo para eu prosseguir.

Ao meu filho Diogo por existir em minha vida de forma tão doce e amorosa. Tudo que há de melhor em mim é por ele e para ele.

Ao meu esposo Diego por ser o companheiro em todos os momentos, por me inspirar a prosseguir e buscar sempre mais, seja através de um simples gesto carinhoso, seja pelos inesperados e empolgantes debates filosóficos travados em momentos diários que contribuíram de forma singular para a formação da professora que habita em mim.

Aos mestres e amigos Maria Gabriela Bello Koblitz e Aristóteles Góes-Neto meu eterno e sincero agradecimento pela confiança em mim depositada e ensinamentos transmitidos.

À pesquisadora Deborah Bauer e ao Professor Dr. Anderson Junger Teodoro pela gentil contribuição com as análises de fenólicos e atividade antioxidante.

À Mars Cacau pelo fornecimento do material que constituiu objeto de estudo desse trabalho.

RESUMO

Um problema recorrente na indústria de chocolate é a baixa qualidade das amêndoas de cacau, o que influencia o aroma do chocolate. Uma forma de contribuir para solucionar este problema é a aplicação de enzimas exógenas comerciais sobre a ardósia. Esse trabalho propôs a detecção e sequenciamento, por espectrometria de massas, dos peptídeos presentes em ardósia submetidas ao tratamento com enzima microbiana proposto por Oliveira et al. (2011). Associado às análises de peptídeos, foi feito um estudo da concentração de fenólicos e atividade antioxidante, uma vez que a redução de fenólicos nas etapas de processamento do cacau é conhecida por causar redução da adstringência e amargor, contribuindo para a formação de compostos importantes para o aroma de chocolate. Os resultados indicam que embora o padrão qualitativo dos aminoácidos hidrofóbicos presentes na mistura de peptídeos responsáveis pelo aroma de chocolate seja mais importante que o padrão quantitativo, a presença dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina em proporções adequadas é essencial para a obtenção do aroma desejado. O tratamento proposto causou redução na concentração de fenólicos, o que é desejável para o aroma de chocolate, e na atividade antioxidante. De modo geral, o perfil de peptídeos, o teor de fenólicos e a atividade antioxidante de ardósia tratada foi muito mais semelhante ao das amêndoas de boa qualidade sugerindo a eficiência do tratamento proposto. Pesquisas de mercado e tendências indicaram condições interessantes à difusão do tratamento proposto nas indústrias de processamento.

Palavras-chave: Cacau. Aroma. Chocolate. Proteases. Espectrometria de massas. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

A recurring problem in the chocolate industry is the low quality of cocoa beans, which influences the chocolate aroma. One possibility to contribute to solve this problem is the application of commercial exogenous enzymes on slate. This work proposed detection and sequencing, by mass spectrometry, of the peptides present in slates subjected to treatment with microbial enzyme proposed by Oliveira et al. (2011). Associated to the analysis of peptides was studied the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity since the reduction of phenolics in cocoa processing steps is known to cause reduction of astringency and bitterness contributing to the formation of important compounds for the chocolate aroma. The results indicate that although the qualitative standard of the hydrophobic amino acids present in the peptides responsible for the mixture of chocolate aroma is more important than the quantitative standard, the presence of the amino acids leucine, alanine, phenylalanine, and tyrosine in appropriate amounts is essential for obtaining desired aroma. The proposed treatment caused a reduction in the phenolics concentration, which is desirable for a chocolate aroma, and in antioxidant activity. In general, the profile peptide, the phenolic content and antioxidant activity of treated slate resembled more good quality almonds suggesting the effectiveness of the proposed treatment. Research the market and trends indicated favorable conditions for diffusion of the proposed treatment in the process industries.

Keywords: Cocoa. Aroma. Chocolate. Proteases. Mass spectrometry. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção mundial de cacau por continente e país – AAI – 2000/2001	20
Figura 2: Consumo de cacau por continente e país – AAI – 1999/2000	20
Figura 3: Cadeia produtiva de cacau e chocolate	21
Figura 4: Fases do cacau durante o processamento	27
Figura 5: Mecanismos e fatores que influenciam a formação de aroma de chocolate	31
Figura 6: Visão geral da Reação de Maillard	48
Figura 7: Visão específica da formação de aroma de chocolate	49
Figura 8: Componentes básicos de um espectrômetro de massas	55
Figura 9: Esquema do processo de formação de íons numa fonte de eletrospray	57
Figura 10: Cromatograma da amostra TE	71
Figura 11: Espectro de massas do peptídeo LLTRP / amostra TE	72
Figura 12: Espectro de massas do peptídeo FELLGSH / amostra TE	72
Figura 13: Espectro de massas do peptídeo MKALPKK / amostra TE	72
Figura 14: Espectro de massas do peptídeo LDNYDNSAGKVS / amostra TE	73
Figura 15: Espectro de massas do peptídeo DPVVLST / amostra TE	73
Figura 16: Cromatograma da amostra PB	73
Figura 17: Espectro de massas do peptídeo LDNYDNSAGKW/ amostra PB	74
Figura 18: Cromatograma da amostra PR	75
Figura 19: Espectro de massas do peptídeo KVLDFKPVV/ amostra PR	76
Figura 20: Espectro de massas do peptídeo LSFGVALKL/ amostra PR	76
Figura 21: Espectro de massas do peptídeo DEEGDFKLLK/ amostra PR	76
Figura 22: Espectro de massas do peptídeo FGDSPYHFL/ amostra PR	77
Figura 23: Espectro de massas do peptídeo VLEYLLL/ amostra PR	77
Figura 24: Espectro de massas do peptídeo LGLGTPTKKF/ amostra PR	77
Figura 25: Espectro de massas do peptídeo RAHVPL/ amostra PR	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau: Instrução Normativa nº 38/2008	15
Tabela 2: Composição centesimal das amêndoas fermentadas e secas de cacau	32
Tabela 3: Compostos aromáticos do cacau	50
Tabela 4: Compostos característicos de aroma de chocolate identificados em cacau	54
Tabela 5: Parâmetros para análise e sequenciamento de peptídeos	66
Tabela 6: Sequências de pepetídeos com grau de confiança igual ou superior a 90% encontrados na amostra TE	71
Tabela 7: Sequências de pepetídeos com grau de confiança igual ou superior a 90% encontrados na amostra PB	74
Tabela 8: Sequências de pepetídeos com grau de confiança igual ou superior a 90% encontrados na amostra PR	75
Tabela 9: Concentração de fenólicos nas amostras PB, TE e PR	78
Tabela 10: Atividade antioxidante nas amostras PB, TE e PR pelos métodos DPPH, ABST e FRAP	79
Tabela 11: Concentração dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina em peptídeos sequenciados com grau de confiança $\geq 80\%$ na amostra TE	81
Tabela 12: Concentração dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina em peptídeos sequenciados com grau de confiança $\geq 80\%$ na amostra PB	82
Tabela 13: Concentração dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina em peptídeos sequenciados com grau de confiança $\geq 80\%$ na amostra PR	82
Tabela 14: Distribuição de frequências dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nos peptídeos analisados	83
Tabela 15: Distribuição de frequências dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas posições N-terminal, C-terminal e Central dos peptídeos analisados	86
Tabela 16: Dados obtidos a partir do BlastP para a amostra TE	88
Tabela 17: Dados obtidos a partir do BlastP para a amostra PB	89
Tabela 18: Dados obtidos a partir do BlastP para a amostra PR	90
Tabela 19: Médias obtidas para concentração de fenólicos nas amostras PB, TE e PR	94
Tabela 20: Comparação de médias da atividade antioxidante das amostras PB, TE e PR pelos métodos DPPH, ABST e FRAP	96
Tabela 21: Comparação de médias da atividade antioxidante das amostras PB, TE e PR para as diferentes soluções extratoras	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação da frequência relativa percentual dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas amostras TE, PB e PR	84
Gráfico 2: Representação da frequência relativa percentual dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas posições N-terminal, C-terminal e Central nas amostras TE, PB e PR	87
Gráfico 3: Representação da proporção de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos nos peptídeos analisados para as amostras TE, PB e PR	91
Gráfico 4: Concentração de compostos fenólicos nas amostras TE, PB e PR	95
Gráfico 5: Atividade antioxidante nas amostras TE, PB e TR pelo método DPPDH	98
Gráfico 6: Atividade antioxidante nas amostras TE, PB e TR pelo método ABTS	99
Gráfico 7: Atividade antioxidante nas amostras TE, PB e TR pelo método FRAP	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abicab (Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Balas e Derivados)

ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira)

CID (dissociação induzida por colisão)

DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)

ESI (fonte de ionização Electrospray / *Electrospray ionization*)

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power* / Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

MS (mass spectrometry)

PB (nibs de amêndoas de cacau bem fermentadas, secas e torradas - aroma de chocolate bem desenvolvido)

PMF (*peptide mass fingerprint*)

PR (nibs de ardósia, secas e torradas - aroma de chocolate pouco desenvolvido)

TE (nibs de ardósia secas, torradas, tratadas enzimaticamente)

u.a. (unidade de atividade - quantidade de enzima necessária para elevar a leitura no espectrofotômetro em 0,001 unidades em relação ao branco).

VCG (Globulina tipo vicilina)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	HISTÓRICO	18
2.2	BENEFICIAMENTO DE CACAU	21
2.3	DESENVOLVIMENTO DO AROMA DE CHOCOLATE	30
2.3.1	Composição da amêndoa de cacau	31
2.3.2	Características genéticas	36
2.3.3	Fermentação e atividade enzimática	37
2.3.4	Secagem	45
2.3.5	Torrefação	46
2.3.6	Alcalinização	50
2.3.7	Conchagem	51
2.4	CONSTITUINTES QUÍMICOS DO AROMA DE CHOCOLATE	51
2.5	SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS	54
2.6	DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	60
3	MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1	PREPARO DAS AMÊNDOAS	63
3.2	TRATAMENTO ENZIMÁTICO	63
3.3	TORREFAÇÃO	64
3.4	SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS	64
3.4.1	Análise dos resultados	66
3.5	DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	67
3.5.1	Análise dos resultados	68
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	68
3.6.1	Obtenção do extrato	68
3.6.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH	69
3.6.3	Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS	69
3.6.4	Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP	69
3.6.5	Análise dos resultados	70
3.7	DESENVOLVIMENTO DE ESTUDO DE VIABILIDADE	70
4	RESULTADOS	71
4.1	SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS	71
4.2	DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	78
4.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	78
4.4	ESTUDO DE VIABILIDADE	79
5	DISCUSSÃO	80
5.1	SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS	80
5.2	DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	93
5.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	95
5.4	ESTUDO DE VIABILIDADE	102

6	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	122

1 INTRODUÇÃO

Cacau é o nome dado ao fruto do cacauzeiro (*Theobroma cacao*). Trata-se de um produto de grande importância econômica, o qual constitui a principal matéria-prima para a produção do chocolate. O cacau é originário das Américas e seu cultivo, na América Central e no México, é anterior às viagens de Cristóvão Colombo. Os descobridores o encontraram, pela primeira vez, no México entre os Astecas que o consumiam e comercializavam, usando suas sementes como objeto de troca. Estudos recentes apontam os povos Olmec e Maia, antecessores dos Astecas, como os mais antigos usuários (LIMA, 2010). Em 1520 a Espanha recebeu os primeiros carregamentos de cacau, que a partir de então iria se espalhar por toda a Europa. Os espanhóis foram ainda responsáveis pela disseminação do cacau na África, onde viria a se tornar uma importante fonte de divisas para diversos países (KOBBLITZ, 2011). Hoje, o cultivo do cacauzeiro se espalha ao redor do globo, ao longo do equador (ROHAN, 1964).

A produção mundial de cacau tem se comportado, via de regra, sempre ascendente. Entre 1993/94 e 2003/04 a produção mundial saiu de 2.486 mil toneladas para 3.452 mil toneladas, perfazendo um crescimento de 38,86%. Atualmente concentra-se nos países em desenvolvimento sendo que aproximadamente 71% da oferta mundial de cacau vêm da África Ocidental, principalmente da Costa do Marfim, Gana e Nigéria. O Brasil é o sexto maior produtor mundial, com 4,64% (200 mil toneladas), atrás da Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013). Em 1993/94 a produção brasileira estava em 300 mil toneladas e a sua participação na produção mundial estava em 12,07%, a produção chegou ao mínimo em 1999/2000 com 123,5 mil toneladas chegando a participar com 4,01%, mas a recuperação mesmo começou a partir de 2000/01 e se consolidou em 2003/04 quando obteve 163,8 mil toneladas aumentando um pouco sua participação na produção mundial (CEPLAC, 2008a). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na safra de 2012 o Brasil participou com um volume de 256,6 mil toneladas. A Bahia destacou-se como maior produtor com 159,4 mil toneladas (62,1%); o Pará fechou a safra com uma produção de 67,3 mil toneladas (26,2%); Rondônia com 16,4 mil toneladas (6,4%) e Espírito Santo com 8,3 mil toneladas (3,2%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

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, que proporciona a quem a prova uma sensação bucal única. Mas também no sabor, muito apreciado, que é desenvolvido nas sementes devidamente processadas: o *flavor* de chocolate. As sementes naturais – fruto com embrião vivo que ainda pode ser germinado – extraídas do fruto maduro do cacau, não possuem qualquer sabor de chocolate. Na verdade, elas são extremamente amargas e adstringentes. Para que o desejado aroma se desenvolva, as sementes devem passar por processos de fermentação e de secagem, que levam à formação dos compostos precursores de aroma. Estes, quando as amêndoas – fruto que sofreu as transformações ocasionadas pela fermentação perdendo a capacidade de germinação – são torradas, sofrem uma série de degradações térmicas que levam à formação do aroma (BECKETT, 1994).

Um problema recorrente na indústria de chocolate é a baixa qualidade das amêndoas de cacau. A Tabela 01 apresenta os principais defeitos em amêndoas de cacau conforme Instrução Normativa nº 38/2008.

Tabela 1: Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau: Instrução Normativa nº 38/2008.

Enquadramento do Produto	Defeitos					
	Mofadas	Fumaça	Danificadas por insetos	Ardósia	Germinadas	Achatadas
Tipo 1	De zero até 4,0%	De zero até 1,0%	De zero até 4,0%	De zero até 5,0%	De zero até 5,0%	De zero até 5,0%
Tipo 2	Acima de 4,0% até 6,0%	Acima de 1,0% até 4,0%	Acima de 4,0% até 6,0%	Acima de 5,0% até 10,0%	Acima de 5,0% até 6,0%	Acima de 5,0% até 6,0%
Tipo 3	Acima de 6,0% até 12,0%	Acima de 4,0% até 6,0%	Acima de 6,0% até 8,0%	Acima de 10,0% até 15,0%	Acima de 6,0% até 7,0%	Acima de 6,0% até 7,0%
Fora do tipo	Acima de 12,0% até 25,0%	Acima de 6,0%	Acima de 8,0%	Acima de 15,0%	Acima de 7,0%	Acima de 7,0%

De acordo com o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau (Instrução Normativa nº 57 do MAPA), ardósia 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.

Uma vez que o processo de fermentação e secagem é feito ainda nas fazendas, sem qualquer controle, uma porcentagem significativa das sementes de cada batelada não sofre as alterações necessárias (principalmente a redução 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 aroma 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 após o pré-processamento no campo.

Uma forma de contribuir para solucionar este problema é a aplicação de enzimas exógenas comerciais, com padrão de atividade semelhante às 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 aroma que não foram produzidos ao longo do período de fermentação. Oliveira et al. (2011) testaram a aplicação de enzimas proteolíticas de origem microbiana, animal e vegetal (extraídas das sementes de cacau) sobre ardósia – amêndoas mal fermentadas ou provenientes de frutos verdes fermentadas ou não – com o objetivo de produzir os precursores de aroma desejados para a produção de chocolate de qualidade. Os testes sensoriais realizados apontaram que é possível, por meio do uso de enzima microbiana contendo endoprotease aspártica e carboxipeptidase (exopeptidase), gerar, em amêndoas classificadas como ardósia, a mistura de compostos que irá liberar, após a torrefação, o aroma característico de chocolate. Uma vez confirmadas as conclusões obtidas pelos testes sensoriais realizados nesse estudo será possível estabelecer uma metodologia a ser levada para a indústria de processamento do cacau e do chocolate de modo a possibilitar a obtenção de chocolate de melhor qualidade, mesmo a partir de amêndoas mal processadas no campo. Desta forma seria possível uniformizar a qualidade do cacau produzido, garantindo a qualidade do chocolate a ser obtido

O objetivo deste trabalho foi detectar e seqüenciar, por espectrometria de massas, peptídeos que caracterizam o aroma de chocolate desejável, em amêndoas classificadas como ardósia e submetidas ao tratamento com enzima microbiana proposto

por Oliveira et al. (2011). Esse trabalho pretendeu também desenvolver estudo de viabilidade visando um conhecimento mais amplo do mercado de cacau e chocolate e seus aspectos regulatórios, oportunidade de negócio e estratégias de comercialização da tecnologia bem como barreiras e riscos relativos ao projeto com fins de empreendimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie da família *Malvaceae*, nativa das florestas tropicais da América Central e do Sul (MORORÓ; MULLER e VALLE, 2012). Das 22 espécies conhecidas do gênero *Theobroma*, cacau é uma das poucas utilizadas com fins econômicos (SODRÉ, 2007). As amêndoas de cacau são consideradas estimulantes devido à presença de metilxantinas, tais como teobromina e cafeína, e flavonóis. O chocolate, obtido das amêndoas processadas, tem alto valor alimentício e nutricional devido à sua alta concentração de carboidratos, lipídeos, proteínas e mais de 300 outros compostos quimicamente ativos (DORAN e PARKIN, 1994). Os botânicos acreditam que o cacau é originário das cabeceiras do rio Amazonas, tendo-se expandido em duas direções principais, originando dois grupos importantes: Criollo e Forastero. O Criollo, que se espalhou em direção ao norte, para o rio Orinoco, penetrando na América Central e Sul do México, produz frutos grandes, com superfície enrugada. Suas sementes são grandes, com o interior branco ou violeta pálido. Este foi o tipo de cacau cultivado pelos índios Astecas e Maias. O Forastero espalhou-se bacia amazônica abaixo e em direção às Guianas. É considerado o verdadeiro cacau brasileiro e se caracteriza por frutos ovóides, com superfície lisa, imperceptivelmente sulcada ou enrugada. O interior de suas sementes é violeta escuro ou, algumas vezes, quase preto (CEPLAC, 2008b). Tradicionalmente dois grupos genéticos principais, Criollo e Forastero, são definidos com base em caracteres morfológicos e origem geográfica. Um terceiro grupo, Trinitario, foi reconhecido e consiste do híbrido de Criollo e Forastero. No entanto, é necessária a classificação de *Theobroma cacao* L. com base em dados genéticos para a criação e gestão de seus recursos genéticos. Motamayor et al (2008) propuseram uma nova classificação em 10 grandes grupos: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana. Esta nova classificação reflete com mais precisão a diversidade genética disponível.

Quando os espanhóis chegaram ao México, em 1519, provaram pela primeira vez a bebida à base das sementes de *T. cacao* que era consumida fria e considerada um alimento excepcional, apresentando inclusive propriedades afrodisíacas. A partir de 1520 o produto começou a ser enviado à Espanha e, à medida que o consumo aumentou

na Europa, o cultivo generalizou-se em várias regiões da América Central, do Sul, no Caribe, Ásia e África (CUENCA e NAZÁRIO, 2004; KOBLITZ, 2011; BADRIE et al., 2015).

Nos seus primórdios o cacau era usado como bebida; o *cacauatl* era uma bebida sem açúcar, consumida à temperatura ambiente. Os espanhóis adicionaram-lhe leite e açúcar e passaram a tomá-la quente. Somente muito mais tarde teve origem o chocolate, apreciado alimento energético. A palavra *cacauatl* sofreu modificações até chegar a chocolate, que atualmente se refere ao produto industrializado, com aroma e sabor típicos. Os espanhóis tiveram o monopólio do cacau e do chocolate por muitos anos, graças ao segredo de sua fabricação. Nos meados do século XVII foi construída a primeira fábrica na França, nas primeiras décadas do século XIX foi fundada uma fábrica de chocolate na Suíça e, em seguida, a produção de chocolate passou de artesanal a industrial tornando-se uma indústria rentável e fonte importante de divisas para produtores de cacau e de chocolate (LIMA, 2010; CEPLAC, 2008b; BADRIE et al., 2015). A apresentação, hoje mais comum, de chocolate em barras ou como bombons tornou-se possível a partir de 1828, quando foi desenvolvida, na Holanda, a tecnologia para extração da manteiga de cacau. Isto possibilitou novas formulações sólidas mais ricas em gordura. A primeira fábrica moderna de chocolates foi fundada na Suíça em 1831 (KOBLITZ, 2011). Diz-se que 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 (PONTILLON, 2009).

De acordo com dados da Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), o cacau é produzido na África (66%), principalmente em Gana (maior produtor mundial) e na Nigéria; na América (15%), onde o Brasil é o principal produtor, seguido do Equador e da Colômbia; e na Ásia (18% a Malásia, Sri Lanka e Java) (Figura 1). O Brasil já foi o maior produtor mundial de cacau tendo, em 1990, produzido cerca de 400.000 toneladas de amêndoas, sendo a maior parte no sul da Bahia. Uma década depois o país produziu apenas 100.000 toneladas de amêndoas. Essa queda significativa na produção é atribuída principalmente à infestação das lavouras por *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da “vassoura-de-bruxa”. Atualmente cerca

de 50% do cacau consumido no Brasil é importado. Cerca de 50% de todo o cacau produzido no mundo é consumido no continente europeu; 38% é consumido nas Américas, onde os EUA são o principal consumidor, seguidos de perto pelo Brasil e pelo Canadá e 12% é consumido na Ásia e Oceania (Figura 2) (KOBBLITZ, 2011; CEPLAC, 2008a).

Estatísticas da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Balas e Derivados (Abicab) revelam que o consumo de chocolate no Brasil em 2000 foi de 1,9 kg por habitante ao ano, enquanto na Europa chega a 10 kg por habitante ao ano.

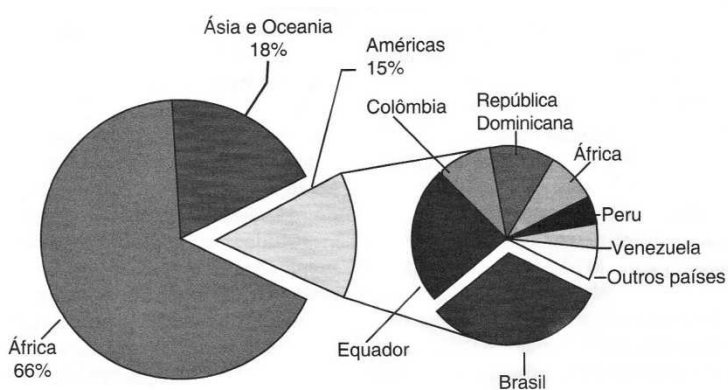


Figura 1: Produção mundial de cacau por continente e país – AAI – 2000/2001
Fonte: Koblitz, 2011.

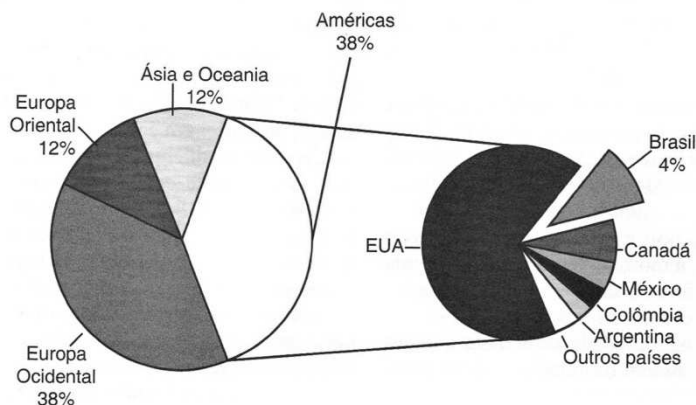


Figura 2: Consumo mundial de cacau por continente e país – AAI – 1999/2000
Fonte: Koblitz, 2011.

2.2. BENEFICIAMENTO DE CACAU

O cacauéiro 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).

Apesar de a polpa mucilaginosa, de sabor agradável, poder ser utilizada na produção de sucos e geléias, a principal utilização do cacau na indústria de alimentos é para fabricação do chocolate a partir do produto obtido após processamento das amêndoas. A matéria-prima mais importante na obtenção do chocolate é chamada *liquor* e consiste em um líquido viscoso, obtido após a fermentação, secagem, torrefação e moagem das amêndoas de cacau. Do *liquor* são obtidos a manteiga de cacau e o pó de cacau, principais ingredientes na formulação do chocolate (KOBBLITZ, 2011; BRADIE et al, 2015). A cadeia produtiva do cacau e do chocolate pode ser organizada em três grupos, sendo eles as fazendas produtoras de cacau, as indústrias de processamento e as fábricas de chocolate. Os grupos estão respectivamente vinculados às principais etapas produtivas do chocolate. A Figura 3 ilustra essas fases e etapas.

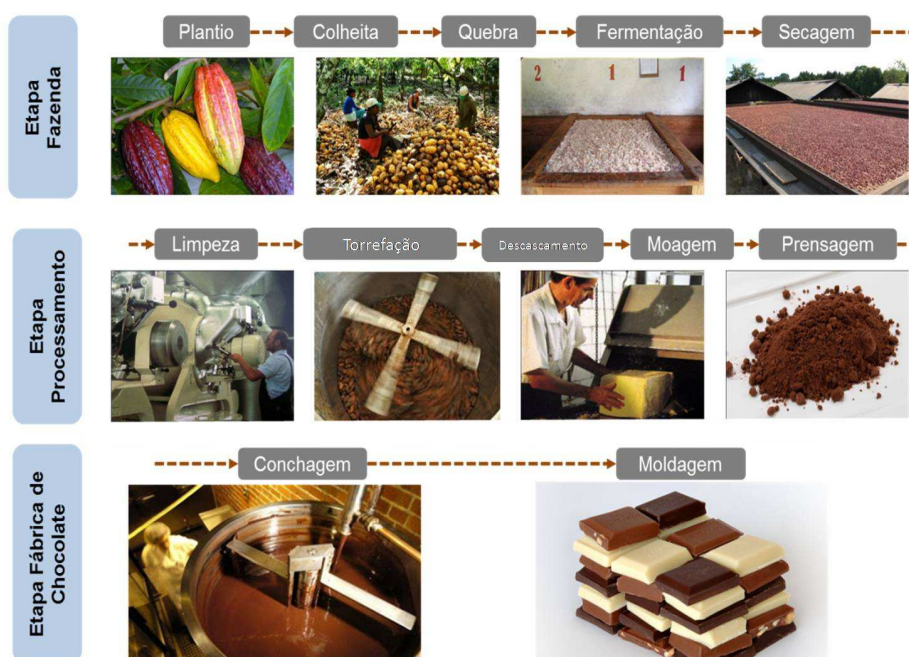


Figura 3: Cadeia produtiva de cacau e chocolate.

As etapas iniciais são plantio, colheita, quebra do cacau, fermentação e secagem e acontecem geralmente nas fazendas produtoras. As sementes de cacau recém-colhidas possuem cor púrpura (mais comum) ou branca – a depender da variedade plantada, sabor amargo e odor adstringente (que não é ácido), não tendo qualquer valor como alimento. Somente após as etapas de fermentação e secagem é que o cacau poderá ser um produto de valor para a indústria. Nestas fases as amêndoas adquirem cor marrom característica, sabor típico de cacau e qualidade boa ou má, estreitamente dependentes das condições de realização dessas etapas (OETTERER, 2006; SALTINI et al., 2013).

Inicialmente os frutos são colhidos com podões, sendo amontoados no chão para serem abertos com facões. A casca é então separada e o material interno (formado de sementes e polpa) é levado à fermentação. Essa etapa facilita a separação da polpa da semente além de proporcionar a ocorrência de uma série de reações químicas. A etapa seguinte é a secagem. Nesta o cacau atinge a umidade necessária para o armazenamento; reações químicas concomitantes estabilizam a cor marrom característica. A fermentação envolve duas fases, uma biológica e outra química. Na fase biológica ocorre uma fermentação alcoólica e outra acética, sequencialmente. Na fase química ocorrem transformações por efeito da ação do ácido acético formado na fase biológica (LIMA, 2010; OETTERER, 2006; COPETTI et al., 2011).

Na etapa de fermentação as sementes são transportadas para galpões próprios o mais rapidamente possível, no máximo dentro de 12 a 24 horas após a colheita, onde são amontoadas ou colocadas em caixas ou cochos. Nesta fase são reviradas mais de uma vez por dia, para evitar o aquecimento excessivo e promover a devida aeração. Das caixas providas de furos ou de espaços entre as partes que compõem o fundo, escorre um líquido açucarado, conhecido por mel, que pode ser aproveitado para fazer geléia, apreciada nas regiões cacaueiras. Nas caixas as sementes também são reviradas por transferência de uma caixa para outra a cada dois ou três dias, de acordo com a variedade, para reduzir a temperatura, homogeneizar o processo e promover a aeração da massa, o que é essencial para o desenvolvimento da fase aeróbica. Na transferência há esfriamento, mas comumente as camadas superiores atingem até 40 ou 50 °C, temperatura suficiente para inativar a microbiota presente ao final da fermentação (LIMA, 2010; SALTINI et al., 2013). No sistema de montões, método mais primitivo, são utilizados de 10 kg a 2 toneladas. No sistema de caixas de madeira ou cochos, os lotes são de 200 kg a 1,5 toneladas, com cerca de um metro de altura. 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). A fermentação é espontânea e acontece em 4 a 7 dias (KOBBLITZ, 2011; SALTINI et al., 2013; BADRIE et al., 2015).

Durante a fermentação, diversos microrganismos se sucedem na polpa mucilaginoso e açucarada que envolve as amêndoas, produzindo calor, alcoóis e ácidos. Esta combinação leva, inicialmente, à morte do embrião e posteriormente, com a difusão dos compostos formados para os cotilédones, cria as condições necessárias para uma variedade de transformações bioquímicas que tem três consequências principais: (1) hidrólise de proteínas, levando à formação de precursores de aroma (compostos aromáticos que se desenvolverão durante o processo de torrefação), (2) oxidação de compostos fenólicos, o que altera a cor dos cotilédones e reduz a característica de adstringência indesejada das amêndoas e (3) liquefação e remoção da polpa, facilitando o posterior processamento do *liquor*. Dos três processos citados, o único que depende exclusivamente da ação dos microrganismos fermentadores é a remoção da polpa. Nos outros casos, a ação de enzimas endógenas dos cotilédones e processos químicos oxidativos também têm grande importância (KOBBLITZ, 2011; NIGAM, e SINGH, 2014).

A fermentação espontânea é desenvolvida por microrganismos transferidos para as amêndoas das mãos dos trabalhadores, das superfícies e das ferramentas usadas para cortar a fruta e dos contentores durante a fermentação (THOMPSON et al., 2001). A fase inicial da fermentação é anaeróbica. Há multiplicação de leveduras que convertem os açúcares da polpa a etanol. Ocorre desintegração da polpa 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 a multiplicação destas leveduras e ocorre autólise das células das leveduras, havendo então a liberação das enzimas importantes para promover o sabor típico do produto (OETTERER, 2006; LIMA, 2010).

Dentre as leveduras presentes as principais espécies são *Saccharomyces cerevisiae* e a *Candida krusei*, predominantes na Bahia (OETTERER, 2006). Cerca de 15 diferentes espécies de leveduras são normalmente encontradas em processos fermentativos, no Brasil e no mundo. Em geral a espécie mais abundante é *S. cerevisiae*, uma espécie altamente eficiente na produção de álcool, nas condições normalmente

encontradas. Entretanto, linhagens de *S. cerevisiae* não costumam produzir pectinases de modo eficiente, contribuindo muito pouco para liquefação da polpa. Outras espécies, como *Kluyveromyces marxianus*, além de diversos fungos filamentosos (*Aspergillus* spp., por exemplo), que surgem nas porções superiores da massa (normalmente no fim do período de fermentação), são apontadas como responsáveis pela remoção da mucilagem (KOBBLITZ, 2011; NIGAM, e SINGH, 2014; COPETTI et al., 2011). Estudos realizados com linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas 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 cacau de qualidade superior. 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 a multiplicação 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*. Testes sensoriais de aceitação mostraram que o chocolate obtido de amêndoas fermentadas com a inoculação de *Kluyveromyces marxianus* foi mais aceito pelos provadores em comparação com o de cacau obtido através de fermentação natural.

Com a conversão dos açúcares a etanol, produzem-se as condições aeróbicas iniciais necessárias para a multiplicação 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 45 °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 bactérias acéticas 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 ácido acético (OETTERER, 2006; NIGAM e SINGH, 2014; COPETTI et al., 2011).

Depois de três a sete dias, dependendo do local, da variedade e da qualidade almejada, a fermentação é considerada suficiente e passa-se à fase de secagem. Vale destacar que o efeito primário da fermentação é aniquilar o embrião sob efeito de calor e, sobretudo, produzir ácido acético; segue-se certa degradação das paredes celulares ocasionando a migração de enzimas que, por sua vez, entram em contato com seus substratos. 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 são hidrolisadas resultando 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 aroma” (PONTILLON, 2009; SALTINI et al., 2013).

Uma vez que a mucilagem tenha sido retirada das amêndoas pela fermentação, estas apresentam um teor de umidade entre 50 e 60%, o que favorece o ataque de insetos e possibilita o crescimento de fungos e outros organismos indesejados. Em virtude disso, as amêndoas devem ser secas, para se completar as alterações necessárias e garantir sua conservação. A secagem pode ser feita ao sol, com a utilização de secadores ou, mais comumente, combinando-se ambas as possibilidades em duas etapas: pré-secagem ao sol seguida com secagem com ar quente soprado (KOBLOITZ, 2011; LIMA, 2010).

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. 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 e uniformizar o processo

(OETTERER, 2006; NIGAM, e SINGH, 2014; COPETTI et al., 2011). O uso da secagem artificial contribui para acelerar a oxidação de compostos fenólicos, melhorando a formação de cor e reduzindo a adstringência residual do produto (KOBLOITZ, 2011; TOMLINS et al., 1993).

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 de baixo custo, mas possui o inconveniente de ser demorada e exigir grande mão-de-obra, particularmente quando é realizada na estação chuvosa, o que é muito comum. A secagem artificial é usada, então, como substituto ou como complemento. Se bem conduzida, essa secagem propicia excelentes resultados, mas pode gerar dois tipos de defeitos: (1) caso o cacau entre em contato com gases de combustão, irá adquirir um sabor desagradável de fumaça e (2) 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, e, aparentemente, o ácido acético também não é bem eliminado, o que gera um cacau de sabor ácido. O mesmo fenômeno ocorre quando se utiliza a secagem natural, se os raios de sol forem muito intensos (PONTILLON, 2009; TOMLINS et al., 1993).

Durante a secagem, as enzimas presentes atuam no interior da amêndoa e promovem reações químicas importantes, estabilizando o sabor e a cor característicos do chocolate. A temperatura da secagem é importante na qualidade final das amêndoas sendo que o ideal está na faixa de 35 a 40°C, faixa ótima de atividade para a maior parte das enzimas envolvidas. O uso de temperaturas mais baixas ou mais altas leva à perda na qualidade, pois ou as enzimas agem mais lentamente ou são destruídas. Além disso, a secagem deve 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; TOMLINS et al., 1993).

As amêndoas de cacau são acondicionadas em sacos de anilagem de 60 kg por cerca de 30 dias. Cuidados durante o armazenamento são essenciais para que o produto apresente a melhor qualidade possível. Em geral, utilizam-se ambientes com temperaturas elevadas, com até 5°C acima da temperatura ambiente e à sombra, para manter a umidade relativa do ar a 70% devendo-se armazenar exclusivamente o cacau. Este procedimento é importante, pois na presença de outros alimentos ou produtos

existe a possibilidade de que as amêndoas absorvam outros aromas, podendo comprometer sua qualidade. (MADRID et al., 1996; OETTERER et al., 2006)

As amêndoas secas e devidamente armazenadas são transportadas para as indústrias processadoras. Estas serão torradas e procede-se então 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 (Figura 4) (PONTILLON, 2009).



Figura 4: Fases do cacau durante o seu processamento. Da esquerda para direita, de cima para baixo: (1) polpa do cacau; (2) sementes de cacau não fermentadas; (3) amêndoas de cacau secas e fermentadas; (4) amêndoas de cacau torradas; (5) cascas das amêndoas de cacau; (6) Nibs de cacau (amêndoa limpa e triturada) em destaque; (7) massa de cacau (*liquor*); (8) manteiga de cacau; (9) pó de cacau.

Fonte: http://www.foto-grafo.de/Cocoa/cocoa_5.html

Na indústria, as amêndoas de cacau secas e fermentadas são separadas de material estranho para posteriormente serem torradas e trituradas. As sujidades presentes – terra, areia, madeira, pedras, vidro, palha e restos vegetais – podem ser separadas por peneiragem, vibração, aspiração e sopro (ventilação). A torrefação posterior pode ser feita na amêndoa inteira, na amêndoa quebrada (nibs) ou no produto moído (massa de cacau) (KOBBLITZ, 2011). Após as operações preliminares de limpeza 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^oC; maiores valores de temperatura podem provocar um efeito de torrefação excessiva, com a consequente formação de sabor de queimado e perda das características intrínsecas de cacau (DROUDEN et al., 1996). 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 do binômio temperatura x tempo, é essencial para a obtenção de qualidade de aroma nos produtos finais (SANAGI et al., 1997). 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 aroma, redução da microbiota bacteriana presente na matéria-prima durante o processo fermentativo e estabilidade durante o armazenamento (PEREGO et al., 1999). Outro objetivo da torrefação é secar suficientemente os nibs, permitindo assim que possam ser moídos (PONTILLON, 2009).

