



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NO PERFIL
DE BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VISANDO
PADRONIZAÇÃO DE AMÊNDOAS SUB-FERMENTADAS.**

THAMIRES SANTOS MELO

SALVADOR-BA

2018

THAMIRES SANTOS MELO

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NO PERFIL
DE BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VISANDO
PADRONIZAÇÃO DE AMÊNDOAS SUB-FERMENTADAS.**

Orientadora: Profa. Dra. Eliete da Silva Bispo

Coorientador: Dr. Leonardo Fonseca Maciel

Dissertação apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de mestre.

SALVADOR-BA

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Melo, Thamires Santos
Influência do tempo de fermentação no perfil de bioativos e atividade antioxidante visando padronização de amêndoas subfermentadas / Thamires Santos Melo. -- Salvador, 2018.
93 f. : il

Orientadora: Eliete da Silva Bispo.
Coorientador: Leonardo Fonseca Maciel.
Dissertação (Mestrado - Ciência de Alimentos) --
Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2018.

1. Theobroma cacao L.. 2. Fermentação. 3. Compostos bioativos. 4. Atividade antioxidante. I. Bispo, Eliete da Silva. II. Maciel, Leonardo Fonseca. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

THAMIRES SANTOS MELO

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NO PERFIL DE BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VISANDO PADRONIZAÇÃO DE AMÊNDOAS SUB-FERMENTADAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 26 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Eliete da Silva Bispo
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr^a. Maria da Pureza Spínola Miranda
Universidade Federal da Bahia

Dr. Sérgio Eduardo Soares
Universidade Federal da Bahia

Aos meus pais, João e Zizene, por todo incentivo e apoio.

À minha irmã, Bárbara, e ao meu sobrinho, Miguel, por todo amor.

À minha família e aos meus amigos por se fazerem sempre presentes em minha vida.

“Não são os frutos da pesquisa científica que elevam um homem e enriquecem sua natureza, mas sim a ânsia de compreender o trabalho intelectual, criativo e receptivo.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, principalmente aos meus pais João e Zizene, a minha irmã, Barbara, e meu sobrinho, Miguel, por todo amor, apoio e força que tem me dado nessa trajetória. Tudo que eu sou e tudo que consegui realizar, eu devo a vocês.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Eliete da Silva Bispo, obrigada pela confiança em mim depositada, pelo incentivo, apoio e acima de tudo pela amizade. Sou muito grata por todos os seus ensinamentos que foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador, Dr. Leonardo Fonseca Maciel, pela paciência, colaboração, pela amizade e, sobretudo por me incentivar a ser uma pessoa melhor a cada dia. É muito bom saber que tenho você na minha vida.

Dirijo um agradecimento especial ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares e a Prof^a. Dra. Marta Suely Madruga que compuseram a minha Banca de Qualificação, pela leitura atenta do trabalho e pelas valiosas contribuições.

À Fazenda Riachuelo, em nome do Sr. Raimundo Mororó e Sra. Marilete, pela confiança e aprendizado, e pelo fornecimento de amostras para a condução deste estudo.

Ao meu querido grupo NEAPCCHOC (Tassia, Alana, João, Edla e Luiz), pela ajuda com a realização desse trabalho e pelo companheirismo. Sem vocês nada disso seria possível. MUITÍSSIMO obrigada!

Às amigas que fiz nesses dois anos, Calionara, Cassia, Ynayara e Laura, com quem compartilhei meus melhores momentos e que levarei sempre comigo.

A toda turma 2016.1, obrigada a todos pela convivência e amizade construída.

Aos laboratórios LAPAAC, LAPESCA, Tecnologia de Alimentos, Instrumental, Multiuso e os seus colaboradores pelo suporte e pela ajuda com as análises realizadas durante o projeto.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho.

E finalmente à Universidade Federal da Bahia (UFBA) e a todos os professores do Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade e pelos ensinamentos ao longo desses dois anos, que deram suporte ao desenvolvimento das atividades acadêmicas importantes para a minha formação. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	16
Objetivo Geral	16
Objetivos Específicos	16
CAPÍTULO I	
1. CACAU	17
1.1. Aspectos Gerais	17
1.2. Produção mundial e nacional de cacau	19
2. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU.....	21
2.1. Colheita e quebra dos frutos	22
2.2. Fermentação.....	23
2.3. Secagem e armazenamento.....	27
3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMÊNDOAS.....	28
3.1 Teste de corte.....	29
3.2 Índice de Fermentação (IF).....	31
4. COMPOSTOS BIOATIVOS	32
4.1. Principais bioativos do cacau.....	34

4.2. Influência da fermentação no teor de compostos bioativos em cacau e produtos derivados.....	38
5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MÉTODOS DE MEDIDA DA ATIVIDADE.....	39
5.1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	41
5.2. FRAP (Potencial Antioxidante de Redução do Ferro)	42
5.3. CUPRAC (Capacidade antioxidante de redução do cobre)	43
REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO II

ABSTRACT	58
1. INTRODUCTION	59
2. MATERIALS AND METHODS.....	62
2.1. Materials	62
2.2. Measurements of cut test	62
2.3. Physical chemistry characterization	62
2.4. Determination of fermentation index (FI)	63
2.5. Sample preparation	63
2.6. Quantification of total polyphenol content (TPC)	63
2.7. Determination of monomeric phenols and methylxanthines by HPLC.....	63
2.8. Quantification of total flavonoids content (TFC)	64
2.9. Quantification of total anthocyanins content (TA)	64
2.10. Determination of Antioxidant Activity.....	65
2.10.1.DPPH	65
2.10.2.FRAP.....	65
2.10.3.CUPRAC.....	66
2.11.Statistical analysis.....	66

3. RESULTS AND DISCUSSION	66
3.1. Cut test and fermentation index (FI) measurements.....	66
3.2. Physicochemical changes of cocoa beans during fermentation.....	69
3.3. Profile of bioactive compounds during fermentation	72
3.4. Determination of monomeric phenols and methylxanthines by HPLC.....	74
3.5. Determination of Antioxidant Activity.....	77
4. CONCLUSION.....	79
ACKNOWLEDGEMENTS	80
REFERENCES	81
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	92
ANEXOS.....	93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1- Produtores mundiais de cacau.....	19
Tabela 2- Maiores produtores de cacau do Brasil.....	21
Tabela 3- Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau: Instrução Normativa nº 38/ 2008.....	30

CAPÍTULO II

Tabela 1- Color changes in cocoa beans with varying fermentation duration.....	67
Tabela 2- Effect of fermentation time on color fraction absorbance value and fermentation index of cocoa beans.	68
Tabela 3- Physical chemistry characterization of cocoa beans.....	70
Tabela 4- Profile of bioactive compounds during fermentation.	72
Tabela 5- Contents of monomeric phenols [(-)-epicatechin, (+)-catechin and gallic acid] and methylxanthines (caffeine and theobromine) in cocoa bean extracts determined by HPLC analysis.	75
Tabela 6- Antioxidant capacity of cocoa product extracts determined by DPPH, FRAP and CUPRAC assays.	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1- <i>Theobroma cacao</i> L.....	17
Figura 2- Corte transversal de um fruto de cacauero.	18
Figura 3- Produção de cacau no Brasil em 2017.....	20
Figura 4- Fluxograma de pré-processamento das sementes de cacau.	22
Figura 5 - Montões de cacau (a) e quebra dos frutos (b).....	23
Figura 6- Cocho de fermentação (a) e massa de cacau coberta com folhas de bananeira e tampo de madeira (b).....	24
Figura 7- Fases da fermentação.....	25
Figura 8- Barcaças para secagem do cacau	28
Figura 9- Prova de corte das amêndoas de cacau.	30
Figura 10- Principais polifenóis encontrados no cacau.....	35
Figura 11- Estrutura química da (+)-catequina e da (-)-epicatequina.	36
Figura 12- Estrutura química das metilxantinas.....	37
Figura 13- Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH	42
Figura 14- Redução do Fe(III) a Fe(II) por adição de um antioxidante.	43
Figura 15- Redução do Cu(II) para CU(I) por adição de um antioxidante.	44

CAPÍTULO II

Figura 1- Representative chromatograms of unfermented (A) and fermented (B) cocoa samples at $\lambda = 280$ nm (mAU: Absorption Units).....	74
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem	IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
·OH - Radical hidróxido	ICCO - International Cocoa Organization (Organização Internacional do Cacau)
¹O₂ - Oxigênio singlete	IF - Fermentation index (Índice de fermentação)
A - absorbance	Kg - Quilograma
AAI - Antioxidant activity index	KJ - Quilo Joule
AlCl₃ - Aluminum chloride	M - Molar
ANOVA - Análise de Variância	MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária	mAU - Absorption Units
AOAC - Association of Official Analytical Chemistry	mEq - miliequivalent
Aw - Water activity	mg - Miligrama
Capes - Coordination and Improvement of Higher Level or Education Personnel	min - Minuto
CE - Catechin equivalent	mL - Mililitro
cm - Centímetros	N - Normalidade
CNPq - National Council for Scientific and Technological Development	Na₂CO₃ - Sodium carbonate
CuCl₂ - Copper (II) chloride	NaNO₂ - Sodium nitrite
CUPRAC - Cupric ion reducing antioxidant capacity (Capacidade antioxidante de redução do cobre)	NaOH - Sodium hydroxide
DNA - Ácido desoxirribonucleico	Nc - Neocuproin
DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	NH₄Ac - Ammonium acetate
ECE - Epicatechin equivalent	nm - Nanômetro
ERN - Espécies reativas de nitrogênio	O₂⁻ - Ânion superóxido
ERO - Espécies reativas de oxigênio	°C - Grau Celsius
et al. - e colaboradores	pH - Potencial hidrogeniônico
fd - dilution factor	RE - Rutin equivalent
FeSO₄·7H₂O - Iron(II) sulfate heptahydrate	RES - Ressonância de elétron spin
FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power (Potencial Antioxidante de Redução do Ferro)	rpm - Rotações por minuto
g - Grama	TA - Total anthocyanins content
GAE - Gallic Acid equivalent	TAE - Tannic acid equivalent
h - Hora	TFC - Total flavonoids content
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio	t - Toneladas
HCl - Hydrochloric acid	TPC - Total polyphenol content
HOCl - Ácido hipoclorítico	TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
HPLC - High performance liquid chromatography	UFBA - Universidade Federal da Bahia
	UV-Vis - Ultravioleta visível
	w/v - Mass Concentration (Mass per unit volume)
	ε - molar absorptivity
	µg - Micrograma
	µL - Microlitro
	µM/mM - Micromolar

RESUMO

O foco constante de diversas linhas de pesquisas na área de alimentos processados tem sido voltado para a busca de uma alimentação mais saudável. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar alimentos naturais que possuam em sua composição substâncias com características funcionais. Dentre essas substâncias, os compostos fenólicos destacam-se devido aos inúmeros efeitos benéficos que propiciam à saúde. Uma fonte popularmente conhecida de compostos fenólicos é o chocolate, porém grande parte dessas substâncias é perdida durante o processamento do cacau, principalmente na etapa de fermentação da amêndoa. O objetivo desse estudo foi verificar, a partir das características físico-químicas de amêndoas de cacau, o período da fermentação em que há um maior teor de compostos bioativos e maior atividade antioxidante para, a partir daí, utilizar essas amêndoas como matéria prima para elaboração de chocolates com propriedades funcionais. As amêndoas foram avaliadas quanto as suas características físico- químicas através de análises de umidade, atividade de água, temperatura, determinação da acidez titulável, pH e qualidade da fermentação, considerando a coloração e a compartimentação dos cotilédones e através da identificação e quantificação de compostos fenólicos, metilxantinas e da atividade antioxidante. As amostras foram coletadas em triplicata a cada 12 horas, durante todo o período da fermentação, e armazenadas após o processo de secagem. As determinações foram feitas em triplicata e submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os resultados demonstraram que o período com maior conteúdo de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante foi o de 48 horas de fermentação, onde se verificou uma redução significativa das sementes ardósias, e o aparecimento de amêndoas parcialmente fermentadas, além da destruição do poder de germinação das sementes causada pela difusão de ácidos orgânicos, devido à elevação da acidez e da temperatura da massa. No estudo foi observada forte correlação entre o conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante, principalmente pelo método CUPRAC. Dessa forma, foi possível propor uma mistura de amêndoas de cacau parcialmente fermentadas por 48 horas com amêndoas totalmente fermentadas, a fim de elaborar chocolates com elevada concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: *Theobroma cacao* L.; Fermentação, Compostos bioativos; Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The constant focus of several lines of research in the area of processed foods has been directed towards the search for a healthier diet. Many studies have been carried out with the objective of identifying natural foods that have in their composition substances with functional characteristics. Among these substances, phenolic compounds stand out due to the numerous benefits that promote health. A commonly known source of phenolic compounds is chocolate, but most of these substances are lost during cocoa processing, mainly in beans fermentation step. The objective of this study was to verify, from the physico-chemical characteristics of cocoa beans, the fermentation period in which there is a higher content of bioactive compounds and a higher antioxidant activity, to then use these beans as raw material for elaboration of chocolates with functional properties. The beans were evaluated for their physico-chemical characteristics through analysis of moisture, water activity, temperature, determination of the titratable acidity, pH and fermentation quality, considering the coloration and the compartmentation of the cotyledons and through the identification and quantification of phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity. The samples were collected in triplicate every 12 hours, throughout the fermentation period, and stored after the drying process. The determinations were made in triplicate and submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means compared by the Tukey test at 5% of significance. The results showed that the period with the highest content of phenolic compounds and with greater antioxidant activity was at 48 hours of fermentation, where there was a significant reduction of the slate seeds, and the appearance of partially fermented beans, besides the destruction of the germination power of the seeds caused by the diffusion of organic acids, due to the increase of the acidity and the temperature of the mass. In the study, a strong correlation was observed between the content of bioactive compounds and antioxidant activity, mainly by the CUPRAC method. Thus, it was possible to propose a mixture of partially fermented cocoa bean for 48 hours with fully fermented beans, in order to elaborate chocolates with high concentration of bioactive compounds and antioxidant activity.

KEYWORDS: *Theobroma cacao* L.; Fermentation; Bioactive compounds; Antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

Atualmente o foco constante de muitas pesquisas na área de alimentos processados tem sido a saúde e o bem estar do ser humano. Tem-se observado uma maior preocupação da população com a alimentação e a demanda por produtos mais saudáveis vem crescendo a cada ano. Desde então muitos estudos tem sido realizados objetivando a identificação de alimentos naturais que possuam em sua composição substâncias conhecidas como funcionais. Dentre elas, destaca-se o interesse da comunidade científica pelos polifenóis (OLIVEIRA, 2005).

Os polifenóis, ou compostos fenólicos, têm sido largamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde, como uma 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; ANKLAN, 2000b). Outros efeitos positivos para a saúde são as propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antiaterogênicas, antitrombóticas, antimicrobianas, analgésicas e vasodilatadoras, comprovadas em estudos científicos (WOLLGAST; ANKLAN, 2000a; GOTTI et al., 2006).

Muitos alimentos foram identificados como fontes naturais de polifenóis, sendo na sua maioria frutas e vegetais. Dentre estes produtos, o chocolate encontra-se como sendo uma fonte interessante destas substâncias (OLIVEIRA, 2005). Das matérias-primas envolvidas no processo de fabricação do chocolate, evidenciou-se que era o cacau a fonte das substâncias conhecidas como polifenóis (FONTES, 2013).

Após a colheita do cacau, são efetuadas as operações de abertura dos frutos, fermentação das sementes junto à polpa que as envolve, secagem e torração para obtenção da massa ou liquor de cacau, que será utilizado na obtenção de manteiga e pó de cacau, além de chocolates e produtos análogos (BECKETT, 1994b).

A fermentação das sementes é essencial ao processamento, pois é responsável pelo desenvolvimento dos precursores e inúmeros compostos de sabor. O processo de fermentação das sementes inicia-se naturalmente pela ação da atividade microbiana na polpa mucilaginosa, que envolve a semente. Os produtos do metabolismo dos microrganismos principalmente álcool, ácidos orgânicos e o calor gerado nos primeiros dias de fermentação provocam a destruição do poder germinativo da semente e desencadeiam importantes transformações físico-químicas e estruturais. Estas

transformações afetam significativamente a qualidade do produto final, principalmente os aspectos que envolvem a formação de sabor (SCHWAN et al, 1990).

Se por um lado, os compostos fenólicos têm sido estudados há várias décadas devido à influência negativa que exercem no sabor, conferindo amargor e adstringência verificados especialmente em produtos com elevados teores desses compostos (FORSYTH; QUESNEL, 1957; ROAHN; CONNEL, 1964; CROSS, VILLENEUVE; VINCENT, 1982; BRITO, 2000; SOARES, 2001), por outro, descobertas mais recentes sobre seus efeitos benéficos à saúde humana têm despertado interesse em mantê-los durante o processamento em produtos obtidos do cacau, sem prejuízo ao sabor (KEALEY et al., 1998; KEALEY et al., 2004; EFRAIM, 2004; RIZO, 2006).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar as amêndoas de cacau em diferentes tempos de fermentação a fim de estabelecer um padrão de amêndoas sub-fermentadas com maior conteúdo de compostos bioativos e maior atividade antioxidante e para obtenção de matéria prima para elaboração de chocolates funcionais.

Objetivos Específicos

- Monitorar as etapas de fermentação das amêndoas;
- Realizar análise físico-química das sementes e amêndoas de cacau
- Avaliar a qualidade das amêndoas em função do grau de fermentação, através da prova de corte e do índice de fermentação;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos e metilxantinas presentes nas amostras;
- Quantificar antocianinas e flavonóides;
- Determinar a atividade antioxidante.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CACAU

1.1. Aspectos Gerais

O cacauero é uma planta da família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L., originada na Bacia Amazônica e cultivada nas regiões tropicais do mundo (ALVES, 2002). As sementes do cacau destacam-se como principal produto do fruto, em termos econômicos, representando cerca de 10% do seu peso. Após seu beneficiamento originam diversos produtos, como por exemplo, a massa (liquor), a manteiga de cacau, os chocolates, aromas naturais e extratos com fins farmacêuticos, sendo que sua maior aplicação está na fabricação do chocolate (DRUMMOND, 1998; LECUMBERRI et al., 2007).

Figura 1- *Theobroma cacao* L.



Fonte: <http://cdn4.kidsdiscover.com/wp-content/uploads/2013/03/10.jpg>

As condições ideais para o cultivo do cacau são temperaturas médias de 25 °C, chuvas regulares com precipitação anual de 1500 a 2500 mm (AFOAKWA, 2010; KIM; LEE; LEE, 2011). O solo deve ser profundo e fértil, o que o torna muito susceptível a pragas e fungos. E o cacauero pode atingir entre 5 a 10 metros de altura (MARTINI, 2004; BATALHA, 2009; BECKETT, 1994a).