A etapa que segue-se à torrefação é a trituração. Esta permite a separação da casca por peneiragem, ventilação e sucção. Os nibs (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 (usado principalmente na produção de achocolatados) e do chocolate, conforme tratamento que receber. Ao passar esta massa por prensas hidráulicas, extrai-se boa parte da manteiga de cacau presente. A torta restante dessa prensagem passa por moinhos que a pulverizam e produzem o cacau em pó (OETTERER, 2006; LIMA, 2010). A moagem deve ser realizada de forma que o produto final não tenha qualquer partícula que possa ser sentida na boca quando o chocolate for posteriormente degustado (KOBBLITZ, 2011).

Em geral, se for destinado à produção de pó, o cacau sofre ainda uma operação de alcalinização, na qual é tratado com uma solução de carbonato de potássio a cerca de 3%. Essa operação melhora o sabor do produto por neutralizar a acidez residual das

amêndoas após a fermentação. Outra consequência importante é a formação de cor mais escura e desejável no produto. Em geral, a alcalinização é feita nos nibs antes da torrefação (que irá remover a água adicionada durante o tratamento). Nessa fase, porém, o uso de álcalis pode provocar saponificação da gordura, caso o tratamento não seja muito criterioso. Uma alternativa é a alcalinização do pó de cacau, após a remoção da manteiga, que além dos efeitos benéficos sobre a cor e o sabor, ainda promove aumento da solubilidade do produto (KOBBLITZ, 2011; OETTERER, 2006).

A transformação desses produtos obtidos em chocolate é realizada pelas fábricas de chocolate por meio dos processos de conchagem e moldagem. A manufatura do chocolate inicia-se pela mistura de massa de cacau com leite em pó, manteiga de cacau, açúcar e outros ingredientes. Ela é feita a 65°C, em misturador de grande capacidade, equipado com rodas de granito de 10 a 15 toneladas, que giram a 300 rpm, por 16 horas. Assim é obtida uma mistura que, em seguida, passa a um refinador para reduzir o tamanho das partículas de 65 a 35 microns, conforme o tipo de chocolate. A refinação é feita em aparelho de grande capacidade (refinador), constituído de cinco rolos superpostos que trabalham em alta rotação e em temperatura de 65 °C. Em seguida à refinação vem a conchagem, realizada em grandes recipientes denominados conchas. Nesta etapa o chocolate é agitado por 12 a 16 horas, conforme o produto, em temperatura variável. O produto resultante (fluido brilhante, aromático, de textura fina que derrete na boca) é descarregado em tanques térmicos a 48°C. Por último, ao sair do tanque térmico, em temperatura de fluidez, o chocolate é resfriado a 28°C (ponto de solidificação da manteiga de cacau) em túneis a 6 °C, dentro de moldes (LIMA, 2010; COPETTI et al., 2011; SALTINI et al., 2013). Esse resfriamento é de fundamental importância para a qualidade final do chocolate. Isso porque a manteiga de cacau pode se cristalizar em diferentes formas, dependendo das condições de resfriamento. Tal processo, conhecido como temperagem, é responsável pela indução da cristalização da manteiga de cacau na forma mais estável, a forma beta (β) e ocorre de forma lenta e gradual, sob movimentação constante. A pré-cristalização ocorre em 2 a 4% da manteiga de cacau, causando aumento da viscosidade. No final da temperagem, o chocolate apresenta viscosidade duas vezes maior quando comparada com o chocolate derretido inicialmente. A temperatura adequada para o final de temperagem varia de acordo com o tipo de chocolate, sendo respectivamente 28°C, 29°C e 31°C, para

chocolate branco, ao leite e meio amargo, respectivamente (GRUNENVALDT, 2009; MCGAULEY, 2002; SCHENK e PESCHAR, 2004).

2.3 DESENVOLVIMENTO DO AROMA DE CHOCOLATE

Para muitos autores o aroma de chocolate provém não apenas da fração aromática volátil, mas também de compostos não voláteis que influenciam a percepção desse atributo. Esta composição complexa depende de diversos fatores dentre os quais estão: características genéticas, condições ambientais, condições de colheita e de processamento (fermentação, secagem e torrefação) e especificamente do conteúdo de proteínas de reserva, polissacarídeos e polifenóis (CLAPPERTON et al., 1994; KATTENBERG e KEMMING, 1993; LUNA et al., 2002; COUNET e COLLIN, 2003; REINECCIUS, 2006; AFOAKWA et al., 2008). A Figura 5 apresenta um resumo de parâmetros importantes para geração de aroma de chocolate de modo que vale destacar que uma apropriada composição inicial nas amêndoas de cacau pode ser convertida, através de tratamentos pós-colheita controlados e subsequentes tecnologias de processamento, a um padrão de aroma de alta qualidade.

A fermentação de cacau é crucial não apenas para a formação de frações voláteis essenciais (alcoóis, ésteres e ácidos graxos), mas também para o fornecimento de precursores de aroma (aminoácidos e açúcares redutores) que contribuem para as características de chocolate. A secagem reduz os níveis de acidez e adstringência em nibs de cacau por redução do teor de ácidos voláteis e polifenóis totais. A Reação de Maillard na torrefação converte precursores de aroma formados durante a fermentação em duas classes principais de componentes aromáticos: pirazinas e aldeídos. Embora nenhum novo odorante importante seja sintetizado durante a conchagem, os níveis de 2-fenil-5-metil-2-hexenal, furaneol, e pirazinas ramificadas aumentam significativamente enquanto aldeídos de Strecker são perdidos por evaporação. Relações diretas são, portanto, observadas entre a composição inicial e tratamentos pós-colheita (fermentação e secagem) de amêndoas de cacau e subsequente processamento (torrefação e conchagem) e seus efeitos tecnológicos na formação do aroma e desenvolvimento das

características do chocolate. Essa complexidade é evidente quando se considera que, ainda hoje, este aroma tão desejável não foi reproduzido pela indústria química.

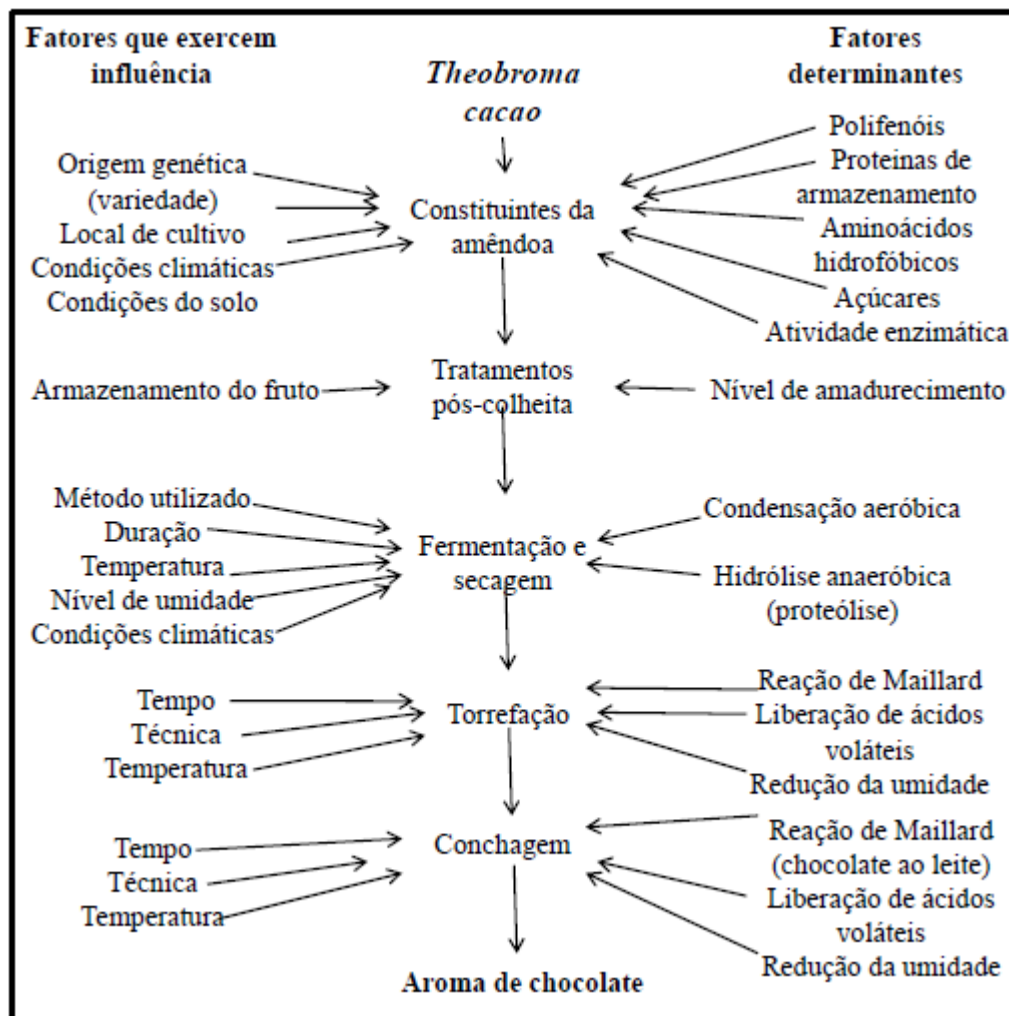


Figura 5: Mecanismos e fatores que influenciam a formação do aroma de chocolate.

Fonte: Adaptado de Afoakwa et al., 2008

2.3.1 Composição da amêndoa de cacau

A composição aproximada de amêndoas de cacau fermentadas e secas está apresentada na Tabela 2. Esta composição pode variar ligeiramente com a variedade plantada, com o manejo e com as particularidades ambientais e culturais de cada região produtora (KOBELITZ, 2011). A concha (testa) representa 10-14 % do peso seco das amêndoas de cacau. O núcleo ou cotilédone, maior parte do que resta, corresponde a

cerca de 86-90%, e confere as características de sabor e aroma do chocolate (ROHAN e STEWART, 1967; OSMAN et al., 2004) sendo composto de dois tipos de células de parênquima de reserva. As células polifenólicas (14-20% do peso da amêndoa) contêm um único grande vacúolo preenchido com os polifenóis e os alcalóides, incluindo cafeína, teobromina e teofilina (OSMAN et al., 2004). As células lipido-protéicas, por outro lado, têm citoplasma fortemente empacotado com múltiplos pequenos vacúolos de proteínas e lipídeos e outros componentes, tais como grânulos de amido, que desempenham diversos papéis na definição de características de sabor e aroma de chocolate (KIM e KEENEY, 1984 apud AFOAKWA et al., 2008; NAZARUDDIN et al, 2001).

Tabela 2: Composição centesimal das amêndoas fermentadas e secas de cacau

Componente	%
Umidade	35,0
Lipídios	31,3
Proteínas	8,4
Teobromina	2,4
Cafeína	0,8
Polifenóis (taninos)	5,2
Carboidratos, ácidos e fibras	13,7
Cinzas	3,2

Fonte: KOBLITZ, 2011.

De acordo com Koblitz (2011), a fração lipídica das amêndoas é conhecida como manteiga de cacau. Apenas três ácidos graxos representam cerca de 95% da composição dessa manteiga: palmítico (P, 16:0), oléico (O, 18:1) e esteárico (St, 18:0). Esses ácidos graxos são encontrados em basicamente três tipos de triacilgliceróis, que representam cerca de 80% da composição da manteiga: POP, POSt e StOSt. Essa composição é responsável pela característica mais interessante da manteiga de cacau, que a torna um produto muito procurado e de alto custo e que é responsável pela propriedade que o chocolate tem de derreter na boca: ponto de fusão entre 32 e 35°C, uma faixa de temperatura de derretimento estreita (apenas 3°C) e ligeiramente abaixo da temperatura do corpo humano. O nitrogênio protéico presente no cacau fermentado

divide-se em: 31,7% de albuminas; 3,1% de globulinas; 8,3% de prolaminas; 13,5% de glutelinas e 43,5% de peptídeos diversos. O cacau fresco contém baixo teor de aminoácidos livres que, em geral, aumenta ao longo da fermentação. Cotilédones contêm como proteínas de reserva frações de albumina e globulina (BIEHL et al., 1982a). A fração globulina, é formada por dois polipetídeos de 47 e 31 kDa (PETTIPHER, 1990; SPENCER e HODGE 1992; VOIGT et al., 1993) e é degradada na fermentação, enquanto a fração albumina (21 kDa) não sofre a mesma degradação. Segundo Voigt et al. (1994a), o aroma característico de chocolate deriva inicialmente da liberação de certas globulinas presentes nos cotilédones por proteases ácidas e exopeptidases das amêndoas.

Ainda há poucas 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 (128 mg/g). A segunda posição foi ocupada pelo ácido aspártico e 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.

As amêndoas apresentam ainda pequena quantidade de amido e de açúcares redutores (glicose e frutose), além dos oligossacarídeos (estaquiase e rafinose) e dos polissacarídeos presentes nas paredes celulares, principalmente celulose (KOBBLITZ, 2011). Reineccius et al. (1972 apud AFOAKWA et al., 2011) afirmaram que amêndoas de cacau frescas não fermentadas continham 15,8 mg/g de sacarose e traços de frutose, sorbose, manitol e inositol. Berbert (1979 apud AFOAKWA et al., 2008) verificou conteúdo de sacarose de 24,8 mg/g em amêndoas não fermentadas respondendo por cerca de 90% dos açúcares totais (27,1 mg/g) da amêndoa, com açúcares redutores frutose e glicose correspondendo a cerca de 6% (0,9 e 0,7 mg/g, respectivamente) e outros (incluindo manitol e inositol) com concentrações inferiores a 0,50 mg/g (cerca de

4%). As diferenças encontradas têm sido atribuídas ao método e tempo de colheita e ao tipo e origem das amêndoas de cacau.

A teobromina (3,7-dimetilxantina) e a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), são bases purínicas de sabor amargo e propriedades excitantes (alcalóides). Em comparação com outros vegetais ricos nesses alcalóides, a concentração dessas substâncias no cacau é considerada baixa. Sua principal consequência na qualidade do chocolate está relacionada com a presença do sabor amargo (KOBBLITZ, 2011).

O cacau é rico em polifenóis, alcalóides e procianidinas, armazenadas em células de pigmento do cotilédone e das folhas. Juntos eles correspondem a cerca de 14 – 20% do peso da amêndoa e são importantes para caracterizar o aroma de chocolate (OSMAN et al., 2004; KIM e KEENEY, 1983; AFOAKWA et al., 2008). Três grupos de polifenóis podem ser identificados: catequinas ou flavan-3-óis (aprox. 37%), antocianinas (aprox. 4%) e proantocianidinas (aprox. 58%). A catequina primária é (-)-epicatequina. Menos abundante é a (+)-catequina com apenas traços de (+)-galocatequina e (-)-epigalocatequina. A fração de antocianinas é dominada por cianidina-3- α -L-arabinosídeo e cianidina-3- β -D-galactosídeo. Procianidinas são principalmente flavon-3,4-dióis de 4 a 8 ou 4 a 6 encadeamentos para formar dímeros, trímeros ou oligômeros, com epicatequina como a principal subunidade de extensão (KIM e KEENEY, 1984; AFOAKWA et al., 2008; ROMANCZYK et al., 1997; LANGE e FINCKE, 1970; HANSEN et al., 2000). Nas amêndoas frescas os taninos totais dividem-se em 40% de taninos condensados e 60% de taninos solúveis. A presença desses compostos confere a cor arroxeada aos cotilédones (Forasteiro) e adstringência, além de um certo amargor (KOBBLITZ, 2011).

Ao longo da fermentação e da secagem, os taninos solúveis tendem a sofrer uma série de reações químicas acabando com a adstringência e gerando a coloração amarronzada típica das amêndoas fermentadas. Com a morte do embrião, os polifenóis entram em contato com as enzimas glicosidase e polifenoloxidase (responsáveis pela hidrólise das antocianidinas e oxidação das algiconas, respectivamente) presentes nas sementes, sofrendo oxidação, complexação com proteínas e formação de quinonas, as quais sofrem condensação covalente com grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras (FORSYTH e QUESNEL, 1958; EFRAIM et al., 2011; HANSEN et al., 1998; BRITO, 2000; BECKETT, 2009). Essas, associadas às demais reações em curso – como a hidrólise de proteínas a aminoácidos e de açúcares – levam à formação

de compostos aromáticos. (KOBLOITZ, 2011; CROSS, 1999; SERRA-BONVEHÍ e VENTURA COLL, 1997).

O teor de polifenóis após a fermentação é reduzido para aproximadamente 5%. Teores de 10% ou superiores são considerados um sinal de fermentação pobre e levam a chocolates de sabor muito adstringente (LEHRIAN e PATTERSON, 1983; AFOAKWA et al., 2011). Misnawi et al. (2005) concluíram que elevadas concentrações de polifenóis em *liquor* não torrado podem influenciar negativamente a formação de compostos desejáveis ao aroma.

Misnawi et al. (2002) verificaram que houve redução de 3% no teor de polifenóis totais durante a torração de *liquor* de cacau a 120°C por 45 min, sugerindo que os polifenóis possam se ligar às pirazinas (compostos formados pela Reação de Maillard). Misnawi et al. (2004) observaram que o aumento na concentração de polifenóis em *liquor* de cacau, além de diminuir a formação de pirazinas durante a torração, também causou redução na disponibilidade de aminoácidos livres e açúcares redutores para a formação de pirazinas, indicando que os polifenóis, além de se ligarem às pirazinas durante a torração, também podem se ligar aos compostos precursores da Reação de Maillard. De acordo com Camu et al. (2008) os conteúdos de polifenóis e alcalóides das amêndoas de cacau foram dependentes do recorte das pilhas/montões, sendo que os níveis de epicatequina e teobromina diminuíram durante a torrefação pela difusão para fora dos cotilédones das amêndoas e condensação e oxidação de polifenóis. Níveis residuais foram responsáveis por gerar o grau de amargor do chocolate final. Sendo assim, concluiu-se que o controle da fermentação foi necessário para controlar o aroma de chocolate final.

Cooper et al. (2008) reportaram não haver evidências suficientes quanto aos reais mecanismos que levam à perda de flavanóis e procianidinas. No entanto, destacaram a possibilidade de tais compostos serem utilizados para a formação de taninos de maior massa molecular, uma vez que o perfil, e não o teor total dos polifenóis, sofre alteração após a fermentação e durante o processamento das amêndoas para a obtenção de *liquor* e cacau em pó.

2.3.2. Características genéticas

A composição da amêndoa interage com a fermentação na formação de aroma de chocolate de qualidade. Uma análise de proteínas da fração de polipeptídeos de reserva globulina tipo vicilina VCG e produtos da sua degradação proteolítica em cinco genótipos populares (Forastero, Criollo, Trinitario, SCA 12 e UIT1) concluiu que as características do chocolate podem variar, mas todos os genótipos são potenciais para o desenvolvimento adequado do aroma (AMIN et al., 2002). Existem diferenças significativas nas atividades enzimáticas em cacau de diferentes genótipos (AFOAKWA et al., 2008) sendo que este influencia tanto a qualidade quanto a intensidade do aroma de chocolate (TAYLOR, 2002; LUNA et al., 2002; COUNET et al., 2004; TAYLOR e ROBERTS, 2004), determinando, provavelmente, as quantidades dos precursores e atividade das enzimas contribuindo, portanto, para a formação do aroma. Três tipos de cacau: Forastero, Criollo e o híbrido Trinitario apresentaram amplas variações no aroma final (BECKETT, 2000; AWUA, 2002; AMOYE, 2006). O cacau caracterizado como *Bulk* (cultivado e utilizado comercialmente em maior escala e disponível no mercado convencional; Forastero) mostra tipicamente características de aroma mais fortes, já o cacau caracterizado como *Fine* (cacau do Equador do tipo Nacional ou certos tipos de Trinitário e Criollo) é aromático e mais suave (KATTENBERG e KEMMING, 1993; JINAP et al., 1995; LUNA et al., 2002). Counet et al. (2002) reportaram que variedades finas submetidas a processos fermentativos rápidos apresentaram altos conteúdos de procianidinas, enquanto amêndoas Trinitario da Nova Guiné e Forastero foram superiores no aroma total.

De acordo com Lopez e Dimick (1991), a qualidade e a intensidade do aroma 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 aroma de chocolate e o que apresentava menor atividade para estas enzimas tinha baixo potencial para o aroma. Porém esta relação não foi linear para todos os cultivares testados. Alguns deles, com alto potencial para formação de aroma apresentaram baixa atividade de proteases. Para as outras enzimas testadas não parece haver qualquer correlação entre a atividade enzimática e o potencial para desenvolver aroma 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 aroma 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.

2.3.3 Fermentação e atividade enzimática

A questão da fermentação da polpa de cacau (que resulta em grandes quantidades de leveduras e bactérias produtoras de ácido acético) ser essencial para o desenvolvimento do aroma 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 aroma de chocolate após a torrefação. Por outro lado, Aquarone et. al. (2001), ao repetir esses trabalhos, constataram que o aroma típico de chocolate aparece, mas sem atingir a qualidade daquele observado em amêndoas fermentadas por microorganismos. Assim, concluíram que a fermentação da polpa resulta em

desenvolvimento de diferentes microorganismos que fornecem enzimas necessárias para a obtenção final do aroma de chocolate.

Mais de 30 espécies bacterianas já foram encontradas na fermentação do cacau. Bactérias lácticas produzem grandes quantidades de ácido láctico pela via homofermentativa, contribuindo para redução do pH do meio, mas podem também gerar diversos produtos secundários (etanol, glicerol, manitol) que contribuem para formação de precursores das características sensoriais do chocolate. As bactérias acéticas são responsáveis pelos processos oxidativos, altamente exotérmicos, que levam à formação de ácido acético a partir do etanol. Nessa etapa da fermentação são alcançados o pH final ácido, característico de preparações de cacau fermentado, e a alta temperatura, ambos considerados responsáveis pela morte do embrião. Em fermentações muito longas (acima de 7 ou 8 dias) a instalação de diversas espécies do gênero *Bacillus*, produtoras de uma variedade de compostos (ácidos, aldeídos e alcoóis), leva à formação de *off-flavor*, isto é, aparecimento de odores e sabores desagradáveis e não característicos de chocolate. Acredita-se ainda que, na ausência de açúcares para obtenção de energia, os microrganismos presentes passem a degradar proteínas, liberando compostos nitrogenados (aminas) de aroma desagradável (KOBELITZ, 2011; COPETTI, 2011; NIGAM e SINGH; 2014). Schwan e Wheals (2004) reportaram que *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisiae* variedade *chevalieri* foram os mais importantes produtores de compostos voláteis característicos de aroma de chocolate. Além disso, *Bacillus* ssp. foi apontado como produtor de ácidos acético e láctico, 2,3-butanodiol, tetrametilpirazinas e ácidos graxos livres C3 – C5, os quais foram considerados *off-flavors* em chocolate.

Durante muito tempo acreditou-se que os diferentes microrganismos presentes na fermentação eram os únicos responsáveis pela formação dos precursores de aroma. Apenas recentemente ficou provado que as principais reações que levam à formação dessas substâncias são devido à ação de enzimas endógenas da própria semente do cacau. A atividade microbiana na polpa de cacau gera calor e produz etanol, ácido acético e ácido láctico que matam o embrião. Os produtos da fermentação da polpa penetram lentamente dentro das amêndoas causando inchaço e estimulando reações enzimáticas que produzem precursores de aroma e, na torrefação, notas de aroma e sabor características. A redução do pH, favorece a ação das enzimas e quantidades apropriadas de precursores são essenciais para produção ótima de voláteis de aroma na

torrefação (KOBLOITZ, 2011; VOIGT et al., 1994a; MOHR et al., 1976; ROHAN e STEWART, 1967; LOPEZ e QUESNEL, 1973 apud AFOAKWA et al., 2008; BIEHL et al., 1990; LOPEZ e DIMICK, 1991; LOPEZ e DIMICK, 1995). De acordo com Beckett (1994), uma vez que a fruta é colhida, iniciam-se vários mecanismos bioquímicos que contribuem para formação dos precursores de aroma de chocolate. Entretanto, é importante que as amêndoas tenham atingido adequado grau de maturação. Caso contrário, nenhum processamento pode produzir o aroma pretendido. Estudos 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 aroma.

Alterações subcelulares nos cotilédones liberam enzimas-chave ocasionando reações entre substratos pré-existentes em amêndoas não fermentadas. As enzimas exibem diferentes estabilidades durante a fermentação e devem ser inativadas por tratamento térmico, ácidos, polifenóis e proteases. Aminopeptidase, invertase, invertase polpa, e polifenoloxidase são significativamente inativadas; carboxipeptidase é parcialmente inativada; enquanto endoproteases e glicosidases permanecem ativas durante a fermentação (HANSEN et al., 1998).

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 aroma 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 aroma de chocolate das amêndoas de cacau:

a. endoproteases e exopeptidases – envolvidas na geração de peptídeos e aminoácidos livres considerados os principais precursores de aroma;

- b. invertase e glicosidases – responsáveis pela liberação de açúcares redutores indispensáveis à formação do aroma 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 a redução da adstringência e 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: modo de ação e a natureza química do 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 aroma em chocolate. 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, o que é essencial para a formação do aroma. 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 aroma de chocolate típicos na presença de açúcares redutores, durante a torrefação (VOIGT et al., 1994a; MISNAWI et al., 2002). O consenso é que a ação combinada de duas proteases, endoprotease aspártica e serina-carboxi-(exo) peptidase, sobre a fração de polipeptídeos de reserva globulina tipo vicilina (7S) (VCG) rende precursores do aroma de chocolate. A endopeptidase aspártica (EC 3.4.23) hidrolisa ligações peptídicas na VCG junto a resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com formação de oligopeptídeos hidrofóbicos, substratos para a serina exopeptidase (EC 3.4.16.1) que remove resíduos de aminoácidos hidrofóbicos carboxi-terminal (BIEHL et al., 1993, 1996; BIEHL e VOIGT, 1999; VOIGT et al., 1994b; AFOAKWA et al., 2008). Proteínas de reserva de outras espécies vegetais ou peptidases alternativas relacionados não conseguiram produzir precursores de aroma apropriados.

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 provadores. 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.

O método de fermentação determina a qualidade final dos produtos produzidos, especialmente do seu aroma. Variações nas condições de fermentação afetam o pH, acidez titulável, e temperatura alcançada durante o processo, influenciando a atividade enzimática e o desenvolvimento do aroma (BIEHL et al., 1990). Kirchhoff et al. (1989) observaram uma correlação entre o acúmulo de aminoácidos livres e a geração de precursores de aroma específicos, com processos proteolíticos dependentes do pH. As atividades das enzimas-chave são dependentes de pH; próximo ao pH 3,8 – ótimo para endopeptidase aspártica – mais oligopeptídeos hidrofóbicos e menos aminoácidos livres são produzidos. Considerando o pH 5,8 o ótimo para serina exopeptidase, há aumento de oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos hidrofóbicos. Com uma rápida queda do pH (<4,5) é observada redução em precursores de aroma e uma lenta difusão de ácidos orgânicos através dos cotilédones, de modo que o momento de início da condição de pH

ótimo, a duração do período de pH ótimo e o pH final são cruciais para o aroma final (BIEHL e VOIGT, 1999). Ziegleder (1991) comparou extratos de cacau de acidez natural (pH 5.5 – 6.5) e alcalino (pH 8) obtidos por extração direta – o primeiro apresentou um aroma de chocolate mais intenso do que o último, sendo isso atribuído aos altos teores de ácidos aromáticos e produtos da degradação de açúcar com fortes notas aromáticas de doce e caramelo. Amêndoas de cacau com pH mais baixo (4.75 – 5.19) e mais alto (5.5 – 5.8) apresentaram aroma de chocolate menos intenso e maior teor de *off-flavor* respectivamente, em relação às amêndoas de pH intermediário (5.2 – 5.49) que apresentaram aroma intenso de chocolate (JINAP et al., 1995). A acidificação durante a fermentação é crítica para a qualidade final do cacau, uma vez que o diferente pH ótimo de atividades de endoprotease e carboxipeptidase determina a eficiência e os produtos da proteólise. O resultado é uma mistura de peptídeos hidrofóbicos e hidrofílicos, os últimos mais importantes na formação de notas de aroma típico. Em resumo pode-se concluir que a proteólise da globulina é essencial para a formação de aroma de chocolate. Produtos da hidrólise de proteínas de baixa massa molecular e açúcares redutores contribuem para reações de Maillard que produzem o aroma de chocolate na torrefação (ROHAN e STEWART, 1967 apud AFOAKWA, 2008). Peptídeos e aminoácidos livres hidrofóbicos, especificamente leucina, alanina, fenilalanina e tirosina, liberados durante a fermentação por atividade de protease e carboxipeptidase (VOIGT et al., 1993, 1994a) contribuem para o aroma pela reação com frutose e glicose (MOHR et al., 1976, LOPEZ et al., 1978 apud AFOAKWA, 2008).

Voigt et al. (1995) purificaram protease aspártica de *T. cacao* em um heterodímero de polipeptídeos de 29 e 13 KDa que hidrolisou eficientemente vicilina de amêndoas de *T. cacao* e (menos eficientemente) o inibidor de tripsina em peptídeos (VOIGT et al., 1994a).

Duas espécies de cDNA, TcAP1 e TcAP2 respectivamente, decodificando diferentes polipeptídeos da família de genes de protease aspártica vegetal, foram clonadas e caracterizadas (LALOI et al., 2002). Ambos genes foram previamente induzidos em amêndoas em desenvolvimento e mostraram significativo decréscimo de expressão quando as sementes atingiram a maturidade. Entretanto, a expressão de TcAP2 é induzida a níveis mais altos sugerindo que o gene codifica a protease aspártica

primária na amêndoa madura. Deve ser considerado que amêndoas de *T. cacao* têm normalmente altos níveis de atividade de protease aspártica (VOIGT et al., 1994a).

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 aroma. 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 microrganismos que fornecem enzimas necessárias para a obtenção final do aroma 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).

Rodriguez-Campos et al. (2012) avaliaram os efeitos do tempo de fermentação e temperatura de secagem no perfil de compostos voláteis após 2, 4, 6 e 8 dias de fermentação seguida de secagem a 60, 70 e 80 °C. Eles observaram que a fermentação exerceu maior efeito no perfil de compostos voláteis do que a secagem. Concentrações de alguns compostos indesejáveis ocorreram após 8 dias de fermentação e 6 dias foi o período considerado suficiente para produzir compostos com aroma desejável em cacau. O processo de secagem a 70 e 80 °C após 6 dias de fermentação resultou em um perfil de compostos voláteis similar ao obtido por secagem das amêndoas ao sol. Entretanto, o período de 6 dias de fermentação seguido de secagem a 70 °C foi considerado como a condição ótima para evitar a produção de *off-flavors*.

Embora a conversão de sacarose em glicose e frutose seja 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).

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.

Amêndoas de cacau de baixa qualidade foram enzimaticamente tratadas para melhorar precursores de aroma de chocolate na produção de *liquors* (OLIVEIRA et al., 2011). As amostras enzimaticamente tratadas foram avaliadas por testes sensoriais de diferença do controle e ordenação por preferência. Pelo Teste de Diferença do Controle, ao nível de significância de 5 %, tratamentos com enzima de origem vegetal, animal e

microbiana foram significativamente diferentes tanto das amêndoas de cacau de boa qualidade como daquelas de baixa qualidade, em relação ao aroma de chocolate. O tratamento com enzima vegetal foi o de pior resultado, uma vez que no Teste de Diferença do Controle apresentou-se mais distante das amêndoas de cacau de boa qualidade, em relação ao aroma de chocolate. Além disso, no Teste de Preferência, este tratamento foi o menos preferido entre os julgadores. Os tratamentos com enzima animal e enzima microbiana 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 aroma de chocolate. No Teste de Preferência não houve diferença estatística nem entre os dois tratamentos nem entre o tratamento com enzima microbiana e o padrão bom para aroma de chocolate. Embora, de forma geral, tenha havido diferença estatística significativa entre os tratamentos em relação ao aroma de chocolate, não houve diferença, em termos quantitativos, em relação à atividade proteolítica das enzimas testadas. Isso foi apontado como um indicativo de que as enzimas testadas possuem diferentes padrões de atividade, gerando peptídeos diferentes, que só em alguns casos levam à formação do aroma de chocolate. Baseado nesses resultados Oliveira et al. (2011) concluíram que houve uma melhora de 50% no aroma de chocolate usando a enzima *Flavorzyme*, a qual continha proteases aspárticas e carboxipeptidases de origem microbiana sendo que esse processo é objeto da patente BR 10 2012 012897 7.

2.3.4. Secagem

O desenvolvimento do aroma nas amêndoas de cacau continua durante a secagem, sendo esta etapa marcada principalmente pelo desenvolvimento da coloração marrom induzida pelas reações enzimáticas de oxidação de polifenóis. O uso de secagem artificial pode aumentar a temperatura dos cotilédones (AFOAKWA et al., 2008). Dimick e Hoskin (1999) reportaram que o endurecimento do cotilédone pode restringir a perda de ácidos voláteis, com efeitos prejudiciais no aroma final do chocolate. A avaliação sensorial de amêndoas de cacau secas usando diferentes estratégias para a secagem tais como secagem ao sol, insuflação de ar, secagem à sombra e em estufa sugeriu que amêndoas secas ao sol são melhores no que se refere ao desenvolvimento de chocolate com pouco *off-flavors* (DIAS e AVILA, 1993;

BUYUKPAMUKCU et al., 2001; AWUA, 2002; KYI et al., 2005; GRANVOGL et al., 2006; AMOYE 2006).

2.3.5 Torrefação

A torrefação do cacau é uma etapa essencial para o desenvolvimento do aroma de chocolate a partir de precursores formados durante a fermentação e secagem. Após a torrefação há redução da acidez devido à diminuição da concentração de ácidos voláteis tais como ácido acético (BECKETT, 2000; RAMLI et al., 2006; GRANVOGL et al., 2006) mas não de ácidos não voláteis tais como oxálico, cítrico, tartárico, succínico e láctico (JINAP et al., 1998; AWUA, 2002).

A Reação de Maillard, uma das mais importantes e complexas reações que envolvem a formação do aroma, é importante na torrefação e ocorre em uma larga faixa de temperatura (100-150°C) para os vários modelos de sistemas alimentícios (PORTE et al., 2007; AFOAKWA et al., 2008). Esta reação é responsável por alguns dos mais prazerosos aromas 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 aroma 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 aroma (REINECCIUS, 2006).

A reação de Maillard é geralmente dividida em três estádios. 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 à formação de aroma, a chamada degradação de Strecker é de extrema importância. Nela, aminoácidos são degradados por desaminação e descarboxilação. As várias reações possíveis acontecem a depender das condições de temperatura, pH e natureza dos reagentes (tipo de açúcar, aminoácido ou proteína). Uma visão geral é dada na Figura 6. Deve-se notar que, no caso de proteínas e peptídeos o grupo amino reativo é o da lisina e também o grupo N terminal, uma vez que os grupos α -amino estão comprometidos na ligação peptídica e, portanto, não disponíveis nem para reação de Maillard e 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 aroma 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 degradação de Strecker acontece com menos frequência, e isto tem consequências para a geração de aroma (VAN BOEKEL, 2006).

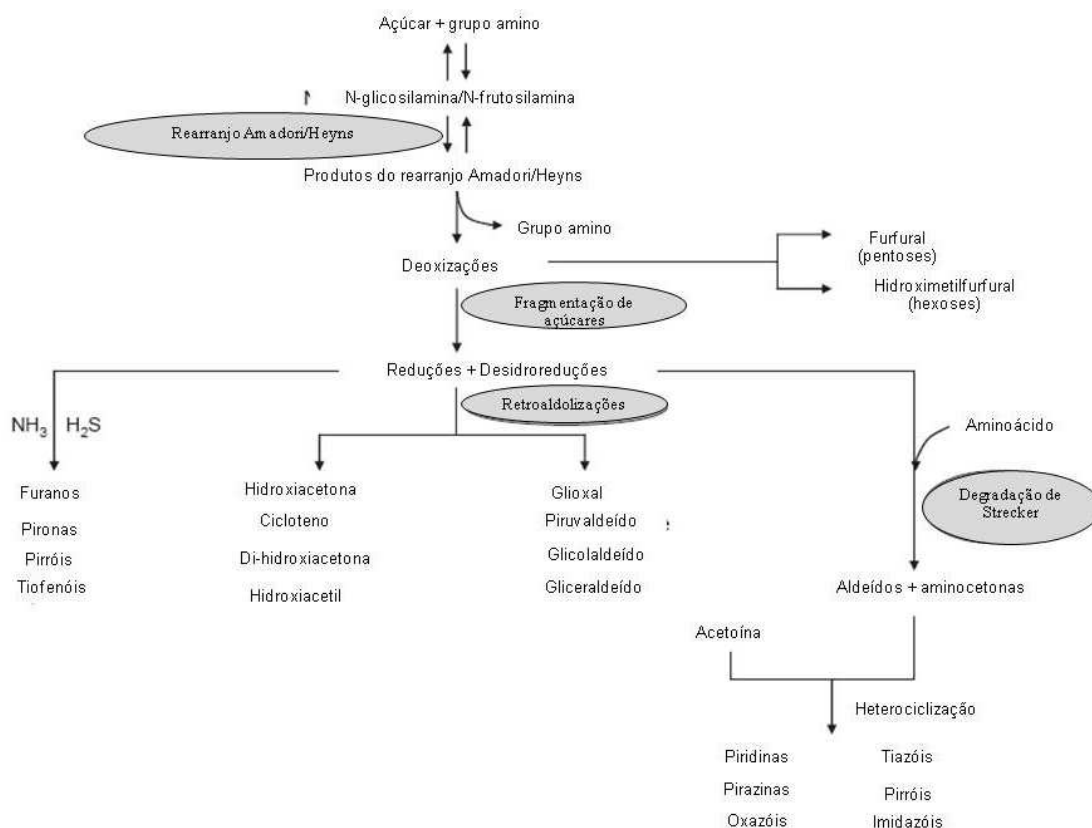


Figura 6: Visão geral da reação de Maillard

Fonte: VAN BOEKEL, 2006.

Na Figura 7 tem-se uma visão mais específica da formação do aroma de chocolate, que se desenvolve durante a torrefação das amêndoas de cacau fermentadas. Os aromas surgem a partir dos precursores criados durante a fermentação por 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 aroma do chocolate. Além disso, as cetonaminas se condensam para gerar pirazinas (PONTILLON, 2009).

A estrutura do aminoácido dita o aldeído resultante e também a amina e ácido que podem ser produzidos da degradação do aminoácido. A natureza do componente amina é crucial para a formação do aroma de chocolate visto que, não apenas estes próprios aldeídos são ativadores de aroma, mas reações posteriores produzem compostos heterocíclicos importantes para as características finais. Leucina e glicose produzem notas de aroma descritas como “chocolate doce”, treonina, glutamina e glicose produzem notas de “chocolate” quando aquecidas a 100 °C e valina e glicose,

aquecidas a 180°C produzem uma nota descrita como “chocolate penetrante” (DIMICK e HOSKIN, 1999). Em um meio ácido, geralmente hidroximetilfurfural e outros produtos furfurais são formados e em pH neutro, os resultados da reação são redutonas. Os intermediários são complexos e pouco é conhecido sobre suas estruturas e natureza exata da formação em sistemas alimentícios. Entretanto, os compostos intermediários, individualmente e quantitativamente dependentes da reação com substrato e do pH, polimerizam-se e determinam o aroma final de chocolate. Compostos importantes incluem pirazinas, pirróis, piridinas, imidazóis, tiazóis e oxazóis (DIMICK e HOSKIN, 1999; COUNET et al., 2002; RAMLI et al., 2006; GRANVOGL et al., 2006).

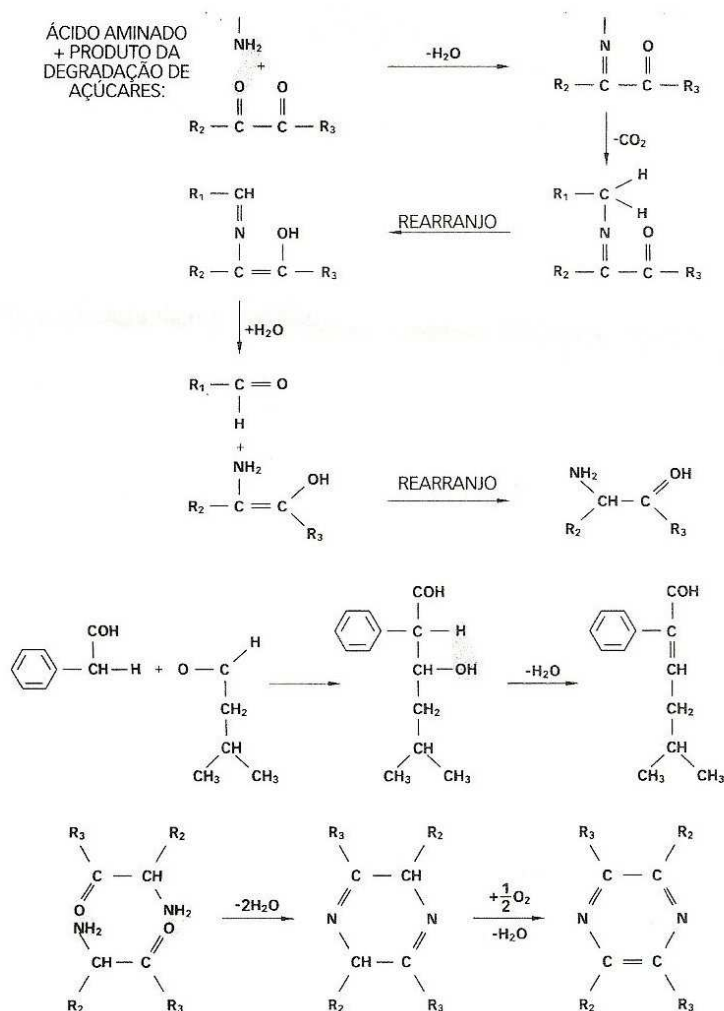


Figura 7: Visão específica da formação do *flavor* de chocolate

Fonte: van BOEKEL, 2006.

Alquilpirazinas e aldeídos de Strecker são os principais compostos voláteis contribuintes para o aroma de chocolate e alguns deles estão listados na Tabela 3 (DIMICK e HOSKIN, 1999; BONVEHÌ e COLL 2002; BELITZ et al., 2004).

Tabela 3: Compostos aromáticos 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

2.3.6 Alcalinização

A alcalinização é realizada primariamente para mudar a cor, mas também influencia o aroma do chocolate. Dimick e Hoskin (1999) sugeriram que o nibs de cacau da Malásia e do Brasil são caracterizados por alta acidez e baixo aroma de chocolate, limitando o desenvolvimento de possíveis atributos de aroma no processamento. Sharif (1997) mostrou que melhoras na qualidade do nibs e do *liquor* de cacau destas origens poderiam ser alcançadas por tratamentos com álcalis sendo que chocolates obtidos de *liquor* de cacau alcalinizado tiveram melhores aromas do que aqueles obtidos de nibs de cacau torrado não alcalinizado. Ele concluiu que a alcalinização reduziu a acidez bem como a adstringência e promoveu a intensificação do aroma desejável.

Hannum et al. (2002) reportaram que quando dois produtos de cacau comercialmente disponíveis foram analisados, o cacau suavemente alcalinizado apresentou 0,36 mg de flavonóides por grama, enquanto o cacau altamente alcalinizado apresentou apenas 0,07 mg de flavonóides por grama do produto.

2.3.7 Conchagem

A conchagem é o estágio final na fabricação do chocolate e, portanto, essencial para o desenvolvimento do aroma final e textura apropriada. Nesta etapa os ácidos voláteis residuais e umidade são removidos, a viscosidade é modificada e ocorre mudança da cor (AWUA, 2002; BECKETT, 2003; REINECCIUS, 2006; AFOAKWA et al., 2007).

Beckett (2000) sugeriu que as oxidações ocorridas nesta fase modificam os precursores desenvolvidos na fermentação e na torrefação para alcançar o aroma final havendo eliminação de notas de aroma indesejáveis bem como de acidez e de adstringência. Fenóis voláteis apresentaram 80% de redução em análise por cromatografia gasosa em poucas horas de conchagem (BECKETT, 2000).

Dimick e Hoskin (1999) concluíram que os polifenóis, através de oxidação e mecanismos enzimáticos, formam complexos com aminoácidos, peptídeos e proteínas havendo redução na percepção de adstringência devido às interações fenólicas irreversíveis e aroma final mais “adocicado”.

Heinzler e Eichner (1991) reportaram que os compostos de Amadori formados na secagem e torrefação diminuem durante a conchagem. É consenso geral que chocolates mostram acentuado decréscimo no total de *off-flavors* após a conchagem (PONTILLON, 1995; HOSKIN e DIMICK, 1983; PLUMAS et al., 1996; BECKETT, 2003; COUNET et al., 2002).

2.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO AROMA DE CHOCOLATE

Mais de 600 compostos foram 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 aroma de chocolate em função de seus fortes atributos sensoriais (FEENEY et al., 1975; SANAGI et al., 1997; HUMBERT e SANDRA, 1985; PEREGO et al., 2004; DIMICK e HOSKIN, 1981; HEINZLER e EICHNER, 1992; COUNET et al., 2002; AFOAKWA et al., 2009).

Importantes componentes de aroma produzidos durante a fermentação incluem: etil-2-metilbutanoato, tetrametilpirazina e certas pirazinas, 3-metilbutanol, fenilacetaldeído, 2-metil-3-(metildithio)furano, 2-etil-3,5-dimetil e 2,3 – dietil-5-metilpirazina (TAYLOR, 2002). Estudos analíticos têm identificado mais de 600 compostos voláteis em produtos de chocolate e cacau (SCHIEBERLE e PFNUER, 1999; TAYLOR, 2002; TAYLOR e ROBERTS, 2004; REINECCIUS, 2006), principalmente pirazinas, ésteres, aminas e amidas, ácidos e hidrocarbonetos. Schnermann e Schieberle (1997) identificaram os seguintes compostos aromáticos importantes na fração neutra/básica em chocolate ao leite: 3-metilbutanol, 2-etil-3,5-dimetilpirazina, 1-octen – 3 – ona, 2-etil-3,6-dimetil pirazina, 2,3-dietil-5-metilpirazina, (Z)-2-nonenal, 2-metil-3-(metilditio)furano, (E,E)-2,4- nononadienal, e *R*- δ -decalactona. Entre voláteis ácidos, 14 componentes foram identificados como contribuintes para o aroma com vanilina (baunilha), adicionada também na fabricação, seguida por 2- e 3-ácido metilbutanóico (amanteigado, rançoso) e sotolon (fenacho/ xarope de bordo/ caramelo) apresentando as maiores intensidades de aroma. Em essência os componentes de aroma importantes no chocolate ao leite parecem originar-se principalmente na torrefação das amêndoas de cacau.

Em seu estudo analítico Counet et al., (2002) identificaram 60 compostos, entre aldeídos e cetonas, ésteres, alcoóis, hidrocarbonetos, nitrilas e sulfetos. Destes, 10 não tinham sido previamente identificados como constituintes de chocolate entre os quais destacam-se 1-pentanol (1), 3-(metiltiol)-propionaldeído, metilbenzeno, pirazina, etenilpirazina, piridina, 2-metilpiridina, 1-(2-furanilmetil)-1H-pirrol, 1H-indol, e dimetil disulfida. Outros dois, benzil álcool e dihidro-2-metil-3(2H)-furanona, foram reportados apenas em chocolates ao leite. Comparando as concentrações desses compostos antes e após a conchagem Counet et al. (2002) observou que a maioria dos aromas foram

diferentes entre as amostras analisadas já antes da conchagem, indicando que a fermentação e secagem de cacau não são reprodutíveis de lote para lote. Ainda pelo estudo de Counet et al. (2002) somente alguns voláteis em concentrações de mg/kg emergiram como compostos aromáticos importantes na cromatografia gasosa olfatométrica. Estes incluem quatro aldeídos de Strecker, 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal e fenilacetaldeído, derivados respectivamente de valina, leucina, isoleucina e fenilalanina. Os três primeiros, com fortes notas de chocolate, muito provavelmente têm um grande impacto no aroma de chocolate escuro. O 3-(etilol) propionaldeído é um outro aldeído de Strecker fortemente percebido pelo olfato apesar de suas baixas concentrações em algumas amostras (45 ug/kg). Heterocíclicos nitrogenados específicos das reações de Maillard foram considerados os compostos mais importantes no chocolate escuro: 3 (ou 2), 5-dimetil-2 (ou 3)-etilpirazina, 3,5-(ou 6)-dietil-2-metilpirazina, acetilpirrol, e furfurilpirrol. O grupo etil em dois compostos de pirazina sugere funções importantes para alanina e/ou seu aldeído de Strecker, acetaldeído, na síntese de aroma de chocolate (CERNY e FAY, 1995; CERNY e GROSCH, 1994). Outros quatro heterocíclicos; 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina, tetrametilpirazina e 2-isopropil-3-metoxipirazina foram identificados sendo a tetrametilpirazina, a pirazina mais abundante em chocolate escuro com uma concentração maior que 6 mg/kg. Ainda de acordo com Counet et al. (2002) dos 33 componentes particularmente aromáticos na fração neutra/básica três apresentaram características de chocolate especificamente fortes: 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, e 3-metilbutanal. O padrão da fração ácida – de aroma caracteristicamente fenólico, doce – foi muito diferente daquele da fração neutra-básica essencialmente com aroma de chocolate. Somente 6 dos 18 compostos foram aromáticos, sendo um deles, a vanilina, adicionado antes da conchagem.

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

A Tabela 4 traz a descrição de alguns compostos relacionados ao aroma de chocolate identificados em cacau.

Tabela 4: Compostos característicos de aroma de chocolate identificados em cacau.

Etapa do processo	Compostos identificados	Autor/ano
Amêndoas fermentadas e torradas	2,5-dimetilpirazina; 2,3-dimetilpirazina; 2,3,5-trimetilpirazina; 2,3,5,6-tetrametilpirazina.	MISNAWI e JAMILAH, 2004
Amêndoas fermentadas por 10 dias e torradas em temperaturas de 50-200°C por 30 minutos.	Monometilpirazina; 2,3- dimetilpirazina; 2,5-dimetilpirazina; 2,6-dimetilpirazina; trimetilpirazina; tetrametilpirazina.	HASHIN e CHAVERON, 1994
Amêndoas fermentadas e torradas por 5-65 minutos a 110-170°C	Tetrametilpirazina; trimetilpirazina; acetato de fenietila; acetato de isoamila; acetato de 3-metilbutil; fenilacetaldeído; benzaldeído; 2-feniletanol.	JINAP et al., 1998
Amêndoas fermentadas e torradas entre 120 e 170 ° C	Alquilpirazinas; aldeídos; alcoóis; ácidos; ésteres; cetonas; dimetilpirazina; trimetilpirazina; acetaldeído; metilbutanal.	HUANG e BARRINGER, 2011
Liquor de cacau	Dimetilpirazina; trimetilpirazina; tetrametilpirazina.	JINAP et al., 2004

2.5 SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS

A química de proteínas tem passado por grandes avanços tecnológicos e científicos. Isso tem se tornado possível através da integração e evolução de diferentes técnicas analíticas que permitem gerenciar, analisar e integrar dados. Estas envolvem o isolamento sistemático, identificação, quantificação e sequenciamento de proteínas expressas em uma organela, célula ou tecido de um organismo, bem como seu estado de ativação, interação, alteração e suas propriedades (ANDERSON et al., 2001 apud ANDRADE, 2006). Esse cenário tem se caracterizado pelo domínio de um novo método analítico empregado no estudo de proteínas: a espectrometria de massas (mass spectrometry - MS). A implementação da espectrometria de massas para as análises de peptídeos e de aminoácidos tornou possível a identificação de centenas de proteínas em experimentos únicos (SALVATO e CARVALHO, 2010).

A MS é um método de determinação preciso de massas molares. Há várias décadas esse método vem se consolidando como ferramenta insubstituível para a determinação de estruturas químicas, principalmente de compostos orgânicos pequenos e voláteis. Durante a década de 1980 foram desenvolvidos novos mecanismos de ionização em espectrômetros de massa para moléculas grandes e polares como peptídeos e proteínas, até então impossíveis de serem analisados por esta técnica, o que permitiu que vários problemas bioquímicos pudessem ser resolvidos (CUNHA, et al., 2006).

A MS é, essencialmente, uma técnica de ionização e fragmentação de moléculas que são, depois, separadas em fase gasosa para obter um espectro segundo a razão massa/carga (m/z) dos fragmentos. Como a maior parte dos íons adquire carga unitária, o espectro seleciona, na prática, as massas e, em teoria, permite a identificação do composto original. Além de fornecer os pesos atômicos e moleculares, a técnica dá informações estruturais e permite o estudo da cinética e do mecanismo de reações além da análise de misturas (VOGEL, 2008).

O princípio de funcionamento de qualquer espectrômetro de massas baseia-se na detecção de íons selecionados de acordo com a sua razão m/z , sendo m a massa em u [massa atômica unificada, chamada também de Dalton (Da)] e z a carga formal. A essência da técnica envolve a geração de íons que são depois detectados. A sofisticação surge nos métodos que são usados para a geração desses mesmos íons e no modo de analisá-los. Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, cada qual com suas vantagens e limitações. Porém, todos apresentam os mesmos componentes básicos: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector e registrador. Um esquema da estrutura básica de um espectrômetro de massas é mostrado na Figura 8 (DINIZ, 2011).

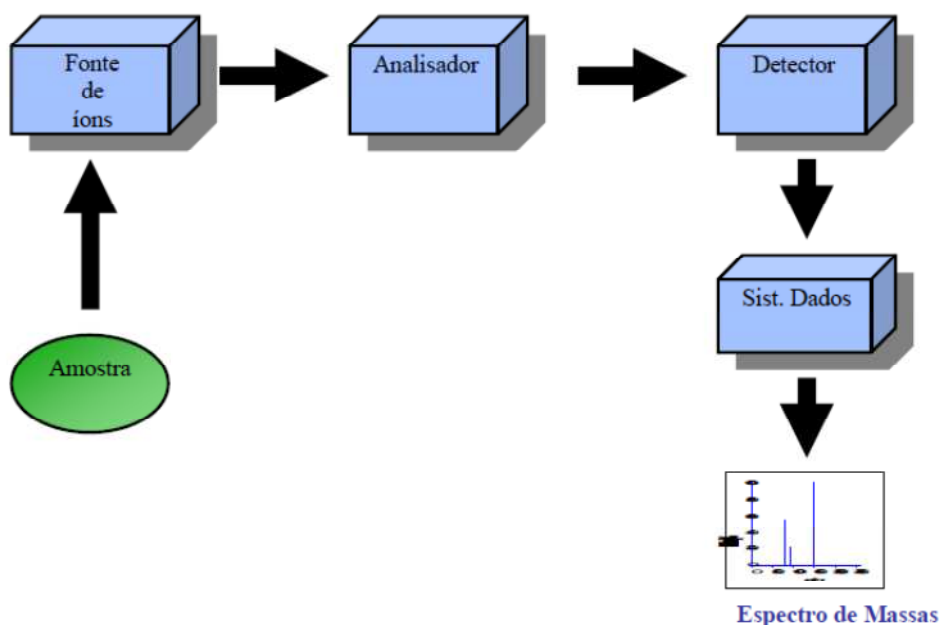


Figura 8: Componentes básicos de um espectrômetro de massas.

Fonte: DINIZ, 2011.

As fontes de ionização possuem a função de ionizar (de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica) e transferir os compostos a serem analisados para a fase gasosa. As principais fontes utilizadas são *Electrospray* (ESI) e *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI). Os analisadores de massas, como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações m/z . Diversos analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros são comercialmente disponíveis e cada um possui aspectos positivos e negativos, de acordo com o experimento planejado e o resultado experimental requerido. Estes analisadores podem ser usados “sozinhos” e de maneira independente ou acoplados entre si, dando origem a equipamentos classificados como híbridos, que fazem uso das vantagens inerentes a cada analisador. Tais equipamentos permitem que experimentos em sequência (*tandem*) sejam realizados, isto é, sendo possível detectar um determinado íon e posteriormente submetê-lo a uma etapa de fragmentação. Uma vez separados, esses íons são detectados por eletromultiplicadoras que constituem os detectores mais largamente usados (CANTÚ et al., 2008). O sucesso dos métodos de ionização ESI e MALDI e o desenvolvimento de analisadores de massa em sequência (*tandem*) levaram a um grande aumento na resolução e sensibilidade do método, tornando-o uma ferramenta essencial nas análises estruturais e químicas de peptídeos e proteínas. Atualmente os espectrômetros de massa permitem selecionar uma só molécula ionizada, fragmentá-la e, através da análise das massas dos fragmentos, conhecer a estrutura da molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a sequência de aminoácidos de um peptídeo (PATTERSON e AEBERSOLD, 2003; MANN e STEEN, 2004; PIMENTA, 2003).

A eletropulverização é uma das técnicas de ionização mais utilizada para a análise de proteínas. Nesse tipo de ionização, a proteína é dissolvida em uma solução acidificada a qual é pulverizada em uma agulha metálica - ou um capilar de vidro revestido de metal - submetida a intenso campo elétrico, o que causa sua ionização. Uma corrente de gás inerte flui no sentido contrário ao da pulverização, o que causa sua dessolvatação. A proteína, já ionizada e no estado gasoso, é atraída para dentro do espectrômetro de massa, onde é analisada. O termo ESI (*electrospray ionization*) é comumente empregado para designar tal técnica (CUNHA et al., 2006).

Há essencialmente três características que fazem com que ESI seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira destas características é a capacidade para produzir íons multiplamente carregados, reduzindo assim a razão m/z , de tal modo que é possível analisar compostos de elevada massa molecular. A segunda característica é que as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último, ESI é uma técnica de ionização suave, provocando pouca (ou nenhuma) fragmentação dos analitos estudados. A Figura 9 ilustra o processo que acontece em uma fonte ESI. Uma solução contendo íons é passada por um capilar onde é aplicada uma alta tensão, positiva ou negativa, ocorrendo então a redução/oxidação de alguns íons (etapa a). Nesta etapa é formado um spray eletrolítico (etapa b). As gotículas carregadas diminuem de tamanho devido à evaporação do solvente (etapa c), até o momento em que são obtidos os íons isolados (etapa d) (DINIZ, 2011).

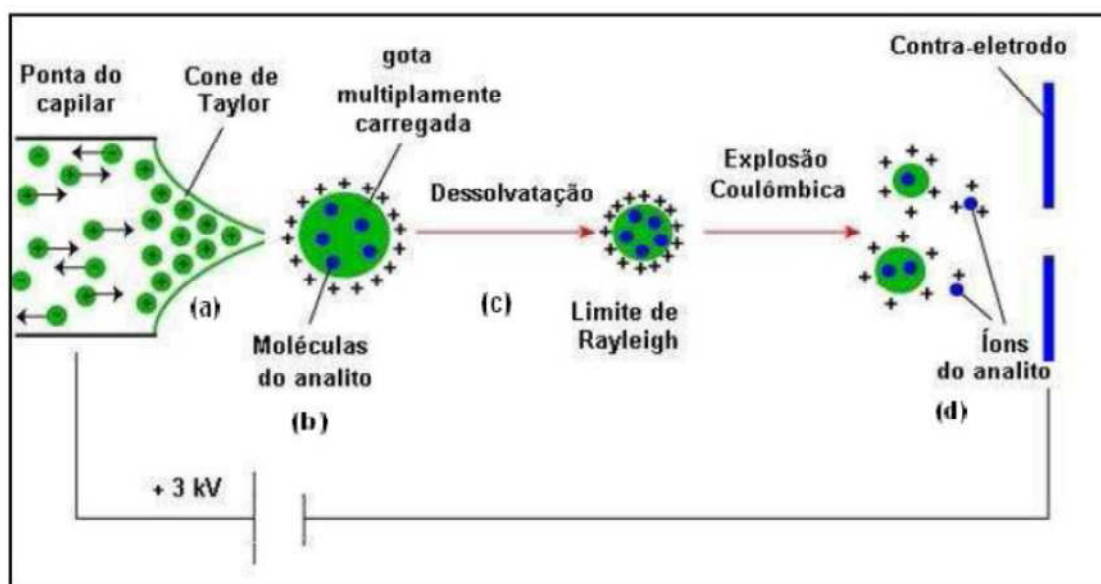


Figura 9: Esquema do processo de formação de íons numa fonte de eletrospray.

Fonte: DINIZ, 2011.

Após serem gerados na fonte de ionização, os íons são transferidos para o analisador de massas, onde sua razão m/z é medida. Os principais analisadores de massa que acompanham os sistemas de ionização por dessorção a *laser* e eletropulverização

são quadrupolo (Q), aprisionamento de íons (*ion trap*) e tempo de voo (TOF – *Time of Flight*) (CUNHA, 2006).

Após o íon de interesse ser formado no espectrômetro de massas, pode-se selecionar o mesmo dentro do analisador de massas e aplicar uma energia para que esse íon se fragmente. Esse processo é conhecido como dissociação induzida por colisão (CID), sendo utilizado em sistemas de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e desempenha um importante papel na determinação estrutural de íons e análises de misturas complexas. O processo CID pode ser dividido em duas etapas: (a) ativação do íon precursor através da colisão com um gás inerte, onde uma fração de sua energia cinética é convertida em energia interna; (b) dissociação unimolecular do íon precursor excitado. A formação de vários fragmentos provenientes da dissociação do íon precursor fornece informações valiosas sobre a estrutura deste íon, necessárias para sua identificação e caracterização (DINIZ, 2011; SCHALLEY, 2000).

Embora seja uma técnica excelente para a identificação de substâncias desconhecidas, a espectrometria de massas exige o uso de substâncias puras. Até mesmo misturas simples tendem a produzir espectros complicados que são, às vezes, de interpretação difícil ou impossível. Por outro lado a quantificação de amostras introduzidas diretamente no espectrômetro é, com frequência, difícil porque pode ser complicado introduzir quantidades conhecidas da substância na fonte de íons e podem ocorrer variações na abundância dos íons produzidos por algumas fontes. Estas dificuldades facilitaram o desenvolvimento de técnicas associadas, capazes de combinar a capacidade de separação de outras técnicas com o espectrômetro de massas e permitindo a introdução no espectrômetro de massas de pequenas quantidades de amostras puras de forma controlada. Os candidatos mais óbvios são os métodos cromatográficos, para os quais se dispõe de interfaces para CG-MS, HPLC-MS, e SFC-MS. Além dessas técnicas de separação, outros métodos podem ser usados. As técnicas de MS-MS, ou espectrometria de massas em sequencia, também podem ser utilizadas sendo que, em muitos aspectos, elas podem ser melhores do que a cromatografia convencional para análise de misturas (VOEGEL, 2008; CUNHA, 2006).

Ainda de acordo com Voegel (2008), a introdução direta de amostras nos espectrômetros de massas muito raramente leva a resultados que podem ser considerados quantitativos, mesmo se a amostra é “pura” e tem um só componente. Isto é consequência da alta sensibilidade da técnica (alguns miligramas, normalmente, são

suficientes para a obtenção do espectro) e da eficiência de ionização, às vezes variável, dependendo das fontes de íons. A grande utilidade da espectrometria de massas está na identificação de substâncias. Como, entretanto, o espectrômetro de massa está frequentemente associado à outra técnica, usualmente CG ou HPLC, ele funciona como detector da frente cromatográfica. Nestas condições, pequenas quantidades, reprodutíveis, da amostra entram no espectrômetro de massas ao eluir da coluna e a análise quantitativa torna-se possível. Nessas técnicas associadas o analista tem a possibilidade de separar misturas complexas, identificar os componentes e quantificá-los em uma única operação. Entretanto, suas possibilidades como técnica analítica são parcialmente reduzidas pela complexidade e custo do aparelho.

Falando especificamente sobre o sequenciamento de proteínas por MS/MS, Cunha (2006) destaca que nesse tipo de análise, inicialmente, uma amostra de peptídeo puro ou mesmo uma mistura de peptídeos obtidos por digestão enzimática é injetada no espectrômetro de massa. No caso mais complexo de mistura de peptídeos, um peptídeo de interesse é selecionado no 1º filtro de massa, introduzido e acelerado em uma câmara de colisão, onde existe uma corrente gasosa de um gás inerte. As colisões entre as moléculas do íon peptídico e do gás inerte provocam a fragmentação da cadeia polipeptídica (CID). As ligações mais lábeis são justamente as ligações peptídicas, seguidas pelas demais ligações da cadeia principal. Assim, um espectro dessa fragmentação é rico em informações de sequencia.

Cantú (2008) descreve o sequenciamento de peptídeos empregando MS em seis etapas, apresentadas a seguir:

- i) As proteínas e/ou peptídeos a serem analisados devem ser primeiramente isolados ou extraídos. Tal procedimento comumente emprega metodologias de extração ou de fracionamento.
- ii) Os peptídeos obtidos podem ser separados por meio das técnicas de cromatografia líquida uni- ou multidimensional, ionizados e transferidos (ESI ou MALDI) para o analisador de massas.
- iii) Nesta etapa o espectro de massas dos peptídeos oriundos da digestão enzimática é adquirido. Este resultado indica a relação m/z e, por consequência, a massa molecular dos peptídeos. Para esse resultado dá-se o nome de *peptide mass fingerprint* (PMF).
- iv) Os peptídeos previamente detectados durante o PMF (chamados de íons precursores) são então isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás

inerte, tal como argônio, nitrogênio ou hélio. O espectro obtido é chamado espectro de fragmentação ou MS/MS.

v) Ao final do processo, os resultados inerentes a massa molecular (MM) dos peptídeos, obtida a partir do PMF, bem como a informação relativa a sequência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (MS/MS), são usados pelos softwares de busca para “localizar” as proteínas nos bancos de dados.

Em relação à identificação de peptídeos e proteínas em cacau por MS não foram encontrados trabalhos na literatura pesquisada.

2.6 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais utilizadas. O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA et al., 2007; BONOLI et al., 2004).

Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006). Dentre os principais métodos utilizados pode-se citar o FRAP (baseado no poder de redução do metal) e o ABTS e DPPH (baseados na captura do radical orgânico) (FRANKEL e MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003). De acordo com Pérez-Jiménez e Sauracalixto (2006), ABTS, FRAP e DPPH são alguns dos mais usados atualmente.

O método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é um método colorimétrico rápido e eficaz para estimar a atividade antiradicalar. O radical DPPH é um composto orgânico estável contendo nitrogênio com uma forte absorção em λ_{\max} 517 nm e uma cor púrpura escura. Depois de reagir com compostos antioxidantes, ele é reduzido e a cor muda para amarela. A mudança pode ser medida por um espectrofotômetro e plotada

contra a concentração. Para expressar a atividade antiradicalar (ou % SRL) utiliza-se o EC50, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação (RUFINO et al., 2007a). Brand-Williams et al. (1995) propuseram o método envolvendo a utilização do DPPH[•], no qual compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de metanol ou etanol. A redução do DPPH[•] é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorbância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH[•] apresenta absorbância a 517 nm, mas sob redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R[•]) a absorbância diminui.

As vantagens do método DPPH são: avaliar uma grande quantidade de amostras rapidamente; um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado; permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol (VEDANA, 2008).

Outra metodologia que tem sido bastante aplicada pelos pesquisadores é o método utilizando o radical ABTS, que apresenta com principais vantagens em relação aos demais, ser utilizado tanto para extratos hidrofílicos como lipofílicos e a forma de expressão dos resultados como valor TEAC (atividade antioxidante total equivalente ao trolox), facilitando assim comparações entre diversos alimentos. O radical ABTS[•], (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) pode ser gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática e normalmente se utiliza o persulfato de potássio. O radical formado é um cromóforo estável quimicamente e com elevada solubilidade em água e um máximo de absorbância de 414 nm com medidas secundárias de absorbâncias de 645, 734 e 815 nm (MILLER et al., 1993; RE et al., 1999; RUFINO, 2007b).

Pulido et al. (2000) descrevem o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power* – Poder Antioxidante de Redução do Ferro) como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas. A reação ocorre pela formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe (III), de cor amarelada. Na presença de um antioxidante, o ferro presente é reduzido, dando origem ao

$[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, de coloração azul escura. A reação acontece em pH de 3,6 e a absorvância máxima é de 593 nm. Os valores de pH tem efeito importante na redução da capacidade antioxidante. Em condições ácidas, a redução da capacidade pode ser suprimida devido à protonação com compostos antioxidantes, enquanto que em meio básico, ocorre a dissociação de prótons de compostos fenólicos que pode aumentar a capacidade de reduzir uma amostra (HUANG et al., 2005). Uma das críticas a esse método consiste no fato de que a capacidade de redução obtida não reflete necessariamente na atividade antioxidante da amostra (ROGINSKY; LISSI, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARO DAS AMÊNDOAS

As amêndoas utilizadas foram doadas por empresas beneficiadoras de cacau da cidade de Ilhéus – BA. Foram obtidos pacotes contendo 1000 g de amêndoas fermentadas e secas classificadas dentro das próprias empresas, em dois grupos: amêndoas de baixa qualidade (ardósia) e amêndoas de boa qualidade (a serem usadas como padrão de formação de aroma durante a torrefação).

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

Os dois grupos de amêndoas assim obtidos (amêndoas de boa qualidade e ardósia) foram moídos com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino que foi armazenado a -18°C, até o momento da utilização.

3.2 TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Alíquotas de 60 g do pó obtido da moagem de ardósia foram pesadas em frascos de 250 mL e adicionadas de 120 mL de água destilada. O pH do meio foi então ajustado para 3,5 por adição de 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 da carboxipeptidase também em quantidade equivalente a 22000 u.a.. Nova incubação (36°C por 8 horas) teve início. A enzima utilizada para o tratamento foi a Flavorzyme®, enzima de origem microbiana contendo atividade de endopeptidase e carboxipeptidase. A escolha por essa enzima foi baseada em estudo prévio conduzido por OLIVEIRA et al. (2011) no qual 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. Amostras obtidas a partir dos diferentes tratamentos enzimáticos foram avaliadas sensorialmente, em relação ao aroma de

chocolate, por Teste de Diferença do Controle e Teste de Ordenação – Preferência. Os testes sensoriais realizados indicaram a enzima microbiana como aquela que produziu características de aroma que mais se aproximam do aroma obtido a partir de amêndoas de cacau bem fermentadas. O material resultante do tratamento enzimático foi seco em estufa de circulação de ar a 50°C por 5 horas e armazenado sob congelamento (-18°C) até o momento da torrefação. O tratamento foi realizado em triplicata.

3.3 TORREFAÇÃO

As amostras a serem submetidas à análise química (material enzimaticamente tratado e seco) foram distribuídas 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). Vale destacar que para a análise de peptídeos as amostras não foram torradas.

Para a obtenção dos padrões partiu-se de amêndoas de cacau de boa qualidade e ardósia 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 aroma de chocolate bem desenvolvido (PB) e pouco desenvolvido (PR), respectivamente, que serviram como padrão para comparações nas análises químicas.

3.4 SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS

Após as etapas de preparo das amêndoas, tratamento enzimático, secagem e torrefação obtiveram-se três grupos de amostras a serem analisados quimicamente, a saber: ardósia que foram enzimaticamente tratadas, secas e torradas (TE); ardósia, torradas, utilizadas como padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate (PR) e amêndoas de cacau suficientemente fermentadas, torradas, utilizadas como padrão de boa qualidade para aroma de chocolate (PB). As três amostras obtidas foram processadas para extração de peptídeos e submetidas à análise por espectrometria de massas, para verificação da presença de peptídeos e determinação de sua sequência.

Para a extração peptídica foi utilizado o protocolo padrão descrito em Castro et al. (2010). Alíquotas de 2 g das amostras foram suspensas em 10 mL de água deionizada a 80 °C, sonicadas e mantidas em banho-maria, na mesma temperatura, por 20 minutos. Para a extração dos peptídeos, a amostra foi acidificada com 10 µL de HCl 0,1 M gelado (concentração final de 10 mM de HCl) e sonicadas três vezes com 20 pulsos de 4 Hz. A amostra foi então centrifugada a 660 x g, por 40 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado. O sobrenadante foi ultracentrifugado (100.000 x g, 60 minutos, 4 °C), transferido para um filtro de exclusão molecular que impede a passagem de moléculas inferiores a 5.000 Da (Millipore, Merk) e centrifugado novamente a 660 x g, por 1 hora, a 4°C. A fração da amostra com menos de 5.000 Da foi limpa em sistema de extração em fase sólida (coluna C18 – Oasis, Waters) e concentrada sob vácuo. Alíquotas de 3,2 µg do pellet resultante foram ressuspensas em 10 µL de ácido fórmico 0,1% (solvente A) e submetidas à análise por cromatografia líquida Easy nLC II (Thermo Scientific, USA) acoplada ao espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific, USA). Os peptídeos foram separados em gradiente de eluição de 5 – 45% de solvente B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila) durante 90 minutos, em um fluxo de 200 nL/min. As amostras foram carregadas em uma prévia coluna (ID 100 µm x OD 360 µm), empacotadas *in house* com 5 cm de partículas Jupiter C18 de 10 µm (Phenomenex) e separadas em coluna analítica com *frit* na ponta (ID 75 µm, OD 360 µm) preparadas e empacotadas *in house* com 15 cm de partículas Acqua C18 de 5 µm (Phenomenex). Os dados foram adquiridos automaticamente em modo dependente (data dependent acquisition, DDA) após geração de múltiplos peptídeos protonados por ionização em eletrôn spray (ESI), seguido de dissociação em MS/MS (Top 10) por colisão com nitrogênio (CID) em intensidade de 10 a 30 eV, voltagem no capilar do nanofluxo de 2,3 KV e temperatura da fonte de 250°C. O tempo de injeção no Ion-Trap foi fixado a 100 ms e a injeção no FT-MS a 1000 ms com resolução de 30000 em m/z 300 – 1800. Para o scan no IT a fragmentação foi realizada com limite mínimo de 5000 counts e exclusão dinâmica em 70 segundos. Os arquivos raw foram analisados no software PEAKS (6.0).

3.4.1 Análise dos resultados

A sequência dos peptídeos detectados foi identificada por sequenciamento *de novo* aplicando o software PEAKS 6.0. Os parâmetros utilizados para a análise estão descritos na Tabela 5. Embora não seja uma técnica quantitativa, uma vez que a intensidade do sinal detectado está diretamente relacionada à capacidade de ionização do composto e não à sua abundância na amostra, os peptídeos identificados com maior grau de certeza pelo software têm uma boa probabilidade de serem também os em maior concentração na amostra, por dois motivos distintos: a) o grau de certeza da identificação é sempre maior quanto maior (mais intenso) for o sinal detectado e b) todas as substâncias analisadas eram compostas por misturas de aminoácidos, o que reduz a possibilidade de existirem grandes diferenças na capacidade de ionização de cada peptídeo. Assim, para a seleção dos peptídeos identificados a serem considerados para análise foi aplicado o valor de ALC% (average local confidence). Esse valor considera o escore individual de cada aminoácido (local confidence %) em relação ao número de aminoácidos do peptídeo e reporta o número de peptídeos sequenciados identificados corretamente. De acordo com o fabricante do software, valores de ALC superiores a 55% são considerados de alta confiança, o que não significa que toda a sequência esteja correta, uma vez que o início e o fim de espectros de massa são de mais difícil sequenciamento de novo, em virtude da redução da relação sinal/ruído.

Tabela 5: Parâmetros para análise e sequenciamento de peptídeos

Parâmetro	
Tolerância de erro dos íons precursoros	5.0 ppm
Tolerância de erro dos íons fragmentos	0.5 Da
Enzima usada para obtenção dos peptídeos	nenhuma
Quantidade máxima de modificações por peptídeo	3
Número de possíveis sequências reportadas para cada peptídeo	5

Para identificação e levantamento de possíveis proteínas de origem dos peptídeos selecionados foi realizada busca no site NCBI BlastP. As sequências de

interesse (sequencia teste) foram lançadas, sendo fornecido, para cada uma delas, todas as sequencias do banco (*subject sequence*) que foram alinhadas com a mesma. Para seleção das possíveis proteínas de origem foram observados dois parâmetros: a) identidade (*ident*) e b) cobertura da sequencia teste (*query coverage*). Dessa forma foram levantadas, em média, 10 possíveis proteínas de origem para cada uma das sequencias teste, sendo todas com valores de *ident* de 100% e valores de *query coverage* entre 44 e 100%. Assim, para cada proteína assim selecionada foi feito um estudo da sequencia completa da mesma no intuito de identificar a sequencia teste na proteína e obter informações dos seus aminoácidos laterais.