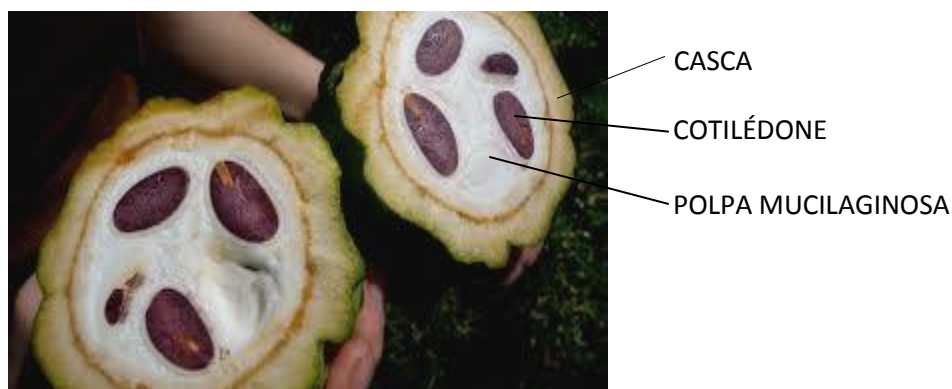
O cacauero é uma planta perene, visto que seu ciclo produtivo poder ultrapassar os 100 anos. Seus primeiros frutos são colhidos cerca de 5 anos após a

plantação, atingindo plena produtividade aos 12 e produz, em média, até 35 anos. A época de colheita é variável nas zonas cacauceiras (OETTERER, 2006). Para fins de comercialização, a colheita de cacau na Bahia é dividida em dois períodos, a safra principal, que vai de outubro a abril e a safra temporã, entre maio a setembro (MELÉNDEZ, 2017).

O fruto é composto por casca, polpa e sementes, sendo que cada fruto contém entre 20 e 50 sementes e a casca representa 75% do total (OETTERER, 2006; AFOAKWA, 2010). No processo de industrialização, as sementes não são aproveitadas integralmente, havendo a eliminação da casca (testa) e do embrião. As condições ambientais e tratos culturais afetam o desenvolvimento e a constituição química das sementes de cacau (AFOAKWA, 2010).

O cacau possui forma oval com 15 a 20 cm de comprimento do eixo maior, e cor amarela ou roxa quando maduro, a depender da variedade. O cotilédone e um pequeno gérmen de planta embrionária são recobertos por uma película denominada testa, e a semente é revestida por uma polpa branca, mucilaginosa e adocicada (MARTINI, 2004; BATALHA, 2009; BECKETT, 1994a). Embora as sementes estejam recobertas de mucilagem doce, o seu sabor é amargo e adstringente (LIMA, 2010).

Figura 2- Corte transversal de um fruto de cacauceiro.



Fonte: <http://chocolate.pro.br/wp-content/uploads/2013/09/cacau-forastero.jpg>

A polpa de cacau é rica em açúcar, com aproximadamente 15% de monossacarídeos e 84% de umidade, 0,20 % de lipídios e 0,8% de proteínas. O valor de pH é de 3,5 a 3,6 e o principal ácido presente é o ácido cítrico (OETTERER, 2006; PUGLIESE, 2010).

A composição química das sementes de cacau, assim como de diversos vegetais, depende de inúmeros fatores como: variedade, origem, técnicas agrícolas,

clima, solo, e o grau de maturação dos frutos (LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001; EFRAIM et al., 2011).

1.2. Produção mundial e nacional de cacau

De acordo com dados da ICCO (International Cocoa Organization), a produção mundial de cacau em 2016/17 foi de 4,7 milhões de toneladas, sendo que dessa produção, 75,8% estavam localizadas no continente africano, 16,1% no continente americano e 8,1% no continente asiático e Oceania. A Costa do Marfim é o principal país produtor, seguida por Gana, Indonésia, Equador, Camarões, Nigéria, Brasil, e Papua Nova Guiné (Tabela 1) (ICCO, 2017). O Brasil, até a chegada da vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) em 1989, era o segundo maior produtor de cacau do mundo caindo para a sexta posição depois do aparecimento desta doença (MARTINI, 2004; LOPES et al., 2011).

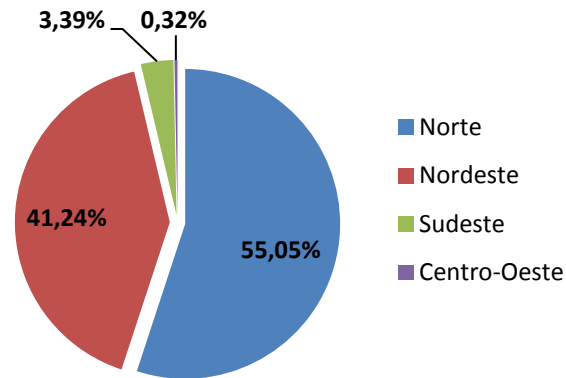
Tabela 1- Produtores mundiais de cacau.

Países	Produção de cacau em mil t/ano
Costa do Marfim	2010
Gana	950
Indonésia	290
Equador	270
Camarões	240
Nigéria	225
Brasil	180
Papua Nova Guiné	40

Fonte: ICCO, (2017).

Segundo dados do IBGE (2017), as Regiões Norte e Nordeste são as principais produtoras de cacau no Brasil, sendo responsáveis por mais de 96% da produção (Figura 3). Da produção total, que atingiu 214 mil toneladas ao final de 2017 - um aumento de 0,2% com relação a igual período do ano anterior - cerca 54% foi produzido no Estado do Pará, atualmente o maior produtor nacional, seguido pela Bahia com 38%, Espírito Santo com 3,1%, Rondônia com 2,8%, Amazonas com 0,6%, Mato Grosso, Minas Gerais e Roraima com menos de 0,3% do total.

Figura 3- Produção de cacau no Brasil em 2017.



Fonte: IBGE, 2017.

A produção de cacau na Bahia teve seu pico máximo registrado na safra de 1986/87 com aproximadamente 397 mil toneladas comercializadas. Porém, devido a uma série de fatores decorrentes da conjuntura econômica, dificuldade de acesso ao crédito, preços baixos e o estabelecimento da doença vassoura de bruxa, registrou-se uma queda na produção, que chegou a seu nível mais baixo na safra 1999/2000, com apenas 96 mil toneladas. No período de outubro a dezembro de 2015, onde acontece a renovação foliar e início da floração do temporão da safra seguinte, choveu apenas 10% da média histórica para esse período. Essa drástica diminuição hídrica juntamente com perdas por ataque de roedores, incidência de vassoura de bruxa e podridão parda provocaram uma redução na área produtiva, por morte de cacauzeiros o que, consequentemente, resultou em uma produção comercializada no temporão da safra de 2016/17, correspondente a 54,6% a menos do que a produção temporã da safra de 2015/2016 (MELÉNDEZ, 2017). De 2016 para 2017 (Tabela 2), a produção de cacau na Bahia sofreu uma queda de 27,5% enquanto que no Pará houve um aumento de mais de 35% (IBGE 2017).

Tabela 2- Maiores produtores de cacau do Brasil.

Produção de cacau (t/ano)		
Estado	Safra 2016	Safra 2017
Pará	85,826	116,536
Bahia	115,756	83,869
Espírito Santo	5,507	6,700
Rondônia	5,272	5,095
Amazonas	797	1,304
Mato Grosso	515	647
Minas Gerais	162	189
Roraima	8	8
Total	213,843	214,348

Fonte: IBGE, 2017.

Em se tratando de qualidade, o cacau do Brasil ficou entre os 50 melhores do mundo, ganhando o título de Cacau de Excelência, como o melhor cacau da América Latina, na categoria Cacau Chocolate (CRUZ, 2013).

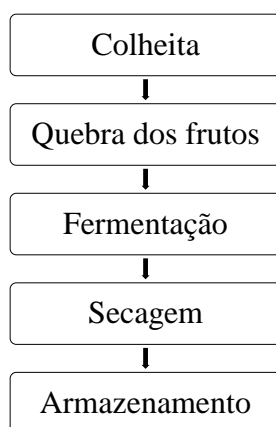
2. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU

A cadeia produtiva do cacau apresenta diferentes etapas para obtenção de seus produtos derivados, sendo que as etapas de pré-processamento são de extrema importância e devem ser conduzidas com cautela e uniformidade para garantir a qualidade sensorial e nutricional desses produtos.

Fatores como a variedade do cacau, manejo agrônomo, fatores do solo, condições climáticas, e a tecnologia pós-colheita influenciam diretamente na qualidade dos grãos de cacau. Portanto, é necessária a avaliação dos parâmetros físicos, químicos e organolépticos para determinar essa qualidade (BRUNETTO et al., 2007).

No pré-processamento (Figura 4) são efetuadas as operações de colheita, quebra ou abertura dos frutos, fermentação das sementes junto à polpa que as envolve, secagem e armazenamento. Durante essas etapas o cacau tem seus precursores de sabor gerados e alguns de seus constituintes modificados (LEITE, 2012).

Figura 4- Fluxograma de pré-processamento das sementes de cacau.



Fonte: Leite, 2012.

2.1. Colheita e quebra dos frutos

A colheita do cacau é a fase inicial no beneficiamento. Deve ser efetuada quando os frutos apresentarem ponto ideal de maturação, pois apenas os frutos maduros possuem açúcar e outros substratos em quantidade adequada para uma boa fermentação (LOPES, 2000). A depender da variedade, esses frutos apresentaram uma coloração da casca diferenciada (CRUZ, 2012).

A colheita deve ser realizada utilizando podões ou tesouras de poda, devendo-se ter o cuidado de não cortar o pedúnculo do fruto e evitar danificar a almofada floral, para não comprometer a produtividade da planta (SERRA, 2004). Outro fator que deve ser levado em consideração é não causar nenhum corte no fruto, pois desta forma dará início ao processo fermentativo antes mesmo de estar nos cochos, comprometendo a qualidade das amêndoas.

Depois de colhidos, os frutos são amontoados em montões (Figura 5-a), separando-se os frutos infectados e perfurados dos frutos saudáveis. Em seguida são cortados (Figura 5-b) e as sementes transportadas imediatamente até o local de cura, onde são distribuídas em caixas de madeira com fundo perfurado (LIMA, 2010; FERREIRA et al., 2013).

Figura 5 - Montões de cacau (a) e quebra dos frutos (b).



Fonte: Autoria própria

O intervalo de tempo para se realizar a quebra dos frutos é de 2 a 3 dias em relação à colheita, facilitando a separação das sementes com a casca, além de aumentar a concentração dos açúcares da polpa. Um intervalo de tempo maior pode comprometer a qualidade das sementes ocasionando germinação no interior dos frutos, alterando todo o mecanismo do sabor e aroma do chocolate (SERRA, 2004; FERREIRA et al., 2013).

2.2. Fermentação

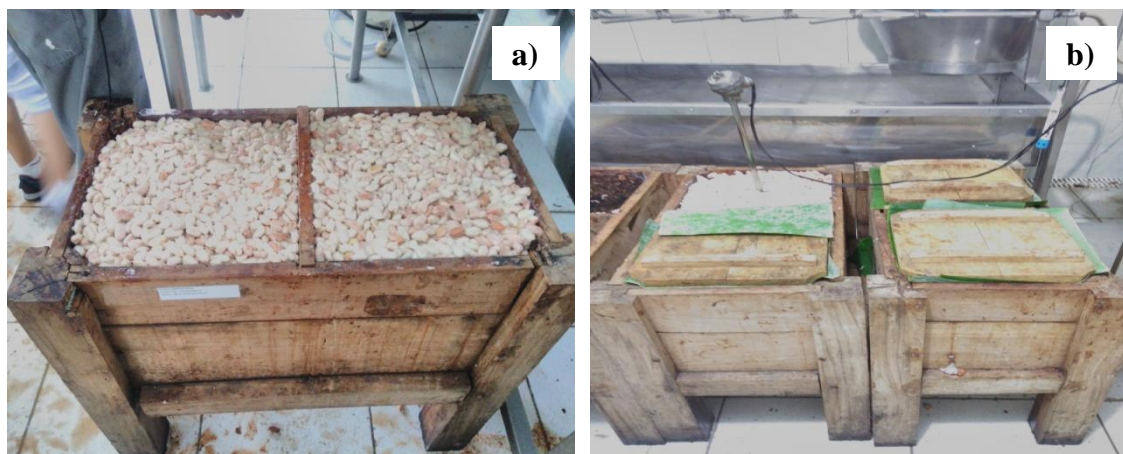
A fermentação das sementes é essencial para a obtenção de produtos de boa qualidade sensorial. Durante esta etapa, ocorrem reações bioquímicas complexas, importantes para o desenvolvimento dos compostos precursores do sabor característico do chocolate. Nesse processo, o sistema, a temperatura do ambiente e da massa, o pH e a acidez da polpa e do cotilédone, o tempo de processo, o revolvimento da massa bem como a microflora presente são fatores de grande importância (ROHAN; CONNELL, 1964; LOPEZ; QUESNEL, 1973; AFOAKWA, 2010).

O tempo requerido para a fermentação das sementes é variável, dependendo do tipo de cacau, das condições climáticas, das quantidades a serem fermentadas, entre outros aspectos (BECKETT, 2009). Normalmente, esse processo dura entre quatro e sete dias (KOBLOITZ, 2011; SALTINI; AKKERMAN; FROSCHE, 2013). Fermentações muito longas (acima de sete ou oito dias) podem levar à formação de off-flavors, ou seja, aparecimento de odores e sabores desagradáveis e não característicos de chocolate, devido a instalação de diversas espécies do gênero *Bacillus*, produtoras de uma variedade de compostos (ácidos, aldeídos e alcoóis). 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 (KOBLOITZ, 2011; COPETTI et al., 2011; NIGAM; SINGH; 2014).

A fermentação de cacau pode ocorrer em montes, cestos, caixas ou gavetas de madeira, a depender da prática local. No Brasil, ocorre tradicionalmente em caixas de madeira (Figura 6-a), que são os chamados cochos de fermentação (FERREIRA et al., 2013). Nesses cochos, a massa de cacau é revolvida de uma caixa para outra com auxílio de pás de madeira. Durante o processo de fermentação, a massa é coberta com sacos de juta ou folhas de bananeira (Figura 6-b) para reduzir as perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial (WOOD; LASS, 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004; OETTERER, 2006; PONTILLON, 2009; DE VUYST et al., 2010).

Figura 6- Cocho de fermentação (a) e massa de cacau coberta com folhas de bananeira e tampo de madeira (b).

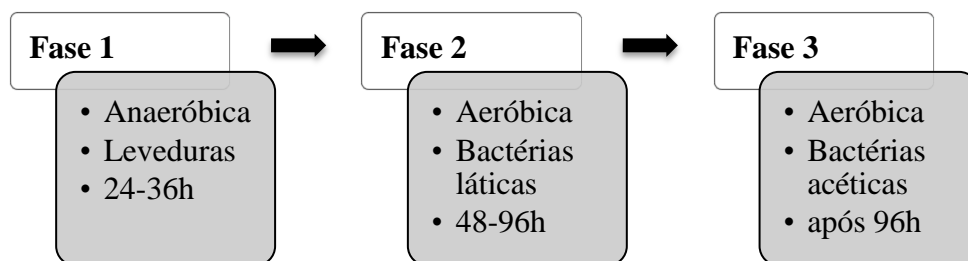


Fonte: Autoria própria

A polpa de cacau é um meio rico para desenvolvimento microbiano, consistindo de 82-87% de água, 10-15% de açúcar, 2-3% de pentosanas, 1-3% de ácido cítrico e 1-1,5% de pectina. Proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais também estão presentes (FERRÃO, 2002). Antes da quebra do fruto maduro, as sementes encontram-se microbiologicamente estéreis ou quase estéreis, e a contaminação da polpa ocorre quando o mesmo é aberto com facas, introduzindo-se uma grande variedade de microrganismos, muitos dos quais subsequentemente contribuem para a fermentação. Os microrganismos fermentadores são transferidos para as sementes através principalmente das mãos dos trabalhadores, facas, cestos utilizados para transporte e mucilagem seca presente nas caixas, remanescente de fermentações anteriores (SCHWAN; WHEALS, 2004; NIELSEN et al., 2007).

Segundo Schwan e Wheals (2004), o processo de fermentação pode ser dividido em três fases (Figura 7).

Figura 7- Fases da fermentação.



Fonte: Adaptado de SCHWAN; WHEALS, (2004).

Nas primeiras 24-36h, a fermentação ocorre anaerobicamente. Há multiplicação de leveduras, fato que é favorecido pelo alto conteúdo de açúcares (15% de monossacarídeos), baixo pH (em torno de 3,5), conferido pelo ácido cítrico e concentrações limitadas de oxigênio na polpa. As leveduras convertem o açúcar em álcool e dióxido de carbono, até um determinado ponto da fermentação onde o próprio álcool inibe o crescimento desse micro-organismo (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004; CRUZ et al., 2013). Nesse momento ocorre autólise das células das leveduras, havendo então a liberação das enzimas importantes para promover o sabor típico dos produtos derivados (OETTERER, 2006; LIMA, 2010). Em no máximo 24 horas, as leveduras consomem todo oxigênio presente na massa que está fermentando, criando assim condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias (THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001).

Esta fase da fermentação é moderadamente exotérmica (93,3 kJ por mole de glicose consumida), levando a um relativo aumento na temperatura da massa que varia de 35 a 40°C, e é imprescindível no desenvolvimento da fase de fermentação posterior (JESPERSEN et al., 2005; FERRÃO, 2007).

Normalmente, a partir do segundo dia até o final do processo se realiza o revolvimento da massa que está fermentando a fim de controlar o nível de acidez e temperatura (para que não ultrapasse 45°C), de forma a não inativar as enzimas endógenas necessárias no desenvolvimento do aroma e sabor dos produtos derivados de cacau (SCHWAN et al., 1990; OETTERER, 2006).

Essa elevação da temperatura da massa em conjunto com o aumento da acidez provocado pela presença de álcool etílico, e em seguida, ácido acético, são responsáveis pela morte do gérmen e consequente perda da capacidade de germinação das sementes, que a partir desse momento passam e se denominar amêndoas (CRUZ, 2002; SCHWAN; WHEALS, 2004; CRUZ et al., 2013; AFOAKWA, 2010).

Algumas linhagens de leveduras produzem enzimas pectinolíticas que rompem o cimento entre a parede das células da polpa, gerando um suco chamado “mel de cacau”. Com o escoamento do mel e o revolvimento da massa, o ar começa a penetrar mais facilmente no interior do cocho e esse pequeno aumento dos níveis de oxigênio e a presença significativa de gás carbônico e açúcar na massa favorecem o crescimento de bactérias lácticas, que por sua vez irão produzir o ácido láctico (FERREIRA et al., 2013).