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizada a Distribuição de Frequências. Esta consiste no agrupamento de dados em classes, de tal forma que contabilizamos o número de ocorrências em cada classe. O número de ocorrências de uma determinada classe é denominada frequência absoluta (f). O objetivo é apresentar os dados de uma maneira mais concisa e que nos permita extrair informação sobre seu comportamento. A seguir, estão apresentadas algumas definições necessárias à construção da distribuição de frequências.

- Frequência absoluta ou, simplesmente, frequência (f): é o número de observações correspondente a cada classe.
- Frequência relativa (f_r): é o quociente entre a frequência absoluta da classe correspondente e a soma das frequências (total observado).
- Frequência relativa percentual ($f_r \%$): é obtida multiplicando-se a frequência relativa por 100%.
- Frequência acumulada (F): é o total acumulado (soma) de todas as classes anteriores até a classe atual.
- Frequência acumulada relativa (F_r): é o quociente entre a frequência acumulada da classe correspondente e a soma das frequências (total observado).
- Frequência acumulada relativa percentual ($F_r \%$): é obtida multiplicando-se a frequência acumulada relativa por 100%.

3.5 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A concentração de fenólicos totais das amostras foi determinada com o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito em Singleton e Rossi (1965).

Resumidamente, fez-se a reação de 0,50 mL da amostra com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 mol/L durante 4 minutos. Em seguida adicionou-se 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (cerca de 75 g/L) à mistura de reação. As leituras de absorvância foram realizadas a 760 nm, após a incubação à temperatura ambiente por 2 h. O ácido gálico foi usado como padrão de referência e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 g de amostra. As análises foram feitas em triplicata. Foram utilizadas quatro soluções de extração, a saber: metanol, metanol 50%, sequencial e acetona 70%.

3.5.1 Análise dos resultados

Os dados obtidos foram exportados para o programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2007) e submetidos à análise de variância ANOVA. Utilizou-se o teste de Tuckey para comparação das médias das amostras ao nível de 5% de significância.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH (expresso como % DPPH, μmol Trolox, μmol ácido ascórbico), ABTS (μmol Trolox e μmol ácido ascórbico) e FRAP (μmol sulfato ferroso) conforme procedimentos descritos em Brand-Williams et al. (1995), Rufino et al. (2007b) e Rufino et al. (2006), respectivamente. Foram utilizadas, para cada método, quatro soluções de extração, a saber: metanol, metanol 50%, sequencial (acetona 70% seguido de metanol 50%) e acetona 70%.

3.6.1 Obtenção do extrato

Pesou-se 1,25 g de amostra e fez-se a adição de 5 mL da solução extratora sendo a mistura homogeneizada e deixada em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi então, sonicada por 30 minutos. Procedeu-se a filtração em papel filtro e avolumou-se para 25 mL com água destilada. Especificamente para a solução extratora sequencial, fez-se a adição de 5 mL de solução de acetona 70% e 5 mL de solução de metanol 50%.

3.6.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A partir dos extratos obtidos no item anterior, foram preparadas as diluições em triplicata. Em ambiente escuro, uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato foi transferida para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (solução DPPH x mM) e homogeneizada em agitador de tubos. Da mesma forma, 0,1 mL da solução controle (solução controle de álcool metílico, acetona e água) foi transferido para tubos de ensaio contendo 3,9 mL do radical DPPH e a mistura foi homogeneizada. Álcool metílico foi utilizado, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras no espectrofotômetro foram feitas a 517 nm. Vale destacar que tais leituras foram monitoradas a cada minuto, de modo a observar a redução da absorvância até sua estabilização. A leitura da absorvância final foi feita após a estabilização da mesma.

3.6.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

O ensaio com o radical livre ABTS foi obtido pela reação ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 μ M, concentração final). O sistema foi mantido em repouso, a temperatura ambiente por 16 horas em ausência de luz. Uma vez formado o radical $ABTS^{\bullet+}$, diluiu-se com etanol até obter um valor de absorvância entre 700 e 705 nm.

A partir do extrato obtido no item 3.6.1, preparou-se as diluições em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical $ABTS^{\bullet+}$ e homogeneizou-se em agitador de tubos. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 734 nm após 6 minutos da mistura sendo utilizado o álcool etílico como branco, para calibrar o equipamento. A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos foi possível determinar a equação da reta para cálculo da atividade antioxidante total.

3.6.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP

A partir do extrato obtido no item 3.6.1, preparou-se as diluições em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio, acrescentando-se em seguida 270 μ L de água destilada. Fez-se a

adição de 2,7 mL do reagente FRAP e a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e mantida em banho-maria a 37°C. As leituras de absorvância foram feitas a 595 nm após 30 minutos da mistura preparada utilizando-se o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos foi possível determinar a equação da reta para cálculo da atividade antioxidante total.

3.6.5 Análise dos resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste Tuckey de comparação de médias ao nível de 5% de significância com auxílio do Programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2007).

3.7 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO DE VIABILIDADE

Um plano de negócio é um documento que descreve os objetivos de um negócio e quais passos devem ser dados para que esses objetivos sejam alcançados, diminuindo os riscos e as incertezas. A tecnologia de tratamento enzimático de ardósia para melhoria do aroma de chocolate apresenta-se de forma bastante promissora dados os resultados de testes realizados por Oliveira et al. (2011). Diante disso e da boa possibilidade de gerar, com base nessa tecnologia, um empreendimento promissor, os pesquisadores envolvidos no projeto buscaram parceria com o Instituto para o Desenvolvimento de Empresas de Base Tecnológica (Instituto EBT) que integra o Parque Tecnológico de Belo Horizonte (BH.TEC).

Foram realizadas reuniões na sede do Instituto EBT das quais resultou um estudo de viabilidade. Neste foi feita, inicialmente, a caracterização da tecnologia e levantamento da oportunidade real de negócio; descrição do mercado no qual a tecnologia se insere, bem como de seus aspectos regulatórios; descrição da oportunidade de negócios com levantamento de ameaças, forças, fraquezas e estratégias de comercialização; levantamento de barreiras e riscos relativos ao projeto. A partir da análise das informações levantadas foi possível obter conclusões no que se refere à viabilidade do negócio.

4 RESULTADOS

4.1 SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS

Com base nas condições de análise apresentadas anteriormente (item 3.4) foram realizados 8882 MS scans para a amostra de ardósia tratada enzimaticamente (TE). Destes, 6834 scans seguiram para espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) sendo que um total de 1004 peptídeos foram sequenciados. O cromatograma obtido, em contagem total de íons (TIC total ion count), está apresentado na Figura 10.

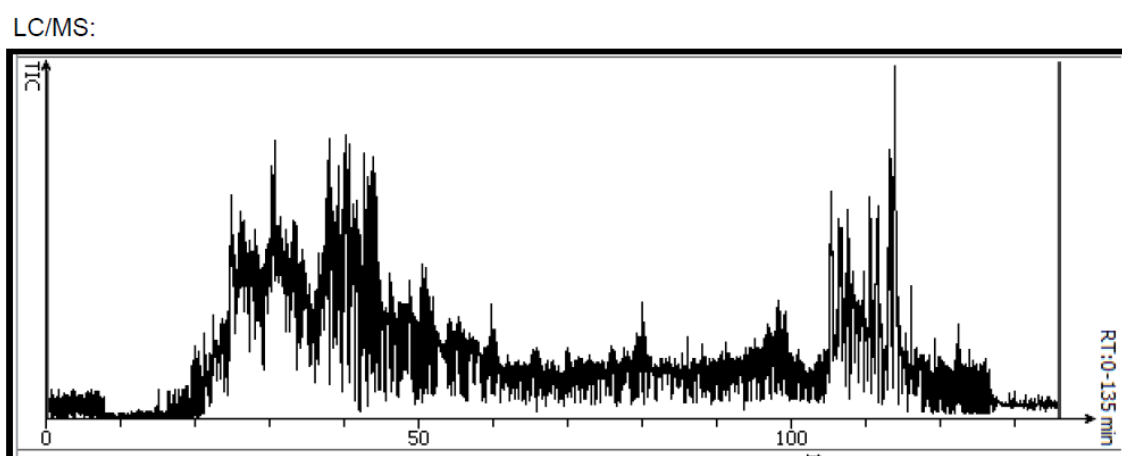


Figura 10: Cromatograma da amostra TE

A Tabela 6 lista as sequências dos peptídeos da amostra TE identificados com grau de confiança igual ou superior a 90% (ALC%).

Tabela 6: Sequências de peptídeos com grau de confiança igual ou superior a 90% encontrados na amostra TE.

Peptídeo	Tamanho da sequência	ALC (%)	m/z	z	Massa	ppm	Confiança local (%)
Leucina Leucina Treonina Arginina Prolina	5	97	3.001.974	2	5.983.802	0.0	99 99 99 95 95
Fenilalanina Glutamato Leucina Leucina Glicina Serina Histidina	7	95	4.017.084	2	8.014.021	0.1	96 99 98 92 89 96 96
Metionina Lisina Alanina Leucina Prolina Lisina Lisina	7	92	4.082.611	2	8.145.098	-2.6	90 95 93 95 90 89 96
Leucina Aspartato Asparagina Tirosina Aspartato Asparagina Serina Alanina Glicina Lisina Valina Serina	12	91	6.417.975	2	12.815.837	-2.5	80 91 96 99 100 96 99 99 99 99 73 63
Aspartato Prolina Valina Valina Leucina Serina Treonina	7	90	3.657.032	2	7.293.909	1.4	89 93 92 93 92 86 86

Os espectros de massas relativos a esses peptídeos estão apresentados nas Figuras 11 a 15. Nesses espectros é possível observar os fragmentos complementares b e y.

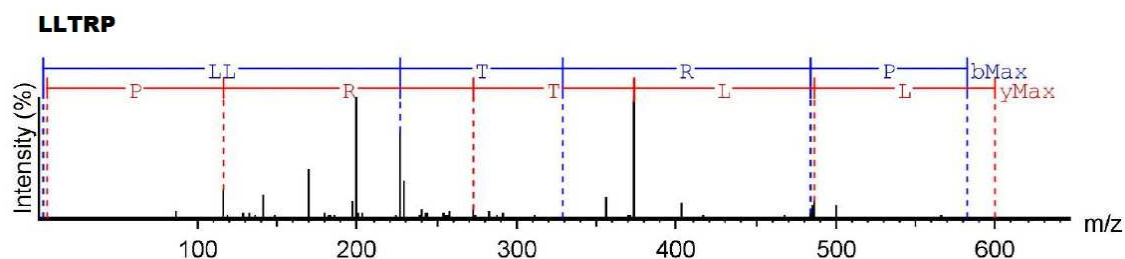


Figura 11: Espectro de massas do peptídeo Leucina Leucina Treonina Arginina Prolina / amostra TE.

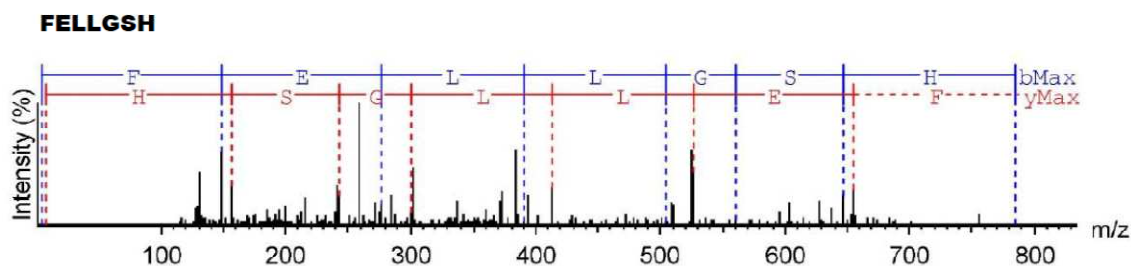


Figura 12: Espectro de massas do peptídeo Fenilalanina Glutamato Leucina Leucina Glicina Serina Histidina / amostra TE.

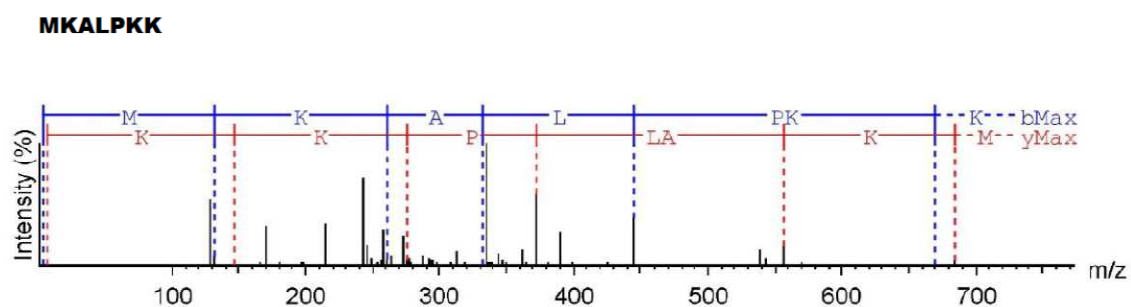


Figura 13: Espectro de massas do peptídeo Metionina Lisina Alanina Leucina Prolina Lisina Lisina / amostra TE.

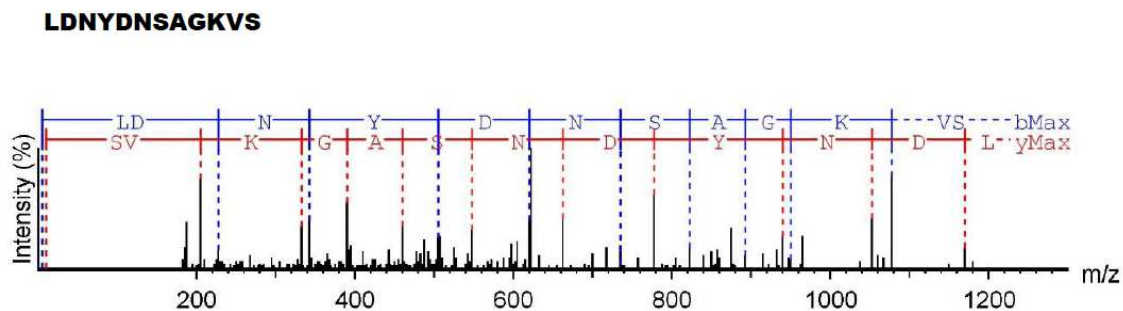


Figura 14: Espectro de massas do peptídeo Leucina Aspartato Asparagina Tirosina Aspartato Asparagina Serina Alanina Glicina Lisina Valina Serina / amostra TE.

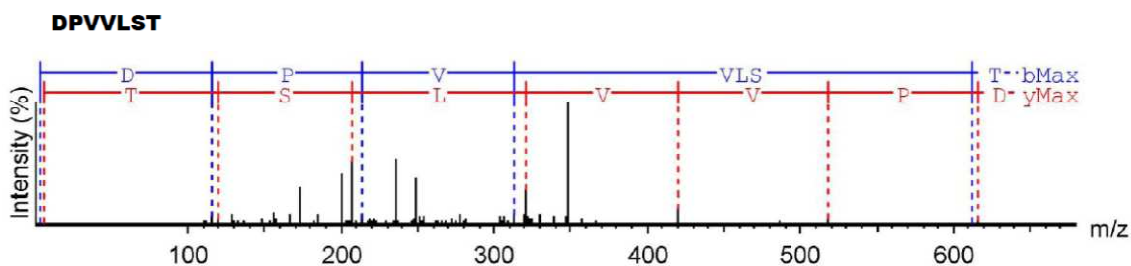


Figura 15: Espectro de massas do peptídeo Aspartato Prolina Valina Valina Leucina Serina Treonina / amostra TE.

Para a amostra de amêndoas de cacau de boa qualidade (PB), considerada padrão de aroma de chocolate bem desenvolvido, foram realizados 8877 MS scans. Destes 6004 seguiram para MS/MS sendo que um total de 272 peptídeos foram sequenciados. O cromatograma obtido, em contagem total de íons (TIC total ion count), pode ser observado na Figura 16.

LC/MS: amostra PB

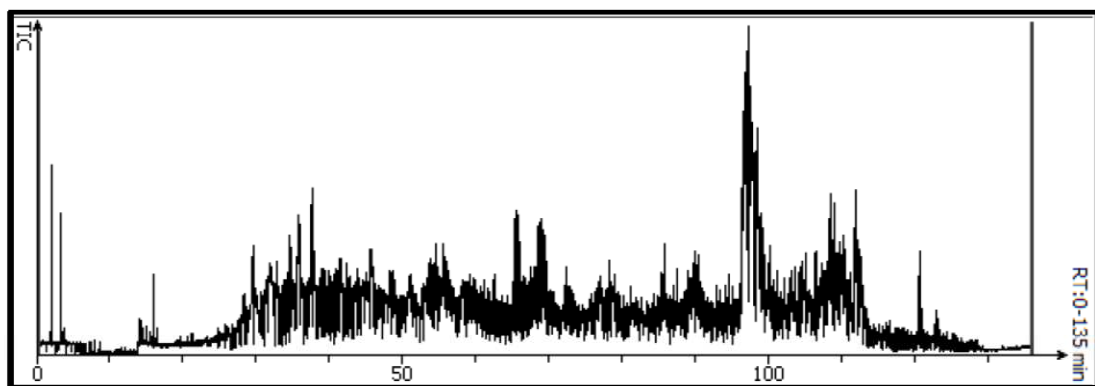


Figura 16: Cromatograma da amostra PB

A Tabela 7 lista a sequência do peptídeo da amostra PB com mais de 90% de grau de confiança.

Tabela 7: Sequência de peptídeos com grau de confiança igual ou superior a 90% encontrados na amostra PB.

Peptídeo	Tamanho da sequência	ALC (%)	m/z	z	Massa	ppm	Confiança local (%)
Leucina Aspartato Asparagina Tirosina Aspartato Asparagina Serina Alanina Glicina Lisina Triptofano	11	96	6.417.898	2	12.815.625	2.0	82 92 97 100 100 99 98 98 99 99 95

O espectro de massas relativo a esse peptídeo pode ser observado na Figura 17.

LDNYDNSAGKW

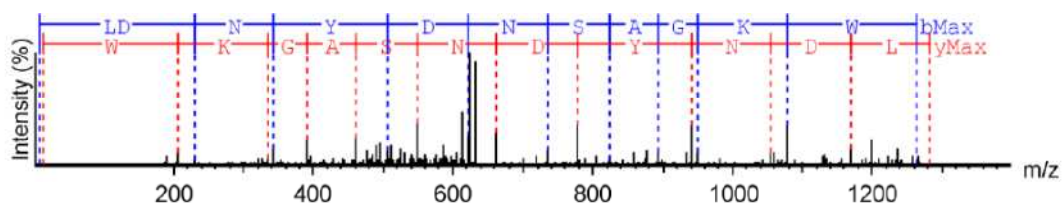


Figura 17: Espectro de massas do peptídeo Leucina Aspartato Asparagina Tirosina Aspartato Asparagina Serina Alanina Glicina Lisina Triptofano / amostra PB

Para a amostra de ardósia (PR), considerada padrão de aroma de chocolate pouco desenvolvido, foram realizados 8646 MS scans. Destes 7683 seguiram para MS/MS sendo que um total de 1686 peptídeos foi sequenciado. O cromatograma obtido, em contagem total de íons (TIC, total ion count), está apresentado na Figura 18.

LC/MS: amostra PR

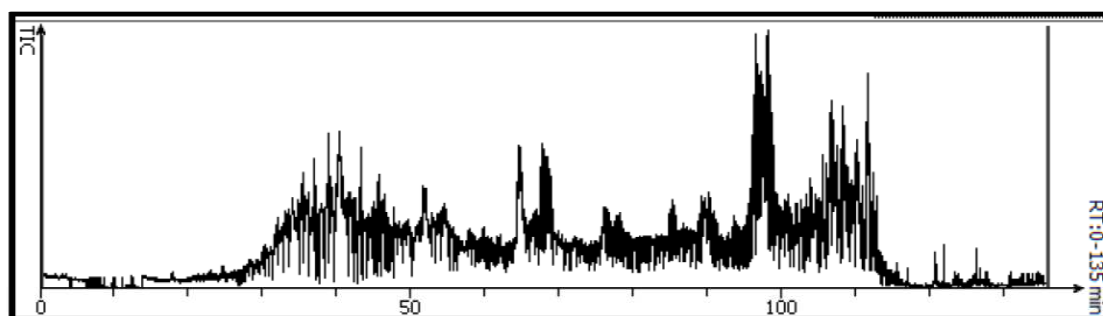


Figura 18: Cromatograma da amostra PR

A Tabela 8 lista as sequências dos peptídeos da amostra PR com mais de 90% de grau de confiança.

Tabela 8: Sequências de peptídeos com grau de confiança igual ou superior a 90% encontrados na amostra PR.

Peptídeo	Tamanho da sequência	ALC (%)	m/z	z	Massa	ppm	Confiança local (%)
Lisina Valina Leucina Aspartato Fenilalanina Lisina Prolina Valina Valina	9	94	5.228.265	2	10.436.379	0.4	92 96 97 91 95 95 97 96 93
Leucina Serina Fenilalanina Glicina Valina Alanina Leucina Lisina Leucina	9	93	4.742.985	2	9.465.851	-2.9	89 93 98 98 98 94 93 91 90
Aspartato Glutamato Glutamato Glicina Aspartato Fenilalanina Lisina Leucina Leucina Lisina Fenilalanina Glicina Aspartato	10	93	5.973.084	2	11.925.974	4.1	85 97 100 99 94 90 89 96 95 88
Serina Prolina Tirosina Histidina Fenilalanina Leucina	9	92	5.417.532	2	10.814.868	4.6	94 94 99 100 99 97 95 80 74
Valina Leucina Glutamato Tirosina Leucina Leucina Leucina	7	92	4.317.695	2	8.615.211	3.9	79 91 96 86 96 98 98
Leucina Glicina Leucina Glicina Treonia Prolina Treonina Lisina Lisina Fenilalanina	10	91	5.313.215	2	10.606.279	0.6	92 89 97 98 99 82 77 93 95 89
Arginina Alanina Histidina Valina Prolina Leucina	6	90	3.467.150	2	6.914.129	3.6	90 87 82 93 95 97

Os espectrogramas de massas relativos a esses peptídeos podem ser observados na Figuras 19 a 25.

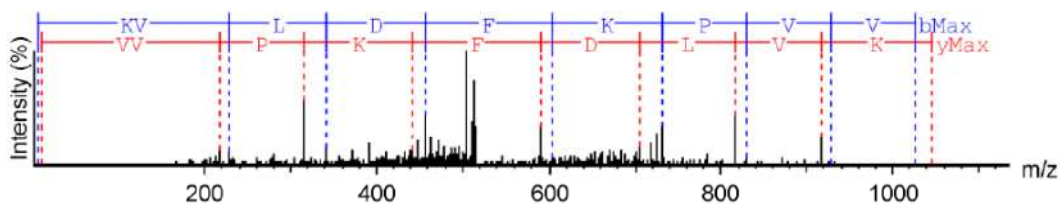
KVLDFKPVV

Figura 19: Espectro de massas do peptídeo Lisina Valina Leucina Aspartato Fenilalanina Prolina Valina Valina / amostra PR

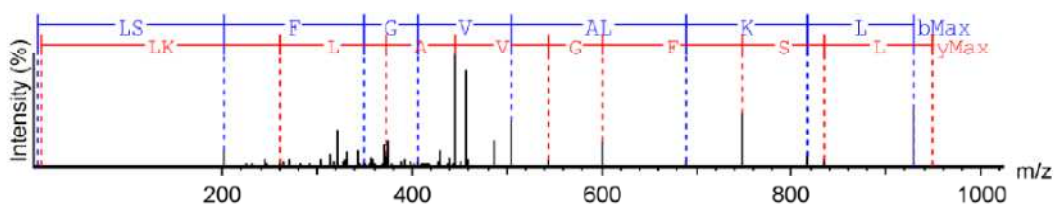
LSFGVALKL

Figura 20: Espectro de massas do peptídeo Leucina Serina Fenilalanina Glicina Valina Alanina Leucina Lisina Leucina / amostra PR

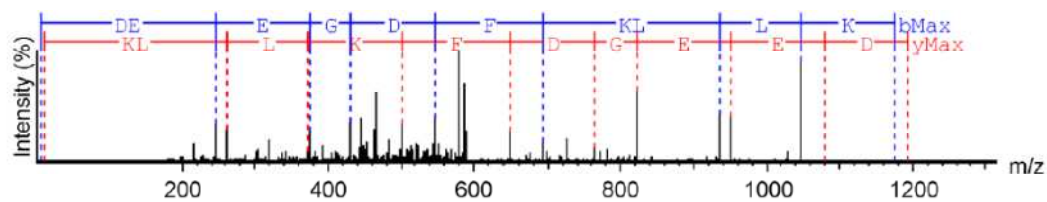
DEEGDFKLLK

Figura 21: Espectro de massas do peptídeo Aspartato Glutamato Glutamato Glicina Aspartato Fenilalanina Lisina Leucina Leucina Lisina / amostra PR

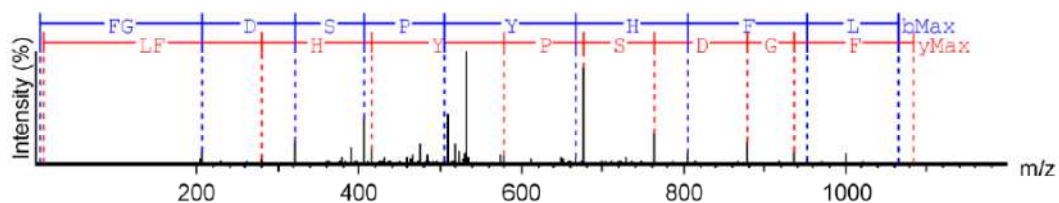
FGDSPYHFL

Figura 22: Espectro de massas do peptídeo Fenilalanina Glicina Aspartato Serina Prolina Tirosina Histidina Fenilalanina Leucina / amostra PR

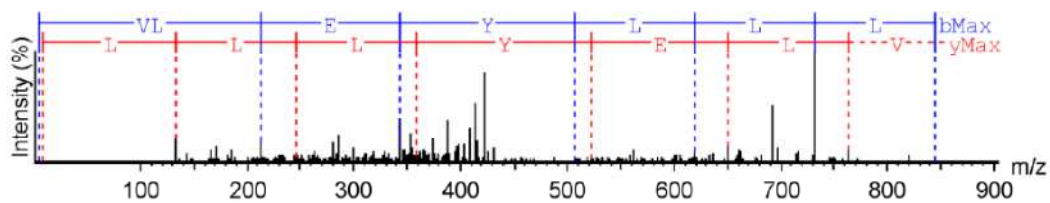
VLEYLLL

Figura 23: Espectro de massas do peptídeo Valina Leucina Glutamato Tirosina Leucina Leucina Leucina / amostra PR

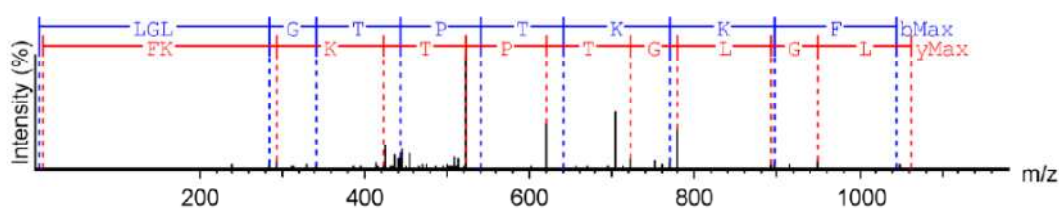
LGLGTPKKF

Figura 24: Espectro de massas do peptídeo Leucina Glicina Leucina Glicina Treonina Prolina Treonina Lisina Lisina Fenilalanina / amostra PR

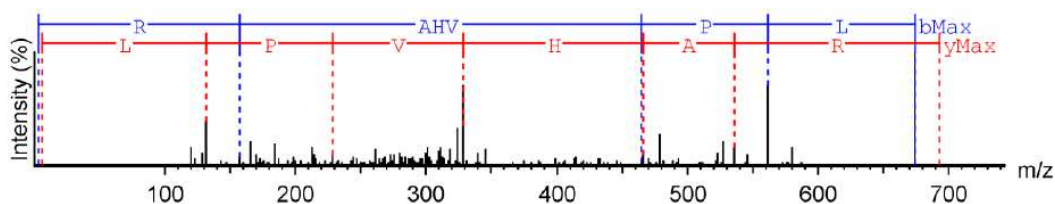
RAHVPL

Figura 25: Espectro de massas do peptídeo Arginina Alanina Histidina Valina Prolina Leucina / amostra PR

4.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

Os resultados da determinação da concentração de fenólicos nas amostras TE, PB e PR estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Concentração de fenólicos (mg ácido gálico/100g amostra) nas amostras PB, TE e PR.

Solução de extração	PB'	PB''	PB'''	TE'	TE''	TE'''	PR'	PR''	PR'''
I	659,73	659,73	663,23	326,42	333,90	330,80	861,80	865,09	868,39
II	788,48	791,85	801,93	1150,91	1165,84	1158,37	1669,84	1679,71	1674,78
III	1203,32	1206,83	1205,07	1814,24	1821,70	1817,97	1020,91	1027,49	1024,20
IV	1250,69	1254,10	1264,34	1493,65	1481,19	1487,42	2348,98	2355,55	2352,27

Soluções de extração: I - Metanol; II - Metanol 50%; III - Sequencial (Acetona 70% seguido de Metanol 50%); IV - Acetona 70%. Amostras: TE - ardósia tratadas enzimaticamente; PB - amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR - amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados da determinação da atividade antioxidante nas amostras TE, PB e PR estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Atividade antioxidante nas amostras PB, TE e PR pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP.

Amostra	Soluções de extração	% DPPH	DPPH	DPPH	ABTS	ABTS	FRAP
			$\mu\text{mol Trolox}$	$\mu\text{mol Ascorbic Acid}$	$\mu\text{mol Trolox}$	$\mu\text{mol Ascorbic Acid}$	$\mu\text{mol Ferrous sulphate}$
PB	I	67,65	682,48	605,30	1250,77	802,09	146,36
	II	70,86	662,31	589,39	1395,06	908,11	148,67
	III	72,38	1001,03	811,92	2600,09	1267,42	297,29
	IV	71,82	990,48	760,22	1517,96	1095,84	291,58
TE	I	27,37	510,21	381,68	936,52	610,58	78,56
	II	11,25	864,58	744,43	1566,58	938,23	208,29
	III	17,20	1208,50	1033,61	1988,07	1213,597	213,67
	IV	33,30	3522,52	2808,12	2772,28	1700,42	228,56
PR	I	56,04	2147,38	1585,20	464,23	264,22	225,54
	II	83,42	4375,68	3097,58	2171,86	1101,33	449,96
	III	58,58	2432,71	1897,31	1321,68	753,78	261,00
	IV	30,50	1834,88	1312,91	1698,52	1004,20	179,50

Soluções de extração: I - Metanol; II - Metanol 50%; III - Sequencial (Acetona 70% seguido de Metanol 50%); IV - Acetona 70%. Amostras: TE - ardósia tratadas enzimaticamente; PB - amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR - amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

4.4 ESTUDO DE VIABILIDADE

O estudo de viabilidade elaborado em parceria com o Instituto EBT apresenta a caracterização da tecnologia de tratamento enzimático de ardósia para melhoria do aroma e, conseqüentemente, da qualidade global, do chocolate obtido a partir dessas amêndoas trazendo um levantamento da oportunidade real de negócio. O estudo traz ainda a descrição do mercado no qual a tecnologia se insere, bem como de seus aspectos regulatórios; descrição da oportunidade de negócios com levantamento de ameaças, forças, fraquezas e estratégias de comercialização; levantamento de barreiras e riscos relativos ao projeto. O Estudo de viabilidade elaborado está apresentado, na íntegra, no Anexo A.

5 DISCUSSÃO

5.1 SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS

De acordo com a teoria defendida por Voigt et al. (1993, 1994a) os aminoácidos hidrofóbicos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina liberados por atividade de proteases na fermentação são importantes contribuintes para o aroma final de chocolate, juntamente com os açúcares redutores frutose e glicose derivados da hidrólise de sacarose. Voigt et al. (1993, 1994a e 1994c) afirmam que peptídeos hidrofóbicos são gerados quando proteínas são degradadas pela endoprotease aspártica de amêndoas de cacau, sendo que estes peptídeos hidrofóbicos precisam ser transformados em uma mistura de oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos livres predominantemente hidrofóbicos para obter-se os precursores de aroma específicos de chocolate. Usando proteínas de amêndoas de cacau purificadas, Voigt et al. (1994b) mostraram que a fração globulina, e não a fração albumina de amêndoas de cacau, constitui substrato adequado para a geração de precursores de aroma típicos. Partindo-se dessas teorias os dados obtidos nesse estudo foram analisados com relação à: 1) presença de aminoácidos importantes para o aroma de chocolate; 2) localização desses aminoácidos importantes na cadeia peptídica; 3) proteínas de origem dos peptídeos sequenciados; 4) polaridade dos aminoácidos nos peptídeos sequenciados; 5) polaridade dos aminoácidos laterais aos peptídeos sequenciados.

Inicialmente realizou-se uma análise criteriosa dos peptídeos identificados e sequenciados pela metodologia descrita no item 3.4, identificando-se e registrando-se a presença dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas amostras TE, PB e PR. Diante da grande quantidade de peptídeos sequenciados foi realizada, inicialmente, uma seleção a partir da verificação do grau de confiança de cada aminoácido (local confidence) presente nos peptídeos, selecionando-se apenas aqueles nos quais esse parâmetro foi igual ou superior a 70%. Os resultados dessa análise podem ser observados nas Tabelas 11, 12 e 13, que complementam as Tabelas 6, 7 e 8, uma vez que incluem peptídeos que foram sequenciados com grau de confiança entre 80 e 90%.

Tabela 11: Concentração dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina em peptídeos sequenciados com grau de confiança $\geq 80\%$ na amostra TE.

AMOSTRA TRATADA ENZIMATICAMENTE (TE)										
	Peptídeo	ALC (%)	m/z	ppm	Confiança local (%)	Frequência	% no peptídeo	% no total de peptídeos		
1	Leucina Leucina Treonina Arginina Prolina	97	3.001.974	0.0	99 99 99 95 95	2	40,00	1,54		
2	Fenilalanina Glutamato Leucina Leucina Glicina Serina Histidina	95	4.017.084	0.1	96 99 98 92 89 96 96	3	42,86	2,31		
3	Metionina Lisina Alanina Leucina Prolina Lisina Lisina	92	4.082.611	-2.6	90 95 93 95 90 89 96	2	28,57	1,54		
4	Leucina Aspartato Asparagina Tirosina Aspartato Asparagina Serina Alanina Glicina Lisina Valina Serina	91	6.417.975	-2.5	80 91 96 99 100 96 99 99 99 99 73 63	3	25,00	2,31		
5	Aspartato Prolina Valina Valina Leucina Serina Treonina	90	3.657.032	1.4	89 93 92 93 92 86 86	1	14,29	0,77		
6	Alanina Glutamato Glutamato Triptofano Fenilalanina Glicina Arginina Glutamato	88	5.122.316	2.8	80 88 97 91 97 77 85 94	1	12,50	0,77		
7	Triptofano Alanina Leucina Fenilalanina Valina Prolina Histidina	88	4.352.360	-2.4	74 88 98 99 90 83 89	3	42,86	2,31		
8	Prolina Glutamato Leucina Valina Alanina Arginina Arginina	87	4.207.569	1.9	70 95 98 93 85 85 84	2	28,57	1,54		
9	Leucina Leucina Asparagina Prolina Triptofano Glicina Glutamina Arginina Leucina	87	5.488.177	1.9	98 98 96 92 91 82 84 70 76	3	33,33	2,31		
10	Triptofano Lisina Prolina Treonina Glicina Tirosina	86	3.761.908	-4.0	95 91 69 79 87 95	1	16,67	0,77		
11	Fenilalanina Prolina Leucina Treonina Prolina Valina Alanina Histidina	86	4.412.481	1.2	93 85 97 97 79 82 92 71	3	37,50	2,31		
12	Glutamato Aspartato Alanina Glicina Aspartato Asparagina Lisina Leucina Leucina Serina Tirosina	86	6.127.902	-0.8	91 83 95 85 96 84 89 86 83 71 86	4	36,36	3,08		
13	Glutamato Prolina Leucina Valina Alanina Arginina Arginina	85	4.207.569	1.9	87 72 98 93 84 84 83	2	28,57	1,54		
14	Alanina Leucina Prolina Glicina Asparagina Alanina Valina Leucina Triptofano	85	4.707.657	-1.1	75 90 89 78 74 81 94 98 94	4	44,44	3,08		
15	Leucina Leucina Serina Alanina Lisina Prolina	84	3.147.039	-3.7	78 90 92 84 89 72	3	50,00	2,31		
16	Aspartato Glicina Leucina Alanina Valina Fenilalanina	81	3.111.658	0.2	79 79 78 79 83 94	3	50,00	2,31		
17	Leucina Glicina Glicina Alanina Asparagina Prolina Tirosina Prolina	80	3.947.011	1.5	80 72 74 76 81 89 93 82	3	37,50	2,31		
Total	-	-	-	-	-	43	-	33,11		

Aminoácidos realçados de amarelo são apontados como importantes contribuintes para o aroma final de chocolate. Aminoácidos marcados em vermelho são hidrofílicos.

Tabela 12: Concentração dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina em peptídeos sequenciados com grau de confiança $\geq 80\%$ na amostra PB.

AMOSTRA COM AROMA DE CHOCOLATE BEM DESENVOLVIDO (PB)									
	Peptídeo	ALC (%)	m/z	ppm	Confiança local (%)	Frequência	% no peptídeo	% no total de peptídeos	
1	Leucina Aspartato Asparagina Tirosina Aspartato Asparagina Serina Alanina Glicina Lisina Triptofano	96	6.417.898	2.0	82 92 97 100 100 99 98 98 99 99 95	3	27,27	13,64	
2	Leucina Aspartato Lisina Serina Leucina Treonina	88	3.386.989	4.5	76 94 94 94 93 77	2	33,33	9,09	
3	Fenilalanina Leucina Leucina Leucina Tirosina	85	3.347.037	-2.4	82 92 99 72 82	5	100,00	22,73	
Total	-	-	-	-	-	10	-	45,46	

Aminoácidos realçados de amarelo são apontados como importantes contribuintes para o aroma final de chocolate. Aminoácidos marcados em vermelho são hidrofílicos.

Tabela 13: Concentração dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina em peptídeos sequenciados com grau de confiança $\geq 80\%$ na amostra PR.

AMOSTRA COM AROMA DE CHOCOLATE POUCO DESENVOLVIDO (PR)									
	Peptídeo	ALC (%)	m/z	Ppm	Confiança local (%)	Frequência	% no peptídeo	% no total de peptídeos	
1	Lisina Valina Leucina Aspartato Fenilalanina Lisina Prolina Valina Valina	94	5.228.265	0.4	92 96 97 91 95 95 97 96 93	2	22,22	1,68	
2	Leucina Serina Fenilalanina Glicina Valina Alanina Leucina Lisina Leucina	93	4.742.985	-2.9	89 93 98 98 98 94 93 91 90	5	55,56	4,20	
3	Aspartato Glutamato Glutamato Glicina Aspartato Fenilalanina Lisina Leucina Leucina Lisina	93	5.973.084	4.1	85 97 100 99 94 90 89 96 95 88	3	30,00	2,52	
4	Fenilalanina Glicina Aspartato Serina Prolina Tirosina Histidina Fenilalanina Leucina	92	5.417.532	4.6	94 94 99 100 99 97 95 80 74	4	44,44	3,36	
5	Valina Leucina Glutamato Tirosina Leucina Leucina Leucina	92	4.317.695	3.9	79 91 96 86 96 98 98	5	71,43	4,20	
6	Leucina Glicina Leucina Glicina Treonina Prolina Treonina Lisina Lisina Fenilalanina	91	5.313.215	0.6	92 89 97 98 99 82 77 93 95 89	3	30,00	2,52	
7	Arginina Alanina Histidina Valina Prolina Leucina	90	3.467.150	3.6	90 87 82 93 95 97	2	33,33	1,68	
8	Fenilalanina Alanina Treonina Treonina Lisina Alanina Glicina Prolina Leucina	89	4.532.560	-4.7	94 97 87 86 88 98 95 84 79	4	44,44	3,36	
9	Metionina Prolina Lisina Prolina Lisina	89	3.006.819	4.7	97 97 99 73 81	0	0,00	0,00	
10	Serina Alanina Glicina Serina Valina Lisina	88	2.746.548	-2.7	88 94 91 83 84 92	1	16,67	0,84	
11	Fenilalanina Lisina Leucina Glutamato Lisina Lisina Valina Leucina	88	5.028.280	-1.5	82 93 100 99 93 82 79 80	3	37,50	2,52	
12	Fenilalanina Glicina Valina Arginina Arginina	88	3.176.928	0.0	95 90 95 79 79	1	20,00	0,84	
13	Leucina Fenilalanina Valina Prolina Glutamato Alanina Histidina Fenilalanina	87	4.802.510	-3.9	96 97 99 90 92 74 79 73	4	50,00	3,36	
14	Fenilalanina Valina Lisina Serina Glicina Lisina Glicina Treonina Leucina Treonina Fenilalanina	87	5.928.398	4.1	92 92 80 85 82 86 70 83 97 96 93	3	27,27	2,52	
15	Leucina Leucina Tirosina Valina Prolina Leucina Arginina	86	4.372.797	-3.9	84 75 76 99 93 90 85	4	57,14	3,36	
Total	-	-	-	-	-	44	-	36,96	

Aminoácidos realçados de amarelo são apontados como importantes contribuintes para o aroma final de chocolate. Aminoácidos marcados em vermelho são hidrofílicos.

Através da análise dos resultados apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13 é possível concluir que, com exceção do peptídeo 9 da amostra PR, todos os peptídeos analisados apresentam pelo menos um dos aminoácidos hidrofóbicos apontados por Voigt et al (1993, 1994a) como importantes para o aroma final de chocolate. Diante da grande quantidade de dados apresentados nestas tabelas e com a finalidade de facilitar e organizar a compreensão propiciando a análise estatística dos dados, procedeu-se a transformação das informações de frequência (ocorrência dos aminoácidos importantes para o aroma desejado) e quantificação (% de aminoácidos importantes para o aroma desejado por peptídeo) em uma distribuição de frequências para os aminoácidos leucina, alanina fenilalanina e tirosina nos peptídeos analisados, a qual está apresentada na Tabela 14.

Tabela 14: Distribuição de frequências dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nos peptídeos analisados.

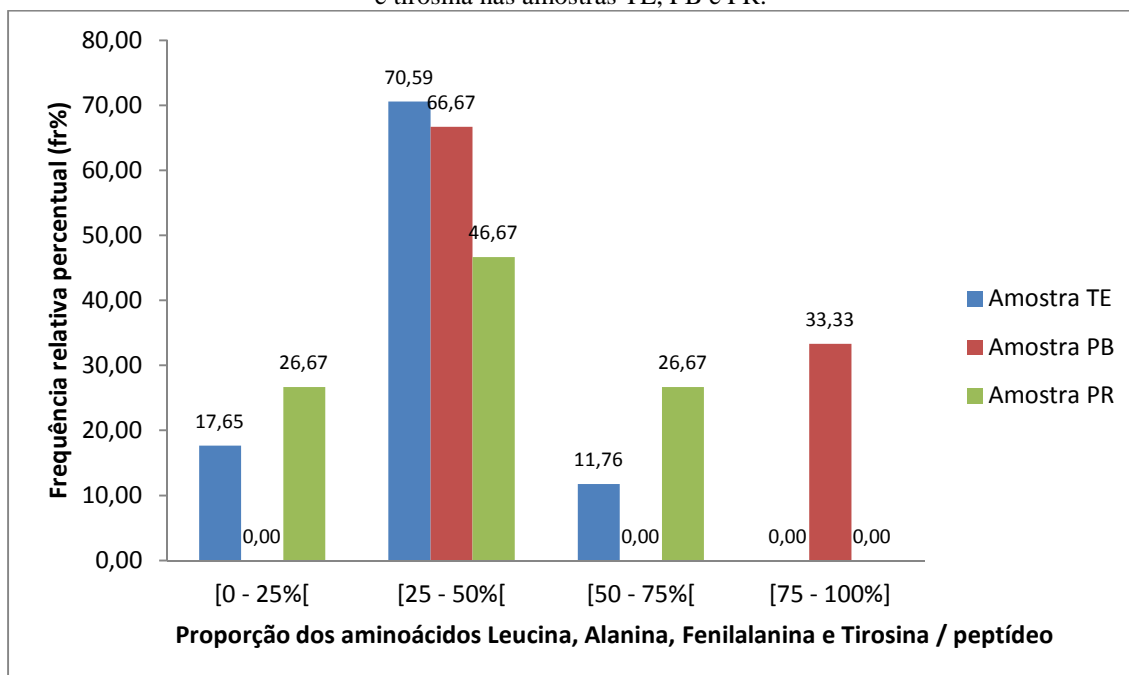
Proporção dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina na cadeia peptídica	AMOSTRA TE				AMOSTRA PB				AMOSTRA PR			
	F	f _r %	F	F _r %	F	f _r %	F	F _r %	f	f _r %	F	F _r %
[0 - 25%[3	17,65	3	17,65	0	0,00	0	0,00	4	26,67	4	26,67
[25 - 50%[12	70,59	15	88,24	2	66,67	2	66,67	7	46,67	11	73,34
[50 - 75%[2	11,76	17	100,00	0	0,00	2	66,67	4	26,67	15	100,01
[75 - 100%]	0	0,00	17	100,00	1	33,33	3	100,00	0	0,00	15	100,01
TOTAL	17	100,00	–	–	3	100,00	–	–	15	100,00	–	–

TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

A distribuição de frequências por classes permitiu, a partir da observação da frequência relativa percentual (f_r%) na Tabela 14 e no Gráfico 1, perceber que para a maioria dos peptídeos analisados, os aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina representam de 25 a 50% da composição de cada peptídeo. Vale destacar que essa proporção é observada em 66,67% dos peptídeos analisados na amostra PB, 70,59% dos peptídeos analisados na amostra TE e apenas 46,67% dos peptídeos analisados na amostra PR. Considerando que a amostra PB representa o ideal em relação à aroma de chocolate e partindo-se da teoria proposta por Voigt et al. (1993, 1994a), é possível sugerir que estes aminoácidos deveriam representar uma proporção de 25 a 50% da cadeia de aminoácidos de cada peptídeo em pelo menos 60% dos peptídeos presentes na mistura obtida após a fermentação. Partindo-se desse parâmetro,

pode-se afirmar que a amostra TE aproxima-se mais da amostra PB do que a amostra PR já que esta tem apenas 46,67% de seus peptídeos com proporções de aminoácidos importantes para o aroma de chocolate na faixa de 25 a 50% da cadeia de aminoácidos. Por outro lado, na amostra TE esse valor é de 70,59% sugerindo que o tratamento enzimático das amêndoas de cacau insuficientemente fermentadas pode melhorar consideravelmente o aroma do chocolate produzido a partir dessas amêndoas. Observa-se, inclusive, que a quantidade de peptídeos presentes nessa amostra, que apresentam os aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina na proporção de 25 a 50% de suas respectivas cadeias é superior (70,59%) àquela observada na amostra PB (66,67%). É importante salientar ainda que, baseado nessa análise, a amostra TE (70,59% dos peptídeos com proporção de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina entre 25 e 50% em suas cadeias) se afasta da amostra PB (66,67% dos peptídeos com proporção de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina entre 25 e 50% em suas cadeias) em um grau menor (diferença de apenas 3,92%) do que a amostra PR (46,67% dos peptídeos com proporção de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina entre 25 e 40% em suas cadeias, com grau de diferença de 20% em relação à PB).

Gráfico 1: Representação da frequência relativa percentual dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas amostras TE, PB e PR.



TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

Desse modo, a partir da análise da $f_r\%$ obtida para as amostras em estudo é possível sugerir que o tratamento enzimático proposto melhorou a qualidade do aroma final de chocolate, uma vez que a amostra tratada enzimaticamente alcança padrão quantitativo de peptídeos com proporção dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina entre 25 e 50% da cadeia de aminoácidos (70,59%) bastante similar ao padrão da amostra PB (considerada ideal no que se refere ao aroma de chocolate) para o mesmo parâmetro (66,67%). Estes resultados corroboram aqueles apresentados por Oliveira et al. (2011), que reportaram que testes sensoriais apontaram que é possível, através do uso de enzima microbiana contendo endoprotease aspártica e carboxipeptidase (exopeptidase), gerar, em amêndoas classificadas como ardósia, a mistura de compostos que irá liberar, após a torrefação, o aroma característico de chocolate.

Ainda pela observação da distribuição de frequências, ao analisar a frequência relativa acumulada percentual ($F_r\%$) observa-se que tanto para a amostra TE como para a amostra PR 100% dos peptídeos analisados apresentam proporção de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina inferior a 75% de suas respectivas cadeias o que diferencia-se consideravelmente do que está explicitado para a amostra PB na qual apenas 66,67% dos peptídeos analisados apresentam proporção de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina inferior a 75% de suas respectivas cadeias. Por outro lado, o estudo da $f_r\%$ permite observar que para a amostra PB 33,33% dos peptídeos analisados apresentam proporção de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina correspondendo a 75 a 100% de cada peptídeo enquanto as amostras TE e PR não possuem peptídeos com proporção de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina na cadeia de aminoácidos igual ou superior a 75% apresentando, portanto, $f_r\%=0,00$ para esse intervalo de classe.

É importante destacar que não foram encontradas na literatura informações relacionadas à participação e importância dos demais aminoácidos no desenvolvimento do aroma final de cacau/chocolate.

Não só a presença dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina é importante para o desenvolvimento do aroma adequado de chocolate, mas também a posição deles na cadeia peptídica. Isso porque, além dos aminoácidos livres que reagem diretamente na reação de Maillard, os aminoácidos N-terminais dos peptídeos também estão disponíveis para essa reação. Sendo assim, é possível sugerir que a presença de leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas extremidades N-terminais dos peptídeos analisados pode levar à produção de aromas melhores do que aqueles que tenham esses

mesmos aminoácidos em outras posições (centrais ou C-terminais). Para tal análise foi feita a Distribuição de frequências dos aminoácidos leucina alanina, fenilalanina e tirosina nas posições N-terminal, C-terminal e Central dos peptídeos analisados (Tabela 15). Vale destacar que a classificação dos peptídeos analisados em uma das categorias da Distribuição de frequências o exclui, automaticamente, das demais sendo que os peptídeos foram analisados primeiramente quanto à presença dos aminoácidos importantes para o aroma na extremidade N-terminal; os que não se enquadraram nessa categoria foram então analisados quanto à presença dos aminoácidos importantes para o aroma na extremidade C-terminal; e só então os que ainda não haviam sido classificados foram analisados quanto à presença dos aminoácidos importantes para o aroma em posições centrais.

Tabela 15: Distribuição de frequências dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas posições N-terminal, C-terminal e Central dos peptídeos analisados.

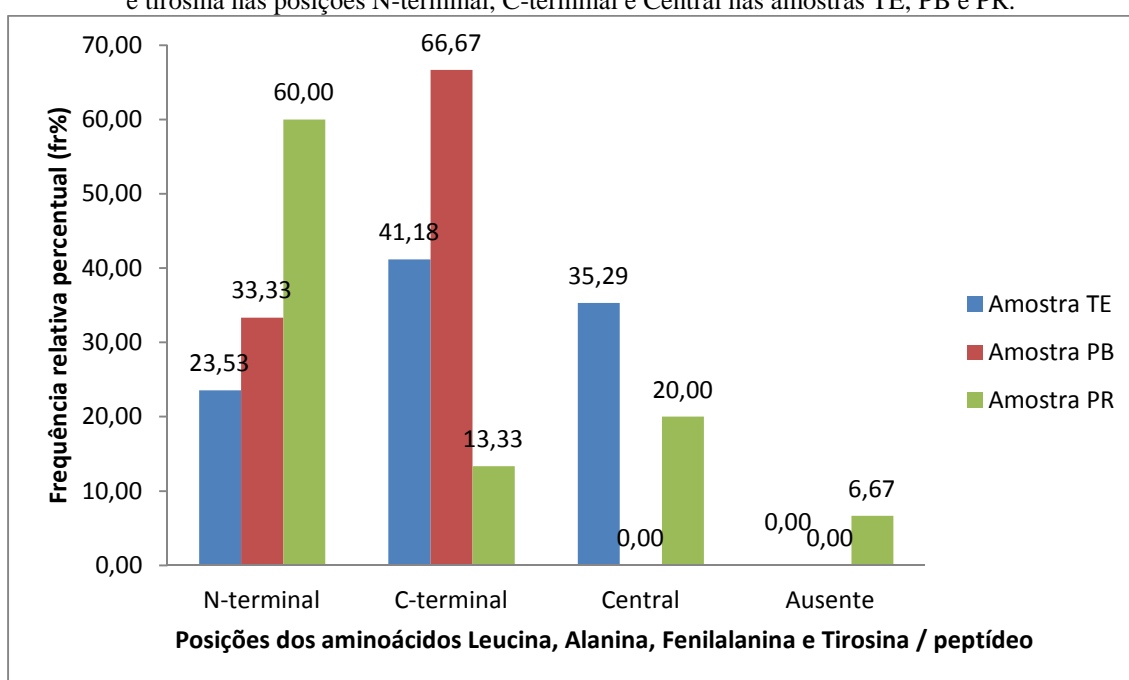
Posição dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina na cadeia peptídica	AMOSTRA TE				AMOSTRA PB				AMOSTRA PR			
	F	f _r %	F	F _r %	F	f _r %	F	F _r %	f	f _r %	F	F _r %
N-terminal	4	23,53	4	23,53	1	33,33	1	33,33	9	60,00	9	60,00
C-terminal	7	41,18	11	64,71	2	66,67	3	100,00	2	13,33	11	73,33
Central	6	35,29	17	100,00	0	0,00	3	100,00	3	20,00	14	93,33
Ausente	0	0,00	17	100,00	0	0,00	3	100,00	1	6,67	15	100,00
TOTAL	17	100,00	–	–	3	100,00	–	–	15	100,00	–	–

TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

A observação da Tabela 145e Gráfico 2 permite concluir que em 60% dos peptídeos analisados para a amostra PR os aminoácidos importantes para o aroma estão presentes na posição N-terminal enquanto que para a amostra PB isso acontece em 33,33% dos peptídeos analisados e para a amostra TE apenas em 23,53% dos peptídeos analisados. Por outro lado, a maior parte (66,67%) dos peptídeos analisados na amostra PB apresentam leucina, alanina, fenilalanina ou tirosina na extremidade C-terminal, sendo que para a amostra TE isso ocorre em 41,18% dos peptídeos analisados e para a amostra PR ocorre em apenas 13,33% dos peptídeos analisados. Os resultados obtidos não condizem com o esperado já que, por ser o padrão ideal para o desenvolvimento de aroma de chocolate, era esperado que para a amostra PB a maioria dos peptídeos

analisados apresentasse leucina, alanina, fenilalanina ou tirosina na extremidade N-terminal. Apesar disso, é possível observar que a amostra tratada enzimaticamente (TE) segue a mesma tendência apresentada pela amostra PB sendo que também para TE a maioria dos peptídeos analisados (41,18%) apresenta leucina, alanina, fenilalanina ou tirosina na extremidade C-terminal levando a sugerir que essa amostra (TE) se aproxima mais da amostra PB que da amostra PR o que pode constituir um indicativo da eficiência do tratamento proposto.

Gráfico 2: Representação da frequência relativa percentual dos aminoácidos leucina, alanina, fenilalanina e tirosina nas posições N-terminal, C-terminal e Central nas amostras TE, PB e PR.



TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

Para complementar a análise dos dados, julgou-se importante a pesquisa e investigação das proteínas de origem dos peptídeos analisados nas amostras TE, PB e PR bem como a identificação, quando possível, dos aminoácidos laterais e suas respectivas polaridades. Essa pesquisa foi realizada através do BlastP conforme item 3.4.1 e a compilação dos dados obtidos está apresentada nas Tabelas 16, 17 e 18. Vale salientar que, para a grande maioria dos peptídeos analisados, não foi encontrada a sequência de aminoácidos equivalente à sequência do peptídeo em análise não sendo possível, nesses casos, a identificação dos aminoácidos laterais e suas polaridades. As Tabelas 16, 17 e 18 trazem apenas os peptídeos para os quais isso foi possível.

Tabela 16: Dados obtidos a partir do BlastP para a amostra TE.

Prováveis proteínas de origem	Aminoácidos laterais (C-terminal)	Aminoácidos laterais (N-terminal)
PEPTÍDEO 1: Leucina Leucina Treonina Arginina		
Uncharacterized protein TCM_043724 [Theobroma cacao]	Glicina Lisina Serina Cisteína	Asparagina Asparagina Lisina Glutamina
Uncharacterized protein TCM_037362 [Theobroma cacao]	Arginina Glicina Arginina Serina	Cisteína Tirosina Leucina Lisina
Pseudouridine synthase family protein isoform 4 [Theobroma cacao]	Treonina Serina Leucina Serina	Serina Leucina Serina Leucina
SKP1 interacting partner 4 [Theobroma cacao]	Arginina Leucina Serina Prolina	Prolina Cisteína Lisina Leucina
Pseudouridine synthase family protein isoform 3 [Theobroma cacao]	Treonina Serina Leucina Serina	Serina Leucina Serina Leucina
Pseudouridine synthase family protein isoform 2 [Theobroma cacao]	inicia cadeia	Serina Leucina Serina Leucina
RING/U-box superfamily protein isoform 3 [Theobroma cacao]	Histidina Serina Serina Glutamato	Prolina Valina Glutamato Serina
Phosphoglycerate mutase family protein isoform 2 [Theobroma cacao]	Serina Cisteína Aspartato Serina	Prolina Serina Prolina Serina
Pseudouridine synthase family protein isoform 1 [Theobroma cacao]	Treonina Serina Leucina Serina	Serina Leucina Serina Leucina
RING/U-box superfamily protein isoform 1 [Theobroma cacao]	Histidina Serina Serina Glutamato	Prolina Valina Glutamato Serina
RING/U-box superfamily protein isoform 2 [Theobroma cacao]	Histidina Serina Serina Glutamato	Prolina Valina Glutamato Serina
LETM1-like protein isoform 1 [Theobroma cacao]	Glicina Leucina Triptofano Serina	Prolina Isoleucina Arginina Asparagina
ARM repeat superfamily protein, D,CHO [Theobroma cacao]	Valina Leucina Serina Lisina	Aspartato Metionina Prolina Lisina
PEPTÍDEO 15: Leucina Leucina Serina Alanina Lisina Prolina		
Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family [Theobroma cacao]	Alanina Valina Alanina Alanina	Lisina Aspartato Prolina Treonina
BES1-interacting Myc-like protein 2, putative isoform 3 [Theobroma cacao]	Isoleucina Serina Prolina Fenilalanina	Aspartato Prolina Prolina Aspartato
GTP binding [Theobroma cacao]	Asparagina Treonina Fenilalanina Glutamina	Valina Valina Tirosina Leucina
Uncharacterized protein TCM_019970 [Theobroma cacao]	Prolina Cisteína Aspartato Glutamato	Valina Leucina Fenilalanina Aspartato
PEPTÍDEO 16: Aspartato Glicina Leucina Alanina Valina Fenilalanina		
Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 2 [Theobroma cacao]	Isoleucina Asparagina Tirosina Treonina	Treonina Tirosina Isoleucina Asparagina
Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1 [Theobroma cacao]	Isoleucina Asparagina Tirosina Treonina	Treonina Tirosina Isoleucina Asparagina

Aminoácidos marcados em vermelho são hidrofílicos.

TE – ardósia tratadas enzimaticamente.

Tabela 17: Dados obtidos a partir do BlastP para a amostra PB.

Prováveis proteínas de origem	Aminoácidos laterais (C-terminal)	Aminoácidos laterais (N-terminal)
PEPTÍDEO 1: Leucina Aspartato Asparagina Tirosina Aspartato Asparagina Serina Alanina Glicina Lisina Triptofano		
trypsin inhibitor [Theobroma speciosum]	Treonina Valina Triptofano Lisina	Triptofano Valina Treonina Treonina
trypsin inhibitor [Theobroma cacao]	Treonina Valina Triptofano Arginina	Triptofano Valina Treonina Treonina
putative 21 kDa trypsin inhibitor [Theobroma grandiflorum]	Treonina Valina Triptofano Lisina	Triptofano Valina Treonina Treonina
putative 21 kDa trypsin inhibitor [Theobroma microcarpum]	Treonina Valina Triptofano Lisina	Triptofano Valina Treonina Treonina
putative 21 kDa trypsin inhibitor [Theobroma cacao]	Treonina Valina Triptofano Arginina	Triptofano Leucina Alanina Treonina
putative 21 kDa trypsin inhibitor [Theobroma bicolor]	Treonina Valina Triptofano Lisina	Triptofano Valina Treonina Treonina
21 kDa seed protein [Theobroma cacao]	Treonina Valina Triptofano Arginina	Triptofano Valina Treonina Treonina
PEPTÍDEO 3: Fenilalanina Leucina Leucina Leucina Tirosina		
Uncharacterized protein TCM_031336 [Theobroma cacao]	Valina Glutamato Isoleucina Alanina	Leucina Glutamato Triptofano Arginina
Uncharacterized protein TCM_009638 [Theobroma cacao]	Serina Fenilalanina Serina Fenilalanina	Isoleucina Glutamato Valina Valina
Cupredoxin superfamily protein isoform 3 [Theobroma cacao]	Fenilalanina Serina Prolina Triptofano	Fenilalanina Glutamina Glutamina Triptofano
Uncharacterized protein TCM_022548 [Theobroma cacao]	Leucina Prolina Isoleucina Treonina	Isoleucina Asparagina Isoleucina Prolina
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [Theobroma cacao]	Isoleucina Isoleucina Valina Alanina	Treonina Isoleucina Leucina Alanina
Uncharacterized protein TCM_041983 [Theobroma cacao]	Glicina Treonina Treonina Fenilalanina	Histidina Glutamato Tirosina Glicina
Uncharacterized protein TCM_024076 [Theobroma cacao]	Tirosina Histidina Arginina Leucina	Tirosina Leucina Prolina Lisina
C2H2-like zinc finger protein isoform 1 [Theobroma cacao]	Leucina Leucina Isoleucina Glutamato	Asparagina Treonina Valina Serina
C2H2-like zinc finger protein isoform 2 [Theobroma cacao]	Leucina Leucina Isoleucina Glutamato	Asparagina Treonina Valina Serina
Single hybrid motif superfamily protein isoform 2 [Theobroma cacao]	Glutamato Treonina Cisteina Leucina	Fenilalanina Aspartato Serina Aspartato
Uncharacterized protein TCM_027361 [Theobroma cacao]	Glicina Triptofano Treonina Cisteina	finaliza a cadeia

Aminoácidos marcados em vermelho são hidrofílicos.

PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate.

Tabela 18: Dados obtidos a partir do BlastP para a amostra PR.

Prováveis proteínas de origem	Aminoácidos laterais (C-terminal)	Aminoácidos laterais (N-terminal)
PEPTÍDEO 9: Metionina Prolina Lisina Prolina Lisina		
Uncharacterized protein TCM_032277 [Theobroma cacao]	inicia cadeia	Alanina Glutamina Leucina Prolina
Tyrosine kinase, putative [Theobroma cacao]	Tirosina Serina Serina Prolina	Fenilalanina Treonina
Uncharacterized protein TCM_032266 [Theobroma cacao]	inicia cadeia	Alanina Glutamina Leucina Prolina
PR5-like receptor kinase [Theobroma cacao]	Isoleucina Lisina Serina Serina	Alanina Glutamina Leucina Prolina
PR5-like receptor kinase [Theobroma cacao]	Lisina Fenilalanina Fenilalanina Serina	Alanina Glutamina Leucina Prolina
PEPTÍDEO 10: Serina Alanina Glicina Serina Valina Lisina		
Basic helix-loop-helix DNA-binding superfamily protein [Theobroma cacao]	Glicina Aspartato Glutamato Serina	Arginina Glutamina Arginina Treonina
Sugar transporter 1 [Theobroma cacao]	Glicina Glicina Metionina Prolina	Asparagina Tirosina Prolina Glicina
PEPTÍDEO 12: Fenilalanina Glicina Valina Arginina Arginina		
Uncharacterized protein TCM_042179 [Theobroma cacao]	Serina Isoleucina Glutamato Glutamina	Leucina Lisina Fenilalanina Serina
Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein [Theobroma cacao]	Treonina Serina Leucina Fenilalanina	Asparagina Alanina Leucina Fenilalanina

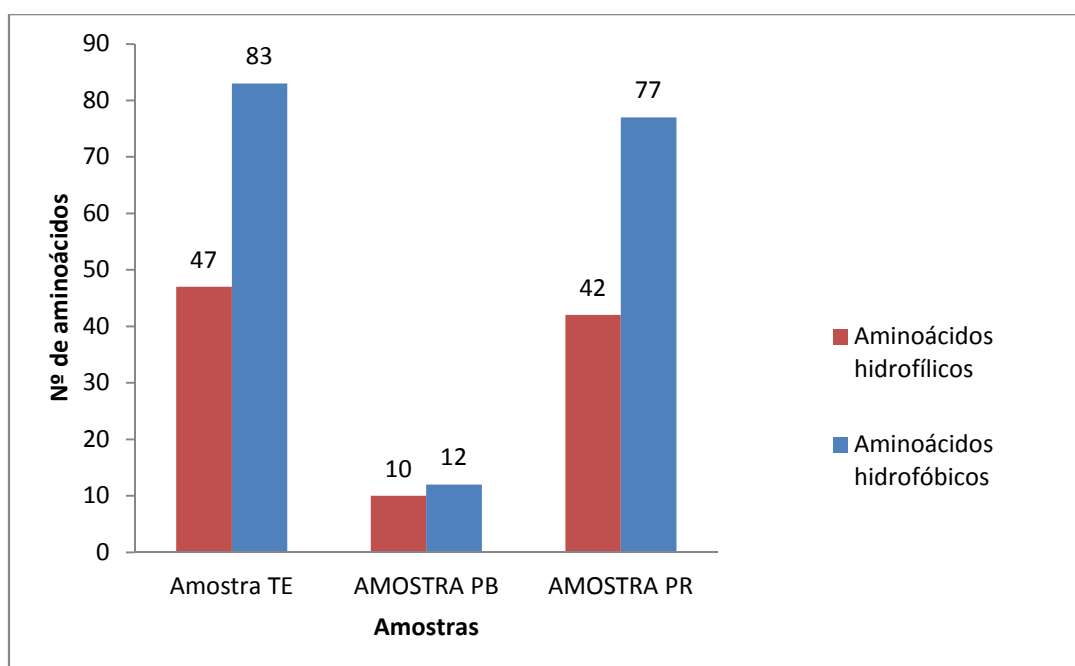
Aminoácidos marcados em vermelho são hidrofílicos. PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

A observação da Tabela 17 permite inferir facilmente que para a amostra PB o peptídeo 1 (identificado e sequenciado com 97 % de grau de confiança) provavelmente é originário da proteína “inibidor de tripsina”. Essa proteína foi reportada por Thai et al (1991) como importante para o desenvolvimento do aroma final de chocolate. A mesma também foi apontada por Voigt et al. (1994b) como sendo uma das proteínas que é substrato das proteases nativas do cacau. Observa-se, entretanto, que a mesma não aparece como possível proteína de origem para as amostras TE e PR. Por outro lado essas amostras trazem, predominante, proteínas ainda não caracterizadas como possíveis proteínas de origem dos peptídeos obtidos, as quais, embora ainda não estudadas, podem estar relacionadas ao aroma final de chocolate. Também é importante salientar que as possíveis proteínas de origem relacionadas para a amostra TE não coincidem com aquelas relacionadas para a amostra PR garantindo, portanto, que muito provavelmente o aroma produzido na amostra enzimaticamente tratada não deve ser o mesmo daquele produzido na amostra considerada padrão indesejável para o aroma de

chocolate. Ou seja, embora provavelmente a amostra TE não tenha a mesma origem protéica da amostra PB (padrão desejável para o aroma final de chocolate), ela também não se assemelha à amostra PR para o mesmo parâmetro. Não foram encontrados na literatura dados que relacionem as possíveis proteínas de origem obtidas para as amostras TE e PR com o aroma de chocolate sendo necessário, portanto, novos estudos e pesquisas com o objetivo de identificar e caracterizar as proteínas presentes na amostra de cacau após o tratamento enzimático proposto e o devido estudo de como estas influenciam o aroma final de chocolate.

Uma observação simples dos peptídeos listados nas Tabelas 11, 12 e 13 em relação às suas polaridades leva a perceber que, para as três amostras, há predominância de aminoácidos hidrofóbicos nos peptídeos analisados sendo que nas amostras TE e PR a predominância desses aminoácidos é maior que na amostra PB (Gráfico 3). Apenas 33,33% dos peptídeos analisados para a amostra PB possuem em suas cadeias peptídicas mais aminoácidos hidrofóbicos que aminoácidos hidrofílicos, enquanto nas amostras TE e PR 82,35% e 80%, respectivamente, dos peptídeos analisados apresentam predominância de aminoácidos hidrofóbicos em suas cadeias.

Gráfico 3: Representação da proporção de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos nos peptídeos analisados para as amostras TE, PB e PR.



TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

Com base nesses resultados e nas duas teorias propostas por Voigt et al (1993, 1994a e 1994c) é possível sugerir que, de modo geral, o padrão qualitativo dos aminoácidos hidrofóbicos livres presentes na mistura de peptídeos responsáveis pelo aroma final de chocolate é mais importante que o padrão quantitativo. Entretanto, esse padrão quantitativo torna-se extremamente importante quando se fala especificamente dos aminoácidos leucina, fenilalanina, alanina e tirosina de modo que é possível inferir que a presença desses aminoácidos hidrofóbicos específicos em proporções adequadas é essencial para a obtenção do aroma final de chocolate desejado.

Ainda em relação à polaridade, a observação dos aminoácidos laterais aos peptídeos analisados permite inferir que, de forma geral, a ocorrência de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos é bastante equilibrada tanto nas extremidades C-terminal como nas extremidades N-terminal (Tabelas 16, 17 e 18). Entretanto, especificamente para a amostra TE observa-se uma leve predominância de aminoácidos hidrofílicos nas extremidades C-terminal. Partindo da premissa que a enzima utilizada para o tratamento dessas amostras tem atividade de carboxipeptidase e que, para esta, os aminoácidos da extremidade C-terminal são muito mais importantes que os da extremidade N-terminal esse fato pode ser apontado como mais uma evidência da eficiência do tratamento já que, na Reação de Maillard os aminoácidos da extremidade N-terminal também estão disponíveis para reagir e a amostra TE apresenta mais aminoácidos laterais hidrofóbicos na extremidade N-terminal que na extremidade C-terminal, sendo que muitos destes aminoácidos hidrofóbicos laterais da extremidade N-Terminal são leucina, alanina, fenilalanina ou tirosina. Entretanto, vale salientar que como para a grande maioria dos peptídeos analisados (77,1%) não foi possível, através da busca no BlastP, identificar os aminoácidos laterais aos peptídeos sequenciados, não é possível trazer maiores informações quanto aos oligopeptídeos liberados com a degradação da proteína de origem e suas naturezas químicas, já que os dados foram obtidos para apenas oito (22,9%) do total de trinta e cinco peptídeos analisados não sendo, portanto, representativos do todo.

O aroma é, sem dúvida, o mais notável atributo do chocolate. A combinação e o equilíbrio dos numerosos compostos que contribuem para o aroma final dependem de diversos fatores dentre os quais estão fatores genéticos, condições ambientais, condições de colheita e de processamento. Essa complexidade é evidente quando se considera que, ainda hoje, este aroma tão desejável não foi reproduzido pela indústria química

(REINECCIUS, 2006). Em função dessa complexidade as análises realizadas neste trabalho são insuficientes para explicar o aroma de chocolate produzido nas amostras analisadas. Entretanto, importantes informações foram obtidas e, certamente, irão contribuir para desvendar a contribuição de aminoácidos e peptídeos para o aroma desejado de chocolate. Vale salientar que os resultados discutidos aqui estão de acordo com estudos reportados por Voigt et al. (1993, 1994a, 1994c) os quais fundamentaram o desenvolvimento da metodologia enzimática para melhoria do aroma de chocolate obtido de ardósia desde os estudos iniciados por este mesmo grupo de pesquisa em 2008 (OLIVEIRA et al., 2011).

5.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

Diversos estudos apontam que o teor de polifenóis após a fermentação cai para aproximadamente 5% de modo que teores de 10% ou mais são considerados sinal de fermentação insuficiente e concentrações de polifenóis superiores a esse valor levam a chocolate de sabor muito adstringente (LANGE e FINCKE, 1970 apud AFOAKWA et al., 2008; HANSEN et al., 2000). Baseado nisso e partindo da premissa de que o tratamento enzimático proposto nesse estudo deverá promover a hidrólise de proteínas presentes nas amêndoas de cacau, liberando os precursores de aroma que não foram produzidos ao longo do período de fermentação é possível sugerir que a concentração de fenólicos nas amêndoas de cacau tratadas enzimaticamente (TE) e sua comparação com os padrões de aroma desejável (PB) e indesejável (PR) podem fornecer informações importantes quanto à eficiência do tratamento enzimático proposto.

Os dados obtidos na determinação da concentração de fenólicos nas amostras PB, TE e PR foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Sisvar 5.0. Os dados obtidos para a comparação de médias com diferentes soluções de extração estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Médias obtidas para concentração de fenólicos (mg ácido gálico/100g amostra) nas amostras PB, TE e PR.

Solução de extração I		Solução de extração II		Solução de extração III		Solução de extração IV	
Tratamento	Média	Tratamento	Média	Tratamento	Média	Tratamento	Média
TE	330,37 ^a	PB	794,09 ^a	PR	1024,20 ^a	PB	1256,38 ^a
PB	660,90 ^b	TE	1158,37 ^b	PB	1205,07 ^b	TE	1487,42 ^b
PR	865,09 ^c	PR	1674,78 ^c	TE	1817,97 ^c	PR	2352,27 ^c

Soluções de extração: I - Metanol; II - Metanol 50%; III – Sequencial (Acetona 70% seguido de Metanol 50%); IV - Acetona 70%.

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

TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

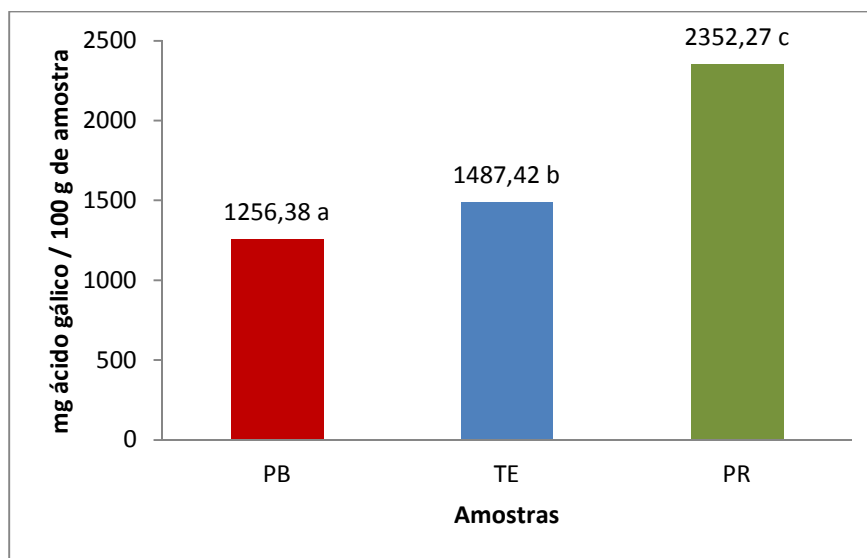
A observação da Tabela 19 permite perceber que as amostras PB, TE e PR foram consideradas estatisticamente diferentes ao nível de probabilidade testado ($p < 0,05$), independentemente da solução extratora utilizada. Sendo assim, optou-se por discutir as diferenças no teor de compostos fenólicos entre as amostras considerando apenas os dados obtidos para a melhor solução extratora que foi a acetona 70%.