Estas bactérias estão presentes desde o início da fermentação, mas só se tornam dominantes entre 48 e 96 h. Bactérias lácticas convertem açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido láctico. Por não ser volátil, o ácido láctico é um dos grandes responsáveis pela acidez das amêndoas. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50° C. Nessa fase, há uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor das sementes (FERREIRA et al., 2013). Segundo Brito (2000), líquidos celulares se movem através das paredes, se espalhando por todo o grão de cacau, sendo que a difusão dos ácidos para o interior do cotilédone contribui para reações enzimáticas.

Na terceira fase, as bactérias acéticas, responsáveis pela conversão do álcool em ácido acético tornam o tegumento permeável, fazendo com que as amêndoas sofram a ação das enzimas (BECKETT, 2009). A partir dessa fase é possível sentir um forte cheiro de “vinagre” (de ácido acético) dentro do cocho. Que só irá reduzir à medida que a massa for sendo revolvida constantemente, até o final da secagem, pois ao contrário do ácido láctico, o ácido acético é um composto volátil (FERREIRA et al., 2013). Ressalta-se ainda a redução da adstringência e amargor devido à oxidação dos compostos fenólicos, formando complexos com proteínas e peptídeos, traduzindo-se, entre outras, na transformação da cor púrpura a marrom dos cotilédones, com o aumento da concentração de ácido acético e oxidação das antocianinas. A oxidação iniciada nesta fase continua na etapa de secagem até que a umidade atinja um ponto no qual cessa a atividade da polifenoloxidase (CRUZ, 2002; BECKETT, 2009).

Para Lagunes-Galvez et al. (2007) a fermentação é uma das etapas da pós-colheita que mais afetam a qualidade dos produtos obtidos a partir do cacau. Considerando que o processo de fermentação e secagem é feito ainda nas fazendas, sem qualquer controle de processo, uma porcentagem significativa das sementes não sofre as alterações necessárias (principalmente a acidificação do pH e aumento da temperatura) para que as reações enzimáticas se processem de forma satisfatória. Uma possibilidade de remediar este problema é o acompanhamento e intervenção, principalmente no processo de fermentação, objetivando caracterizar os compostos, enzimas e melhores condições de processo para melhor uniformizar e aumentar a qualidade das amêndoas de cacau produzidas (AQUARONE et. al., 2001).

2.3. Secagem e armazenamento

A secagem deve ser iniciada imediatamente após a fermentação. Muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam durante a secagem, permitindo a redução do amargor, da adstringência e da acidez das amêndoas, além do escurecimento dos cotilédones (BECKETT, 2009). Nesse processo, as amêndoas atingem a umidade necessária para o armazenamento.

Após a fermentação, uma vez que a mucilagem tenha sido retirada das amêndoas, 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 (KOBLOITZ, 2011; LIMA, 2010).

O tempo e a temperatura de secagem são fatores de extrema importância na qualidade final das amêndoas. A secagem não deve ser realizada de forma rápida e com emprego de altas temperaturas, pois isso provoca a migração de manteiga de cacau para a testa e dificulta a eliminação do ácido acético, elevando a acidez final das amêndoas, o que afeta o desenvolvimento do sabor característico de chocolate (CRESPO, 1985). Também não pode ser feita muito lentamente, para impedir o desenvolvimento de fungos e a produção de toxinas prejudiciais à saúde (SOARES, 2001, EFRAIM et al., 2006). Deve-se encontrar um equilíbrio que pode ocorrer em um período de 7 a 15 dias de processo a depender do microclima de cada região (FERREIRA et al., 2013).

A faixa de temperatura considerada ótima para ação da enzima está na faixa de 35°C a 40°C. O uso de temperaturas mais baixas ou mais elevadas conduz à perda da qualidade, visto que a enzima age lentamente ou é destruída.

A secagem deve proceder até que as amêndoas de cacau tenham um teor de umidade máxima de 8% (BRASIL, 2008). Teores maiores que 8% de umidade podem levar ao crescimento de fungos no armazenamento e transporte (OETTERER, 2006; ANKLAM; WOLLGAST, 2000a).

Na Bahia, a forma mais tradicional de secar o cacau é através da secagem natural, que utiliza a luz solar como fonte de energia. Essa secagem é feita em barcaças, que são estruturas compostas por um lastro fixo de madeira ou aço inox e uma cobertura móvel (Figura 8). Nos horários de sol forte (das 10 as 14 h) a cobertura deve ser fechada para que o cacau fique na sombra, possibilitando uma secagem mais prolongada e eficiente (PEREIRA, 2013; FERREIRA et al., 2013).

Figura 8- Barcaças para secagem do cacau



Fonte: Autoria própria.

Cuidados durante o armazenamento são essenciais para que o produto apresente a melhor qualidade possível. Depois de secas, as amêndoas de cacau são acondicionadas em sacos de aniagem de 60 kg por cerca de 30 dias. 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, para evitar que as amêndoas absorvam outros aromas, podendo comprometer sua qualidade (VICENTE et al., 1996; OETTERER et al., 2006).

3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMÊNDOAS

O cacau recém-colhido possui amêndoas de cor púrpura ou branca, a depender da variedade plantada, sabor amargo e adstringente, não tendo qualquer valor comercial. Uma infusão delas apenas resultaria em um líquido amargo e sem aroma.

Quando cortadas, apresentam cotilédones unidos quase no tegumento (LIMA et al., 2001; LIMA, 2010). Tão somente após a chamada “cura”, resultado do calor e das transformações bioquímicas ocorridas é que o cacau poderá ser um produto de valor para a indústria (FADINI, 1998; SCHAWN, 1998). Segundo Nielsen et al. (2007), as amêndoas de cacau são naturalmente amargas, desagradáveis e adstringentes e precisam ser fermentadas, secas e torradas para adquirirem o aroma característico do chocolate.

De acordo com Lopes, Garcia e Vasconcelos (2003), a característica de uma amêndoa de cacau bem fermentada é principalmente a coloração marrom e uma evidente formação de sulcos nos seus cotilédones. Amêndoas de cacau que apresentem uma mistura de coloração marrom com violeta, em grande extensão da superfície exposta, sugerem uma fermentação insuficiente, sendo estas classificadas como parcialmente ou sub-fermentadas, dependendo da intensidade desta coloração.

Existem vários procedimentos utilizados atualmente para avaliar o grau de fermentação de amêndoas de cacau para controle de qualidade (LANGANTILEKE; WAHYUDI; BAILON, 1991; MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003). A primeira tentativa de padronização dos critérios de qualidade comercial das amêndoas foi estabelecida com a prova de corte, que verifica aspectos qualitativos referentes ao grau de fermentação e de secagem (LOPEZ, 1982; POWELL, 1984). Segundo Puyutaxi et al. (2009), consiste em um procedimento simples, com base em mudanças de cor registradas durante a fermentação, e que tem sido usado a nível mundial. No entanto, esse método não é totalmente quantitativo e a avaliação de cores é muito subjetiva (LANGANTILEKE; WAHYUDI; BAILON, 1991).

3.1 Teste de corte

O teste de corte é a principal forma de avaliar a qualidade das amêndoas fermentadas e secas. Este teste é utilizado mundialmente como forma de classificar e caracterizar lotes quanto à sua qualidade (BRASIL, 2008).

A prova consiste no corte longitudinal de 100 amêndoas de cacau em triplicata, dispostas em uma tábua de corte (Figura 9), onde são analisadas quanto ao grau de fermentação pela coloração (marrom, parcialmente marrom, violácea, ardósia), a compartimentação dos cotilédones (bem, parcialmente ou pouco compartimentada), bem como a presença de fungos, infestações por pragas durante a estocagem, amêndoas germinadas (provenientes de frutos sobre-maduros) e achatadas, além do aroma externo

e após o corte, entre outros parâmetros (BRASIL, 2008; PUYUTAXI et al., 2009; EFRAIM, 2009).

Figura 9- Prova de corte das amêndoas de cacau.



Fonte: Fábrica Mendoá.

Para a classificação das amêndoas utiliza-se a Instrução Normativa Nº. 38, de 23 de junho de 2008, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabeleceu o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade (BRASIL, 2008). As amêndoas de cacau podem ser classificadas em Tipos de acordo com os percentuais de tolerância de defeitos previstos (Tabela 2).

Tabela 3- Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau: Instrução Normativa nº 38/2008.

Classificação	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%

Fonte: Brasil (2008).

Na classificação de amêndoas de cacau são avaliados seis tipos de defeitos, sendo eles: amêndoas que apresentam desenvolvimento interno de fungos, visíveis ao olho (mofadas) e danificadas por insetos. A presença de aroma de fumaça, característico de defumados. Amêndoas não fermentadas, de coloração cinzento-escura (cor de ardósia) ou roxa, com embrião branco ou marfim e que podem se apresentar compactas. Amêndoas que possuem a testa rompida pelo desenvolvimento do embrião (germinadas), oriundas da colheita de frutos sobremaduros ou furados por roedores. E amêndoas achatadas, que apresentam cotilédones muito finos, que não permitam o corte, com uma só folha embrionária, ou sem a presença desta (chocha) (SERRA, 2004; SANTOS, 2013).

Na prova de corte também são percebidos problemas no processo fermentativo através da coloração final das amêndoas de cacau após a secagem (EFRAIM, 2004; SANTANA, 1981). As amêndoas de frutos não completamente maduros não fermentam bem devido à falta de açúcares. Isto produz a compactação de cotilédones e o efeito de cor violácea (em amêndoas pigmentadas), além de reterem grande teor de umidade e apresentar forte adstringência e acidez elevada. As amêndoas provenientes de fruto sobremaduros, não fermentam adequadamente, perdem o aroma e o sabor (SANTANA, 1981).

3.2 Índice de Fermentação (IF)

De acordo com Gourieva e Tserevitinov (1979), o índice de fermentação é uma medida que avalia o grau de fermentação do cacau. Ao contrário do teste de corte, o índice de fermentação é um teste quantitativo mais preciso, já que a determinação é feita usando-se espectrofotômetro.

A coloração das amêndoas de cacau está intimamente relacionada aos polifenóis como catequinas, proantocianidinas e antocianinas (WOLLGAST; ANKLAM, 2000b). Os pigmentos de antocianina em condições ácidas dão uma cor de vermelha à púrpura com uma absorvância máxima de 500-550 nm antes da fermentação. Ao longo do processo, as antocianinas são oxidadas gerando produtos tais como cianidina-3- β -D-galactósideo e cianidina-3- α -L-arabinósideo que são suspeitos de contribuir para o desenvolvimento de pigmentos marrons, com valores de absorvância inferiores a 500 nm (SHAHRIR; DIMICK, 1986; MAMOT, 1989; MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003).

Portanto, o valor do índice de fermentação é obtido a partir da razão de absorbância de 460 nm a absorbância a 530 nm (GOURIEVA; TSEREVITINOV, 1979). Neste caso, valores de IF inferiores a 1.000 indicam que as amêndoas de cacau estão sub-fermentadas, valores entre 1.000 - 1.599 indicam amêndoas completamente fermentadas e acima de 1.600, amêndoas sobre-fermentadas (SULAIMAN, 2014).

4. COMPOSTOS BIOATIVOS

Os alimentos de origem vegetal apresentam compostos não nutrientes (fitoquímicos), com reconhecida propriedade antioxidante, que atuam retardando a velocidade da reação de oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000; SHUI ;LEONG 2005).

A importância desses compostos naturais para a medicina preventiva vem sendo amplamente reconhecida nos últimos anos. Acredita-se que alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, bem como diabetes e doenças reumáticas sejam causados ou acelerados por estresse oxidativo (WEISBURGER; WILLIAMS, 2000).

A possibilidade de prevenir ou reduzir o risco de se desenvolver essas doenças através da dieta tem atraído à atenção tanto da comunidade científica como das indústrias alimentícias com o objetivo comum de desenvolver os atualmente conhecidos como "alimentos funcionais", ou alimentos ricos em um ou mais compostos bioativos que apresentam efeitos positivos à saúde (PINTO, 2008).

É válido destacar que o conteúdo de compostos bioativos está fortemente correlacionado com a capacidade antioxidante, como constatado por Canuto et al. (2010), Rufino et al. (2010) e Souza et al. (2012), em estudos realizados com frutas, onde relataram que amostras com maior teor de compostos bioativos apresentaram maior capacidade antioxidante.

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, que ocorrem em frutas, hortaliças, sementes, flores, vinhos, ervas, chás, cacau e soja, constituem um dos mais numerosos e largamente distribuídos grupos de agentes fitoquímicos do reino vegetal (BRAVO, 1998; WOLLGAST; ANKLAN, 2000a). No entanto, o teor desses compostos nos alimentos também pode variar conforme a região de plantio, tipo de solo, exposição solar, índice pluviométrico e estágio de maturação (MARTINS et al., 2011).

O nome polifenóis vem da nomenclatura *poli* que quer dizer muitos e de *fenol* que é um composto químico (CROZIER; BORGES; STEWART, 2004). São produtos do metabolismo secundário de vegetais e possuem em sua estrutura molecular pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxilas (-OH) (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011), sendo encontrados na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (ARAÚJO, 2011).

Bioquimicamente, originam-se de duas vias principais, a do chiquimato e a do acetato, ambas derivadas do metabolismo da glicose (BRAVO, 1998). O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008). A origem biogenética é que vai determinar o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, formados a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em *meta* (BRUNETON, 1991; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2001; ALMEIDA, 2007).

Por se tratar de um amplo grupo, contendo mais de oito mil compostos já identificados, os polifenóis podem ser agrupados em diferentes classes dependendo de sua estrutura básica, sendo estas os fenóis simples, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, xantonas, antraquinonas, flavonoides, lignanas e ligninas, entre outras (BRAVO, 1998; WOLLGAST e ANKLAM, 2000a). De maneira simplificada, podem ser agrupados de acordo com a massa molecular. A classe de baixa massa molecular compreende os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos; a classe de massa molecular intermediária, os flavonoides, que incluem os flavanóis, flavonóis, antocianinas, flavonas e flavanonas, considerada a maior e mais importante; e, entre os de alta massa molecular, estão os taninos condensados (procianidinas) e os taninos hidrolisáveis (ESCARPA; GONZALEZ, 2001).

Outro importante grupo de compostos bioativos são as metilxantinas, alcalóides que ocorrem naturalmente em várias espécies de plantas pertencentes a 28 gêneros e mais de 17 famílias, utilizadas na obtenção de bebidas alimentícias ou estimulantes, como chás, café, chocolate, mate e refrigerantes. As mais abundantes são

a cafeína (1,3,7- trimetilxantina), a teofilina (1,3-dimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina) (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

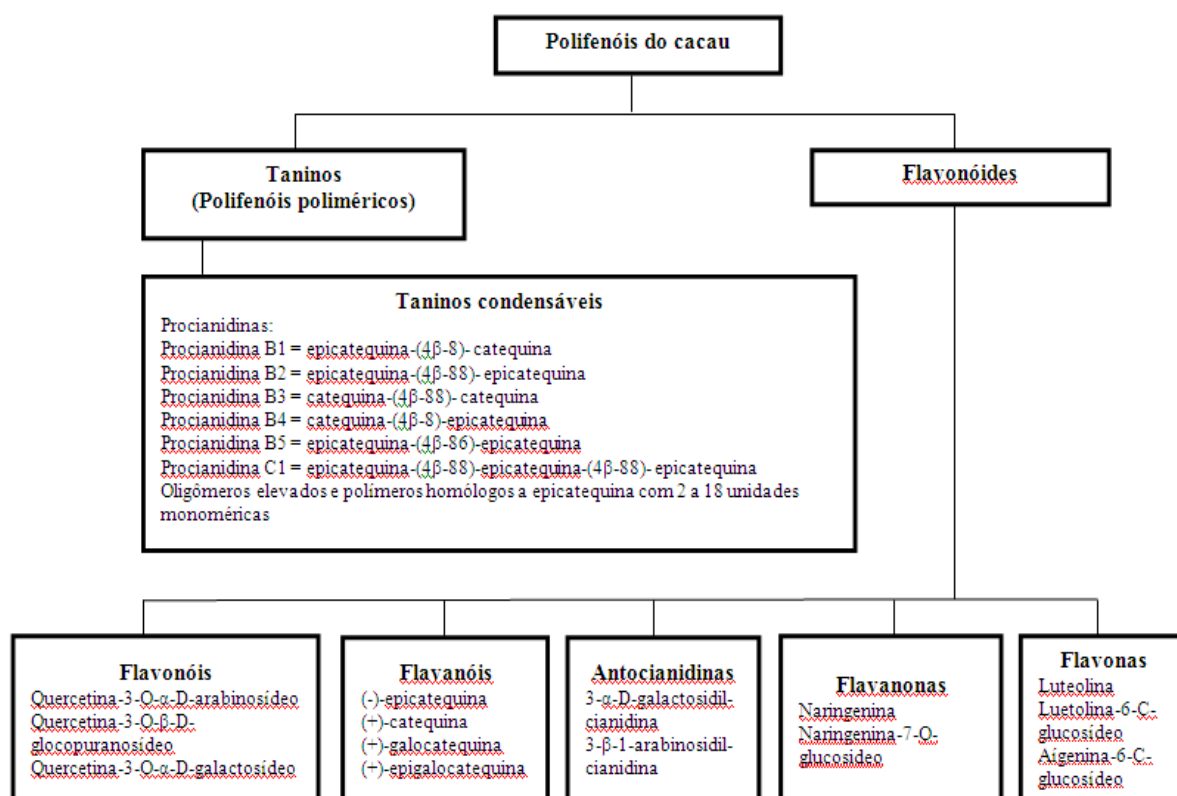
A cafeína exerce efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, músculos cardíacos, sistema respiratório e secreção de ácido gástrico. Também é considerada como um diurético fraco e relaxante muscular. A teobromina tem ação diurética e a teofilina tem predominantemente efeito broncodilatador (ALVES; BRAGAGNOLO, 2002; DE MARIA; MOREIRA, 2007).

4.1. Principais bioativos do cacau

A semente de cacau é uma das fontes mais conhecidas de polifenóis, que representam em média 12-18% do peso da semente fresca (seca e desengordurada), podendo chegar a valores de 120 a 180 g/Kg, a depender da variedade. Já em amêndoas fermentadas, secas e desengorduradas, com cerca de 6% de umidade, valores de fenólicos totais próximos a 11% são indicativos de uma boa fermentação, enquanto valores iguais ou superiores a 23% são indicativos de má fermentação (NAZARUDDIN et al., 2006; WOLLGAST; ANKLAN, 2000b; MENG; JALIL; ISMAIL 2009).

Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau são listados na Figura 10, estando dentro das classes dos taninos e dos flavonoides.

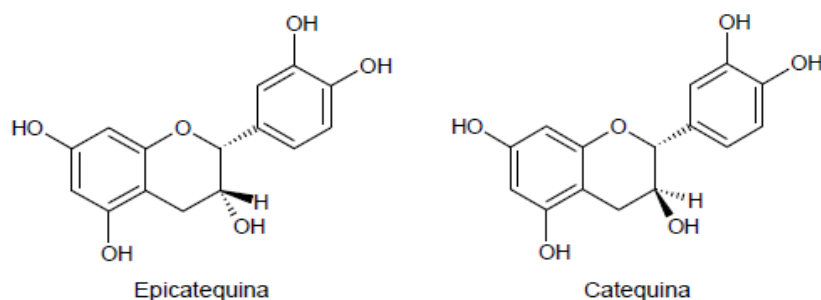
Figura 10- Principais polifenóis encontrados no cacau.



Fonte: Porter et al. (1991); Sanbongi et al. (1998); Sanchez-Rabeneda et al. (2003); Counet et al. (2006).

Os flavonóides constituem substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico. Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, formando um sistema C6- C3-C6 (FINE, 2000; FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001; ARAÚJO, 2008). São divididos em sete famílias em função do grau de oxidação da cadeia de três carbonos. As mais importantes são as flavonas, flavonóis, as flavanonas, as antocianinas e os flavanóis. Dentre estas, os flavanóis destacam-se com a família mais abundante na semente de cacau, sendo a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (Figura 11) os principais representantes. A (-)-epicatequina tem sido reportada como o principal flavanol monomérico do cacau, representando aproximadamente 35% do total de compostos fenólicos (WOLLGAST; ANKLAM, 2000b).

Figura 11- Estrutura química da (+)-catequina e da (-)-epicatequina.



Fonte: WOLLGAST; ANKLAM, (2000b).

Outra família importante da classe dos flavonoides são as antocianinas, que são glicosídeos que apresentam em sua estrutura química um resíduo de açúcar no carbono 3 (DEWICK, 2002). Entre as antocianinas identificadas em sementes de cacau in natura encontram-se os pigmentos roxos, cianidina-3- β -D-galactósido e cianidina-3- α -L-arabinósido, os quais representam cerca de 4% do conteúdo total de polifenóis das sementes (WOLLGAST; ANKLAM, 2000a).

As antocianinas são um grupo de pigmentos naturais com estruturas fenólicas variadas. Nas sementes de cacau, esses compostos estão armazenados em células específicas no cotilédone (DREOSTI, 2000; WOLLGAST; ANKLAM, 2000b). São os componentes de muitas frutas vermelhas e hortaliças escuras. Representam um significativo papel na prevenção ou retardam o aparecimento de várias doenças por suas propriedades antioxidantes (ARAÚJO, 2008).

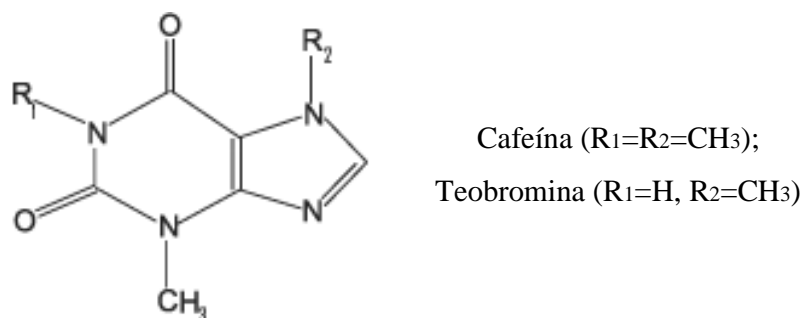
As proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros de alto peso molecular que têm como precursoras unidades monoméricas de flavan-3-óis (catequinas e epicatequinas) em união com flavan-3,4-dióis ou leucoantocianidinas. Quando as moléculas que se condensam são catequinas ou epicatequinas, as proantocianidinas são denominadas procianidinas (EFRAIM et al., 2006).

No cacau os polifenóis são componentes importantes do sabor, responsáveis principalmente pelo amargor e adstringência, embora a literatura reporte que outros fatores, como a presença de certos aminoácidos e a complexação de peptídeos com metilxantinas, também contribuem com estas características (BRITO, 2000). Segundo alguns autores, os produtos da condensação de compostos fenólicos gerados durante a fermentação e secagem são responsáveis pela cor marrom do cacau e do chocolate (ELWERS et al., 2009).

A quantidade de compostos fenólicos presentes no cacau e, conseqüentemente, em chocolates, depende não apenas de características genéticas, mas também de outros fatores como a origem geográfica, o clima, o tipo de solo e a região de plantio (fatores agrônômicos e ambientais) (JALIL; ISMAIL, 2008). As diferentes etapas da transformação do cacau em chocolate também podem influenciar no teor de polifenóis dos produtos finais (fatores de processo) (RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2010).

Metilxantinas, tais como a cafeína e teobromina, são outro grupo de compostos bioativos encontrados em amêndoas de cacau. Estes alcaloides apresentam estruturas moleculares semelhantes (Figura 12) e têm efeito estimulante sobre o cérebro. Alguns trabalhos relacionam a presença desses compostos em chocolates com efeitos como o vício e a redução da pressão arterial (BRUINSMA, TAREN, 1999).

Figura 12- Estrutura química das metilxantinas



Fonte: MARIA; MOREIRA, (2007).

Os alcaloides teobromina e cafeína pertencem à família das purinas e representam mais de 99 % dos alcaloides presentes na amêndoa do cacau (PUYUTAXI et al., 2009). De acordo com Cruz (2012), as amêndoas contêm aproximadamente 2-3 % de teobromina, 0,2 % de cafeína e traços de teofilina, sem qualquer alteração quantitativa desta concentração relatada durante a fermentação e torrefação.

Segundo Wakao (2002), os teores finais de teobromina e cafeína estão relacionados com o genótipo de cacau, o grau de maturidade das amêndoas e o nível de fermentação.

Matissek (1997) apontou as razões de interesse no grupo das metilxantinas: contribuem com o sabor amargo do chocolate, juntamente com compostos formados durante a torração; sendo utilizados como parâmetro de qualidade, pois atestam a

presença de cacau (o cacau é a única planta americana que possui teobromina como alcalóide principal). Ainda, possuem efeitos farmacológicos sobre os sistemas: nervoso, cardiovascular, gastrintestinal, respiratório e renal (CAUDLE; BELL, 2000).

4.2. Influência da fermentação no teor de compostos bioativos em cacau e produtos derivados

Estudos tem demonstrado que durante o processo de fermentação do cacau há uma redução considerável no teor de compostos bioativos nas amêndoas, levando a uma conseqüente diminuição das características funcionais desse produto, contudo, graças aos efeitos benéficos desses compostos à saúde humana, há um grande interesse em mantê-los durante o processamento dos produtos obtidos do cacau, sem que causem prejuízo ao sabor (KEALEY et al., 1998; KEALEY et al., 2004; EFRAIM, 2004; RIZO, 2006; SANTOS, 2013).

Compostos fenólicos são armazenados em células de pigmentos dos cotilédones, também chamadas células de armazenamento de polifenóis, e a quantidade de antocianinas nessas células de pigmentos dão aos grãos coloração que variam de branco a violeta. Quando os grãos de cacau passam pelos processos de fermentação e secagem, que são passos críticos no processamento do cacau, as membranas das células de pigmento se rompem e os polifenóis entram em contato com as enzimas polifenoxidase e glicosidase presentes nas sementes (FORSYTH; QUESNEL, 1957; BRITO, 2000; BECKETT, 2009), sofrendo oxidação e complexação com proteínas, resultando em taninos de maior massa molecular, na sua maioria insolúveis. As antocianinas são rapidamente hidrolisadas em antocianidinas e açúcares (galactose e arabinose) pelas glicosidases, o que explica a mudança de coloração dos cotilédones. As polifenoxidases convertem os polifenóis (principalmente epicatequina e antocianidinas livres) em quinonas, as quais sofrem condensação covalente com grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras (FORSYTH; QUESNEL, 1957; RUSCONI; CONTI, 2010), diminuindo a solubilidade e a adstringência, dando origem à coloração marrom das amêndoas típicas dos grãos de cacau bem fermentados (Del BOCA, 1962; SHAMSUDDIN, 1986).

O teor de antocianinas decresce, chegando a 7% do valor inicial, e grande parte dessa perda ocorre entre o primeiro e o terceiro dia (CROSS et al., 1982; BRITO, 2000). O conteúdo de antocianinas tem sido considerado como um bom índice na determinação do grau de fermentação das amêndoas de cacau (SHAHIDI; NACZK,

1995). Já o conteúdo de polifenóis totais diminui cerca de 70%, sendo que a (-)-epicatequina, principal substrato da enzima polifenoloxidase, sofre redução de 90% de sua concentração inicial.

O sabor amargo do cacau está primariamente relacionado com as metilxantinas, teobromina e cafeína, e secundariamente com as substâncias fenólicas (EFRAIM, 2004). Durante o processo de fermentação das amêndoas, o conteúdo de teobromina e cafeína reduz cerca de 20 a 30 % (PUYUTAXI et al., 2009). A diminuição do teor de teobromina, conseqüentemente faz com que haja uma diminuição do amargor das amêndoas. Puyutaxi et al. (2009) concluíram que o teor de teobromina além de diminuir após a fermentação, também diminui na época chuvosa.

5. ATIVIDADE ANTIOXIDADADE E MÉTODOS DE MEDIDA DA ATIVIDADE

O termo oxidação de uma substância pode ser definido como sendo a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons, ou seja, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância, enquanto que redução é considerada o procedimento inverso (LARSON, 1997). Essa transferência de elétrons é um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células. O efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres que podem causar dano oxidativo.

Radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), podem ser definidas como moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais elétrons não pareados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O elétron livre favorece a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (SHAMI; MOREIRA, 2004).

As ERO têm papel importante em muitos processos biológicos. São geradas durante reações de transferência de elétrons em células aeróbicas, especialmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (COENTRÃO, 2005). Incluem o radical hidróxido ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (SIES, 1991). O estresse oxidativo é causado pela produção excessiva de radicais livres, devido ao estilo de vida e situações patológicas, e quando não são destruídos pelo sistema antioxidante de defesa do organismo, podem reagir facilmente com o DNA, as proteínas e os lipídios, provocando

doenças como câncer, aterosclerose, injúria da mucosa gástrica e envelhecimento (HALLIWELL, 1990; GENOVESE, LANNES, 2009).

Para auxiliar os sistemas antioxidantes de defesa, é desejável a ingestão de substâncias com capacidade antioxidante para combater o excesso de ERO, como alguns polifenóis, carotenoides e vitaminas C e E (JACOB; BURRI, 1996). Alimentos como frutas, vegetais e grãos são relatados para conter uma grande variedade dessas substâncias.

Os componentes antioxidantes são microconstituintes presentes nos alimentos que podem retardar ou impedir a oxidação lipídica, inibindo a iniciação ou propagação de reações oxidantes em cadeia (como rancificação e formação de off-flavors em alimentos) estando presente em pequenas concentrações quando em comparação com o agente oxidante (KATALINIC et al., 2004; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

Estes componentes podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos ação. Assim, a depender do mecanismo, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia de reação radicalar, reagindo com radicais para formarem produtos termodinamicamente estáveis ou complexos mais estáveis que o radical livre precursor. Já os antioxidantes secundários, retardam a etapa que precede a formação dos radicais por diferentes mecanismos, como a complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes primários e sua capacidade antioxidante devem-se à facilidade com a qual um átomo de hidrogênio do grupo hidroxil aromático pode ser doado para um radical livre e à habilidade do grupo fenólico suportar um elétron não pareado (BURNS et al., 2000).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES et al., 2010). Dentre estes, pode-se destacar o uso de métodos espectrofotométricos para medir os níveis de atividade

antioxidantes *in vitro*, como o DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazil), FRAP (potencial antioxidante de redução do ferro) e CUPRAC (capacidade antioxidante de redução do cobre).

A maioria dos métodos empregados apresenta o mesmo princípio, onde um radical colorido sintético é empregado e/ou um composto redox-ativo é gerado, e a habilidade da amostra biológica de eliminar o radical ou reduzir o composto redox-ativo é monitorado por espectrofotômetro (UV-Vis-Fluorescência), utilizando-se um padrão apropriado para a quantificação (FLOEGEL et al., 2011).

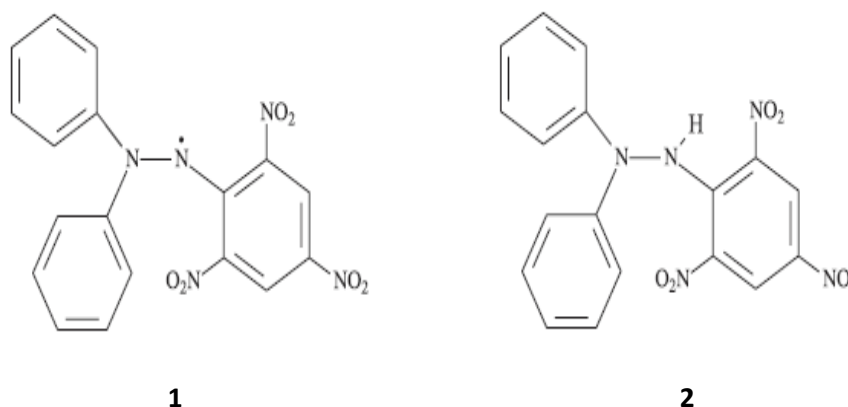
Entretanto, a falta de padronização desses métodos dificulta as comparações entre dados publicados por diferentes grupos de pesquisas, principalmente pelo uso de diferentes solventes e pelas maneiras distintas de expressar os resultados. Além disso, variações no complexo antioxidante de uma matriz alimentar podem fornecer respostas diferentes em cada método. Por isso, recomenda-se a combinação de pelo menos dois desses métodos para fornecer resultados mais completos e representativos da capacidade antioxidante de alimentos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

Na determinação da atividade antioxidante são utilizadas as avaliações direta e indireta. Os métodos diretos baseiam-se no estudo do efeito que um alimento contendo antioxidantes é capaz de induzir na degradação oxidativa de um sistema em análise. Já na aplicação dos métodos indiretos, estuda-se a habilidade do antioxidante em capturar radicais livres, o que não necessariamente corresponde a real degradação oxidativa, embora em alguns casos a doação de átomos de hidrogênio (ou elétrons) correlacione-se com a atividade antioxidante. (ROGINSKI; LISSI, 2005).

5.1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

O método do radical DPPH é um procedimento físico-químico aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres (SUCUPIRA et al., 2012). A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (MOLYNEUX, 2004). A medida de sua capacidade sequestrante baseia-se no princípio de que o DPPH aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável (hidrazina), sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela (Figura 13) (MENSOR et al., 2001).

Figura 13 - Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH



Fonte: ALVES et al., (2010).

Esta habilidade foi primeiramente avaliada espectroscopicamente por ressonância de elétron spin (RES), uma vez que a intensidade do sinal do radical DPPH é inversamente relacionada com a concentração do antioxidante testado e o tempo de reação (CHEN et al., 2000). Entretanto, o método de controle mais utilizado é o decaimento da absorvância no comprimento de onda observado entre 515 a 528 nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH (SZABO et al., 2007).

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalente do padrão utilizado, ou como EC50, a qual expressa à quantidade de antioxidante ou amostra necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC50 e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

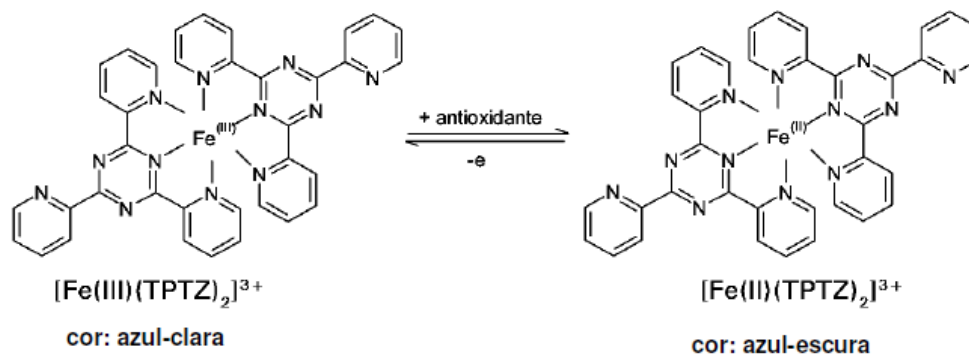
Apesar de ser um dos mais utilizados, por ser considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade, este método também apresenta limitações, como o uso de quantidades significativas de reagentes, padrões e amostras; número limitado de análises simultâneas e impossibilidade de avaliação da atividade de antioxidantes hidrofílicos, uma vez que o radical é dissolvido em solventes orgânicos (principalmente alcoóis) e não em meio aquoso (ARNAO, 2000; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

5.2. FRAP (Potencial Antioxidante de Redução do Ferro)

O método FRAP foi originalmente desenvolvido por Benzie e Strain (1996) para medir o poder de redução no plasma, mas a abordagem foi posteriormente adaptada

para uso em antioxidantes de vegetais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). É baseado no mecanismo de transferência de elétrons, e avalia a capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina], a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) de coloração azul escura, em pH ácido (3,6), como demonstrado na figura 14.

Figura 14- Redução do Fe(III) a Fe(II) por adição de um antioxidante.



Fonte: HUANG; OU; PRIOR, (2005).

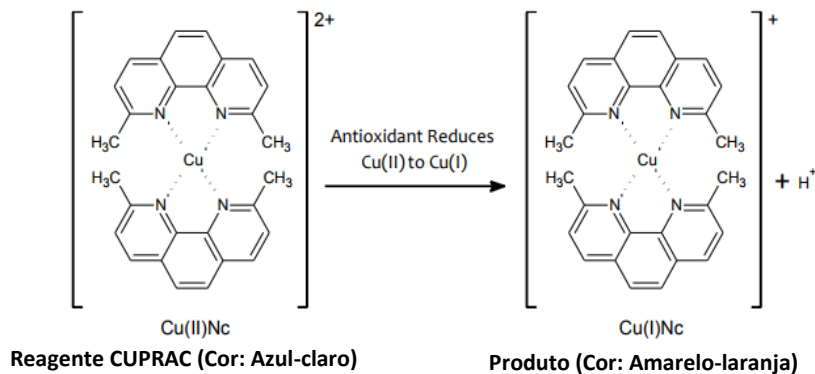
O complexo formado pela reação do íon férrico possui uma coloração azul intensa e pode ser monitorado em espectrofotômetro a 595 nm. Este método é econômico, o procedimento é direto e rápido, não requer equipamentos especializados e os resultados são reprodutíveis (NIKI, 2010). Entretanto, uma das críticas a esse método consiste no fato de que a capacidade de redução obtida não reflete necessariamente na atividade antioxidante da amostra (ROGINSKY; LISSI, 2005), já que requer meio ácido para ser realizado. Segundo Huang, Ou e Prior (2005) os valores de pH tem efeito importante na redução da capacidade antioxidante, pois em condições ácidas a redução da capacidade pode ser suprimida devido à protonação com compostos antioxidantes, enquanto que em meio básico, ocorre à dissociação de prótons de compostos fenólicos que pode aumentar a capacidade de reduzir uma amostra.