Analisando-se os resultados obtidos para a extração de compostos fenólicos com solução de acetona 70% observa-se que a amostra PR apresenta a maior concentração de fenólicos (2352,27), o que era esperado já que a mesma foi obtida de amêndoas de cacau insuficientemente fermentadas. Comparando-se as amostras TE e PR percebe-se que a primeira expressou concentração de fenólicos significativamente menor (1487,42) que a segunda (2356,38) (Gráfico 4). Considerando que a amostra TE é obtida de amêndoas de cacau insuficientemente fermentadas (PR) que foram enzimaticamente tratadas, pode-se concluir que o tratamento enzimático proposto contribuiu para a redução do teor de compostos fenólicos exercendo efeito similar à fermentação adequada das amêndoas. Pode-se sugerir, portanto, que o tratamento proposto é eficiente já que a redução da concentração de polifenóis está associada à redução da adstringência e do sabor amargo e formação de compostos aromáticos importantes para o aroma final de chocolate.

A observação do Gráfico 4 ainda permite verificar que a amostra TE expressou concentração de fenólicos maior (1487,42) que a amostra PB (1256,38), o que era esperado já que a amostra PB foi obtida de amêndoas de cacau suficientemente fermentadas e a fermentação é apontada na literatura como uma das etapas que mais contribuem para a redução do teor de compostos fenólicos das amêndoas de cacau. É importante destacar que a diferença entre as concentrações de fenólicos nas amostras TE e PB é consideravelmente menor (231,04) que a diferença entre as amostras TE e PR

(864,85) indicando que a amostra TE aproxima-se mais do padrão ideal para aroma de chocolate (PB) do que do padrão indesejável para esse atributo (PR).

Gráfico 4: Concentração de compostos fenólicos nas amostras TE, PB e TR Solução de extração: Acetona 70%.



TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

Em relação à redução de polifenóis nas etapas de processamento do cacau Kealey et al. (1998) apud Efraim et al. (2011) observaram perdas de 53 a 74% de flavanóis e procianidinas durante a fermentação. Kealey et al. (2001) quantificaram os teores de polifenóis de sementes de cacau durante o processamento e, observaram perdas de 32, 47, 57 e 87% dos polifenóis em relação aos teores iniciais de sementes não fermentadas nas etapas de fermentação, torração, obtenção de *liquor* natural e obtenção de *liquor* alcalinizado, respectivamente.

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos fenólicos têm sido largamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde. Dentre esses efeitos se destaca a potente atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres, bem como na proteção contra danos ao DNA das células (WOLLGAST e ANKLAN, 2000). Alguns polifenóis, como o flavonol quercetina e os flavanóis catequina e epicatequina,

além de compostos não fenólicos como carotenóides e as vitaminas C e E, têm sido reportados por apresentarem elevada atividade antioxidante (JACOB e BURRI, 1996). Por outro lado, sabe-se que durante as etapas de processamento do cacau, principalmente a fermentação e alcalinização (EFRAIM, et al., 2011), os flavanóis sofrem uma série de reações químicas, como oxidação, complexação e lixiviação contribuindo significativamente para a formação do sabor desejável com redução do amargor e da adstringência (CROSS, 1999 apud EFRAIM, 2011). Tais reações levam à redução do teor de polifenóis após o processamento das amêndoas de cacau ocasionando, assim, a redução da atividade antioxidante no produto final.

Baseado no que foi exposto no parágrafo acima e partindo da premissa de que o tratamento enzimático proposto nesse estudo deverá promover a hidrólise de proteínas presentes nas amêndoas de cacau, liberando os precursores de aroma que não foram produzidos ao longo do período de fermentação é possível sugerir que a medida da atividade antioxidante nas amêndoas de cacau tratadas enzimaticamente (TE) e sua comparação com os padrões de flavor desejável (PB) e indesejável (PR) podem fornecer dados importantes quanto à eficiência do tratamento enzimático proposto.

Os dados obtidos nas análises de determinação da atividade antioxidante foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Sisvar 5.0. Os dados obtidos para a comparação de médias estão apresentados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20: Comparação de médias da atividade antioxidante das amostras PB, TE e PR pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP.

% DPPH		DPPH μmol Trolox		DPPH μmol ácido ascórbico	
Tratamento	Média	Tratamento	Média	Tratamento	Média
TE	22,28 ^a	PB	834,08 ^a	PB	691,70 ^a
PR	57,14 ^{a,b}	TE	1526,45 ^a	TE	1241,96 ^a
PB	70,68 ^b	PR	2697,66 ^a	PR	1973,25 ^a
ABTS μmol Trolox		ABTS μmol ácido ascórbico		FRAP μmol sulfato ferroso	
Tratamento	Média	Tratamento	Média	Tratamento	Média
PR	1414,07 ^a	PR	780,88 ^a	TE	182,27 ^a
PB	1690,97 ^a	PB	1018,36 ^a	PB	220,98 ^a
TE	1815,86 ^a	TE	1115,71 ^a	PR	279,00 ^a

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

TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

Tabela 21: Comparação de médias da atividade antioxidante das amostras PB, TE e PR para as diferentes soluções extratoras

% DPPH		DPPH $\mu\text{mol Trolox}$		DPPH $\mu\text{mol ácido ascórbico}$	
Solução de extração	Média	Solução de extração	Média	Solução de extração	Média
IV	45,20 ^a	I	1113,36 ^a	I	857,39 ^a
III	49,39 ^a	III	1547,41 ^a	II	1247,61 ^a
I	50,35 ^a	II	1967,52 ^a	III	1477,13 ^a
II	55,18 ^a	IV	2115,96 ^a	IV	1627,08 ^a
ABTS $\mu\text{mol Trolox}$		ABTS $\mu\text{mol ácido ascórbico}$		FRAP $\mu\text{mol sulfato ferroso}$	
Solução de extração	Média	Solução de extração	Média	Solução de extração	Média
I	883,84 ^a	I	558,96 ^a	I	150,15 ^a
II	1711,17 ^a	II	982,56 ^a	IV	233,21 ^a
III	1969,94 ^a	III	1078,27 ^a	III	257,32 ^a
IV	1996,25 ^a	IV	1266,82 ^a	II	268,97 ^a

Soluções de extração: I - Metanol; II - Metanol 50%; III - Sequencial (Acetona 70% seguido de Metanol 50%); IV - Acetona 70%.

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

TE - ardósia tratadas enzimaticamente; PB - amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR - amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

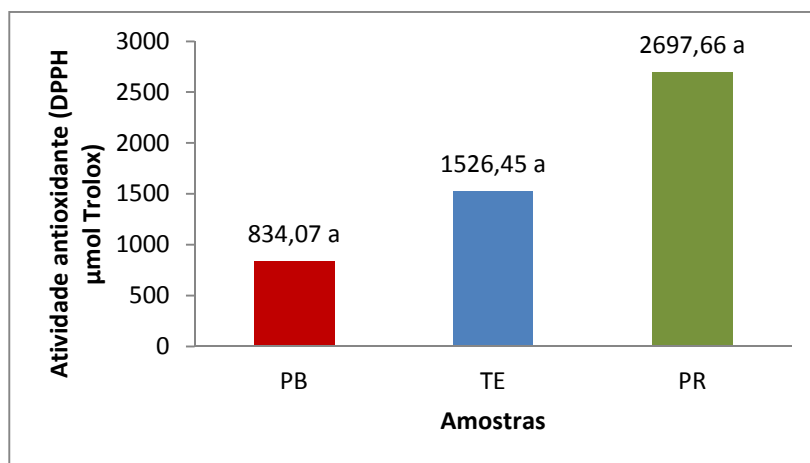
Uma vez que não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade para as diferentes soluções de extração utilizadas os dados obtidos foram analisados apenas em relação à melhor solução extratora que foi a acetona 70% (Solução IV) (Tabela 21). Além disso, embora tenha se verificado a atividade antioxidante em diferentes formas de expressão, optou-se por fazer a discussão dos dados baseado na forma mais comum de expressão que é equivalentes de trolox.

Para a determinação de atividade antioxidante pelo método DPPH a tabela de comparação de médias (Tabela 20) indica que não há diferença estatística significativa ao nível de probabilidade de 5% entre as amostras PB, TE e PR. Apesar das amostras não serem consideradas estatisticamente diferentes observa-se que a amostra TE apresentou atividade antioxidante consideravelmente menor (1526,45) que a amostra PR (2697,66) (Gráfico 5). Isso sugere que o tratamento enzimático proposto pode ter contribuído para a redução do teor de compostos fenólicos exercendo efeito similar à fermentação adequada das amêndoas. Tal fato constitui bom indicativo em relação à eficiência do tratamento proposto já que a redução do teor de fenólicos leva à redução da adstringência e do sabor amargo além de contribuir para a formação de compostos aromáticos importantes para o aroma de chocolate. A análise dos resultados apresentados na Tabela 20 e Gráfico 5 permite perceber ainda que a amostra TE expressou atividade antioxidante relativamente maior (1526,45) que a amostra PB

(834,07). Entretanto, a diferença entre as médias de atividade antioxidante nas amostras TE e PB é consideravelmente menor (692,38) que a diferença entre as amostras TE e PR (1171,21) indicando que a amostra TE aproxima-se mais do padrão ideal para aroma de chocolate (PB) do que do padrão indesejável para esse atributo (PR).

Apesar de não haver diferença estatística entre as médias de atividade antioxidante das amostras PR e PB ao nível de probabilidade testado ($p < 0,05$), observou-se que, como esperado, a primeira apresenta atividade antioxidante superior (2697,66) àquela apresentada pela segunda (834,07). Isso provavelmente se deve ao fato da amostra PB ter sofrido um processo adequado de fermentação o que ocasiona maior redução no teor de fenólicos e consequentemente menor atividade antioxidante.

Gráfico 5: Atividade antioxidante nas amostras TE, PB e PR pelo método DPPH.



TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

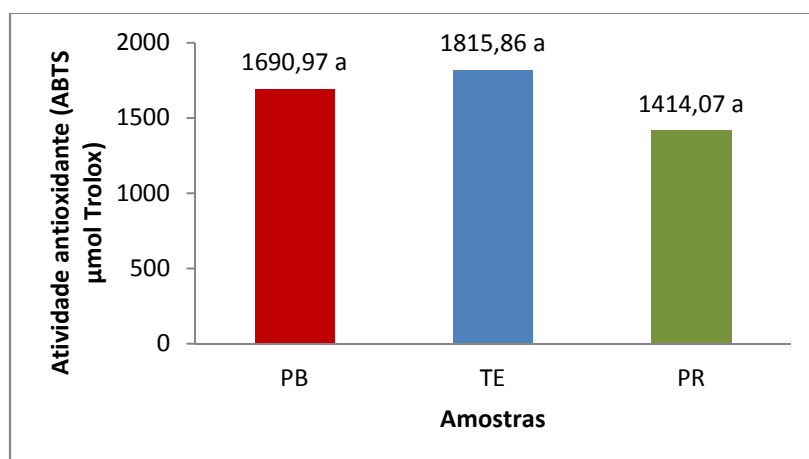
Com relação à determinação de atividade antioxidante pelo método ABTS a tabela de comparação de médias (Tabela 20) indica que não há diferença estatística significativa ao nível de probabilidade de 5% entre as amostras PB, TE e PR. Apesar das amostras não serem consideradas estatisticamente diferentes observa-se que a amostra TE apresentou atividade antioxidante maior (1815,86) que a amostra PR (1414,07) (Gráfico 6). Isso pode estar relacionado à presença, na amostra PR, de outros compostos antioxidantes além dos compostos fenólicos ou a fatores experimentais.

A observação da Tabela 20 e Gráfico 6 permite perceber ainda que a amostra TE expressou atividade antioxidante maior (1815,86) que a amostra PB (1690,97). Além

disso, a diferença entre as médias de atividade antioxidante nas amostras TE e PB é consideravelmente menor (124,89) que a diferença entre as amostras TE e PR (401,79) indicando que a amostra TE aproxima-se mais do padrão ideal para aroma de chocolate (PB) do que do padrão indesejável para esse atributo (PR).

Apesar de não haver diferença estatística entre as médias de atividade antioxidante das amostras PR e PB ao nível de probabilidade testado ($p < 0,05$), observou-se que, inesperadamente, a primeira expressou atividade antioxidante inferior (1414,07) àquela apresentada pela segunda (1690,97). Isso pode sugerir a presença, na amostra PB, de outros compostos antioxidantes além dos fenólicos ou se dever a fatores experimentais.

Gráfico 6: Atividade antioxidante nas amostras TE, PB e PR pelo método ABTS.



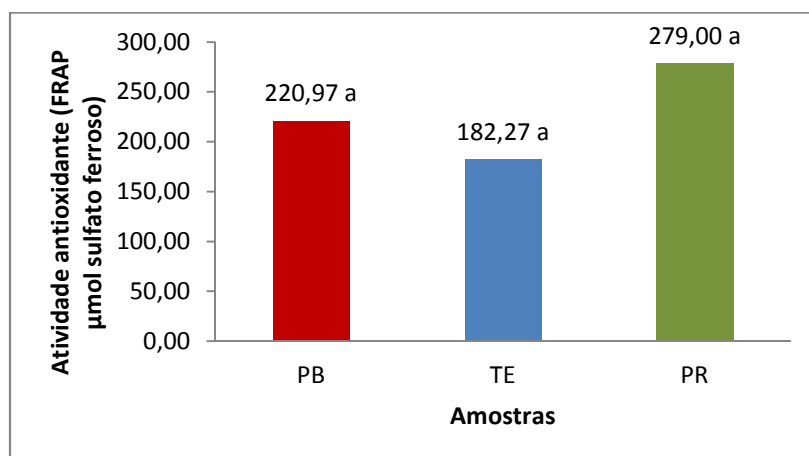
TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

Com relação à determinação de atividade antioxidante pelo método FRAP a Tabela 20 indica que não há diferença estatística significativa ao nível de probabilidade de 5% entre as amostras PB, TE e PR. Apesar das amostras não serem consideradas estatisticamente diferentes observa-se que a amostra TE apresentou atividade antioxidante menor (182,27) que a amostra PR (279,00) (Gráfico 7). Isso constitui um indicativo da eficiência do tratamento enzimático já que menor atividade antioxidante sugere menor teor de compostos fenólicos e melhor desenvolvimento do aroma de chocolate.

A observação da Tabela 20 e Gráfico 7 permite perceber ainda que a amostra TE expressou atividade antioxidante menor (182,27) que a amostra PB (220,97) sendo que a diferença entre as médias de atividade antioxidante nas amostras TE e PB é consideravelmente menor (38,70) que a diferença entre as amostras TE e PR (96,73) indicando que a amostra TE aproxima-se mais do padrão ideal para aroma de chocolate (PB) do que do padrão indesejável para esse atributo (PR).

Apesar de não haver diferença estatística entre as médias de atividade antioxidante das amostras PR e PB ao nível de probabilidade testado ($p < 0,05$), observou-se que, como esperado, a primeira apresenta atividade antioxidante superior (279,00) àquela apresentada pela segunda (220,97). Isso provavelmente se deve ao fato da amostra PB ter sofrido um processo adequado de fermentação o que ocasiona maior redução no teor de fenólicos e conseqüentemente menor atividade antioxidante.

Gráfico 7: Atividade antioxidante nas amostras TE, PB e PR pelo método FRAP.



TE – ardósia tratadas enzimaticamente; PB – amêndoas bem fermentadas, não tratadas, padrão de boa qualidade para aroma de chocolate; PR – amêndoas insuficientemente fermentadas, não tratadas, padrão de baixa qualidade para aroma de chocolate.

Observando-se os dados de modo geral é possível perceber que a atividade antioxidante nas amostras PB, TE e PR é variável de acordo com o método empregado para a medida. No caso específico do método DPPH percebe-se que a atividade antioxidante é maior na amostra PR (2697,66), seguida pela amostra TE (1526,45) e pela amostra PB (834,07) (Gráfico 5). Esse resultado corresponde ao esperado considerando-se que, de forma desejável, o conteúdo de fenóis é reduzido em PB (em função da fermentação adequada) e TE (em função do tratamento enzimático) em relação à amostra PR. Para o método ABTS percebe-se que a atividade antioxidante é

maior na amostra TE (1815,86), seguida pela amostra PB (1690,97) e pela amostra PR (1414,07) (Gráfico 6). Isso possivelmente indica que outros compostos, diferentes dos fenólicos, estão agindo como captadores do radical ABTS•+ e que esses compostos estão mais presentes na amostra TE do que nas demais amostras. Entretanto, vale destacar que, como descrito anteriormente, a amostra TE apresenta tendência a estar mais próxima de PB do que de PR, o que era esperado. Especificamente para o método FRAP percebe-se que para todas as amostras a atividade antioxidante é baixa (PR: 279,00; PB: 220,97; TE: 182,27) não havendo diferença considerável entre elas. Isso pode ser indicativo de que a redução do ferro não constitui uma forma importante de atividade antioxidante do cacau.

É importante destacar que embora o tratamento enzimático proposto reduza a quantidade de fenóis, o que é desejável para atingir o aroma ideal de chocolate, o mesmo não elimina outros compostos com atividade antioxidante do cacau. Além disso, os resultados obtidos indicam que o perfil de conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante da amostra TE se assemelhou muito mais ao da amostra PB do que da amostra PR.

Em relação à capacidade antioxidante em amêndoas de cacau Aikpokpodion e Dongo (2010) estudaram o perfil da capacidade antioxidante do sistema, do primeiro ou sexto dia de fermentação, quando os compostos fenólicos são reduzidos. O conteúdo de catequina das sementes de cacau não reduziu durante a fermentação e os resultados mostraram que, apesar da perda dos polifenóis totais durante a fermentação, a concentração restante nas sementes é altamente suficiente para resultar em uma alta capacidade antioxidante.

Todorovic et al. (2015) avaliaram o teor de polifenóis, flavonóides e proantocianidinas de chocolates produzidos na Sérvia utilizando métodos espectrofotométricos. No mesmo estudo foi avaliada a atividade antioxidante de chocolate e cacau pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS e ORAC. Os resultados obtidos para todos os métodos utilizados indicaram que a atividade antioxidante de extratos de cacau e chocolate seguiram o mesmo perfil dos teores de polifenóis, flavonóides e proantocianidinas.

Silva et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante de extrato seco de cacau orgânico e constataram que esse extrato demonstrou poder antioxidante mediante sua

capacidade em sequestrar aproximadamente 77% dos radicais livres 1,1-difenil-2-picrilidrazil quando empregado na concentração de 100 µg/mL.

Vinson e Motisi (2015) avaliaram antioxidantes polifenólicos em chocolate em barra pelos métodos do reagente de Folin e FRAP usando catequina como padrão e fazendo correção dos valores para sólidos não gordurosos, fonte de polifenóis em cacau. Eles encontraram uma relação linear significativa entre a % de sólidos de cacau e a atividade antioxidante concluindo que consumidores devem escolher o chocolate com base no teor de sólidos de cacau.

Vale destacar que como os padrões (PB e PR) não passaram pelas etapas de tratamento enzimático e secagem, consequentemente 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 em todas as análises realizadas.

5.4 ESTUDO DE VIABILIDADE

A partir das pesquisas realizadas até o presente momento, assim como o atual cenário mercadológico e suas tendências futuras, verifica-se que as circunstâncias são inicialmente interessantes à implementação e difusão do tratamento enzimático proposto. Principalmente quando considerada a oportunidade de obtenção de nibs de boa qualidade para serem comercializados às indústrias de processamento.

Para compreender a viabilidade do empreendimento quanto à escala de produção, um estudo mais aprofundado dos impactos e das estratégias necessárias para a produção de nibs de maior qualidade em escala industrial se faz necessário. O estágio atual de desenvolvimento da tecnologia não permite uma conclusão sobre seu potencial de escalabilidade. Mas, considerando-se os resultados já apresentados, é consistente a alteração que o tratamento, através das enzimas microbianas, gera nas amêndoas de cacau de baixa qualidade (ardósia). Essa efetividade, aliada aos dados de mercado, mostram um cenário positivo para a geração de um novo produto, um chocolate com uma qualidade superior, oriundo de cacau com baixa qualidade de fermentação. É válido salientar que os chocolates produzidos a partir das amêndoas tratadas não se tornarão semelhantes aos ditos chocolates finos, mas poderão até ocupar a posição de um produto intermediário entre os chocolates convencionais e os finos

Os estudos de mercado apontam para o Brasil como um país com crescente consumo de chocolate, ocupando atualmente a décima nona colocação no ranking mundial de consumo de chocolate per capita e com expectativas de aumento graças aos incentivos das empresas desse mercado e ao histórico de crescimento do setor. É significativo também o aumento na procura por produtos de maior qualidade, movimento esse impulsionado pelo advento do poder de compra conquistado pelas classes C e D, que desejam experimentar e presentear chocolates de aroma e sabor mais intensos. Outro nicho do mercado de chocolate que vem ganhando destaque é o fato desse produto ter ganho *status* como alimento funcional. Diversas pesquisas evidenciam a presença de flavonóides nas sementes do cacau. Sendo conhecido o poder antioxidante destas substâncias e os benefícios que podem promover à saúde, cada vez mais a ingestão de chocolates com maior teor de cacau e menor adição de açúcar é recomendada. Os próprios resultados obtidos nas análises de concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas amostras TE, PB e PR indicam que embora o tratamento enzimático proposto tenha reduzido a quantidade de fenólicos, fato desejável, ele não eliminou outros compostos com atividade antioxidante do cacau sendo que esta se manteve em níveis consideráveis. Isso indica que o tratamento enzimático, além de favorecer a elaboração de chocolate de melhor aroma, mantém a capacidade antioxidante do cacau e, conseqüentemente, os possíveis benefícios à saúde.

Ainda em relação ao mercado brasileiro, o país se destaca também como forte produtor de cacau, e com indícios de que irá expandir sua produção nos próximos anos. Para isso, os produtores contam com intensos incentivos governamentais, semelhantes à situação no Pará, como apresentado no Estudo de Viabilidade, em que os investimentos visam que o estado aumente sua área cultivada, a fim de se tornar o maior estado brasileiro produtor de cacau, até o ano de 2023. Esse cenário representa uma grande oferta de insumos aptos a receber o tratamento com as enzimas microbianas, gerando assim um produto diferenciado, em relação às suas propriedades organolépticas.

A inserção na cadeia produtiva como pretendido pelo negócio, entretanto, pode enfrentar barreiras, uma vez que este é um mercado já bem estruturado. Mas, em contrapartida, os empreendedores do projeto já possuem uma proximidade estratégica com dois importantes *players* do mercado. A Cargill, grande indústria de processamento com fábrica no estado da Bahia, é um possível consumidor dos nibs gerados pelo negócio proposto. E também a fabricante de chocolate Mars, que quer chegar em 2020

vendendo anualmente 500 milhões de dólares de chocolates no Brasil e passar de menos de 2% de participação no mercado brasileiro de chocolate para mais de 10% em sete anos. Portanto as características do mercado corroboram para um cenário otimista nos próximos anos, com oportunidades de crescimento e de diferenciação das linhas de produtos, janelas importantes para a apreciação dos chocolates oriundos dos processos de tratamento enzimático.

6 CONCLUSÃO

Por meio da análise da $f_r\%$ para as amostras TE, PB e PR foi possível inferir que o tratamento enzimático é eficiente, uma vez que a amostra tratada enzimaticamente (TE) alcança padrão quantitativo de peptídeos importantes para o aroma de chocolate bastante similar ao padrão da amostra PB, considerada ideal para esse atributo. Além disso, pode-se concluir que tanto para a amostra TE como para a amostra PB a maioria dos peptídeos analisados apresentam aminoácidos importantes para o aroma de chocolate na extremidade C-terminal o que não acontece na amostra PR constituindo, portanto, mais um indicativo da semelhança entre as amostras TE e PB e, conseqüentemente, da eficiência do tratamento proposto.

A busca feita no BlastP apontou “inibidor de tripsina” como principal proteína de origem dos peptídeos sequenciados para a amostra PB sendo que essa não foi indicada como proteína de origem para peptídeos sequenciados nas amostras TE e PR. Para estas amostras a maioria das proteínas de origem apontadas ainda não foi caracterizada de modo que não é possível conhecer sua influência no aroma de chocolate. As possíveis proteínas de origem apontadas para a amostra TE não coincidiram com aquelas indicadas para a amostra PR sugerindo, portanto, que deve haver diferenças no aroma de chocolate produzido por cada uma delas. Sendo assim, pode-se concluir que, embora as amêndoas enzimaticamente tratadas não tenham peptídeos de mesma origem protéica daqueles de amêndoas bem fermentadas, elas também não se assemelham à ardósia em relação à origem protéica dos peptídeos.

A análise da polaridade dos aminoácidos que compõem os peptídeos sequenciados leva à conclusão que há predominância de aminoácidos hidrofóbicos, sendo essa predominância maior para as amostras TE e PR do que para a amostra PB. Isso leva a sugerir que o padrão qualitativo dos aminoácidos hidrofóbicos presentes na mistura de peptídeos responsáveis pelo aroma de chocolate é mais importante que o padrão quantitativo. Por outro lado, esse padrão quantitativo torna-se extremamente importante quando se fala especificamente dos aminoácidos leucina, fenilalanina, alanina e tirosina de modo que é possível inferir que a presença desses aminoácidos hidrofóbicos específicos em proporções adequadas é essencial para a obtenção do aroma de chocolate desejado.

A análise da polaridade dos aminoácidos laterais aos peptídeos analisados mostrou leve predominância de aminoácidos hidrofóbicos nas extremidades N-terminal para a amostra TE. Isso também constitui evidência da eficiência do tratamento proposto considerando que esses aminoácidos estarão disponíveis para reagir na Reação de Maillard. Entretanto esses dados não foram considerados representativos já que a polaridade de aminoácidos laterais só pôde ser observada para oito dos trinta e cinco peptídeos analisados.

A amostra TE expressou concentração de fenólicos significativamente menor que a amostra PR ao nível de probabilidade testado ($p < 0,05$) indicando que o tratamento enzimático proposto, contribuiu para a redução de fenólicos exercendo efeito similar à fermentação adequada das amêndoas. Acompanhando a tendência do conteúdo de fenólicos, a amostra TE também expressou atividade antioxidante significativamente inferior à amostra PR para dois (DPPH e FRAP) dos três métodos utilizados. Apesar do tratamento enzimático reduzir a quantidade de fenóis, o que é desejável para atingir o aroma ideal de chocolate, o mesmo não elimina outros compostos com atividade antioxidante do cacau. Além disso, os resultados obtidos indicam que o perfil de conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante da amostra TE se assemelhou muito mais ao da amostra PB do que da amostra PR.

De um modo geral, para todas as análises realizadas as amêndoas de cacau tratadas enzimaticamente apresentaram perfil mais próximo das amêndoas de cacau bem fermentadas se distanciando da ardósia sugerindo que o tratamento enzimático proposto é eficiente e pode levar à produção de aroma de chocolate desejável mesmo partindo de amêndoas de cacau de baixa qualidade.

Em função da complexidade, as análises realizadas neste trabalho são insuficientes para explicar o aroma de chocolate produzido nas amostras analisadas. Entretanto, importantes informações foram obtidas e, certamente, irão contribuir para desvendar a contribuição de aminoácidos e peptídeos para o aroma desejado de chocolate.

As pesquisas realizadas juntamente com o atual cenário mercadológico e suas tendências futuras indicam que as circunstâncias são inicialmente interessantes à implementação e difusão do tratamento enzimático proposto, principalmente quando considerada a oportunidade de obtenção de nibs de boa qualidade para serem comercializados às indústrias de processamento.

REFERÊNCIAS

ADEYEYE, E. I. et al. (2009). Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. *Food Chemistry*, 127.

AFOAKWA, E. O. et al. (2009). Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. *Food Chemistry*, 113:208–215.

AFOAKWA, E. O. et al. (2008). Flavor Formation and Character in cocoa and chocolate: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48:840-857.

AFOAKWA, E. O. et al. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18:290 - 298.

AIKPOKPODION, P. E.; DONGO, L. N. (2010). Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. *International Journal of Sustainable Crop Production*, Bangladesh, v. 5, n. 4, p. 66-70.

AMIN, I. et al. (2002). Analysis of vicilin (7S)-class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82:728–732.

AMOYE, S. (2006). Cocoa Sourcing, World Economics and Supply. *The Manufacturing Confectioner*, 86(1):81 - 85.

AMRANI-HEMAIMI, M. et al. (1995). Mechanisms of formation of alkylpyrazines in the Maillard Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2818 - 22.

ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundance in human liver. *Electrophoresis, Weinheim*, v. 18, p. 533-537.

ANDRADE, A. (2006). Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*. 121f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

AQUARONE, E. et al. (2001). Biotecnologia industrial. Sao Paulo: E. Blucher. v. 4.

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology* 86: 87 - 99.

ARNOLDI, A. et al. (1988). Flavor components in the Maillard reaction of different amino acids with fructose in cocoa butter-water. Qualitative and quantitative analysis of pyrazines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36:988–92.

ARUOMA, O.I. (2003). Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, v.9-20, p.523-524.

AWUA, P. K. (2002). Cocoa Processing and Chocolate Manufacture in Ghana. David Jamieson and Associates Press Inc., Essex, UK.

BAILEY, S. et al. (1962). Studies of the volatile components of different varieties of cocoa beans. *Journal of Food Science.*, 27:165-170.

BAINBRIDGE, J.; DAVIES, S. (1912). The essential oil of cocoa. *Journal of the Chemical Society*, 101: 2209-2221.

BECKETT, S. T. (2009). Industrial Chocolate Manufacture and Use. 4. ed. London: Wiley-Blackwell. 720 p.

BECKETT, S. T. (2003). Is the taste of British milk chocolate different? *International Journal of Dairy Technology*. 56:3, 139 - 142.

BECKETT, S. T. (2000). The Science of Chocolate. Royal Society of Chemistry Paperbacks.

BECKETT, S.T. (1999). Industrial Chocolate Manufacture and Use. Oxford, Blackwell Science, 3rd edition.

BECKETT, S.T. et. al. (1994). Industrial Chocolate Manufacture and Use. Second Edition.

BELITZ, H. D; GROSCH, W. (2004). Food chemistry. 3. ed Berlin; New York: Springer Verlag. 774 p.

BIEHL, B.; VOIGT, J. (1999). Biochemistry of cocoa flavour precursors. In *Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference*, Salvador, Brazil, 1996, pp. 929 - 938. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers Alliance.

BIEHL, B. et al. (1996). Nature of proteases and their action on storage proteins in cocoa seeds during germination as compared with fermentation. In *12th Cocoa Research Conference*, Salvador, pp. 18 - 23. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers Alliance.

BIEHL, B. et al. (1993). The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angewandte Botanik*, 67:59 - 65.

BIEHL, B. et al. (1990). Bean spreading: A method of pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysian. *J. Food Agric.* 51:35 - 45.

BIEHL, B. et al. (1985). Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 36:583 - 598.

BIEHL, B. et al. (1982a). Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 33:1291-1304.

BIEHL, B. et al. (1982b). Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 33:1101 - 1109.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, V. (2002). Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalized cocoa powder. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(13): 3743 - 50.

BRAND-WILLIAMS, W. et al. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25 - 30

BRITO, E. S. (2000). Estudo de Mudanças Estruturais e Químicas Produzidas Durante Fermentação, Secagem e Torração do Cacao (*Theobroma Cacao L.*); e Propostas de Tratamento Para o Melhoramento de Sabor. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas).

BRITO, E.S. et al. (2002). Effect of polyphenol oxidase and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 22(1): 45 - 48.

BUYUKPAMUKCU, E. et al. (2001). Characterization of peptides formed during fermentation of cocoa bean. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49:5822 - 5827.

CAMU, N. et al. (2008). Fermentation of cocoa beans: Influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J. Sci. Food Agri.* 88:2288 - 2297.

CANTÚ, M. D. et al. (2008). Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, v. 31, n. 3, 669 - 675.

CASTRO, L.M. et al. (2010). Similar intracellular peptide profile of TAP1/ β 2 microglobulin double-knockout mice and C57BL/6 wild-type mice as revealed by peptidomic analysis. *The AAPS Journal*, 12(4): 608 - 616.

CEPLAC (2008a), Evolução da Produção Brasileira de Cacau. Acesso em: 05 jan. 2014. Disponível em: < http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado_cacau.htm>.

CEPLAC (2008b), cacau – história e evolução. Disponível em: 05 jan. 2014. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>.

CERNY, C.; FAY, L. B. (1995). Mechanism of formation of alkylpyrazine in the Maillard reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43:2818 - 2822.

CERNY, C.; GROSCHE, W. (1994). Precursors of ethylpyrazine isomers and 2,3-diethyl-5-methylpyrazine formed in roasted beef. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 198:210 - 214.

CLAPPERTON, J. et al. (1994). Contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 71:303 - 308.

COOPER, K. A. et al. (2008). Predictive relationship between polyphenols and nonfat cocoa solids content of chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 56, n.1, p. 260 - 265.

COPETTI, M. V. et al. (2011). Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. *Food Microbiology*. v. 28: 1499 – 1504.

COUNET, C. et al. (2004). Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52:6243 - 6249.

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

COUNET, C. et al. (2002). Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:2385 - 2391.

CROSS, E. (1999). Cocoa flavor development. *The Manufacturing Confectioner, Princeton*, v. 79, n. 2, p. 70-77.

CUENCA, M. A. G.; NAZARIO, C. C. (2004). Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 25p.

CUNHA, R. et al. (2006). Espectrometria de massas de proteínas: o papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Ano IX - nº 36. p. 40 - 46.

DIAS, J. C.; AVILA, M. G. M. (1993). Influence of the drying process on the acidity of cocoa beans. *Agrotropica*, 5:19–24.

DIMICK, P. S.; HOSKIN, J. C. (1999). The Chemistry of Flavour Development in Chocolate. In *Industrial Chocolate manufacture and use*. 3rd edition, p. 137 - 152. S. T. Beckett., Blackwell Science, Oxford.

DIMICK, P. S.; HOSKIN J. M. (1981). Chemico-physical aspects of chocolate processing: a review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 4: 269 – 82.

DINIZ, M. E. R. (2011). Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas. 93f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais.

DORAN, J.W.; PARKIN, T. B. (1994). Defining and assessing soil quality. In DORAN, J. W. et al. (Eds.), *Defining soil quality for sustainable environment* (p. 3 - 21). Wisconsin: Soil Science Society of America (Special Publication Number 35).

DROUDEN, M. et al. (1996). *Technology for Sweet: Chocolate* (Drouden & Fabry), v. I, pp. 27 - 29.

EFRAIM, P. et al. (2011). Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian Journal of Food Technology*. v.4, n.3, p. 181 - 201.

FEENEY, R.E. et al. (1975). *Advances in Protein Chemistry*, 29: 136 - 204.

FORSYTH, W. G. C; QUESNEL, V. C. (1958). Cacao glycosidase and color changes during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 8, n. 9, p. 505 - 509.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. (2000). The problem of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.1925 - 1941.

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

GRANVOGL, M. et al. (2006). Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems: new insights into pathways of the Strecker reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 1730 - 1739.

GRUNENVALDT, F. L. (2009). Avaliação de propriedades físicas e sensoriais e do desempenho tecnológico de chocolates produzidos com misturas de manteiga de cacau e gorduras low/zero trans. 2009. 151 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GUILLOTEAU, M. et al. (2005). Identification and characterisation of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 549 - 562.

HANSEN, C. E. et al. (2000). Comparison of enzyme activities involved in flavour precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1193 - 1198.

HANSEN, C. E. et al. (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 77, n. 2, p. 273 - 281.

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

HEINZLER, M.; EICHNER, K. (1992). The role of Amadori compounds during cocoa processing formation of aroma compounds under roasting conditions. *Z Lebensm Unters Forsch*, 21: 45 - 50.

HOLM, C. S. et al. (1993). The effects of the organic acids in cocoa on flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61: 65 - 71.

HOSKIN, J.; DIMICK, P. (1983). Role of nonenzymatic browning during the processing of chocolates - A review. *Process Biochemistry* 11: 92 - 104.

HUANG, Y.; BARRINGER, A.S. (2011). Monitoring of Cocoa Volatiles Produced during Roasting by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science*, 76 (2): C279 – C86.

HUANG, D. et al. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington, v. 53: 1841 - 1856.

HUMBERT, B.; SANDRA, P. (1985). LC-GC, 5(12): 1035 - 1037.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Levantamento+sistemático+da+produção+agrícola#1>>. Acesso em: 02 ago. 2015.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Production: latest figures from the quarterly bulletin of cocoa statistics. International Cocoa Organization Westgate House, London, 2013. Disponível em: <http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html>. Acesso em: 02 ago. 2015.

JACOB, R. A.; BURRI, B. J. (1996). Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 63, p. 985S.

JINAP, M. S. et al. (2004). Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry*. 85: 73 - 80.

JINAP, M. S. et al. (1998). Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of Science of Food and Agriculture* 77: 441 - 448.

JINAP, S. et al. (1995). Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*, 6 (2), 105 - 110.

KATTENBERG, H.; KEMMING, A. (1993). The *flavor* of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. In: *Food Flavors, Ingredients and Composition*. p. 1 - 22. Charalambous, G. Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands.

KEALEY, K.S. et al. (2001). Cocoa Components, Edible Products Having Enriched Polyphenol Content, Methods of Making Same and Medical Uses. USA n. PI 6.015.913.

KEALEY, K. S. et al. (1998). Cocoa Components, Edible Products Having Enhanced Polyphenol Content, Methods of Making Same and Medical Uses. WO n. PI 98/09533

KIM, H.; KEENEY, P. G. (1984). Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science*. 49: 1090 - 1092.