5.3. CUPRAC (Capacidade antioxidante de redução do cobre)

Este método se baseia na transferência de elétrons que ocorre na redução de Cu(II) a Cu(I) por redutores (antioxidantes), e a capacidade antioxidante é mensurada com base na medição da absorção do quelato formado Cu(I) e neocuproina (Nc) como resultado da reação redox entre o antioxidante e o reagente CUPRAC, Cu(II) e Nc, medindo a absorvência no comprimento máximo de 450 nm, (HUANG et al., 2005;

APAK et al., 2007; ÖZYÜREK et al., 2011; OMENA, 2012). A Figura 15 representa a reação que ocorre em solução.

Figura 15- Redução do Cu(II) para Cu(I) por adição de um antioxidante.



Fonte: OZYUREK et al., (2011).

O CUPRAC apresenta vantagem em relação ao FRAP por ser conduzida a pH 7,0, ou seja melhor simulada nas condições fisiológicas, onde a reação é completa para a maioria dos flavonoides. O método FRAP requer um meio ácido (pH 3,6), que é distante do pH fisiológico e apresenta uma reação incompleta com polifenóis (APAK *et al.*, 2007; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Além disso, possui maior sensibilidade para medir antioxidantes hidrófilos e lipofílicos, ao contrário do método de DPPH (APAK et al. , 2004, APAK et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. England: Wiley-Blackwell, 2010. p. 21.
- ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação in vitro e em modelo alimentar**. 2007. 137f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2007.
- ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 237-43, 2002.
- ALVES, C. Q.; DAVID J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-10, 2010.
- ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (Crinipellis perniciosa (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba**. 2002. 70f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2002.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-40, 2007.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; DEMIRATA, B.; OZYUREK, M.; ÇELIK, S. E.; BEKTASOGLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496-547, 2007.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 4, p. 413-19, 2008.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7970-81, 2004.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia industrial**. Sao Paulo: E. Blucher, v. 4. 2001.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2476-81, 2009.
- ARAÚJO, C. R. R. R. **Composição química, potencial antioxidante e hipolipidêmico da farinha da casca de *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba)**. 2011. 119f. Dissertação

(Mestrado) - Universidade Federal do Vale de Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2011.

ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. 477p.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-21, 2000.

BATALHA, P. G. **Caracterização do cacau catongo de São Tomé e Príncipe**. 2009. 101f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. Lisboa, 2009.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 2 ed. London: Chapman and Hall, 1994b. p. 408.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. London: Wiley Blackwell, 2009. p. 720.

BECKETT, S.T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Zaragoza: Editorial Acribica, 1994a. p. 432.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-6, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 57, de 12 de nov. de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutritional Review**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. 134f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

BRUINSMA, K; TAREN, D. L. Chocolate: food or drug? **Journal of the American Dietetic Association**, v.10, n.10, p.1249-56, 1999.

BRUNETON, J. **Fitoquímica y Farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1 ed., 1991. 594p.

BRUNETTO, M. R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A., GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of

theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, p. 459–467, 2007.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D. B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MASLEAN, M. R.; LEAN, M. E. J.; DUTHIE, G. C.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220-30, 2000.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196-05, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**, p. 443-459. 3 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. 821p.

CAUDLE, A. G.; BELL, L. N. Caffeine and theobromine contents of ready-to-eat chocolate cereals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 100, n. 6, p. 690-2, 2000.

CHEN, C.; TANG, H. R.; SUTCLIFFE, L. H.; BELTON, P. S. Green tea polyphenols react with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals in the bilayer of liposomes: direct evidence from electron spin resonance studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5710-4, 2000.

COENTRÃO, P. A. M. **Avaliação das Técnicas de Isolamento de Polifenóis: Aplicação em Amo COCOAVIA stras de Chocolate Meio Amargo**. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Química, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2005.

COPETTI, M. V. IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PEREIRA, J. L.; TANIWAKI, M. H. Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1499-504, 2011.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 649-57, 2006.

CRESPO, S. **Judging the quality of cocoa beans**. Chicago: The Manufacturing Confectioner, v. 4, 1985. p. 59-64.

CROSS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J. C. Recherche d'un índice de fermentation du cacao. **Café, Cacao Thé**, v. 16, n. 2, p. 109-13, 1982.

CROZIER, A.; BORGES, G.; STEWART, A. J. Absorption, metabolism and potential bioavailability of dietary flavonols and anthocyanins. **AgroFOOD industry hi-tech**, p. 16-9, 2004.

CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. 2002. 101f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

CRUZ, J. F. M. **Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 2012. 102f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

CRUZ, J. F. M.; LEITE, P. B.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, p. 5218-25, 2013.

De MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99-105, 2007.

De VUYST, L.; LEFEBER, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.). **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 301-25.

Del BOCA, C. Cocoa beans: quality requirements and methods of assessment. **Rev Int Chocolaterie**, v 17, p. 218-21, 1962.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2002. 515p.

DREOSTI, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Health Sciences and Nutrition**, v. 16, p. 692-4, 2000.

DRUMMOND, M. C. M. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Theobroma cacao* L.), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**. 1998. 127f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Campinas, 1998.

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

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, através da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

- EFRAIM, P.; ALVES, A.B.; JARDIM, D.C.P. Review: Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 181-201. 2011.
- EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCIA, N. H.; HADDAD R.; EBERLIN, M. N. Teores de Compostos Fenólicos de Sementes de Cacaueiro de Diferentes Genótipos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229-36, 2006.
- ELWERS, S.; ZAMBRANO, A.; ROHSIUS, C.; LIEBEREI, R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). **European Food Reserch Technology**, v. 229, p. 937-48, 2009.
- ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.
- FADINI, A. L. **Comparação da eficiência do processo convencional detorração do cacau frente ao processo por micro-ondas**. 1998. 139p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1998.
- FERRÃO, J. E. M. **Cacau: Tecnologia pós-colheita**. Lisboa: Ligalu edições, 2002. p. 303.
- FERREIRA, A. C. R.; AHNERT, D.; NETO, B. A. M.; MELLO, D. L. N. **Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade**. Ilhéus: Instituto Cabruca, 2013. 52p.
- FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.;
- CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Agros, 2001. p. 317-34.
- FINE, A. M. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. **Alternative Medicine Review**, v. 5, n. 2, p.144-51, 2000.
- FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043-8, 2011.
- FONTES, M. J. V. **Do cacau ao chocolate: trajetória, inovações e perspectivas das pequenas agroindústrias de cacau/chocolate**. 2013. 216 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.
- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. Cocoa glycosidase and color changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, n. 9, p. 505-9, 1957.

- GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. S. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 810-4, 2009.
- GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S.; CAVRINI, V. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin modified micellar eletrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 345-52, 2006.
- GOURIEVA, K. B.; TSEREVINOV, O.B. Methods of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans. **USSR Patent** 64654, 1979.
- HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, p. 1-32, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 5, 2007.
- HUANG, D; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 6, p. 1841-56, 2005.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado> >. Acesso em 19 de fevereiro de 2018.
- ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, v. XLIII, n. 3, **Cocoa year 2016/17**. Disponível em: < https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html > Acesso em: 19 de fevereiro de 2018.
- JACOB, R. A.; BURRI, B. J. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 985S, 1996.
- JALIL, A. M. M.; ISMAIL, A. Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? **Molecules**, v. 13, p. 2190-219, 2008.
- JESPERSEN, L.; NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of Yeast involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 441-53, 2005.
- KATALINIC, V.; MILOS, M.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. **Food Chemistry**, v. 86, p. 593-600, 2004.
- KEALEY, K. S.; SNYDER, R. M., ROMANCZYK, L. J.; HAMMERSTONE, J. F.; BUCK, M. M.; CIPOLLA, G. G.. Method for producing fat and/or solids from beans and compositions containing polyphenols. **US Patent Application** 2004/0058022, Mars Incorporated, USA, 2004.
- KEALEY, K.S.; SNYDER, R. M.; ROMANCZYK, L. J.; GEYER, H. M.; MYERS, M. E.; WITHCARE, E. J.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHIMITZ, H. H. Cocoa

components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same medical uses. **Patent Corporation Treaty (PCT) WO 98/09533**, Mars Incorporated, USA, 1998.

KIM, J.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B. (Ed.). **Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention**. London: Elsevier, 2011. p. 351-60.

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

LAGUNES-GALVEZ, S.; LOISEAU, G.; PAREDES, J. L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J. P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 124-30, 2007.

LANGANTILEKE, S. G.; WAHYUDI, T.; BAILON, M. G. Assessment methodology to predict quality of cocoa beans for export. **Journal of Food Quality**, v. 14, p. 481-96, 1991.

LARSON, R. A. **Naturally Occurring Antioxidants**. New York: Lewis Publishers, 1997. p. 1.

LECUMBERRI, E.; MATEOS, R.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; RUPÉREZ, P.; GOYAA, L.; BRAVO, L. Dietary fiber composition, antioxidant capacity and physicochemical properties of a fiber rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 104, p. 948-54, 2007.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 344p.

LEITE, P. **Caracterização de chocolates provenientes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L resistentes a vassoura de bruxa**. 2012. 170f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; BARBERY, S. D. F.; GARCIA, N. H. P.; BRITO, E. S.; LIMA, C. A. A. Obtenção e utilização de enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha madura no melhoramento do sabor de cacau. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 709-13. 2001.

LIMA, U. **Matéria prima dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2010. p. 238-331.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobromaa cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. 2000. 130f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2000.

LOPES, A. S.; GARCIA, N. H. P.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das Condições de Torração Após a Fermentação de Amêndoas de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e Cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n.2, p. 309-16, 2003.

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

LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V. C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 24, n. 3, p. 319-24, 1973.

LOPEZ, S. A. F. **Efeito da fermentação na difusão de substâncias químicas através da testa das amêndoas de cacau**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1982. p. 215 (Informe Técnico).

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, n. 6, p. 1-10, 2013.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1409-18, 2007.

MAMOT, S. Some methods to determine the degree of fermentation in cocoa beans. In: CHE MAN, Y. B.; ABDUL KARIM, M. N. B.; ASBI, B. A. (Ed.). **Proc. Conf. of Food Processing – Prelude to 90's**. 1989, p. 41-51.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

MARTINI, M. H. **Caracterização das sementes de seis espécies de Theobroma em relação ao Theobroma cacao L.** 2004. 86f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-73, 2011.

MATISSEK, R. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate: nutritional and chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 205, n. 3, p. 175-84, 1997.

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (Theobroma cacao L.) e cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum)**. 2001. 164f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, São Paulo, 2001.

MELÉNDEZ, R. R. V. **Efeito da estiagem na produção de cacau da Bahia nas safras de 2016/17 e 2017/18**. Ilhéus: CEPLAC, 2017. (Nota técnica).

MENG, C. C.; JALIL, A. M.; ISMAIL, A. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 200-9, 2009.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-30, 2001.

MISNAWI, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans, **International Journal of Food Science & Technology**, v. 38, p. 285-95, 2003.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-9, 2004.

NAZARUDDIN, R.; SENG, L. K.; HASSAN, O.; SAID, M. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 24, p. 87-94, 2006.

NIELSEN, D. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 168-86, 2007.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Cocoa and Coffee Fermentations. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M.-L. (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. Ed. 2, v. 1, London: Elsevier, 2014. p. 485-92.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-15, 2010.

OETTERER, M. Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate. In: OETTERER, M.; REGITANO, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. (Org.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Editora Manole Ltda., v. 1, 2006. p. 1-50.

OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (Theobroma Cacao)**. 2005. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; TÜTEM, E.; BAŞKAN, K. S.; ERÇAĞ, E.; ÇELİK, S. E.; BAKI, S.; YILDIZ, L.; KARAMANC, Ş.; APAK, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. **Analytical methods**, v. 3, n.11, p. 2439-53, 2011.

PEREIRA, I. O. **Viabilidade da utilização da casca de cacau como combustível no aquecimento de ar para a secagem de amêndoas de cacau**. 2013. 140f. Tese

(Doutorado) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-85, 2008.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-42, 2000.

PINTO, M. S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (Fragaria x ananassa Duch.): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido eláxico**. 2008. 138f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

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

PORTER, L. J.; MA, Z.; CHANG, G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1657-63, 1991.

POWELL, B. D. **Chocolat and cocoa manufactures quality requirements for cocoa beans**. Kuala Lumpur, Malaysian: The Incorporated Society of Planters and the Malaysia. Cocoa Growers Council, 1984. p.1-11.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-302, 2005.

PUGLIESE, A. G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (Theobroma grandiflorum) e do cupulate: composição e possíveis benefícios**. 2010. 146pf Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PUYUTAXI, F. A.; PALACIOS, A.; BARRAGÁN, J. J.; ZHANG, D. **Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor oriente de la provincia de esmeraldas**. Quevedo: INIAP, 2009. p. 120 (Boletín Técnico, n. 135).

RAMIREZ-SANCHEZ, I.; MAYA, L.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin- Ciocalteu method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 8, p. 790-3, 2010.

RIZO, D. C. Barry Callebaut confirma el poder de los polifenoles en el chocolate. **Dulcelandia**, v. 65, n. 789, p. 33-7, 2006.

ROGINSKI, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. v. 92, p. 235-54, 2005.

- ROHAN, T. A.; CONNELL, M. The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of Food Science**, v. 29, n. 4, p. 460-3, 1964.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.
- RUSCONI, M.; CONTI, A. Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 05-13, 2010.
- SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCHE, S. Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, p. 167-87, 2013.
- SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from Theobromacacao. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 454-7, 1998.
- SANCHEZ-RABANEDA, O.; JAUREGUI, I.; CASALS, C. ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (Theobromacacao L.). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.
- SANTANA, C. A. M. **Beneficiamento e padronização do cacau**. Uruçua: CEPLAC/DEPED/EMARC-UR/NAGRI, 1981. p. 46.
- SANTOS, C. C. **Influência dos processos de fermentação e secagem no teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de amêndoas de cacau amazônico (Theobroma cacao var. Forasteiro)**. 2013. 81f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Belém, 2013.
- SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and environmental microbiology**. v. 64, p.1477-83, 1998.
- SCHWAN, R. F.; LOPEZ, A.; SILVA, D. O.; VANETTI, M. C. D. Influência da frequência e intervalos de revolvimento sobre a fermentação do cacau e qualidade do chocolate. **Agrotópica**, v. 2, n. 1, p. 22-31, 1990.
- SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 205-21, 2004.
- SERRA, W. S. **Manual do Cacaicultor: com perguntas e respostas**. p. 177-207, 2004.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company Inc., 1995.

SHAHIR, S.; DIMICK, P. S. Qualitative and quantitative measurements of cocoa beans fermentation. In: DIMICK, P. S. (ed.). **Proceedings of the Cocoa Biotechnology Symposium**. Pennsylvania: Pennsylvania State University USA, 1986. p. 55-78.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.

SHAMSUDDIN, S. B.; DIMICK, P. S. Qualitative and quantitative measurements of cacao bean fermentation. In: DIMICK, P. S. (ed.). **Proceedings of Cocoa Biotechnology**. University Park, Pa: Department of Food Science, Penn State University, 1986. p. 55-78.

SHUI, A. G.; LEONG, L. P. Residue from star frit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, p. 277-84, 2005.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 31S-8S, 1991.

SOARES, M. S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (Theobroma cacao L.) através de ação enzimática durante a fermentação**. 2001. 107f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-5, 2007.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381-6, 2012.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B. da; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. da. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-9, 2012.

SULAIMAN, K. B. Impact of fermentation duration on the quality of malaysian cocoa beans using shallow box. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, v. 19, p. 74-80, 2014.

SZABO, M. R.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers-Slovak Academy of Sciences**, v. 61, n. 3, p. 214-6, 2007.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds.). **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. 2 ed., 2001. p.721-33.

VICENTE, A. M; CENZANO, I; VICENTE, J. M; CESCHIN, J. A. **Manual de Indústrias dos Alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 599p.

WAKAO, H. **Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cação (Theobroma cacao L.) de producción nacional, durante el proceso de beneficio.** 2002. 91f. Tesis (Especialización en Química Analítica) - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito , 2002.

WEISBURGER, J. H.; WILLIAMS, G. M. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicology Science**, v. 49, p. 231-46, 2000.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 423-47, 2000b.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 449-59, 2000a.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**, 4 ed., Oxford: Blackwell Science, 2001.

CAPÍTULO II

ARTIGO

Establishment of the parameters for the definition of unfermented cocoa beans to obtain raw material for functional chocolates

**Thamires Santos Melo^{1*}, Tássia Cavalcante Pires¹, João Victor Pereira Engelman¹,
Alana Lúcia Oliveira Monteiro¹, Leonardo Fonseca Maciel¹, Sergio Eduardo
Soares¹, Eliete da Silva Bispo¹**

¹Bromatological Analysis Department, School of Pharmacy, Federal University of Bahia-UFBA, Barão de Jeremoabo street, s/n, Ondina, CEP: 40171-970, Salvador, Brazil.

*thamiresmelo87@hotmail.com

ABSTRACT

Cocoa is the fruit of the plant *Theobroma cacao* L., and the consumption of its products, such as chocolate, contributes to human health through the supply of antioxidants. Thus, the objective of this study was to evaluate the fermentation time required to obtain more bioactive compounds and higher antioxidant activity in order to propose a mixture of unfermented and fermented cocoa beans in varying concentrations to obtain functional chocolates. Samples were collected every 12 h over a fermentation period of 144 h. The cocoa beans were evaluated according to their physico-chemical characteristics through the cut test, fermentation index (FI), moisture, pH, titratable acidity and water activity, as well as the content of bioactive compounds (total and monomeric polyphenols, flavonoids, anthocyanins and methylxanthines). Antioxidant activity was measured across the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) methods. It was verified that the major changes in the beans occurred after 48 h of fermentation, with a significant reduction in slaty seeds, the appearance of partially fermented beans and the elevation of acidity and temperature, caused by the diffusion of organic acids, which destroyed the ability of seeds to germinate. Until this period, a higher content of bioactive compounds with antioxidant activity was also observed. Throughout fermentation, there was a significant reduction in the bioactive compound

content, especially for epicatechin. Positive and high correlations were observed between the bioactive compound content and the antioxidant activity, most noticeably in the CUPRAC method. Thus, it is possible to propose a blend of cocoa beans fermented for 48 h and completely fermented beans in different concentrations to elaborate chocolates with a high concentration of bioactive compounds and high antioxidant activity.

KEYWORDS: Bioactive compounds; Antioxidant activity; *Theobroma cacao* L.

1. INTRODUCTION

Many studies have considered fruits, vegetables and teas as major sources of dietary antioxidative phenolics, but Lee et al. (2003) demonstrated the importance of cocoa with respect to the content of these compounds. Cocoa (*Theobroma cacao* L.), the key raw material for chocolate manufacturing, is a cash crop of huge economic significance worldwide (KRÄHMER et al., 2015; HO; ZHAO; FLEET, 2015), since its products have greater antioxidant capacity and a higher amounts of flavonoids per serving than either tea or red wine (LEE et al., 2003; STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003). Chocolate can also be a major source of dietary antioxidants (KRIS-ETHERTON; KEEN, 2002; STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003; KEEN et al., 2005).

Naturally occurring polyphenolic compounds have been widely studied for their beneficial effects to human health, as they can combat free radicals, which are harmful to the body and to food systems (OTHMAN et al., 2007). In addition, they are responsible for the cardiovascular protective, antitumor, anti-inflammatory (SELMİ et al., 2008; CORTI et al., 2009; RUSCONI; CONTI, 2010; JOLIC et al., 2011; APROTOSOAIIE; LUCA; MIRON, 2016), antineurodegenerative (NEHLIG, 2013), antibacterial, and anticariogenic properties of functional foods (FERRAZAMO et al., 2009).

Cocoa beans have a high phenolic content of approximately 12-18% (dry weight), and 95% are flavanol monomers (epicatechin and catechin) and procyanidin oligomers (dimmer to decamer) (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 2005). Epicatechin has been reported as the main monomeric flavanol in cocoa. Depending on the variety, fresh cacao beans contain approximately 12.8 to 43.2 mg.g⁻¹ of (-)-epicatechin (KIM;

KEENEY, 1984; PAYNE et al., 2010) and 20 to 30-times less (+)-catechin (PAYNE et al., 2010).

In addition to polyphenols, cocoa is also rich in methylxanthines, bioactive compounds that are associated with some physiological effects to various body systems, including the central nervous, gastrointestinal, respiratory and renal systems. The major methylxanthines in cocoa are theobromine (3.7%) and caffeine (0.2%) (BELSCAK et al., 2009; LI et al., 2012).

However, despite their health benefits, phenolics and methylxanthines have a negative influence on taste, conferring astringency and bitterness, and also affect the stability and digestibility of products with high levels of these compounds (BRUNETTO et al., 2007; LI et al., 2012). As a result, they require subsequent treatments, including fermentation, drying and roasting, to obtain their unique sensory characteristics (WOOD; LASS, 2001).

The fermentation of cocoa is a spontaneous process that begins immediately after the opening of the pods. Cocoa beans are wrapped in a mucilaginous pulp with acid and sugars and, when in contact with workers' hands, containers used for transport, knives and pod surfaces, are contaminated with a variety of microorganisms (ROELOFSEN, 1958; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; JESPERSEN et al., 2005; ARDHANA; FLEET, 2003). In addition, this microbial load is directly related to the conditions prevailing in the fermentation mass, such as pH, temperature, and oxygen (CAMU et al., 2007; SANDHYA et al., 2016).

Microbial fermentation triggers many chemical reactions that promote promising biochemical characteristics in the beans. The pulp sugar is converted to ethanol, lactic acid and acetic acid and generates heat that causes the death of the seed (LOPEZ; DIMICK, 1995; HASHIM et al., 1998; PEREIRA et al., 2012). Several enzymatic reactions also contribute to the formation of desirable flavor and color in the beans. In addition, these spontaneous biochemical changes within the beans also reduce their bitterness and astringency (LAGUNES-GALVEZ et al., 2007). Thus, unfermented cocoa beans will not produce a distinctive chocolate aroma after roasting because the cocoa flavor precursors have not fully formed. In this case, the acidity of the beans is also high (BIEHL, 1984; BIEHL et al., 1985; SCHWAN; WHEALS, 2004).

During the transformation of fresh cocoa beans to chocolate, the concentration of bioactive compounds can be affected by a variety of biological and processing conditions including fermentation, drying, and roasting (AFOAKWA et al.,

2012). It is estimated that the phenolic content decreases approximately 70%, and (-)-epicatechin is reduced by 90% of its initial concentration (RUSCONI; CONTI, 2010; EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; ORACZ; ZYZELEWICZ; NEBESNY, 2015; AFOAKWA et al., 2015). At the same time, catechins form complex tannins, and anthocyanins are hydrolyzed to anthocyanidins, which polymerize themselves (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011). This can be catalyzed by the enzyme polyphenoloxidase, epicatechin epimerization caused by pH changes during fermentation, and the polymerization of quinones during drying, among other reasons (ORACZ; ZYZELEWICZ; NEBESNY, 2015; AFOAKWA et al., 2015).

Therefore, the objective of this study was to evaluate the loss profile of the bioactive compounds during fermentation and to propose standardization of unfermented cocoa beans with a higher content of these compounds and higher antioxidant activity to obtain mixtures of beans as a raw material for the production of functional chocolates.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

The samples of cocoa seeds were obtained from a farm located in the south of Bahia. Fermentation and drying were performed on the farm following the standards of the producer. The cocoa pods were manually opened with a machete after 48 h of harvest, and the seeds with pulp were separated and immediately submitted to fermentation in three 40-Kg wooden boxes.

Approximately 300 g of beans were taken randomly from each fermentation box after every 12-h interval until the end of fermentation (144 h), and temperature measurements were taken from heights of 6 and 24 cm. The pulp was removed from the beans by rubbing with saw dust. Following cleaning, the beans were dried in the sun in stainless steel barges (10 to 15 days). The samples were stored in hermetically sealed sampling bags and kept in refrigerator at 8 °C prior further analysis. After the cut test, dried cocoa beans were peeled to separate the nibs from the shells for analyses. All evaluations were performed in triplicate.

2.2. Measurements of cut test

After fermentation and drying, 100 beans were randomly collected from each trial batch and submitted to the cut test. This test was performed using a longitudinal section to evaluate the quality of beans according to cotyledon staining and degree of fermentation. The results of the cut test were expressed as a percentage (BRASIL, 2008a). To classify almonds, Normative Instruction 38/2008 of MAPA (BRASIL, 2008b) was used to define the official cocoa bean standard, considering its identity and quality requirements, sampling, presentation, marking and labeling as aspects of the classification of the product.

2.3. Physical chemistry characterization

The moisture (Method 931.04), pH (Method 931.04), titratable total acidity (Method 942.15) were conducted according with the official methods of the AOAC (1995). The water activity was measured using a water activity meter to 25 ± 1 °C (AQUA LAB model CX2, DECAGON Devices) (GARCÍA-ALAMILLA et al., 2017).

2.4. Determination of fermentation index (FI)

In this procedure, 20 mg of ground and defatted cocoa bean was extracted with 10 mL of a methanol:HCl (97:3) solution. The homogenate was allowed to stand (8 °C) for 16-19 h and then filtered. Measurements were performed individually in a spectrophotometer UV-Vis (BEL PHOTONICS UV-M51) at wavelengths of 460 nm and 530 nm, and the sample fermentation index was obtained by calculating the ratio of absorbances.

2.5. Sample preparation

Methanolic extracts were obtained according to Oliveira et al. (2011). Two grams of cocoa beans was weighed and degreased with 6 mL of petroleum ether, vortexed (Phoemix, model AP-56) for 5 minutes and centrifuged (Mikro 220R, Lettich zenthifugen) at 6000 rpm for 15 min. The supernatant was discarded, and an additional 6 mL of petroleum ether was added, repeating the procedure five times. Ten milliliters of aqueous methanol (80%) was poured into tubes containing 100 mg of defatted sample, vortexed for 5 min and centrifuged for 25 min. After filtration with filter paper (Qualy 11,0 J.Prolab), the methanolic extracts were stored in a dark bottle at -6 °C.

2.6. Quantification of total polyphenol content (TPC)

Quantification of the phenolic compounds was performed using the Folin-Ciocalteu method described by Carrillo, Londoño-Londoño and Gil (2014), with some modifications. Briefly, 100 µL of the previously prepared extract, 2.5 mL of 10% Folin-Ciocalteu's reagent and 2 mL of 7.5% Na₂CO₃ were mixed. After 2 h, the absorbance of the blue color was measured on a UV-VIS spectrophotometer (BEL PHOTONICS UV-M51) at 760 nm against a blank sample. A calibration curve with epicatechin as a standard was produced (0.06-1.00 mg.mL⁻¹). The TPC was expressed as milligram equivalents of epicatechin per gram of sample (mg ECE.g⁻¹ sample).

2.7. Determination of monomeric phenols and methylxanthines by HPLC

The qualitative and quantitative determination of monomeric phenolic compounds (catechin, epicatechin and gallic acid) and methylxantines (caffeine and theobromine) was performed according to the method described by Maciel, Felício and Hirooka (2017), with some adaptations. Twenty microliters of each sample was analyzed using the HPLC system (Perkin Elmer Model Flexar coupled to a UV/VIS

detector) and a C-18 column (4.6 x 250 mm, 5 µm). The column was maintained at 30 °C for all analyses, and the wavelength used for detection was 280 nm, with the total running time of 24 minutes. For HPLC analysis, the compounds were identified by comparing the retention time to those of pure standards (Sigma-Aldrich). The mobile phase used was (A): water acidified with 0.05% phosphoric acid and (B): methanol: acetonitrile (2:4 v/v) in an isocratic ratio (86:14 v/v), with a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹.

2.8. Quantification of total flavonoids content (TFC)

Flavonoids were quantified according to Lee et al. (2003). Three hundred microliters of the phenolic extract was transferred to a 10-mL volumetric flask containing 4 mL of deionized water. Then, 0.3 mL of 5% sodium nitrite (NaNO₂) solution was added. After 5 min, 0.3 mL of 10% aluminum chloride (AlCl₃) solution was added. After 1 min, 2 mL of 1 M sodium hydroxide (NaOH) was added, and the flask was filled with distilled water. The absorbance was measured at 510 nm in the UV-VIS spectrophotometer (BEL PHOTONICS UV-M51), using white as reference. The TFC in each extract was measured using a standard curve prepared with epicatechin (0.06-1.20 mg.mL⁻¹), and the result was expressed as milligram equivalents of epicatechin per gram of sample (mg ECE.g⁻¹ sample).

2.9. Quantification of total anthocyanins content (TA)

The total anthocyanins were determined according to Fuleki and Francis (1968). Briefly, 0.1 g of sample was added to 4 mL of 95% methanol:1.5 N HCl (85:15, v/v) and manually stirred for 2 min before standing overnight at room temperature (30 °C) while protected from light exposure. The extracts were filtered through filter paper (Qualy 11.0 J.Prolab), and the residue was submitted to exhaustive extraction with the same methanolic solution until colorless. The filtered solution was transferred to a 10-mL volumetric flask and left to stand for 90 min at room temperature, protected from light exposure. The total anthocyanins were quantified by UV-VIS spectrophotometry (BEL PHOTONICS UV-M51) at 535 nm. To calculate the concentration, we use equation 1:

$$TA \text{ mg. } 100g^{-1} = \frac{A \times f \times d \times 100}{\epsilon} \quad (\text{Equation 1})$$

where: A = absorbance at 535 nm; fd = dilution factor; and ϵ = molar absorptivity at 535 nm (98.2).

2.10. Determination of Antioxidant Activity

2.10.1. DPPH

The antioxidant activity was evaluated using the free radical sequestration method with DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), as described by Vinson et al. (2006). A volume of 0.1 mL of the 2.5 mg.mL⁻¹ methanolic extracts was submitted to reaction with 4 mL of 0.004% (w/v) DPPH solution. After 20 minutes in the absence of light, absorbance readings at 517 nm were performed in a UV-Vis spectrophotometer (BEL PHOTONICS UV-M51). The ability to sequester free radicals was expressed as the percent inhibition of radical oxidation and calculated according to equation 2:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{ADPPH - A_{\text{Extr}}}{ADPPH} \times 100 \quad (\text{Equation 2})$$

where A_{DPPH} is the absorbance of the DPPH solution and A_{Extr} is the absorbance of the sample in solution. A_{Extr} was calculated based on the difference in the absorbance of the test sample solution and the blank. The antioxidant activity of each sample (IC_{50}) is defined as the final concentration (in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of the dry extract present in the cuvette that was required to decrease the initial DPPH concentration by 50%.

2.10.2. FRAP

The reduction power according to the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method was evaluated according to the methodology described by Pulido, Bravo and Saura-Calixo (2000), with some modifications. The FRAP assay was determined based on the reduction of Fe^{3+} -TPTZ to a blue Fe^{2+} -TPTZ complex. The FRAP reagent was prepared by mixing 300 mM of acetate buffer (pH 3.6), 10 mM of TPTZ in 40 mM of HCl and 20 mM of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in a ratio of 10:1:1. A total of 90 μL of methanolic extract and 270 μL of distilled water was then added to the test tubes. FRAP reagent (2,7 mL) was pipetted into the same test tubes and incubated at 37 °C for 30 min. Absorbance was read using a spectrophotometer (BEL PHOTONICS UV-M51) at 595 nm. In the FRAP assay, the antioxidant potential of the sample was determined

based on a standard curve ($0.50\text{-}2.50\text{ mM}\cdot\text{mL}^{-1}$), which was plotted using $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The results were expressed as $\mu\text{MFe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ samples.

2.10.3. CUPRAC

The determination of antioxidant activity by copper reduction in the methanolic extracts was performed according to Apak et al. (2008), with some modifications. To a test tube were added 1 mL of 10^{-2} M copper (II) chloride (CuCl_2) (aqueous solution), 1 mL of neocuproin (Nc) (methanolic solution) at a concentration of 7.5×10^{-3} M and 1 mL of ammonium acetate (NH_4Ac) 1 M at pH 7.0. This mixture was vortexed, and 100 μL of the phenolic extract and 1 mL of distilled water were added to yield a final volume of 4.1 mL. The tubes were capped, and after 30 min, the absorbance at 450 nm was recorded in a UV-Vis spectrophotometer (BEL PHOTONICS UV-M51). The analytical curve was prepared with epicatechin ($3.46\text{-}26.67\ \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$), and the result was expressed as μmol of epicatechin equivalent per g of sample ($\mu\text{MECE}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.11. Statistical analysis

The data are presented as the means \pm SD. The statistical significance of the differences between groups was evaluated by one-way ANOVA using Minitab® 17.3.1, using the Tukey test at 5% significance for means comparison. Pearson's correlation (r-value) was also performed using the same statistical program.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Cut test and fermentation index (FI) measurements

Fermentation is a key step in the processing of cocoa and is key in the development of aroma and flavor precursors that are characteristic of chocolate (BRILLOUET; HUE, 2017). Changes in the color of the beans, ranging from purple to brown, were reported during cocoa fermentation (EFRAIM et al., 2010; AFOAKWA et al., 2013; KONGOR et al., 2013; SULAIMAN, 2014; SULAIMAN; YANG, 2015). The cut test is a widely used visual method, due to its simplicity and low cost, to evaluate the quality of a random sample of cocoa beans through analysis of its color and compartmentalization and is frequently used as FI (MAMOT, 1989; MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003; AMOA-AWUA, 2015). On the other hand, several more accurate chemical methods are available. Among these, a quantitative fermentation

index has been proposed for cocoa beans. In this study, both techniques were used because unlike the fermentation index, the cut test has no pattern for over-fermented cocoa beans and is additionally a very subjective technique.

Table 1 shows the results of the cut test for the fermented and dried cocoa beans after the various evaluated fermentation periods.

Tabela 1- Color changes in cocoa beans with varying fermentation duration.

Percentage of bean color and defects	Fermentation time (h)												
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
Purple (%)	-	2	1	6	5	70	49	30	20	24	18	20	17
Purple/Brown (%)	1	1	4	6	15	28	34	49	54	49	52	38	29
Fully brown (%)	-	-	-	-	-	-	16	21	25	25	27	40	53
White (%)	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Slaty (%)	98	96	94	87	78	1	-	-	-	-	-	-	-
Broken (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	-
Flat (%)	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-
No. of cocoa beans in 100 g	77,8	79,3	78,6	78,6	76,5	75,9	78,3	81,0	80,6	80,7	80,5	81,3	81,4

According to the data, the greatest variation occurred after 48 h of fermentation, when the number of slaty beans decreased from 78% to 1% at 60 h. There was also an increase in the percentage of purple beans, from 5 to 70%, and of partially brown beans, from 15 to 28%, in this same period. Brown beans appeared only after 72 h of fermentation, reaching 53% in 144 h.

Similar data were found by Efraim et al. (2010), Afoakwa et al. (2012) and Kongor et al., (2013) by investigating the effect of fermentation time, the type of drying and the method of storage before fermentation.

Slaty beans are common; this classification is used for beans with more than 50% of the cotyledon with a gray color, rubbery texture and cut resistance. This characteristic is reported as a product of drying grains that were not submitted to fermentation. On the other hand, brown beans are beans that have undergone a complete fermentation process before being dried (FOWLER, 2009).

According to Resolution No. 161 of the National Council of Foreign Trade (CONCEX, 1988), cocoa beans are considered to be well fermented when they present brown-colored cotyledons, partially fermented when they present a mixed brown to violet color, and unfermented when they present violet to purple staining for a large part of their length. In addition to coloration, what differentiates well-fermented beans from unfermented beans is the number of furrows present in their cotyledons. More furrows indicate more fermented beans.

Partially brown beans are not defective, as they change to brown upon storage (TAKRAMA; ACULEY; ANEANI, 2006), and the trade accepts up to 30%-40%; however, samples containing over 50% partially brown beans are unacceptable (WOOD; LASS, 2001). Based on the results of Table 1, the beans were adequately fermented after 120 h of fermentation, when the percentage of partially brown beans was below 50%.

In all evaluated periods, the absence of moldy, insect-attacked or germinated beans was observed. The amount of flat, broken and white beans was less than 2%, and the number of beans in 100 g was less than 110. Therefore, according to the cut test, from 60 h of fermentation, the beans were classified as Type I, with superior quality (BRASIL, 2008b).

Table 2 shows the mean of IF data for varying hours of fermentation. The results of the spectral measurements of the color fraction showed that the increase in fermentation time led to drastic decreases in absorbance, falling from 1.240 to 0.417 in 6 days, when reading at 530 nm. These high initial values can be attributed to the presence of high amounts of anthocyanin pigments in unfermented beans. On the other hand, the absorbance at 460 nm showed marginal decreases of 0.488 to 0.441. These resulted in an increased fermentation index of the grains from 0.394 to 1.058 at 0 to 144 h of fermentation. It can be observed that there is significant difference between the data up to 48 h of fermentation.

Tabela 2- Effect of fermentation time on color fraction absorbance value and fermentation index of cocoa beans.