KIM, H.; KEENEY, P.G. (1983). Method of analysis for (-) epicatechin content in cocoa beans by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 48: 548 - 551.

KIRCHHOFF, P. M. et al. (1989). Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chemistry*, 31: 295 - 311.

KOBLITZ, M. G. B. (2011). *Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade*. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 301 p.

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

KRINSKY, N.I. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, v. 66, p. 1003 - 1010.

KYI, T. M.; et al. (2005). The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 323 - 331.

LALOI, M. et al. (2002). Molecular and biochemical characterization of two proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta* 215: 754 - 762.

LANGE, H.; FINCKE, A. (1970). Kakao und Schokolade. In: L. ACKER; K.- G. BERGNER; W. DIEMAIR. *Handbuch der Lebensmittel Band VI: Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz* (p. 210 - 309). Heidelberg Springer Verlag, Berlin.

LEHRMAN, D.W.; Patterson, G. R. (1983). Cocoa fermentation. In: *Biotechnology, a Comprehensive Treatise*, v. 5, p. 529 - 575. Reed, G. Ed. Verlag Chemie, Basel.

LEVANON, Y.; MARTELLI, H. L. (1964). Antigenic Properties of non-fermented and fermented cocoa beans. *Bioch. Biol. Sper.*, Pádua, 3:3.

LEVANON, Y.; ROSSETINI, S. M. O. (1965). A laboratory study of farm processing of cocoa beans for industrial use. *Journal of Food Science*, Chicago, 30: 719.

LIMA, U. A. (2010). *Matérias-primas dos alimentos*. São Paulo, SP: Blucher, xxii, 402 p.

LIMA, E.D.P.A. et al. (2001). 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.

LOPEZ, A. (1979). Fermentation and organoleptic quality of cacao as affected by partial removal of pulp juices from the beans prior to curing. *Revista Theobroma*, 9: 25 - 37.

LOPEZ, A.P.; DIMICK, P.S. (1991). Cap. 25: Enzymes involved in cocoa curing. p. 211-236. In: *Food Enzymology*, v.2. Elsevier Applied Science.

LOPEZ, A. S.; DIMICK, P. S. (1995). Cocoa fermentation. In: *Biotechnology: A Comprehensive Treatise*, v. 9, *Enzymes, Food and Feed* p. 563 - 577. Reed, G. and Nagodawithana, T.W., Eds. (2nd ed.). VCH, Weinheim.

LOPEZ, A. S. et al. (1978). Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of *Theobroma cacao* L. *Rev Theobroma*, 8:105–112.

LOPEZ, A.; QUESNEL, V.C. (1973). Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24: 319 - 326.

LUNA, F. et al. (2002). Chemical composition and *flavor* of Ecuadorian cocoa liquor. *J. Agric. Food Chemistry*, 50: 3527 - 3532.

LUNA, A. F.; JIMENEZ, S. Fermentação de cacau com cultivos puros de levedura, *Informe técnico* – CEPEC, Bahia, 1968-69, p.163.

MACDONALD, H. M. et al. (1994). Partial purification of cocoa seed proteins and studies into the degradation of cocoa storage protein. *Café, Cacao, The* 38: 119 - 124.

MADRID, A. et al., (1996). Manual de Indústrias dos Alimentos. São Paulo: Varela, 1996. 599p.

MANN, M.; STEEN, H. (2004). The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, London, v.5, p. 699 - 711.

MCGAULEY, S. E; MARANGONI, A. G. (2002). Static Crystallization behavior of cocoa butter and its relationship to network microstructure. In: MARANGONI A.G.; NARINE, S.S., eds. *Physical properties of lipids*. New York: Marcel Dekker. cap.4, p.85 - 123.

MCHENRY, L.; FRITZ, P. J. (1992). Comparison of the structure and nucleotide sequences of vicilin genes of cocoa and cotton raise questions about vicilin evolution. *Plant Molecular Biology*, 18: 1173 - 1176.

MILLER, H. E. (1971). Simplified method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.48, n.2, p.91.

MISNAWI J. S. et al. (2005). Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 85, n. 6, p. 917 - 924.

MISNAWI, J.S. et al. (2004). Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry*, v. 85, n. 1, p. 73 - 80.

MISNAWI, S. J. et al. (2002). Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry*, 78: 407 - 417.

MISNAWI J. S. et al. (2002). Effects of cocoa liquor roasting on polyphenols content, their hydrophobicity and relation to astringency. *ASEAN Food Journal*, v. 12, p. 25 - 35.

MOHR, W. et al. (1976). On the specificity of cocoa aroma. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 78: 88 - 95.

MORORÓ, R. C. (2012). Aproveitamento dos derivados, subprodutos e resíduos de cacau. In R. R. M. VALLE (Ed.), *Ciência, tecnologia e manejo do cacau* (2nd ed.) (p. 597 e 653). Ilhéus: Ceplac.

MOTAMAYOR, J. C. et al. (2008). Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE* 3(10): e3311.

MÜLLER, M. W. ; VALLE, R. R. M. (2012). Ecofisiologia do cacau. In R. R. M. VALLE (Ed.), *Ciência, tecnologia e manejo do cacau* (2th ed.) (p. 31 e 66). Ilhéus: Ceplac.

NAZARUDDIN, R. et al. (2001). HPLC Determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products, *Malaysian Journal Analytical Science*, 7: 377 - 386.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. (2014). Cocoa and Coffee Fermentations. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Ed. 2: 485 - 492.

OETTERER, M. et al. (2006). Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. Barueri, SP: Manole, 612 p.

OLIVEIRA, H. S. S. et al. (2011). Improving chocolate flavour in poor-quality cocoa almonds by enzymatic treatment. *Journal of Food Scienc*, 76(5): C755 - C759.

OSMAN, H. et al. (2004). Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chemistry*, 86: 41 - 45.

PATRAS, M. A. et al. (2014). Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC–MS. *Food Research International*, v. 63, part C. p. 353 - 359.

PATTERSON, S. D; AEBERSOLD, R. H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics*, New York, v. 33, p. 311 - 323.

PEREGO, P. et al. (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.

PEREGO, P. et al. (1999), *Ricerche e Innovazioni nell'Industria Alimentare* (Chiriotti, Pinerolo), v. IV, p. 797 - 803.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, v.39, p. 791 - 800.

PETTIPHER, G. L. (1990). The extraction and partial purification of cocoa storage proteins. *Cafe, Cacao, Thé*, 34: 23 - 26.

PIMENTA, A. M. C. (2003). Os desafios do proteoma. *Ciência Hoje*, v. 32, n.192, p. 16 - 22.

PLUMAS, B. et al. (1996). Measurement of the olfactive intensity of chocolate by differential olfactometry. *Food Control*, 7: 117 - 120.

PONTILLON, J. (2009). Do cacao ao tablete. *A Ciência na cozinha*, São Paulo, v. 1, p. 62 - 71.

PONTILLON, J. (1995). La fabrication du chocolat. In: *Pour la Science*; p. 118 - 126, Belin: Paris.

PORTE, A. et al. (2007). Produção de voláteis via sistemas modelo de Maillard usando glicose e l-aminoácidos sob diferentes condições de pH. *Revista Universidade Rural, Sérrie Ciências Exatas e da Terra*, Seropédica, RJ, EDUR, v. 26, n. 1 - 2, p. 12 - 32.

RAMLI, N. et al. (2006). Influence of roasting condition on volatile flavour of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30 (3): 280 - 298.

RE, R. et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231 - 1237.

REINECCIUS, G. (2006). *Flavour Chemistry and Technology*. Second edition. CRC Press, Boca Raton, USA.

REINECCIUS, G.A. et al. (1972). Identification and quantification of the free sugars in Cocoa beans. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 20: 199 - 201.

RODRIGEZ-CAMPOS, J. et al. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132. p. 277 - 288.

ROHAN, T. A.; STEWART, T. (1967). The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. *Journal of Food Science*, 32: 395 - 398.

ROHAN, T.H. (1964). *El Beneficio del cacao bruto destinado al Mercado*. Roma.

ROMANCZYK, L. J. et al. (1997). *Cocoa extract compounds and methods for making and using the same*. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/36497, Mars incorporated, USA.

RUFINO, M. S. M. et al. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa, 2007. (Comunicado Técnico).

RUFINO, M. S. M. et al. (2007a). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, 2007. (Comunicado Técnico).

RUFINO, M. S. M. et al. (2007b). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. Fortaleza: Embrapa, 2007. (Comunicado Técnico).

SALTINI, R. et al. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, v. 29: 167 - 187.

SALVATO, F.; CARVALHO M. C. C. G. (2010). Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.3, p.727 - 734.

SANAGI, M.M. et al. (1997). *Journal of Chromatography A*, 785: 361 - 367.

SÁNCHEZ-MORENO, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, v.8, p.121 - 137.

SCHALLEY C. A. (2000). *International Journal of Mass Spectrometry*, 194, 11.

SCHEK, H.; PESCHAR, R. (2004). Understanding the structure of chocolate. *Radiation Physics and Chemistry*, Amsterdam, v.71, n.3/4, p. 829 - 835.

SCHIEBERLE, P.; PFNUER, P. (1999). Characterization of key odorants in chocolate. In *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress*. p. 147 - 153, Teranishi et al. Eds.; Kluwer Academic/Plenum: New York.

SCHNERMANN, P.; SCHIEBERLE, P. (1997). Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 867 - 872.

SCHWAN, R.F.; WHEALS, A. (2004). Understanding the microbiology of cocoa bean fermentations in order to improve quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: 205 - 221.

SERRA-BONVEHÍ, J.; VENTURA COLL, F. (1997). Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chemistry*, v. 60, n. 3, p. 365 - 370.

SHARIF, S. (1997). Effect of alkalization and quality of cocoa liquor from different origins. MSc thesis, Pennsylvania State University.

SPENCER, M. E.; HODGE, R. (1992). Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. Identification of the proteins as members of the vicilin class of storage proteins. *Planta* 186: 567 - 576.

SCHULTZ, T. H. (1977). Isolation of volatile components from a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 446 - 448.

SILVA, S. A. M. et al. (2013). Atividade Antioxidante do Extrato Seco de Cacau Orgânico (*Theobroma cacao*) - Estudo de Estabilidade e Teste de Aceitação de Cremes Acrescidos Deste Extrato. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(4): 493 - 501.

SINGLETON, V. L., e ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144 - 153.

SODRÉ, G. A. (2007). A espécie *Theobroma cacao*: novas perspectivas para a multiplicação de cacaueteiro. Jaboticabal: *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(2), 0 - 0.

SOUSA, C. M. M. et al. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, 351 - 355.

TAI, H. et al. (1991). Nucleic acid sequence of a 21 KDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (kunitz) family of protease inhibitors. *Plant Molecular Biology*, 16: 913 - 915.

TAYLOR, A. J.; ROBERTS, D. D. (2004). *Flavour Perception*. Blackwell Publishing Limited, Oxford, U.K.

TAYLOR, A. J. (2002). *Food Flavour Technology*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.

THOMPSON, S.S. et al. (2001). Cocoa and coffee. In: Doyle, M.P.

TODOROVIC et al. (2015). Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 4: 137 - 143.

TOMLINS, K. I. et al. (1993). Effect fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. *Food Chemistry*. v.: 46: 257 - 263.

VEDANA, M. I. S. (2008). Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva. Dissertação de Mestrado, 85 f.

VINSON, J. A.; MOTISI, M.J. (2015). Polyphenol antioxidants in commercial chocolate bars: Is the label accurate?. *Journal of functional foods*, 12: 526 - 529.

VOGEL, A. I. (2008). *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LCT. 462p.

VOIGT, J.; BIEHL, B. (1995). Precursors of the cocoa specific aroma components are derived from the vicilin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. *Acta Botanica Brasilica*, 108: 283 - 289.

VOIGT, J. et al. (1995). Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoproteinase during ripening and germination of *Theobroma cacao* seeds. *Journal of Plant Physiology*, 145: 299 - 307.

VOIGT, J. et al. (1994a). *In vitro* formation of cocoa-specific aroma precursors: aromarelated peptides generated from cocoaseed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chemistry*, 49:173 - 180.

VOIGT, J. et al. (1994b). Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry*, 50: 177 - 184.

WHITEFIELD, R. (2005). *Making Chocolates in the Factory*. Kennedy's Publications Ltd, London, UK.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. (2000). Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?. *Food Research International, Essex*, v. 33, n. 6, p. 449 - 459.

ZIEGLEDER, G. (1991). Composition of *flavor* extracts of raw and roasted cocoas. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 192: 512 - 525.

ANEXO A – Estudo de Viabilidade

Tecnologia, produtos e oportunidades de negócio

1.1 Caracterização da tecnologia

O projeto em estudo propõe uma metodologia de tratamento enzimático para a aplicação em amêndoas de cacau de baixa qualidade, conhecidas como ardósia, de modo a contribuir para a formação de precursores de aroma do chocolate. De acordo com o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau (Instrução Normativa nº 57 do MAPA), ardósia 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 ardósia, as amêndoas mal fermentadas bem como aquelas provenientes de frutos verdes fermentadas ou não.

A fermentação é uma das fases consideradas mais importantes, pois é nela que se dá início a formação dos precursores do sabor e aroma do chocolate (ESTIVAL, 2010). Na fermentação natural do cacau ocorre a transformação de alguns compostos em outros, que irão ser os precursores de sabor e aroma.

A tecnologia, portanto, busca simular esse processo enzimático que ocorre no cacau, a fim de criar um tratamento enzimático que melhore a eficiência da fermentação do fruto. A produção enzimática dos precursores de aroma irá proporcionar uma melhor qualidade a essas amêndoas, geralmente responsáveis pela baixa qualidade do *liquor* produzido. Para tanto, foram testadas proteases e carboxipeptidases de diferentes fontes (animal, vegetal e microbiana), sob diversas condições de tratamento.

Oliveira et al. (2011) avaliaram os tratamentos por meio de análise química (eficiência de hidrólise) e análise sensorial do material tratado, através da comparação desse com amêndoas de boa qualidade e de baixa qualidade. Os testes sensoriais foram realizados por equipe de julgadores, composta por alunos e professores do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Os resultados mostraram que as amêndoas tratadas com a enzima microbiana e a enzima animal obtiveram maiores semelhanças com as amêndoas de boa qualidade, comparando com as enzimas de origem vegetal. Como a enzima microbiana possui custo menos elevado e fornecimento em quantidades apreciáveis, ela foi considerada a mais viável. Dessa forma, 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.

Os tratamentos enzimáticos realizados proporcionaram uma melhora de aproximadamente 50% no aroma de chocolate das amêndoas de cacau de baixa qualidade favorecendo, portanto, o estabelecimento de uma metodologia a ser levada para indústria de manufatura do cacau e do chocolate.

1.2 A cadeia produtiva do chocolate e a aplicação da tecnologia

A cadeia produtiva do chocolate pode ser organizada em três grupos, sendo eles as fazendas produtoras de cacau, as indústrias de processamento e as fábricas de chocolate. Os grupos estão respectivamente vinculados às principais etapas produtivas do chocolate.

A Figura 1 ilustra essas fases e etapas da cadeia produtiva do chocolate.



Figura 1 - Cadeia de produção do chocolate

Fonte: <http://piteu-cozinhafetiva.com/2012/07/25/o-cacau-do-plantio-ao-ensacamento-das-amendoas-etapa-fazenda/>

As etapas iniciais são plantio, colheita, quebra do cacau, fermentação e secagem e acontecem geralmente nas fazendas produtoras. É na etapa de fermentação que as sementes do cacau passam para a denominação de amêndoas, após perderem a

capacidade de germinação. Nesse momento também se verifica o início da evolução das características de aroma e sabor, já que, quando recém colhidas, as sementes do cacau apresentam sabor amargo e adstringente, não tendo qualquer valor como alimento. No processo de secagem, as amêndoas são dispostas ao sol para atingirem o nível de umidade pretendido e, por fim, serem comercializadas para as indústrias de processamento.

Nas indústrias de processamento inicia-se o beneficiamento das amêndoas que irão potencializar a formação dos precursores do aroma do chocolate. Em um primeiro momento são realizadas as etapas de limpeza e descascamento, dando origem aos nibs – matéria-prima para os derivados do cacau, conforme destacado na Figura 2. Em seguida, é realizada a etapa de torrefação que consiste em um tratamento térmico das amêndoas de cacau com ar quente e, é essa, a principal responsável pelo desenvolvimento do aroma do chocolate. Após essa etapa, os nibs torrados são moídos e prensados dando origem ao *liquor* (ou torta) de cacau, insumo para a produção do próprio chocolate e também da manteiga e do pó de cacau, outro insumos importantes para o chocolate.



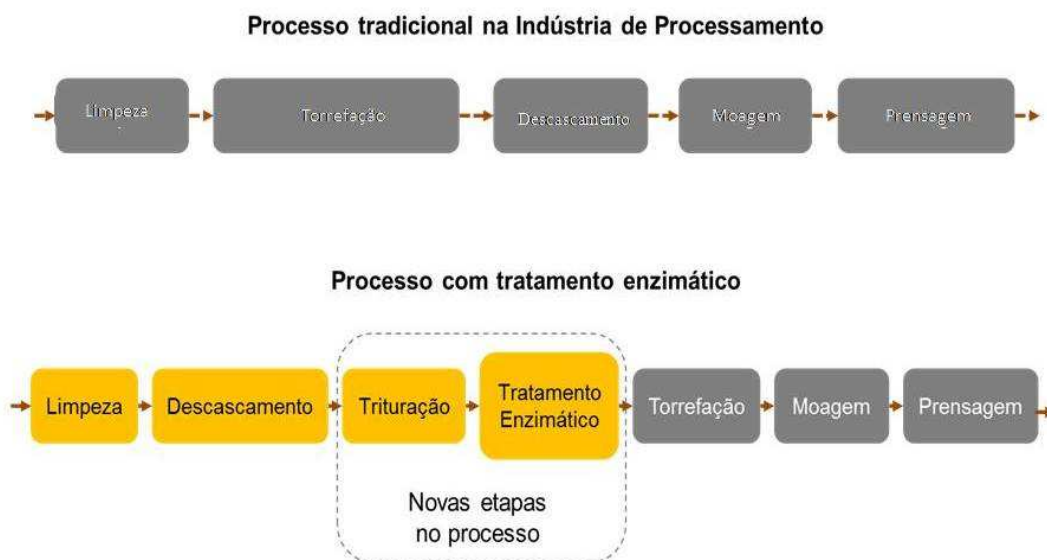
Figura 2 – Fases do cacau durante o seu processamento. Da esquerda para direita, de cima para baixo: (1) polpa do cacau; (2) sementes de cacau não fermentada; (3) amêndoas de cacau secas e fermentadas; (4) amêndoas de cacau torradas; (5) cascas das amêndoas de cacau; (6) Nibs de cacau (limpa e triturada) em destaque; (7); massa de cacau; (8) manteiga de cacau; (9) pó de cacau.

Fonte: http://www.foto-grafo.de/Cocoa/cocoa_5.html

A transformação desses subprodutos no produto final, o chocolate, é realizada em suma pelas fábricas de chocolate por meio dos processos de conchagem e moldagem. O primeiro implica na mistura da massa de cacau com outros ingredientes como: açúcar, leite, manteiga de cacau, lecitina e baunilha, dependendo do tipo de chocolate que se quer produzir. A etapa também irá provocar a evaporação de água e de ácidos indesejáveis. Em seguida é realizada a etapa de moldagem para que o produto final tenha a forma desejada, resultando nos chocolates em barra, bombons e etc.

Embora a tecnologia esteja relacionada à etapa de fermentação, ela será aplicada em outro momento da cadeia produtiva: no início da fase de processamento. A aplicação da tecnologia depende diretamente das etapas de limpeza e descascamento, além disso, acrescentará a etapa de trituração das amêndoas com o objetivo de homogeneizar os insumos para a outra nova etapa: a de tratamento enzimático - que complementa o processo de fermentação das amêndoas e estimula os precursores de aroma do chocolate. A Figura 3 compara as etapas sem e com o tratamento enzimático.

Figura 3 - Comparação entre o Processo Tradicional na Indústria de Processamento e o Processo com Tratamento Enzimático



Fonte: Elaborado pela equipe do IEBT

1.3 Problema de Mercado

1.3.1 Diferenciação entre chocolate fino e convencional

Sobre diferenciação de preços e qualidade do cacau, o mercado contempla apenas duas categorias básicas que são a do tipo Bulk (equivalente a um cacau do tipo regular e/ou ordinário) e também o tipo Fino ou *Flavor* (identificado por sua capacidade aromática ou fina qualidade) (PEREIRA, 2009).

Sob os aspectos genéticos, é possível então, fazer uma classificação de acordo com o tipo do cacau, sendo o Crioulo ou Trinitário a espécie que produz o cacau do tipo Fino, enquanto que a espécie Forastero produz o cacau do tipo Bulk.

Figura 4 - Cacau dos Tipos Forasteiro e Criollo



Fonte: www.foto-grafo.de/Cocoa/cocoa_2.html

Segundo o vice-presidente de Chocolates Premium da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (Abicab), o consumidor brasileiro vem buscando produtos mais sofisticados e de maior qualidade, tendo em vista que o aumento do seu poder aquisitivo lhe proporcionou viajar mais ao exterior e experimentar os chocolates finos. No entanto, a qualidade do produto final inicia-se com o sabor das amêndoas de cacau, influenciado pelas condições de onde estas são processadas. Todas as etapas, desde os cuidados com os cacaueiros até a fermentação e

secagem das sementes podem ser responsáveis por até 50% das características organolépticas do chocolate, principalmente sobre o sabor e aroma.

São várias as distinções entre a produção do chocolate convencional e do chocolate fino. Para produção do chocolate convencional não há nenhum cuidado ou controle especial, pois se inclui na sua elaboração todo tipo de cacau, inclusive frutos danificados ou fora do ponto de maturação. A fermentação das amêndoas de cacau é curta - entre três e quatro dias - para que a perda de peso, que ocorre durante a fermentação, seja a menor possível, sendo que para cada dia de fermentação perde-se, em média, 1% do seu peso. A secagem das amêndoas é feita ao sol e também em secadores artificiais, agilizando esse processo e reduzindo os custos de elaboração dessas amêndoas. Portanto, a produção do chocolate convencional visa à redução dos custos de elaboração do produto e não a sua qualidade, haja vista que no mercado não se paga prêmio pela qualidade desse tipo de cacau (TAVARES, 2009).

Na produção do chocolate fino diversos procedimentos devem ser seguidos a fim de garantir a qualidade do produto final. Todo o cacau utilizado é previamente selecionado, aberto cuidadosamente para não cortar as amêndoas e, então, nova seleção é feita. A massa de cacau é conduzida no mesmo dia para os coxos na casa de fermentação, onde será fermentada por cinco a sete dias, sendo essa massa revolvida a cada 48 horas. Um dos requisitos para essa etapa é que as amêndoas sejam originárias de frutos maduros, uma vez que a partir de frutos verdes não se desenvolve qualidade que se assemelhe à das amêndoas maduras, a qual é necessária à produção do cacau fino. Um ponto de atenção é que o tempo de fermentação pode variar de acordo com a época em que foi colhido o cacau.

Concluída a fermentação, essa massa para cacau fino é conduzida às barcaças, que possuem seus lastros confeccionados em madeira (louro, paraíba, cedro, jequitibá, etc.), onde o processo de secagem se dá sob o sol durante aproximadamente 10 dias, havendo variação no tempo dessa exposição das amêndoas em função do clima. Todos os lotes comercializados são previamente selecionados, sendo descartados aqueles em que a fermentação e a secagem das amêndoas não atingem a perfeição. As impurezas são removidas, como também as amêndoas defeituosas (sem cotilédones, germinadas, quebradas, etc.) e, os sacos que porventura contenham sinais de mofo são substituídos, até mesmo depois de classificados, quando da troca dos sacos para exportação.

A embalagem também faz parte da preocupação do produtor desse segmento, todos os sacos são sequencialmente numerados, identificados com a logomarca da fazenda e a data do término da secagem, para que possam ser rastreados, se necessário (TAVARES, 2010).

O mercado mundial que produz e comercializa o chocolate já contempla um conceito de qualidade para o dito chocolate fino, geralmente utilizando cacau de uma única origem e com aproximadamente 70% de cacau na composição da massa, tendo como resultado a produção de chocolates com características específicas de aroma e sabor. Nesse cenário, percebe-se um mercado exigente, mas que paga prêmio sobre o preço cotado na bolsa de Londres (TAVARES, 2010).

1.3.2 Baixa na produção de cacau no Brasil

O Brasil já se destacou nesse mercado como um forte exportador de cacau, sendo essa 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.

Figura 5 - Cacau acometido pela vassoura de bruxa



Fonte: <http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>

Outro problema recorrente que contribui para a baixa expressão brasileira no setor é a baixa qualidade das amêndoas produzidas, uma vez que o processo de fermentação e secagem é feito nas fazendas, sem qualquer controle de processo. Assim, 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. Conseqüentemente, uma porção importante das amêndoas a serem torradas não desenvolve o aroma característico, o que leva à perda de qualidade do chocolate produzido a partir dessa matéria-prima. Embora esse problema seja conhecido há bastante tempo, verifica-se no Brasil 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.

Em relação à comercialização, o principal problema identificado refere-se à dificuldade de acesso às tecnologias para agregar valor às amêndoas – transformação na chamada massa de cacau ou *liquor*. Os equipamentos disponíveis no Brasil são de alto custo o que impede o pequeno e médio produtor cacaueiro de agregarem essa etapa da produção, que representaria um aumento de mais de 100% no valor do produto comercializado. (CINTRA,2010).

1.4 Proteção intelectual

A tecnologia do processo de aproveitamento de amêndoas de cacau de baixa qualidade para a obtenção de uma mistura de compostos que, após a torrefação, desenvolva um aroma de chocolate significativamente semelhante ao aroma desenvolvido a partir de amêndoas de cacau de alta qualidade, está em processo de deposição de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Existem algumas tecnologias similares já patenteadas e a principal delas é a patente US5888562, de autoria da Nestec S.A.. A principal diferença entre essa patente e a do estudo em questão é a faixa de pH utilizada para aplicação da enzima nas amêndoas de cacau de baixa qualidade. No caso da patente da Nestec S.A. a faixa vai de 3 a 8 e para este estudo, a faixa de pH é mais restrita, indo de 3,0 a 4,5.

Outras patentes relacionadas são: US 2003/0148417 A1, que trata mais especificamente de aspectos da sequência de DNA envolvidos na produção do sabor do cacau; US 2003/0219511 A1, relacionada com um novo gene *carboxypeptidase* e o

polipeptídeo codificado por meio dele, que pode ser utilizado na fabricação do cacau; WO 02/063974 A1, sobre o processo de preparação de licor de cacau enzimaticamente hidrolisado e seu uso para produção de chocolate e processar reações de sabor.

1.5 Estágio de desenvolvimento

O início do desenvolvimento da tecnologia em estudo partiu da busca por referenciais teóricos capazes de embasar tecnicamente as alterações propostas e os resultados almejados, alcançando assim o estigma de que o tratamento enzimático proposto é factível. Como resultado preliminar, obteve-se a comprovação de que alterações enzimáticas poderiam potencializar o efeito do afloramento das características de aroma e sabor desejáveis nas amêndoas de cacau de baixa qualidade, por meio da atuação de enzimas microbianas específicas que, ao gerarem, principalmente, peptídeos e aminoácidos livres desencadeiam o aroma característico do chocolate.

Esse mesmo fato foi averiguado no estudo dos pesquisadores J. Voigt, D. Wrann, H. Heinrichs e B. Biehl que realizaram testes com tratamentos enzimáticos em diferentes culturas utilizando coco, sementes de girassol, avelãs e cacau. Os resultados obtidos elucidaram que dentre as culturas analisadas, somente a de cacau apresentou uma alteração significativa quanto à otimização da obtenção dos precursores de aroma devido à estrutura química particular das vicilinas (globulinas) presentes nas sementes de cacau. Esse efeito foi comprovado através de testes sensoriais, em que 50% dos participantes do teste reconheceram o aroma característico do chocolate nas amêndoas tratadas com as enzimas.

Além disso, no mercado já se encontram patentes similares que também visam, por meio de alterações genéticas enzimáticas, alcançar um nível ascendente quanto à qualidade das amêndoas de cacau a partir dos precursores de aroma.

Para averiguar a evolução e atuação da tecnologia em estudo foram realizados testes sensoriais que consistem em medir, analisar e interpretar as reações produzidas pelas características dos alimentos e materiais, ou seja, como elas são percebidas pelos órgãos da visão, olfato, gosto, tato e audição. Os testes foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) a partir de amostras de pó de cacau enzimaticamente tratado. Esse teste consistiu em duas etapas,

primeiramente realizou-se o Teste de Diferença de Controle em que os participantes deveriam comparar, através do aroma, seis amostras de amêndoas com duas amostras de controle – uma de amêndoas de cacau de boa qualidade e uma segunda, amêndoas de baixa qualidade – e classificá-las quanto à similaridade. Em um segundo momento, instituiu-se o Teste de Ordenação de Preferência, os julgadores foram orientados a ordenar as amostras conforme a preferência, em relação ao aroma de chocolate. Ambos os testes apresentaram resultados favoráveis quanto ao tratamento enzimático aplicado.

Como conclusão dos estudos até essa etapa, tem-se que é possível, 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 aroma característico de chocolate.

A Figura 6 abaixo apresenta um esquema com a fase de desenvolvimento da tecnologia, indicando que ainda há importantes etapas de testes e verificações para conferir melhores resultados à tecnologia, bem como sua caracterização como produto e potencial para escalabilidade.

Figura 6 – Estágio de Desenvolvimento da Tecnologia



Fonte: Elaborado pela equipe do IEBT

2 Mercado

2.1 Aspectos regulatórios

Alguns regulamentos e legislações em âmbito nacional trazem importantes informações do funcionamento do mercado de cacau no Brasil, assim como a forma como ele é regulado: incentivado ou limitado. Abaixo foram destacados alguns que se relacionam ao estudo, acompanhados de uma breve explicação.

2.1.1 Regulamento e Legislação

- **Regulamento Técnico para Chocolate e Produtos de Cacau¹**

Visa fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer o Chocolate e os Produtos de Cacau.

¹ - Fonte: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8991-1-0%5D.PDF>

- **Decreto nº 5.302 /2004²**

Promulga a nova versão do Acordo Internacional do Cacau que visa harmonizar o mercado cacauceiro através da cooperação técnica desenvolvendo as áreas de pesquisa, geração e transferência de tecnologia objetivando a sustentabilidade sob o critério econômico.

- **Lei nº 3665/2012³**

Ainda em trâmite no Senado Federal, esse projeto visa a criação de um Selo Verde para o cacau. Dentre os critérios estabelecidos para a obtenção do Selo Verde Cacau, os cacauicultores terão de atender aos estabelecidos no projeto, entre eles: observar as leis ambientais e trabalhistas nacionais, estaduais e municipais; explorar a atividade de maneira sustentável, desde que não descaracterize a cobertura vegetal existente e não prejudique a função ambiental da área; cultivar o cacau na modalidade agroflorestal cabruca no bioma Mata Atlântica, para o qual será concedido o Selo Verde Cacau Cabruca, ou sob a forma de sistemas agroflorestais no bioma Floresta Amazônica, para o qual será concedido o Selo Verde Cacau Amazônia, de modo a conservar a diversidade biológica e seus valores associados, os recursos hídricos, os solos, os ecossistemas e paisagens frágeis ou singulares, mantendo-se ao máximo possível as funções ecológicas da floresta.

O cacauicultor detentor do Selo Verde terá um produto diferenciado e valorizado no mercado, pela demanda crescente por produtos considerados corretos do ponto de vista ambiental e social.

- **Lei nº 10831/2003⁴**

O cacau orgânico é cultivado através de sistema de produção orgânica, tal como definido internacionalmente no Codex Alimentarius⁵ e no Brasil, pela Lei nº 10831 de 23 de dezembro de 2003 – que visa ao fim do uso de agrotóxicos, à sustentabilidade, à proteção do meio ambiente, à maximização dos benefícios sociais, à minimização da dependência de energia não renovável, ao uso dos recursos naturais, bem como ao respeito à integridade cultural das comunidades rurais. Dessa maneira, o chocolate orgânico não possui leite em sua composição que é substituído por soja orgânica. O

² - Fonte: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/D5302.htm

³ - Fonte: <http://www.ceplacpa.gov.br/site/?p=4523>

⁴ - Fonte: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.831.htm

⁵ - Fonte: Código Alimentar: é uma coletânea de padrões reconhecidos internacionalmente, códigos de conduta orientações e outras recomendações relativas a alimentos, produção de alimentos e segurança alimentar.

produto também é isento de glúten, gordura trans e colesterol, e suas embalagens são de papel reciclado.

2.1.2 Certificação e registros

- **UTZ CERTIFIED⁶:**

Trata-se de um programa de certificação mundial, o qual define as regras para a produção e abastecimento responsável de café, chá e cacau. Essa certificação baseia-se em um sistema de rastreabilidade que assegura que o café, chá ou cacau foram cultivados e colhidos de forma responsável. Para isso, engloba-se requisitos gerais de gestão, de rastreabilidade, boas práticas agrícolas e aspectos ambientais e sociais específicos.

A certificação UTZ reconhece e bonifica os esforços necessários para implementar e melhorar os processos produtivos. Ao fomentar essas práticas tem-se bons resultados, tanto na qualidade das amêndoas de cacau como também na qualidade de vida dos produtores e trabalhadores rurais. Além disso, a iniciativa vem ao encontro de uma demanda crescente por produtos mais sustentáveis, facilitando a entrada em mercados mais exigentes.

Na Bahia, quatro produtores foram auditados recentemente, tornando-se pioneiros no fornecimento de cacau produzido no Brasil com garantia de práticas sustentáveis. Outros 12 produtores de cacau passarão pelo processo de certificação até maio de 2014. Somados, esses produtores representarão um volume aproximado de mil toneladas de amêndoas certificadas.

2.1.3 Programas Governamentais

- **Programa de Desenvolvimento da Cadeia Produtiva de Cacaucultura⁷**

Implementado no Estado do Pará e coordenado pela Comissão Executiva do Plantio da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), com a colaboração da Secretaria de Estado de Agricultura, o programa tem como principal objetivo tornar o Pará o maior produtor brasileiro de cacau até 2023.

Para alcançar a meta estabelecida, o programa prevê a implantação de ações em dois principais agroecossistemas: várzea e terra firme. Nas terras de várzea, o programa

⁶ - Fonte: <https://www.utzcertified.org/pt/products/cocoa>

⁷ - Fonte: http://www.sagri.pa.gov.br/posts/view/151/programa_de_desenvolvimento_da_cacaucultura

pretende alcançar uma produção de 12 mil toneladas de amêndoas de cacau nos próximos sete anos, ocupando uma área equivalente a 20 mil hectares. Em terra firme, visa atingir, no mesmo período, a produção de 247 mil toneladas e ampliar a área cultivada para 220 mil hectares.

O programa também prevê metas de aumento de produtividade em ambos os ecossistemas, passando dos atuais 806 quilos por hectare para cerca de 1.237 quilos por hectare em terra firme até 2019, e de 160 quilos por hectare na várzea para cerca de 600 quilos por hectare nesse período.

- **Programa de Revitalização das Áreas Produtoras de Cacau do Espírito Santo**

O município Cachoeiro de Itapemirim, no Espírito Santo, terá novo incentivo à diversificação agrícola. O cacau, já produzido no estado, terá prioridade na política do agronegócio da cidade. A prefeitura quer que o município produza cacau em grande quantidade, aproveitando as condições climáticas favoráveis a essa cultura. Para isso, oferecerá assistência técnica e outros benefícios a produtores, em parceria com a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), e com o governo do estado.

A partir desse programa, os produtores terão acesso à mudas resistentes a vassoura-de-bruxa, crédito financeiro com condições diferenciadas, apoio técnico direcionado, pagamento por serviços ambientais e outros estímulos.

2.2 Mercado Global de chocolate:

O mercado mundial de chocolate movimenta US\$ 60 bilhões (JUSTE, 2009). Segundo dados de 2007 da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (Abicab), o faturamento do setor foi de R\$ 10,4 bilhões, divididos em R\$ 7,2 bilhões em chocolates, R\$ 2,7 bilhões em balas, confeitos e gomas de mascar e R\$ 519 milhões em amendoins⁸.

O mercado mundial de chocolates está cada vez mais exigente. Assim, os produtos lançados devem ser mais elaborados, competitivos e sua produção deverá estar

⁸ - Fonte: ESTIVAL, Katianny Gomes Santana; CORREA, Solange Rodrigues Santos; CINTRA, Lino Arnulfo Vieira da. Do Consumo de Chocolates à Produção Cacaueira: Alternativas para Agregar Valor à Cadeia Produtiva do Cacau Fino em Ilhéus - Bahia - Brasil. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE SOCIOLOGÍA RURAL, 8., 2010, Porto de Galinhas. **Ponencia.**

de acordo com as exigências da sociedade contemporânea. Tratando-se de preferência, o chocolate tradicional, adocicado, tem perdido espaço no mercado mundial de forma gradativa, cedendo lugar a produtos com maior teor de cacau em sua composição.⁹

2.2.1 Os principais *players* do Mercado Mundial de Chocolate

A Candy Industry publica anualmente uma lista das 100 maiores empresas do mundo de doces, classificando-as por vendas líquidas. A Tabela 1 abaixo é um extrato a partir dessa lista, apresentando as dez maiores empresas do mundo de confeitaria que fabricam algum tipo de chocolate, pelo valor líquido de vendas em 2012:

Tabela 1 - Lista das Principais Empresas de Chocolate do Mundo, Venda Líquida e Market Share - Janeiro 2013.

Empresa	Vendas líquidas em 2012 (US\$ milhões)	Market Share
Mars Inc (USA)	16.800	18%
Mondelēz International Inc (USA)	15.480	17%
Barcel SA, division of Grupo Bimbo (Mexico)	14.095	15%
Nestlé SA (Switzerland)	12.808	14%
Meiji Co Ltd (Japan)	12.428	14%
Hershey Foods Corp (USA)	6.460	7%
Ferrero Group (Italy)	5.627	6%
Chocoladenfabriken Lindt & Sprüngli AG (Switzerland)	2.791	3%
August Storck KG (Germany)	2.272	2%
Yildiz Holding (Turkey)	2.200	2%

Fonte: ICCO¹⁰

Nesse contexto, as vendas líquidas das dez maiores empresas de chocolate do mundo movimentaram mais de US\$ 90 bilhões em 2012. Dessas, apenas cinco representam mais de 80% do mercado total, sendo elas: Mars Inc, Mondelēz International Inc, Barcel SA e Nestlé SA.

⁹ - Fonte: <http://www.alasru.org/wp-content/uploads/2011/07/GT4-Katianny-Gomes-Santana-Estival.pdf>

¹⁰ - Fonte: Internacional Cocoa Organization: <http://www.icco.org/about-cocoa/chocolate-industry.html>

Vale destacar que a Ferrero Group - sétima posição nesse ranking - mesmo se tratando de uma empresa familiar, é avaliada em mais de US\$ 30 bilhões, segundo reportagem publicada na revista Valor Econômico¹¹. Outro destaque é dado à empresa Meiji Co Ltd, marca japonesa de chocolates e confeitos que domina grande parte do mercado asiático, incluindo forte preferência pelos consumidores chineses.

A Figura 7 abaixo ilustra a distribuição dessas dez empresas de chocolate no mundo, e a estimativa de market share, segundo suas vendas líquidas.

Figura 7 - Maiores empresas de chocolate do mundo



Fonte: Elaborado pela equipe do IEBT

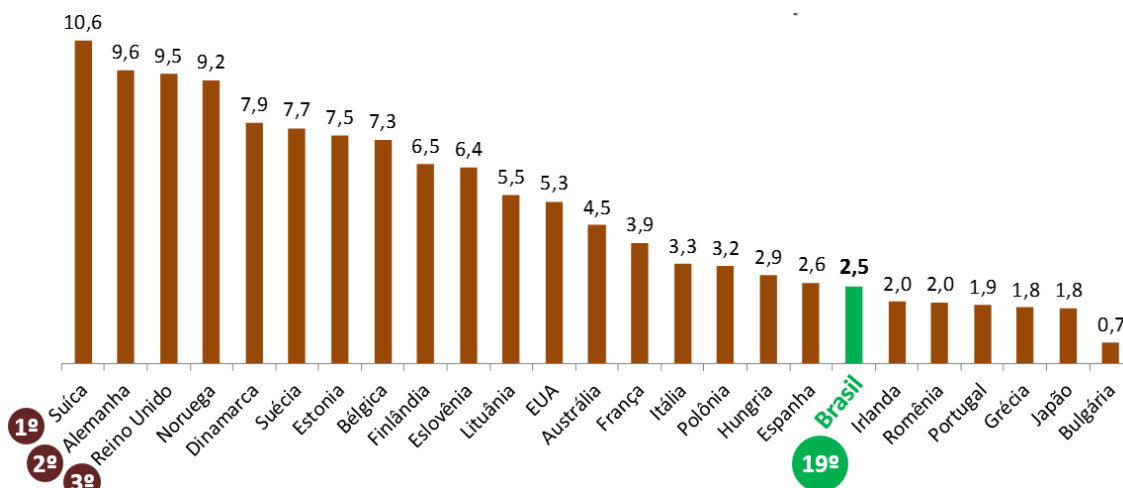
2.2.2 Maiores Consumidores de Chocolate no Mundo

A Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacao, Amendoim, Balas e Derivados (Abicab) publicou o consumo mundial de chocolate per capita em 2011, conforme a Figura 8, na qual se observa que o principal consumidor é a Suíça, com um consumo anual de 10,6 Kg de chocolate por pessoa. Alemanha, Reino Unido e Noruega seguem com um consumo superior a 9,0 Kg/hab. O Brasil ocupava a décima nona posição, quando cada habitante consumia 2,5 Kg por ano, número esse que subiu para 2,83 Kg em 2012.

¹¹ - Fonte: <http://www.valor.com.br/impresso/wall-street-journal-america/ferrero-um-negocio-que-fica-em-familia#ixzz2mML03rDG>

Ainda, segundo a Abicab, esse comportamento deve crescer a um ritmo de 6% nos próximos anos.

Figura 8 - Consumo Mundial de Chocolate per capita em 2011



Fonte: Caobisco – Elaboração: Abicab/ File: C:\Chocolates\Planejamento Estratégico\Planejamento Estratégico 2013\Consumo per capita mundial de chocolates2011.xlsx.

Em relação ao consumo total de chocolate no país (sob todas as formas), o Brasil passa a ocupar a 4ª posição mundial, com um consumo da ordem de 717 mil toneladas no ano de 2012. Nos últimos 10 anos, o consumo de chocolate no Brasil cresceu, em média, 11% ao ano.

2.2.3 O Mercado Mundial de Cacau

Na outra ponta da cadeia do chocolate, estão os produtores de cacau, responsáveis pelo abastecimento do principal insumo do produto. De acordo com a Organização mundial do Cacau, o maior produtor de cacau do mundo é a Costa do Marfim com 35% da produção, seguida de Gana, com 24%. Na sequência vem a Indonésia, Nigéria, República dos Camarões e Brasil. O Brasil, que há três décadas era o maior produtor de cacau do planeta, hoje é responsável por apenas 5% das amêndoas colhidas, revezando-se com o Equador na sexta colocação.

Abaixo na Figura 9 segue o mapa mundial identificando os países com maior produção de cacau. Constata-se no mapa que dos sete maiores produtores, quatro encontram-se no oeste da África.

Figura 9 - Países com maior produção de cacau

Fonte: Elaborado pela equipe do IEBT

A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira¹² (CEPLAC) que tem como missão promover o desenvolvimento sustentável das regiões produtoras de cacau no Brasil, publicou em setembro de 2013 informações do mercado mundial de cacau. Quanto aos maiores produtores de cacau do mundo, obteve-se que:

- Na Costa do Marfim, as firmas exportadoras estimaram que as entradas acumuladas de cacau nos portos até setembro de 2013, teriam alcançado 1.391.000 toneladas frente ao volume reportado de 1.374.000 toneladas para data equivalente em 2012, indicando elevação de 1,24%.
- Em Gana, as compras divulgadas pelo Cocobod revelam queda em 2013. Feita extrapolação a partir dos poucos dados publicados até fins de agosto, as compras totais da corrente safra teriam alcançado 803.990 toneladas ou 4,79% abaixo das 844.416 toneladas, em data equivalente no ano de 2011/12
- Na Indonésia, dados da indústria para a Ilha de Sulawesi e informações governamentais para Lampung, conforme publicação da Agência Reuters, indicaram que o total combinado das exportações de cacau em grão das duas regiões na corrente safra, incluindo outubro de 2012 a julho de 2013, totalizou 97.563 toneladas, comparadas às 98.570 toneladas no mesmo período na safra passada, mostrando redução de 1,02%.

¹²Fonte: CEPLAC

<http://www.ceplac.gov.br/paginas/infomercado/Informa%C3%A7%C3%B5es%20de%20Mercado%2020.pdf>

- Para a República dos Camarões, o National Cocoa and Coffee Board (NCCB) divulgou que a produção total do país na safra 2012/13, que vai de agosto a julho na contagem local, somou 228.941 toneladas, ligeiramente acima das 220.000 toneladas da safra passada.

Em relação ao consumo de cacau, os dados publicados pela Ceplac apresentam um aumento expressivo no mercado norte-americano de 2012 e 2013. As importações de cacau norte-americanas para o 2º trimestre de 2013 somaram 117.277 toneladas de cacau, 71,51% acima do mesmo período de 2012. As importações de manteiga alcançaram 13.063 toneladas, volume 9,08% maior que em 2012. Para os sólidos, as importações do 2º trimestre foram de 30.917 toneladas, com elevação de 18,61% frente ao mesmo período de 2012.

2.2.4 Mercado Nacional de Cacau

O Brasil foi líder na produção de cacau até aproximadamente o ano de 1900. A partir de 1910 passou a ser o segundo produtor, perdendo a liderança para Gana. No final da década de 80, a doença vassoura-de-bruxa passou a atacar as plantações de cacau na Bahia, e a partir de 1994 a produção brasileira começou a diminuir mais rapidamente até atingir o seu nível mais baixo na safra 1999/2000 com 123 mil toneladas. Após esse período, com a introdução de plantas com características genéticas de tolerância ao fungo e de maior produtividade, aliados com o mercado promissor de chocolate, a produção retomou o crescimento.

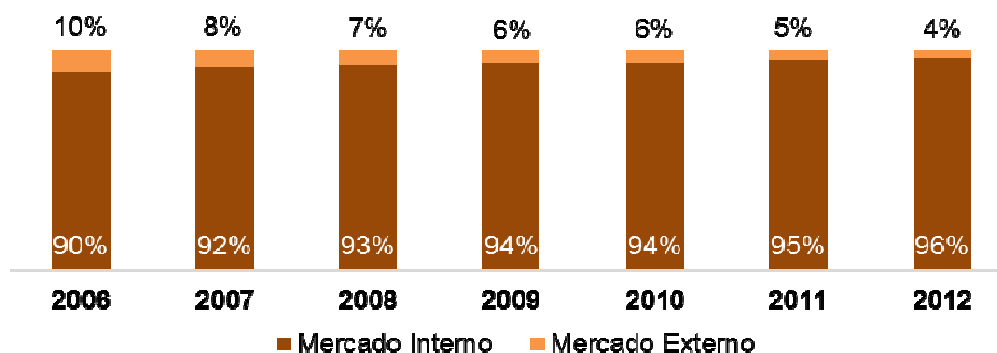
Segundo a Ceplac, a produção da safra de 2011/2012 atingiu cerca de 240,4 mil toneladas de cacau, o que representa um aumento de 40,75%, quando comparada à safra de 2004/2005, que foi de 170,8 mil toneladas.

A produção nacional de cacau em amêndoas está concentrada no sul da Bahia - 62% da oferta brasileira - seguida, em escala bem inferior, pelo Pará - com 26% - e por Rondônia - com 7% -, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Distribuição dos produtores de cacau

Fonte: Elaborado pela equipe do IEBT¹³

Embora as perspectivas de produção sejam positivas, o Brasil ainda não é auto-suficiente na produção de cacau para atendimento da demanda interna. Atualmente, importa-se cerca de 30% do que o país consome provenientes, principalmente, de Gana e da Costa do Marfim. Além da insuficiência de produção de cacau para atender o mercado interno, o Brasil exporta cada vez menos a commodity. Assim, grande parte da produção é focada no mercado interno, conforme mostra a Figura 11.

Figura 11 – Destino da Produção Nacional de Cacau

Fonte: Compilação por: HUY Moreira Auditores – Elaboração: Abicab/ File: C: Chocolate/Planejamento Estratégico/ Planejamento Estratégicos2013/ Matrizes/ Destino da Produção.xls

¹³ - Fonte: Dados obtidos de http://www.businessreviewbrasil.com.br/money_matters/a-industria-do-chocolate-no-brasil

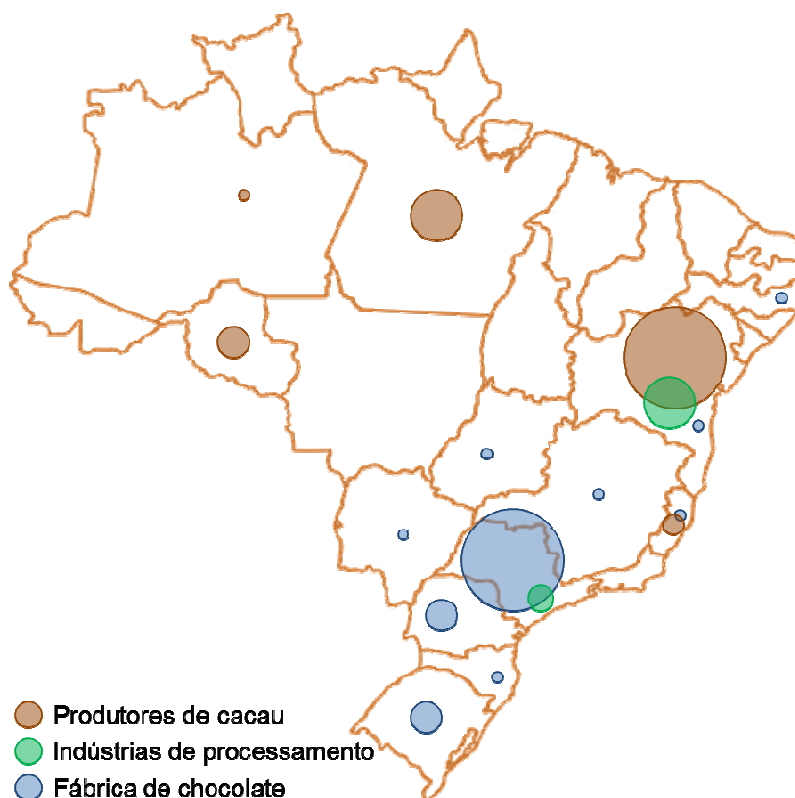
2.2.5 Mercado Nacional de Chocolate

No que tange à produção do chocolate, hoje o Brasil ocupa a terceira colocação no ranking mundial, contando com 40 fábricas de chocolate distribuídas principalmente no sudeste e sul do país, com forte concentração em São Paulo, onde hoje existem 26 delas.

As indústrias de processamento de cacau concentram-se, em sua maioria, próximas à região de maior produção do grão, na Bahia. São elas: ADM; Cargill e Barry Callebaut. A Indeca e a Nestlé localizam-se próximas às fábricas de chocolate no estado de São Paulo. Vale ressaltar que a Nestlé também caracteriza-se como uma grande fábrica de chocolate no país, com forte participação no mercado.

A Figura 12 abaixo apresenta o mapa do Brasil com a distribuição das fazendas de cacau, indústrias de processamento e fábricas de chocolate.

Figura 12 - Distribuição dos produtores de chocolate



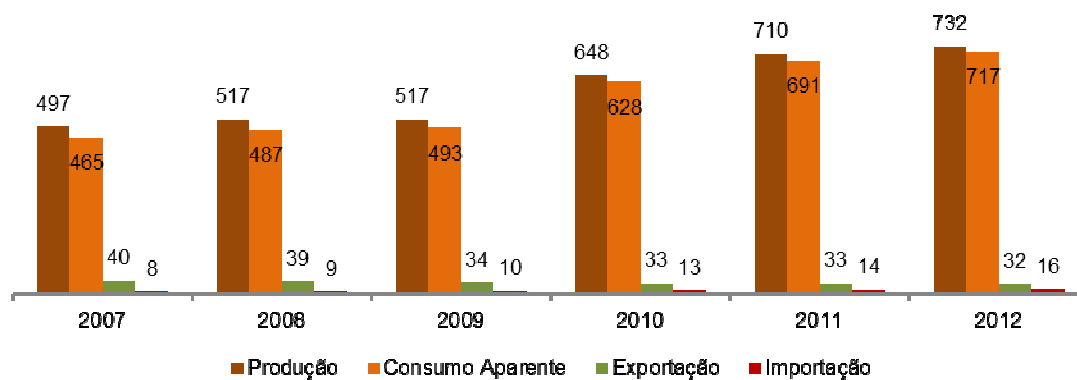
Fonte: Elaborado pela equipe do IEBT¹⁴

¹⁴ -Fonte: Dados obtidos de <http://www.ceplacpa.gov.br/site/?p=3009>; <http://www.abicab.org.br/associados-fornecedores/>; e http://www.abicab.org.br/produtoschocolate/produtos-chocolate/?site_section=associados-chocolate&post_type=associados&s;

A produção nacional de chocolates no primeiro semestre de 2012 totalizou mais de 228.212 toneladas, 4,2% maior se comparada ao mesmo período de 2011, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (Abicab).

Os dados da Abicab ainda mostram que a produção de chocolate no país cresceu 47% desde 2007, enquanto o consumo aparente cresceu 54% no mesmo período, o que justifica um significativo aumento da importação também, conforme pode ser verificado na Figura.

Figura 13 - Produção, Consumo Aparente, Exportação e Importação (sob todas as formas) em mil toneladas



Varição entre 2007 e 2012

Produção: 47,3%

Consumo Aparente: 54,2%

Exportação: -20,0%

Importação : 100,0%

Fonte: Fonte: Associados – compilação por: UHY MOREIRA - AUDITORES | ELABORAÇÃO: ABICAB/File: C: Chocolates/Planejamento Estratégico/ Dados Estratégicos 2012/Matrizes/consumo aparente.exe

Vale observar que apesar da crise financeira de 2008 e 2009, não houve queda do consumo aparente de chocolate, que se manteve praticamente estável e até apresentou um pequeno crescimento no período. Isso mostra que mesmo não se tratando de um bem de primeira necessidade, o consumo de chocolate não é vulnerável a

limitações no orçamento das famílias. Por outro lado, nos anos seguintes, em que os juros caíram e o crédito foi facilitado, causando certa euforia de consumo de maneira geral, a quantidade consumida aumentou significativamente. Dessa maneira, podemos concluir que os consumidores de chocolate não deixam de consumi-lo em caso de crise, mas aumentam seu consumo caso tenham confiança na economia.

Com isso, o produto aponta para uma característica interessante posto que seu consumo é, de certa maneira, estável com viés de crescimento. Além disso, ainda há grande potencial de crescimento para a produção, haja vista que a produção brasileira ainda não atende totalmente a demanda interna e exporta quantidades não significativas.

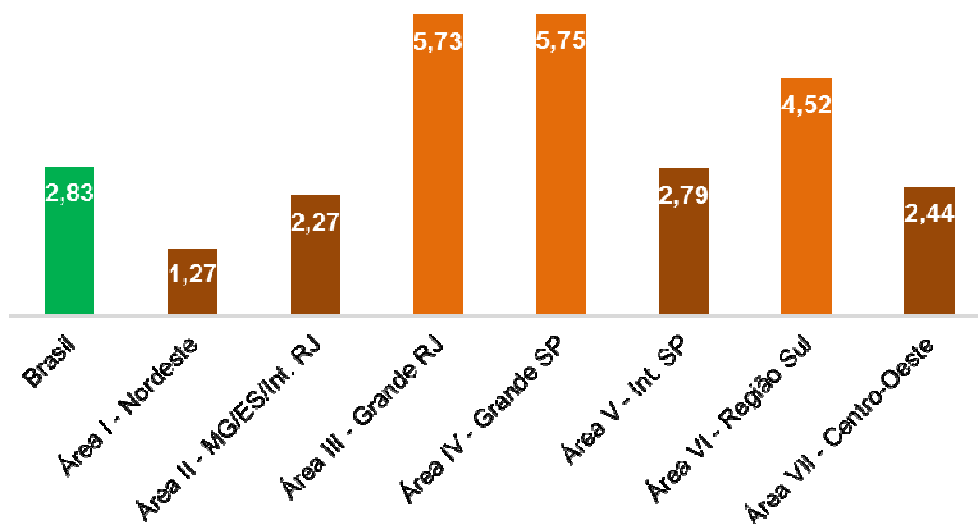
2.2.6 Consumo de chocolate no Brasil

O chocolate mantém o ritmo de crescimento de sua produção e consumo, estimulado pelo aumento da renda e da inserção de uma nova classe consumidora. Entre 2007 e 2012, o consumo interno cresceu, alcançando a marca de 3,7% de crescimento anual ao final de 2012. Isso sustentou fortemente o desenvolvimento do segmento, mesmo com queda de 4,4% no volume exportado no mesmo período.

De acordo com a Cacau Show, no Brasil, apenas o segmento de chocolate movimenta em torno de R\$ 7 bilhões ao ano, com um mercado nacional crescendo a uma taxa de aproximadamente 12% ao ano. De todo esse montante, cerca de 80% é dividido entre três grandes empresas que dominam o mercado de chocolates do Brasil: Nestlé, Kraft e Garoto.

De acordo com o IBGE¹⁵ (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o consumo per capita de chocolate em 2012 foi de 2,83 Kg/hab. Destaca-se São Paulo e Rio de Janeiro como os estados que mais consomem, atingindo as máximas de 5,73 Kg/hab e 5,75 Kg/hab, respectivamente. Na Figura 14, tem-se a representação desse consumo, com a divisão do Brasil em 7 áreas. É possível observar a variação do consumo para as diferentes regiões, sendo notório que regiões mais desenvolvidas consomem mais do produto, ao passo que quanto menos dinâmica a economia local ou quanto menos urbanizada é a região consome-se menos do produto.

¹⁵ - Fonte: IBGE censo 2010/Tendência Nielsen 2012/ Associados ABICAB – Elaboração: ABICAB
File:C:Chocolate/Planejamento Estratégico/Planejamento Estratégico 2013/Consumo per capita brasileiro 2012.xl

Figura 14 - Consumo brasileiro per capita (kg/hab) em 2012.

Fonte: IBGE censo 2010/Tendência Nielsen 2012/ Associados ABICAB – Elaboração: ABICAB/ File: C:Chocolate/Planejamento Estratégico/Planejamento Estratégico 2013/Consumo per capita brasileiro 2012.xls

Os chocolates finos, uma nova face desse mercado, vêm se destacando em âmbito nacional. Estudos da Abicab mostram que há cerca de dois anos eles respondiam por apenas 1% do mercado e hoje já correspondem a cerca de 6% - aproximadamente 30 mil toneladas por ano de um total de 473 mil toneladas. Além disso, esse segmento cresce a taxas superiores ao do chocolate convencional, pois os consumidores buscam novas alternativas de consumo.

Quanto às perspectivas futuras, confiando no ritmo de crescimento apresentado até o momento, as empresas do ramo têm investido com o objetivo de que juntas levem o país à segunda colocação, em termos de consumo, até 2016. De acordo com a Abicab, o principal esforço da indústria está na inovação, em todas as etapas de produção, aprimorando e diversificando sabores, texturas, embalagens, formatos e distribuição.

2.2.7 Os principais players no mercado de chocolate no Brasil

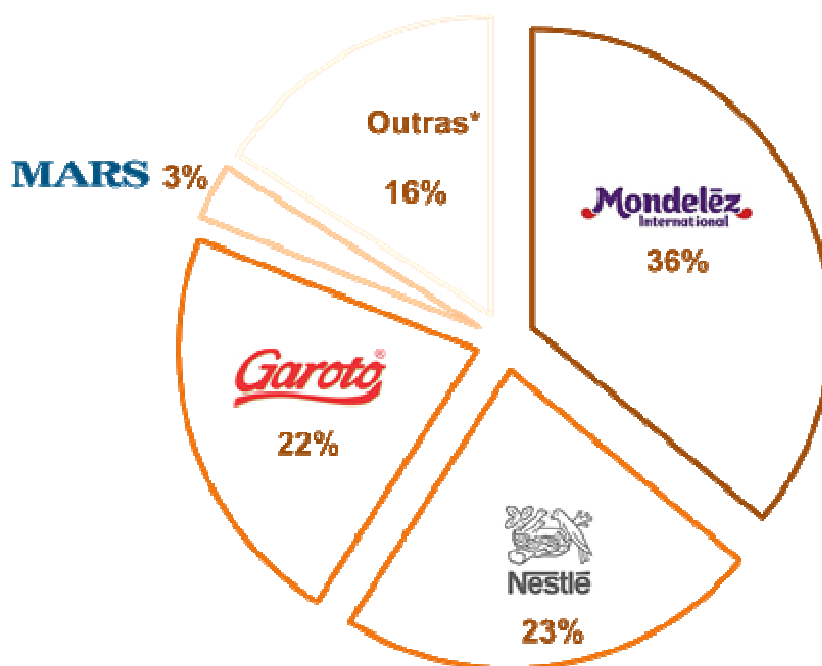
O Brasil conta hoje com a presença de duas grandes marcas no mercado nacional, a Mondelez International (conhecida no país pela marca Kraft Foods) com 36% do mercado e a Nestlé, que após a compra da fábrica de chocolates capixaba

Garoto em 2002, passou a dominar o mercado com 45% do market share, de acordo com dados da ABICAB de 2013.

Mars, maior fábrica de chocolate do mundo, tem planos de dobrar o número de funcionários no Brasil nos dez próximos anos e chegar em 2020 vendendo anualmente 500 milhões de dólares de chocolates no país, aumentando sua participação no mercado brasileiro para mais de 10% em sete anos.¹⁶

Além dessas grandes marcas, empresas como Arcor, Bauducco, Brasil Cacau, Cacau Show, Ferrero Rocher, Hersheys, Kopenhagen e outras compõe o grupo de outras marcas com 16% de participação no mercado nacional, conforme apresentado na Figura 15 abaixo.

Figura 15 – Market share das Fábricas de Chocolate no Brasil



Fonte: http://www.businessreviewbrasil.com.br/money_matters/a-industria-do-chocolate-no-brasil
Abicab

¹⁶ - Fonte: <http://exame.abril.com.br/revista-voce-sa/edicoes/178/noticias/o-google-dos-chocolates>

3 Negócio

3.1 Oportunidades de Negócio

3.1.1 Oportunidades Inicialmente Vislumbradas pelos Empreendedores

A partir do entendimento da cadeia produtiva do chocolate e a aplicação da tecnologia nesse contexto, a primeira oportunidade de negócio vislumbrada é a produção de nibs com a qualidade melhorada a partir do tratamento enzimático para atender uma demanda das indústrias de processamento. Assim, consiste em um negócio ainda no nível intermediário da cadeia do chocolate, que irá comprar amêndoas de cacau e realizar as etapas de limpeza, descascamento, trituração e tratamento enzimático, comercializando esse insumo para a indústria de processamento que seguirá com as demais etapas de torrefação e prensagem. Dessa maneira, poderiam ser adquiridas amêndoas de cacau de baixa qualidade, e realizado o tratamento enzimático para conferir a essas uma qualidade equivalente a produção do chocolate convencional.

Há também a possibilidade de se estabelecer parcerias com uma indústria de processamento de cacau, a fim de agregar ao seu processo produtivo o produto do negócio aqui vislumbrado. Os pesquisadores envolvidos com a tecnologia possuem boa relação com a Cargill, empresa multinacional privada, cuja atividade é a produção e o processamento de alimentos. A vantagem disso é que o negócio teria uma demanda certa, facilitando a gestão da compra das amêndoas e ainda a organização da produção, além de ser possível negociar a produção *in loco*, o que reduz custos de infraestrutura. Por outro lado, vale observar que essa estratégia eleva os riscos do negócio, tendo em vista que ficará exposto às condições e direcionamentos da parceira, posto que essa tem expressão elevada no mercado.

3.1.2 Outras Oportunidades Investigadas

Um atividade secundária que pode ainda agregar valor ao negócio é a constituição de uma fabriqueta de chocolate, para testar o mercado de consumo final do produto. Nesse sentido, a produção de chocolate seria realizada artesanalmente, enquanto a produção de nibs pela empresa poderia seguir um padrão industrial de produção. Assim, o negócio ganha visibilidade entre os consumidores finais. Isso

promoveria maior contato com a opinião do público alvo e poderia oferecer subsídios para o teste de novos métodos de produção, bem como avaliação da aceitação de preços, sabor e etc.

Outra possibilidade de negócio para a tecnologia seria a estruturação de uma indústria de processamento, com a inserção das etapas que implicam na aplicação da tecnologia. Porém, os fatores de risco para essa possibilidade implicam na competição com fortes *players* do mercado, uma vez que existem cinco grandes empresas que realizam essas etapas de produção no Brasil. Além disso, a principal dificuldade para os produtores de cacau em agregar valor ao seu produto é o investimento necessário em maquinário para realizar as etapas de processamento do cacau. Nesse sentido, essa não é inicialmente uma alternativa interessante para a aplicação da tecnologia, por considerar elevado custo e forte barreira de entrada.

Há também a possibilidade de se vender em forma de serviço a agregação de um novo processo para a indústria de processamento. Dessa forma, o negócio seria baseado em um serviço de consultoria para a implantação do processo de tratamento enzimático, com a organização de fornecedores de enzimas, adaptação das etapas produtivas e acompanhamento da implantação das novas etapas. Esse negócio, porém, apresenta uma inviabilidade aparente, uma vez que o mercado das indústrias de processamento no Brasil é muito restrito, sendo dominado por cinco grandes empresas. Tais empresas têm capacidade para investir e desenvolver por elas mesmas tecnologias para melhoramento do processo, de forma que a negociação pode se tornar desfavorável. Além disso, adotando-se essa hipótese os pesquisadores não receberão de acordo com as quantidades produzidas, de forma que os ganhos não serão perpetuados.

Outra forma de aplicar a tecnologia é a transferência da mesma para uma indústria de processamento incluir as novas etapas em seu processo produtivo.

3.2 Análise SWOT

3.2.1 Oportunidades, ameaças, forças e fraquezas

A inserção e difusão da tecnologia aqui apresentada são influenciadas por diferentes fatores de mercado, que podem ou não estar sob influência direta dos pesquisadores e do negócio por eles proposto. Da análise desses ambientes levantam-se as

oportunidades, que influenciam positivamente a organização; as ameaças, de fontes externas à empresa e que pesam negativamente exigindo ações estratégicas; as forças, que descrevem as competências mais fortes do futuro negócio; e por fim, as fraquezas, que são características internas da organização que atrapalham e/ou não geram vantagem competitiva.

- **Oportunidades:**

- Os mercados atuantes, cacau e chocolate, têm como perspectivas uma contínua expansão motivados pelo crescente consumo do produto graças ao aumento do poder de compra das classes C e D;
- Ampliação da procura por produtos de melhor qualidade;
- O Brasil é atualmente o 6º maior produtor de cacau no mundo, o que representa uma grande oferta de insumos;
- Somente o estado da Bahia, onde a pesquisa foi desenvolvida, é responsável por 62% da produção nacional do fruto;
- O Brasil é o 4º maior consumidor mundial de chocolate, sendo esse consumo mais expressivo nos estado de São Paulo, com 5,75 Kg/hab e Rio de Janeiro, com 5,73 Kg/hab;
- Novos investimentos de grandes *players* do mercado de chocolate no Brasil, como por exemplo a Kopenhagen que vai investir, até 2015, R\$ 70 milhões¹⁷ para expandir sua capacidade produtiva e a Mars, que almeja uma participação de 10% do mercado nacional até 2020;

- **Ameaças:**

- Desenvolvimento de tecnologias com foco de atuação similar: melhoria da qualidade das amêndoas de cacau (existem patentes relacionadas);
- O mercado de chocolate convencional se sustenta com a baixa qualidade das amêndoas de cacau utilizadas;
- Concorrência com os chocolates finos no mercado de chocolates de alta qualidade;
- Pulverização da produção de cacau no território nacional com aumento de áreas de plantio. O estado do Pará, por exemplo, com uma política de

¹⁷ - Fonte: <http://www.valor.com.br/empresas/3267442/kopenhagen-investe-em-expansao>

investimento para ampliar a área cultivada, vem apresentando um ritmo de crescimento em sua produção de 10% anuais;

- Dificuldade de comercialização com os produtores de cacau devido às relações e contratos já estabelecidas com as cooperativas ou diretamente com as indústrias de processamento;
- Alteração na cadeia de produção com a adição de um intermediário entre o produtor rural e a indústria de processamento;

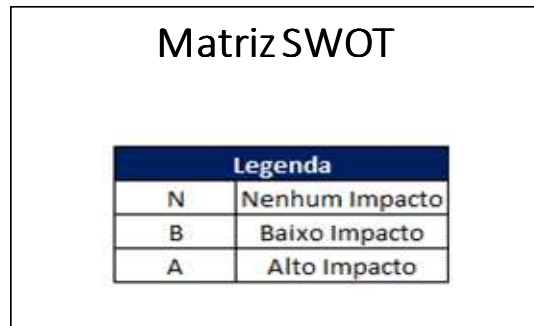
- **Forças:**

- Proximidade geográfica com o mercado fornecedor, representado pela numerosa quantidade de produtores de cacau situados também no estado da Bahia;
- Proximidade geográfica com um possível mercado consumidor, representado pela indústria de processamento Cargill, localizada no sul da Bahia;
- Parceria com a Cargill para o desenvolvimento da pesquisa, facilitando o fornecimento de amêndoas de cacau de alta e baixa qualidade;
- Facilidade de contato com duas grandes indústrias do mercado de chocolate, Cargill e Mars;
- Comprovada melhoria da qualidade das amêndoas de cacau, após aplicação da tecnologia;
- Utilização da enzima microbiana, que possui custo favorável, além de fornecimento em quantidades apreciáveis;
- Ampla experiência gerencial do empreendedor da tecnologia Eduardo Guterman;
- Ampla experiência e renome acadêmico do empreendedor da tecnologia Aristóteles;

- **Fraquezas:**

- Tecnologia em estágio de desenvolvimento incipiente. (ainda faltam testes para comprovar as características que são melhoradas nas amêndoas e teste de produção em escala);
- Distância geográfica entre os empreendedores da tecnologia;

Figura16 - Análise Swot



	FORÇAS								FRAQUEZAS	
	1-Renomado pesquisador como integrante	2-Ampla experiência gerencial de um dos sócios	3-Utilização da enzima microbiana	4-Comprovada melhoria da qualidade das amêndoas de cacau	5-Prévia rede de contatos com duas grandes indústrias	6-Parceria com a Cargill para o desenvolvimento da pesquisa	7-Proximidade geográfica com um possível mercado consumidor	8-Proximidade geográfica com o mercado fornecedor	1-Distância geográfica entre os sócios	2-Tecnologia em estágio de desenvolvimento incipiente
OPORTUNIDADES	N	N	N	B	B	N	A	A	N	N
1-Expansão dos mercados de consumo de cacau e chocolate	N	N	N	A	N	N	N	N	N	A
2-Ampliação da procura por produtos de melhor qualidade	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N
3-Brasil: 6º maior produtor de cacau no mundo: oferta de insumos	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N
4-Bahia: maior produtor nacional de cacau	N	N	N	A	N	N	A	N	N	N
5-Brasil: 4º maior consumidor mundial de chocolate (foco RJ e SP)	B	B	N	A	N	N	N	N	N	N
6-Novos investimentos de grandes players	B	B	N	A	N	N	N	N	N	B
AMEAÇAS	N	N	B	B	N	N	N	N	N	B
1-Desenvolvimento de tecnologias com foco de atuação similar	N	N	N	B	N	N	N	N	N	A
2-Concorrência com os chocolates finos	N	N	N	B	B	N	B	N	N	N
3-Sobrevivência do mercado com amêndoas de baixa qualidade	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N
4-Pulverização da produção de cacau	N	B	N	N	N	N	N	B	N	N
5-Dificuldade de comercialização com o produtor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6-Mudança na cadeia de produção	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Fonte: Elaborado pela equipe do IEPT

3.2.2 Ações estratégicas

Para obter um negócio mais consolidado, algumas ações estratégicas são necessárias a fim de aproveitar o cenário em que se pretende atuar. Dentre essas medidas, encontra-se em tramite a realização dos testes químicos para se conhecer a composição do cacau tratado. Como resultado final espera-se aumentar a eficácia do tratamento aplicado. Dessa forma, o negócio será um grande potencial para o mercado latente de produtos de alta qualidade.

Além disso, dado os resultados dessa tecnologia, esta pode ser um atrativo para importantes *players* do mercado de chocolate, como forma de trazer um diferencial para os seus produtos, visto os contínuos investimentos que essas empresas estão empenhando no mercado nacional.

Quanto à localização geográfica do negócio, conforme já adiantado, é de interesse que este tenha início no estado da Bahia, devido à proximidade com os produtores de cacau, uma vez que trata-se do estado brasileiro maior produtor do fruto, resultando assim no acesso a uma grande oferta de insumos. Também na região encontra-se uma das representantes do grupo de indústrias de processamento, que representa um potencial consumidor fortalecido pela relação já existente com os sócios do negócio pretendido e pelo fato de que, como está auxiliando na realização dos testes, já conhece a atuação da tecnologia.

3.3 Estratégia de comercialização

3.3.1 Posicionamento e modelo de negócio

A tecnologia em estudo, como já descrito, atua nas etapas de interface de dois agentes da cadeia produtiva, o produtor rural e as indústrias de processamento. Dessa forma, um posicionamento estratégico para que o produto proposto possa ser incorporado, levando-se em consideração a análise do mercado e o comportamento de seus agentes, assim como os pontos de gargalo no negócio almejado, é criar uma empresa intermediária, no estado da Bahia, com o objetivo de receber as amêndoas de cacau dos produtores rurais ou através de cooperativas, após completarem a etapa de

secagem, aplicar a tecnologia em questão e repassá-las, então, para as indústrias de processamento.

A estrutura do negócio sobre esses moldes, principalmente se instalado no estado da Bahia, oferece uma logística facilitada do recebimento da matéria-prima, as amêndoas de cacau, visto que na região encontram-se, aproximadamente, 37.000 produtores de cacau. Além disso, a proximidade com uma das maiores indústrias de processamento instaladas no país, com a qual os pesquisadores já possuem uma boa relação, representando um possível mercado consumidor para os nibs gerados ou até mesmo uma parceria.

Dessa forma, o negócio pretendido auxilia a atender as necessidades latentes do público consumidor por produtos de maior qualidade e diferenciados, conforme o cenário mercadológico atual. Aliado ainda à crescente compra desse artigo pelas classes econômicas C e D, que também buscam por chocolates mais apurados.

3.4 Barreiras e riscos relativos ao projeto

O projeto proposto enfrenta algumas limitações que exigem outras ações para contorná-las. É o caso da entrada em um mercado consolidado e crescente em seus moldes atuais, como é o caso do mercado de chocolates convencionais, com a proposta de inserção de uma nova etapa no processo produtivo, objetivando a um aumento na qualidade, fator este que ainda não se mostra como essencial para a perpetuação desse nicho. Atrelado a isso, tem-se a concorrência com os chocolates finos no mercado de chocolates de alta qualidade, já que esse mercado vem apresentando uma taxa de crescimento, inclusive, maior que a do ramo de chocolates convencionais.

Quanto à comercialização, como a venda do fruto para as indústrias de processamento ocorre através de cooperativas ou pelos próprios produtores, aliado ao número restrito de indústrias nesse ramo, o negócio pode encontrar dificuldades para ingressar como um novo intermediário nessas relações.