Fermentation time (h)	Color fraction absorbance values		Fermentation Index (Fraction II/Fraction I)
	Fraction I (530 nm)	Fraction II (460 nm)	
0	1.240	0.488	0.394 ^a
12	1.201	0.478	0.398 ^a
24	1.139	0.530	0.467 ^{ab}
36	1.029	0.495	0.481 ^b
48	0.626	0.330	0.526 ^b
60	0.433	0.274	0.633 ^c
72	0.354	0.308	0.870 ^d
84	0.275	0.259	0.941 ^d
96	0.293	0.336	1.157 ^e
108	0.327	0.366	1.120 ^{ef}
120	0.375	0.413	1.100 ^{ef}
132	0.271	0.301	1.109 ^{ef}
144	0.417	0.441	1.058 ^f

*Means with the same letter in the c columns are not significantly different by ANOVA with the Tukey test (p <0.05).

A similar finding was reported by Afoakwa et al. (2012), who observed rapid changes in FI during the first 4 days of fermentation and an increase from 0.774 to 1.050 on the sixth day, likely because the condensation product became less soluble with increasing fermentation. Sulaiman (2014) and Romero-Cortes et al. (2013) reported mean FI values above 1.000 from 72 h of fermentation.

According to Sulaiman (2006), for fermentation indices less than 1.000, cocoa beans are considered under-fermented, values between 1.000-1.599 correspond to completely fermented beans and values over 1.600 correspond to over-fermented beans.

Anthocyanins are reported as the phenolic compounds responsible for the characteristic purple color of unfermented cocoa beans (ZIEGLER, 2009). Chemically, the disappearance of purple color can be explained by anthocyanin hydrolysis, which occurs mainly between the first and third days of fermentation (BRITO, 2000; CROSS; VILLENEUVE; VINCENT, 1982; AFOAKWA et al., 2012b; MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003). The brown color results from the oxidation of cyanidins, other free phenols, and protein-phenolic complexes (KONGOR et al., 2013; MISNAWI, 2008; NAZARUDDIN et al., 2006). Thus, anthocyanin content is considered a good index for determining the degree of fermentation of cocoa beans (PETTIPHER, 1986; SHAHIDI; NACZK, 1995).

Thus, using only the FI parameter as a reference, fermented cocoa beans up to 84 h are still considered unfermented due to their high anthocyanin content. These pigments impart a red-to-purple color, with a maximum absorbance at 500-550 nm under acid conditions.

According to Efraim et al. (2010), the low productivity and high demand for fermented and dried almonds in the processing industries have led to the reduction in fermentation time from 6-7 days to 2-3 days, causing a decrease in the quality of cocoa products as well as technological problems for processing in these industries.

3.2. Physicochemical changes of cocoa beans during fermentation

Table 3 presents the physical chemistry analysis (temperature, moisture, pH, titratable acidity and water activity (A_w)) of dried and ground beans for fermentation times studied.

Tabela 4- Physical chemistry characterization of cocoa beans.

Fermentation time (h)	Parameters				
	Temperature (°C)	pH	Titrateable Acidity ¹	Moisture ²	Aw
0	27.4 ± 0.00	6.64 ± 0.03 ^a	5.57 ± 0.26 ^d	5.42 ± 0.14 ^c	0.394 ± 0.01 ^{abcd}
12	30.0 ± 0.13	6.61 ± 0.02 ^{ab}	5.65 ± 0.82 ^d	6.11 ± 0.08 ^{abc}	0.429 ± 0.01 ^{ab}
24	32.0 ± 0.12	6.56 ± 0.02 ^b	6.84 ± 0.52 ^d	6.04 ± 0.12 ^{abc}	0.402 ± 0.02 ^{abcd}
36	31.4 ± 0.06	6.44 ± 0.01 ^c	6.65 ± 0.41 ^d	5.72 ± 0.29 ^{bc}	0.373 ± 0.03 ^{bcd}
48	32.2 ± 0.42	6.16 ± 0.02 ^d	8.48 ± 1.11 ^{cd}	5.54 ± 0.20 ^{bc}	0.356 ± 0.02 ^{cd}
60	34.6 ± 1.75	5.60 ± 0.00 ^e	12.83 ± 0.91 ^c	5.64 ± 0.27 ^{bc}	0.343 ± 0.03 ^d
72	46.6 ± 0.63	4.98 ± 0.01 ^f	23.23 ± 1.22 ^b	6.81 ± 0.37 ^a	0.441 ± 0.02 ^{ab}
84	42.5 ± 0.48	4.83 ± 0.01 ^g	26.59 ± 2.29 ^{ab}	6.31 ± 0.06 ^{ab}	0.442 ± 0.02 ^{ab}
96	45.1 ± 0.41	4.75 ± 0.01 ^h	30.11 ± 1.32 ^a	6.71 ± 0.17 ^a	0.449 ± 0.01 ^a
108	42.2 ± 0.27	4.70 ± 0.00 ^{hi}	30.71 ± 0.86 ^a	6.11 ± 0.05 ^{abc}	0.381 ± 0.00 ^{abcd}
120	42.7 ± 0.74	4.67 ± 0.01 ⁱ	30.73 ± 0.42 ^a	6.29 ± 0.06 ^{ab}	0.423 ± 0.01 ^{abc}
132	44.2 ± 0.95	4.68 ± 0.01 ⁱ	26.53 ± 2.18 ^{ab}	5.56 ± 0.40 ^{bc}	0.432 ± 0.01 ^{ab}
144	44.7 ± 1.18	4.72 ± 0.01 ^{hi}	26.52 ± 2.52 ^{ab}	5.82 ± 0.16 ^{bc}	0.443 ± 0.01 ^{ab}

*Means with the same letter in the c columns are not significantly different by ANOVA with the Tukey test (p <0.05).

¹(mEqNaOH.100g⁻¹); ² %

The initial fermentation temperature was 27.4 °C, reaching a maximum of 46.6 °C after 72 h, and accompanied by a reduction to 44.78 °C at the end of 144 h. According to Quesnel and Lopez (1975), during the fermentation, cocoa biomass should reach 45 to 50 °C in approximately 3 days after the beginning of fermentation. The constant increase in temperature may be associated with the release of heat throughout the process, due to the conversion of the available fermentable substrate (sugar) into the desired by-products of the metabolite (SCHWAN; WHEALS, 2004)

The reduction in the temperature of the cocoa mass indicates the end point of the fermentation process and the start of drying. This is one of the most important moments of the fermentation, since from there, the cocoa can undergo excess fermentation that generates products with an unpleasant aroma and flavor (FERREIRA et al., 2013).

In good commercial fermentations, the temperature of the seed mass should reach 45 to 48 °C in approximately 72 h, similar to that measured in this study. This time can vary according to the volume of the fermenting mass, the microbial flora present and even the climatic conditions (ZAMALLOA, 1994).

In this study, the pH of fresh cocoa fell from an initial value of 6.64 to 4.72 at the end of the fermentation. A similar trend was reported by other researchers (SULAIMAN, 2014, KRÄHMER et al., 2015). Based on these observations, the final pH was slightly low. Unlike pH, the titrateable acidity is a more appropriate indicator to measure the level of total acidity in any fermentation process, and generally both parameters are negatively correlated (GANESWARI et al., 2015). The acidity of the

cocoa beans increased from 5.57 mEqNaOH.100 g⁻¹ at the beginning of fermentation to 26.52 mEqNaOH.100 g⁻¹ after 144 h. According to Lopez (1983) and Krähmer et al. (2015), the acidity of cocoa is not inherent in the seeds but is acquired during fermentation. During the first stage, acidity and pH are constant and temperatures are below 40 °C. In the second phase of fermentation, the transformation of ethanol into organic acids (acetic and lactic acid) occurs through the action of microorganisms (CAMU et al., 2007; BIEHL et al., 1985; MISNAWI; JAMILAH; NAZAMID, 2003; CAMU et al., 2008). In addition, an increase in titratable acidity and a consequent decrease in pH after 48 h of fermentation can be observed.

The final pH of cocoa beans after fermentation is very important, since the type of product from the enzymatic proteolysis of proteins changes with pH. These proteolysis products are cocoa aroma, chocolate aroma, and taste precursors (KRATZER et al., 2009). According to Armijos (2002) and Amin et al. (2002), a high flavor potential and good quality of cocoa can be correlated with moderate acidification (pH 5.5-5.0) during fermentation. Calderón (2002) stated that any pH below 5.0 may indicate the presence of undesirable volatile acids affecting the aroma and taste of cocoa.

The moisture of the analyzed beans ranged from 5.42% to 5.82%. These values were close to those found by Padilla, Liendo and Quintana (2000), whose values ranged from 5.68% to 7.17%, and were higher than the results reported by Afoakwa et al. (2013), where the moisture content was 3.8-4.5%. In a study by Efraim et al. (2010), the moisture decreased from 6.38 to 6.29% from the third day of fermentation and showed no significant difference. The moisture values found for all the fermentation periods were close to the allowed range (between 6 and 8%), thus avoiding mold formation and insect attack (BRASIL, 2008b).

The values found in the analysis of water activity for fermented and dried beans varied between samples, from 0.394 to 0.443, throughout the evaluated period. Efraim (2009) emphasizes that water activity should be less than 0.7 to maintain the quality of the beans and avoid the growth of fungi-producing toxins.

Thus, from 48 h of fermentation, the environmental conditions (temperature, pH and acidity) become extremely unfavorable to the seed embryo, which dies and loses its germination capacity, becoming a bean. These factors also lead to cellular decomposition, causing the loss of bioactive compounds of interest, and the formation of aroma precursors (EFRAIM, 2004).

3.3. Profile of bioactive compounds during fermentation

The total contents of phenol (TPC), flavonoids (TFC) and anthocyanins (TA) in defatted cocoa extracts are presented in Table 4.

Tabela 4- Profile of bioactive compounds during fermentation.

Fermentation time (h)	TPC (mgECE.g ⁻¹)	TFC (mgECE.g ⁻¹)	TA (mg.100 g ⁻¹)
0	395.15 ± 0.89 ^a	116.99 ± 8.80 ^a	352.81 ± 7.36 ^a
12	270.06 ± 38.54 ^b	97.99 ± 14.21 ^{abc}	307.93 ± 2.06 ^{ab}
24	398.00 ± 8.74 ^a	108.54 ± 7.49 ^{ab}	275.36 ± 31.11 ^b
36	373.02 ± 12.67 ^a	87.67 ± 8.63 ^{bc}	325.57 ± 10.66 ^a
48	260.06 ± 15.35 ^{bc}	80.04 ± 2.61 ^{cd}	207.54 ± 20.93 ^c
60	208.85 ± 8.39 ^{bcd}	58.64 ± 6.59 ^{de}	110.29 ± 2.49 ^d
72	190.83 ± 8.57 ^{cde}	38.95 ± 5.98 ^{ef}	94.50 ± 14.36 ^d
84	209.92 ± 4.82 ^{bcd}	50.54 ± 1.75 ^{ef}	88.98 ± 4.66 ^d
96	136.22 ± 0.71 ^e	43.78 ± 4.78 ^{ef}	71.94 ± 2.13 ^d
108	254.89 ± 13.38 ^{bcd}	47.86 ± 4.18 ^{ef}	80.88 ± 3.92 ^d
120	178.87 ± 3.03 ^{de}	46.19 ± 2.11 ^{ef}	76.60 ± 3.31 ^d
132	135.33 ± 8.74 ^e	30.59 ± 3.01 ^f	65.40 ± 2.01 ^d
144	154.96 ± 3.03 ^e	42.34 ± 6.04 ^{ef}	70.86 ± 4.56 ^d

*Means with the same letter in the c columns are not significantly different by ANOVA with the Tukey test (p < 0.05).

The content of total phenolic compounds in fresh cocoa beans is comparatively higher than in fermented beans, due to degradation during fermentation. Thus, the average total content ranged from 395.15 to 154.96 mgECE.g⁻¹ for unfermented seeds and after 144 h of fermentation, respectively, representing a reduction of 60%. However, after up to 48 h of fermentation, the reduction was only 34%. This observation agrees with previous reports by Dare, Onwumelu and Oyedapo (2013), for aqueous extracts of unfermented *T. cacao* seeds, where the values presented were also high (382.61 mgTAE.g⁻¹). Afoakwa et al. (2012a) and Onomo et al. (2015) studied fermented cocoa beans for the same period of time and found a mean concentration of these substances of 140.34 mgCE.g⁻¹ and 142.51 mgGAE.g⁻¹, respectively.

In contrast, in a study by Bustamente, Tenorio and Rojano (2013) evaluating the effect of fermentation on the antioxidant activity of different clones of Colombian cocoa, the total phenol content varied from 30.16 mgGAE.g⁻¹ in unfermented beans to 36.40 mgGAE.g⁻¹ in fermented beans. This result was much lower than that found in this study. Similarly, Brito et al. (2017) found lower concentrations of total phenolics, ranging from 77.31 mgCE.g⁻¹ (unfermented) to 53.03 mgCE.g⁻¹ (fermented). Menon et al. (2017), in a study with unfermented beans, also reported values lower than those found in the study (94.4 to 126.3 mgGAE.g⁻¹).

According to Azizah, Ruslawati and Tee (1999) and Wollgast and Anklam (2000), this dissimilarity among the obtained results can be explained by the difference in the solvent extractors and the standards used in the quantification. In addition, it is known that TPC can vary according to the variety of cocoa beans, geographic origin, degree of maturity (harvest season) and post-harvest conditions, such as fermentation, drying, roasting, processing and storage.

On the other hand, the subsequent increase observed after 108 h of fermentation may reflect the polymerization of high molecular weight insoluble compounds (tannins) and their interaction with proteins (MISNAWI, 2008).

Flavonoids in cocoa are mainly flavan-3-ols, which occur both as monomers of epicatechin and catechin and as polymerized flavanols or procyanidins (PORTER; MA; CHEN, 1991; HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; PAYNE et al., 2010) with appreciable amounts of anthocyanins (especially cyanidin glycosides) and flavonols (HERTOG; FESKENS; HOLLMAN, 1993; KELI; HERTOG; FESKENS, 1996).

The total flavonoids in our samples of unfermented cocoa beans were higher than the fermented beans, from 116.99 to 42.34 mgECE.g⁻¹. Similar to that observed for phenolic compounds, the flavonoid content fell by up to 31% after 48 h of fermentation, reaching 64% at the end of the same period.

Similar results were reported by Onomo et al. (2015) in a study with beans derived from four cocoa clones and their offspring, with values between 60 and 165 mgGAE.g⁻¹. In a study by Genovese and Lannes (2009) using different extracts for the analysis of flavonoids in cocoa powder, much lower values were reported, ranging from 0.90 to 1.20 mgRE.g⁻¹.

In our study, the content of anthocyanins decreased by 41% after 48 h and 80% after 144 h (Table 4). The major anthocyanins in cacao beans are cyanidin-3- α -L-arabinoside and cyanidin-3- β -D-galactoside, and their reduction can be explained by the fact that during fermentation, these compounds are hydrolyzed to anthocyanidins by glycosidases, resulting in the brightening of cotyledons (ORACZ; NEBESNY; ZYZELEWICZ, 2015a).

Brito et al. (2017) reported a similar reduction for anthocyanins, with results varying from 301 mg.100g⁻¹ for fresh cocoa beans to 63 mg.100g⁻¹ after 7 days of fermentation. Niemenak et al. (2006) identified variations in the content of the majority anthocyanins in the cocoa bean from 46.6 to 455.2 mg.100g⁻¹ (cyanidin-3- α -L-

arabinoside) and from 29.4 to 281.7 mg.100 g⁻¹ (cyanidin-3-β-D-galactoside) in freshly harvested seeds of different cocoa pods from different clones.

According to Pettipher (1986) and Shahidi and Naczk (1995), anthocyanins generally disappear rapidly after 4 days of fermentation (loss of 93%), which provides a good index for determining the degree of fermentation of cocoa beans.

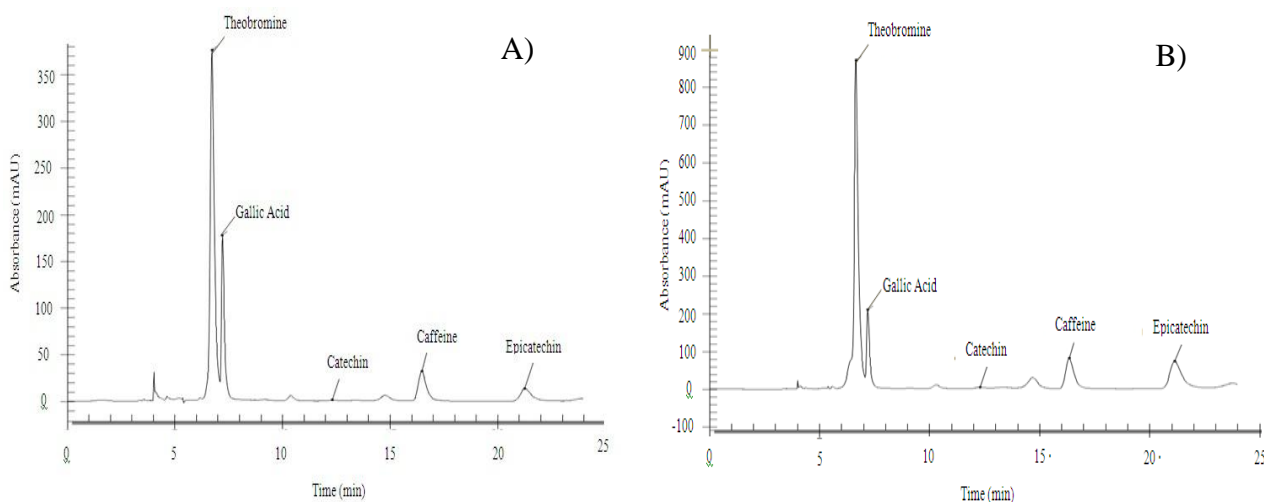
Based on the classification of unfermented beans using the cut test (time less than 132 h) and the FI (time less than 96 h), the highest content of phenolic compounds was at 48 h fermentation, with a great reduction after this period. Considering temperature, pH and acidity, the second day of fermentation is when the major transformations in the beans begin to occur, leading to the formation of aroma and flavor precursors.

3.4. Determination of monomeric phenols and methylxanthines by HPLC

In this study, two flavan-3-ols, a phenolic acid and two methylxanthines were identified by their retention times, HPLC-UV (280 nm) spectra and chromatographic comparisons to primary patterns, using methanol, acetonitrile and phosphoric acid diluted as solvents.

There are clear differences in the chromatograms of the unfermented (A) and fermented (B) cotyledon samples (Figure 1), with the unfermented sample having a richer profile.

Figure 1- Representative chromatograms of unfermented (A) and fermented (B) cocoa samples at $\lambda = 280$ nm (mAU: Absorption Units).



All values, except for that of gallic acid, diminished following the fermentation of cotyledon samples (Table 5). The reduction of these compounds in the cotyledon following fermentation has been reported previously (BUSTAMANTE; TENORIO; ROJANO, 2013; CRUZ et al., 2015, KRÄHMER et al., 2015) and directly depends on reaction time (BRUNETTO et al., 2007).

Tabela 5- Contents of monomeric phenols [(-)-epicatechin, (+)-catechin and gallic acid] and methylxanthines (caffeine and theobromine) in cocoa bean extracts determined by HPLC analysis.

Fermentation time (h)	Phenolic Compound			Methylxanthines	
	(-)-Epicatechin (mg.g ⁻¹)	(+)-Catechin (mg.g ⁻¹)	Gallic acid (mg.g ⁻¹)	Caffeine (mg.g ⁻¹)	Theobromine (mg.g ⁻¹)
0	41.73 ± 3.40 ^a	4.11 ± 0.49 ^a	24.57 ± 1.87 ^{ab}	15.63 ± 2.39 ^a	17.29 ± 0.33 ^a
12	30.35 ± 0.85 ^b	2.94 ± 0.38 ^{ab}	31.04 ± 0.73 ^a	8.51 ± 0.35 ^{bc}	14.82 ± 0.62 ^{ab}
24	30.14 ± 1.70 ^b	3.98 ± 0.70 ^a	23.15 ± 1.80 ^{ab}	11.13 ± 1.12 ^{ab}	16.98 ± 0.46 ^a
36	19.98 ± 3.80 ^{cd}	2.21 ± 0.22 ^{bc}	19.06 ± 3.74 ^b	8.19 ± 1.64 ^{bc}	12.34 ± 1.80 ^{abc}
48	22.09 ± 0.27 ^{bc}	2.25 ± 0.06 ^{bc}	25.72 ± 1.22 ^{ab}	10.14 ± 0.60 ^{abc}	14.69 ± 0.67 ^{abc}
60	6.99 ± 2.21 ^{de}	1.41 ± 0.21 ^{bc}	26.95 ± 3.12 ^{ab}	7.13 ± 0.73 ^{bc}	12.23 ± 1.05 ^{abc}
72	8.92 ± 1.68 ^e	1.38 ± 0.21 ^{bc}	30.24 ± 0.77 ^{ab}	6.46 ± 1.25 ^{bc}	10.89 ± 0.85 ^{bc}
84	4.56 ± 1.41 ^e	0.78 ± 0.05 ^c	25.79 ± 2.07 ^{ab}	4.66 ± 0.66 ^c	8.89 ± 1.56 ^c
96	6.94 ± 1.46 ^e	1.05 ± 0.12 ^c	24.08 ± 1.68 ^{ab}	6.04 ± 0.93 ^{bc}	10.88 ± 1.65 ^{bc}
108	7.70 ± 1.09 ^e	1.20 ± 0.12 ^c	24.77 ± 3.41 ^{ab}	9.05 ± 0.23 ^{bc}	13.54 ± 0.91 ^{abc}
120	7.46 ± 1.33 ^e	0.99 ± 0.05 ^c	27.06 ± 0.09 ^{ab}	5.83 ± 0.54 ^{bc}	11.93 ± 1.09 ^{abc}
132	5.43 ± 0.49 ^e	0.89 ± 0.29 ^c	27.79 ± 2.01 ^{ab}	5.84 ± 0.63 ^{bc}	9.89 ± 0.73 ^{bc}
144	6.71 ± 0.10 ^e	1.36 ± 0.07 ^{bc}	29.25 ± 0.51 ^{ab}	5.88 ± 0.53 ^{bc}	9.79 ± 0.22 ^{bc}

*Means with the same letter in the columns are not significantly different by ANOVA with the Tukey test (p <0.05).

Among the phenolic compounds, catechin had the lowest content (from 4.11 to 1.36 mg.g⁻¹), representing a reduction of 66% after 144 h of fermentation. Epicatechin showed high concentrations at the beginning of fermentation (41.73 mg.g⁻¹), with a reduction of 47% in the first 48 h and 84% by the end of the fermentation. Gallic acid content was high throughout fermentation (from 24.57 to 29.25 mg.g⁻¹), with no significant differences between the times (p <0.05).

Niemenak et al. (2006) determined the content of monomeric phenols in freshly harvested seeds of various clones and found higher catechin indexes (1.25-14.42 mg.g⁻¹) and epicatechin (14.43-43.90 mg.g⁻¹), in line with our results. However, using samples of fermented beans, Onomo et al. (2015) reported higher epicatechin content (29.80 mg.g⁻¹ on average) and lower catechin content (mean of 0.31 mg.g⁻¹) relative to our results.

Camu et al. (2008) and Hernández-Hernández et al. (2018) showed that the fermentation had a different influence on the epicatechin and catechin contents of the

beans. Both had a reduction in the epicatechin concentration above 70% of the initial value. On the other hand, catechin concentrations did not change during fermentation.

For gallic acid, Leite et al. (2013) reported considerably lower values compounds (0.12 to 0.13 mg.g^{-1}) in the cocoa mass of different cultivars, which were resistant and not resistant to "witch's broom disease". Similarly, Cruz et al. (2015) evaluated the content of phenolic compounds at various fermentation times and reported average values for gallic acid of 0.12 mg.g^{-1} in fresh beans at 0.09 mg.g^{-1} after 120 h of fermentation. This acid is the basic constituent of the hydrolysable tannins and is responsible for the astringent sensation in the mouth (LEITE et al., 2013).

Like phenolic compounds, the content of methylxanthines is reduced during fermentation. Theobromine concentration decreased from 17.29 mg.g^{-1} in fresh seeds to 9.79 mg.g^{-1} after 144 h of fermentation. Some studies highlight theobromine as the predominant compound in the extracts (BELŠČAK et al., 2009; CARRILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2014; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018).

Similar results were described by Batista et al. (2016) and Hernández-Hernández et al. (2018) for the theobromine content in fermented and unfermented cocoa samples, corroborating the present work.

In much of the research conducted, the caffeine content was much lower than that presented in this study ($<3.5 \text{ mg.g}^{-1}$ on average) (BELŠČAK et al., 2009; CARRILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2014; CRUZ et al., 2015; BATISTA et al., 2016). According to Aneja and Gianfagna (2001), the highest content of methylxanthines and phenolic compounds may be related to the biochemical mechanisms of plant tissue defense. In addition, some authors have also reported the differences between different cacao genotypes and methylxanthine content (FIGUEIRA et al., 1997).

Those compounds promote various sensory characteristics to the chocolates. The monomeric phenolic is responsible for the bitter taste and the polymeric forms for astringency (AFOAKWA et al., 2008). In addition, the health aspects of these compounds should be considered, since the monomeric form is readily absorbed and used by the human body as an exogenous antioxidants (RICHELLE et al., 1999; HOLT; LAZARUS; SULLARDS, 2002).

From a technological point of view, the methylxanthines and polyphenols are responsible for the bitterness and astringency of the chocolate (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011). From a health standpoint, caffeine is well known for its action on the

central nervous system, promoting a stimulating effect, increasing the sense of alarm, vitality, psychomotor reactions and increased blood pressure. However, theobromine has no stimulant effect because its action on the central nervous system is very weak or almost nonexistent, but it may act as a vasodilator, a muscle relaxant, diuretic and blood pressure reducer (VAN DEN BOGAARD et al., 2010; MITCHELL et al., 2011).

As in the total phenolic compounds content, the content of monomeric polyphenols and methylxanthines presents a reduction pattern after 48 h of fermentation, and thus, this period is most suitable for use in the elaboration of chocolates with functional characteristics.

3.5. Determination of Antioxidant Activity

The antioxidant activity against the DPPH radical was determined by IC_{50} , which is defined as the amount of antioxidant needed to decrease the initial concentration of the DPPH radical by 50% (Table 6). A lower IC_{50} value indicates the strongest ability of extracts to act as DPPH scavengers (OTHMAN et al., 2007).

Tabela 6- Antioxidant capacity of cocoa product extracts determined by DPPH, FRAP and CUPRAC assays.

Fermentation time (h)	Antioxidant Activity		
	DPPH (IC_{50})	FRAP ($\mu MFe^{2+} \cdot 100 g^{-1}$)	CUPRAC ($mgECE.g^{-1}$)
0	13.30 ± 0.06 ^e	329.71 ± 36.56 ^{abc}	38.84 ± 30.29 ^a
12	13.80 ± 0.47 ^{de}	354.32 ± 23.89 ^{ab}	31.95 ± 2.23 ^b
24	13.47 ± 0.05 ^c	389.04 ± 15.90 ^a	40.04 ± 2.02 ^a
36	13.83 ± 0.31 ^{de}	333.71 ± 46.33 ^{abcd}	30.25 ± 3.13 ^{bc}
48	14.32 ± 0.05 ^{de}	255.71 ± 9.75 ^{bcdef}	28.30 ± 0.99 ^{bc}
60	17.96 ± 2.01 ^{cde}	177.08 ± 7.12 ^{efg}	23.51 ± 2.40 ^{cd}
72	20.30 ± 2.23 ^c	263.88 ± 1.08 ^{bcdef}	18.54 ± 0.06 ^{de}
84	22.22 ± 0.22 ^c	280.33 ± 6.79 ^{bcde}	17.33 ± 1.14 ^{de}
96	21.16 ± 1.35 ^c	257.85 ± 26.03 ^{cde}	18.70 ± 1.79 ^{de}
108	19.38 ± 2.24 ^{cd}	281.57 ± 33.80 ^{bcde}	18.82 ± 1.26 ^{de}
120	21.11 ± 1.60 ^c	219.42 ± 1.96 ^{defg}	18.10 ± 1.14 ^{de}
132	28.81 ± 2.87 ^b	163.71 ± 20.24 ^{fg}	9.71 ± 0.92 ^f
144	43.02 ± 2.28 ^a	141.46 ± 18.97 ^g	14.32 ± 0.92 ^{ef}

*Means with the same letter in the columns are not significantly different by ANOVA with the Tukey test ($p < 0,05$).

The IC_{50} for the cocoa extracts increased from 13.30 to 43.02 $\mu g.mL^{-1}$ until the end of the fermentation. However, there was no significant difference ($p < 0.05$) between the initial values for up to 48 h of fermentation.

In a study with 26 cacao genotypes, Hernández-Hernández et al. (2018) verified that the genotypes previously identified as having the highest concentrations of

theobromine, epicatechin, and catechin had some of the lowest IC₅₀ values, and consequently, the antioxidant activities were higher.

The high contents of flavonoids and phenolics in the extracts may be responsible for their high antioxidant activities as excellent hydrogen donors (SKERGET et al., 2005; TALUKDAR, 2013). This reduction along with the fermentation can be explained by the reduction of the flavan-3-ol content and possibly by the complexation of procyanidins with proteins.

According to Oliveira et al. (2011), there appears to be significant relationship between the antioxidant activity of cocoa extracts and the total concentration of phenolic compounds, since extracts with higher concentrations of monomeric phenols also have higher antioxidant activity.

A low correlation coefficient was found between TPC and DPPH in the methanolic extracts ($r = -0.680$), indicating that only small amounts of phenolic antioxidants in cocoa products are responsible for the activity through the elimination of free DPPH radicals. This result is in full agreement with those reported by Arlorio et al., (2005), Othman et al., (2007) and Belščak et al. (2009), suggesting that the high elimination capacity of cocoa extract can be attributed to other methanol-soluble compounds.

The data presented in Table 6 show a reduction in the FRAP value of 329.71 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ in fresh seeds to 141.46 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ in fermented beans. Unlike the DPPH assay, the FRAP assay showed a moderate correlation coefficient with the total polyphenol content ($r = 0.809$), and flavonoids ($r = 0.779$), catechin ($r = 0.708$) and epicatechin ($r = 0.711$). A similar result was reported by Othman et al. (2010) in the ethanolic extracts of fermented cocoa beans, ranging from 77.47 to 143.37 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, showing a positive and moderate correlation based on the FRAP assay between antioxidant potential and epicatechin content. In the same way, Belščak et al. (2009) demonstrated a good correlation between total phenolics and antioxidant capacity in various cocoa products.

The values obtained for the Cuprac assay varied from 38.84 to 14.32 mgECE.g⁻¹ of the sample. No studies were found in the literature evaluating the antioxidant activity of cocoa beans using this method. This method should be advantageous over the FRAP and DPPH assays because, in addition to the faster kinetics of copper (II) redox chemistry as opposed to ferric ion, it also has a higher

sensitivity for measuring both hydrophilic and lipophilic antioxidants (APAK et al., 2004; APAK et al., 2008).

The Cuprac assay had the highest correlation coefficient based on total phenolics ($r = 0.914$), flavonoids ($r = 0.977$), and monomeric phenols ($r = 0.932$ (epicatechin) and $r = 0.936$ (catechin)). According to Apak et al. (2008), higher pH is correlated with a greater dissociation tendency of acids and phenols, with an increase in negative charge and facilitation of electron output (oxidation), evidencing the antioxidant characteristics. In this case, it is possible to emphasize that until 48 h of fermentation, there is a greater antioxidant activity in the cacao seeds.

There is currently no single, widely accepted test method that is applicable to a reasonable variety of food compounds and matrices. As a result, several food products cannot be classified with respect to their antioxidant activity index (AAI). In addition, due to differences in extraction and analysis methodologies, it is difficult to compare these antioxidant capacity values to those cited by workers (APAK et al., 2004; JONFIA-ESSIEN, 2008)

4. CONCLUSION

From a technological point of view, the reduction in bioactive compounds has a positive impact on the sensorial characteristics of the chocolates, especially in terms of aroma, astringency and bitterness. However, for health aspects, this reduction is not an objective, since phenolic compounds and methylxanthines play an important role in the prevention of some degenerative diseases through their high antioxidant activity in biological systems.

In the study, it was verified that from 48 h of fermentation, the increases in temperature and acidity of the cocoa mass become unfavorable to the seed, causing the death of the embryo, which loses the capacity to germinate and, consequently, leading to cell decomposition and the formation of aromatic precursors. This decomposition causes the phenolic compounds to come in contact with the enzymes present in the medium and to be oxidized. As fermentation further progresses, there is a significant reduction in these compounds, mainly epicatechin. It was also observed that up to 48 h, there was high antioxidant activity due to the lower acidity found.

In addition, the fermentation index showed that there was a difference between the samples during the fermentation, even at the initial times (0 to 48 h), when the concentration of the slaty beans was still high.

Thus, due to the high concentration of bioactive compounds and antioxidant activity and lower content of slaty beans, when compared to previous periods, the time of 48 h this would be the most adequate time to interrupt fermentation and use beans in the mixture to obtain raw material for the production of functional chocolates.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Capes (Coordination and Improvement of Higher Level or Education Personnel) for the scholarship and the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for financial support.

REFERENCES

- AFOAKWA, E. O.; OFOSU-ANSAH, E.; BUDO, A. S.; MENSAH-BROWN, H.; TAKRAMA, J. F. Roasting effects on phenolic content and free radical scavenging activities of pulp pre-conditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 15, p. 9635-50, 2015.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavour formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 9, p. 840-57, 2008.
- AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; BUDU, A. S.; TAKRAMA, J.; SAALIA, F. K. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 3, p. 1071-7, 2012a.
- AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; BUDU, A. S.; TAKRAMA, J.; SAALIA, F. K. Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 127-33, 2012b.
- AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; TAKRAMA, J.; BUDU, A. S.; SAALIA, F.K. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. **Journal Food Science and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1097-105. 2013.
- AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; HARIKRISNA, K.; BIEHL, B. Analysis of vicilin (7S)-class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 7, p. 728-32, 2002.
- AMOA-AWUA, W. Methods of cocoa fermentation and drying. In: Schwand, R. F.; Fleet, G. H. **Cocoa and Coffee Fermentations**, 1 ed. CRC Press - Taylor & Francis Group: New York. 2015. p. 71-116.
- ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. Induction and accumulation of caffeine in young actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao*, L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicios*a. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 1), p. 13-6, 2001.
- AOAC. **Official Methods of Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 4, p. 413-19, 2008.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion

reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7970-81, 2004.

APROTOSOAIÉ, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products - An overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 73-91, 2016.

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, Issues 1-2, p. 87-99, 2003.

ARLORIO, M.; COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; VARSALDI, F.; MIGLIO, G.; LOMBARDI, G.; MARTELLI, A. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. **Food Research International**, v. 38, p. 1009-14, 2005.

ARMIJOS, A. **Características de la acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación**. 2002. 103 f. Graduación (Licenciatura en Química) - Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, 2002.

AZIZAH, A. H.; RUSLAWATI, N. M. N.; TEE, T. S. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chemistry**, v. 64: 199-202, 1999.

BATISTA, N. N.; ANDRADE, D. P.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v. 90, p. 313-9, 2016.

BELSCAK, A.; KOMES, D.; HORZIC, D.; GANIC, K. K.; KARLOVIC, D. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 707-16, 2009.

BIEHL, B. Cocoa fermentation and problem of acidity, overfermentation and low flavour. In: **Proceedings of the International Conference on Cocoa and Coconut**, Kuala Lumpur, Malaysia: The Incorporated Society of Planters, p. 167-71, 1984.

BIEHL, B.; BRUNNER, E.; PASSERN, D.; QUESNEL, V. C.; ADOMAKO, D. Acidification, proteolysis and flavor potential in fermenting cocoa beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, n. 7, p. 583-98. 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 57, de 12 de nov. de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 38 de 23 de junho de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. **Diário Oficial da União**, 2008b.

BRILLOUET, J-M.; HUE, C. Fate of proanthocyanidins and anthocyanins along fermentation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 90, p. 141-6, 2017.

BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. DA S.; GLORIA, M. B. A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation, **Food Chemistry**, v. 228, n. 1, p. 484-90, 2017.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BRUNETTO, M. R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A.; GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, p. 459-67, 2007.

BUSTAMANTE, S. Z.; TENORIO, A. T.; ROJANO, B. A. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 3, p. 391-404, 2013.

CALDERÓN, L. **Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad**. 2002. 114 f. Tesis (Licenciatura en Química): Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, 2002.

CAMU, N.; WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; De VUYST, L. Dynamics and Biodiversity of populations of Lactic Acid Bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1809-24, 2007.

CAMU, N.; WINTER, T.; ADDO, S.; TAKRAMA, J.; BERNAERT, H.; VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavor of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2228-97, 2008.

CARRILLO, L. C.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; GIL, A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. **Food Research International**, v. 60, p. 273-80, 2014.

CONCEX. **Conselho Nacional do Comércio Exterior**. Resolução nº 161, Rio de Janeiro, Brasil, 1988.

CORTI, R.; FLAMMER, A. J.; HOLLENBERG, N. K.; LUSCHER, T. F. Cocoa and cardiovascular health. **Circulation**, v. 119, p. 1433-41, 2009.

CROSS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J. C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. **Café, Cacao Thé**, v. 16, n. 2, p. 109-13, 1982.

CRUZ, J. F. M. in memoriam; LEITE, P. B.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao*, L) cultivars during fermentation. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 279-84, 2015.

DARE, C. A.; ONWUMELU, R. N.; OYEDAPO, O. O. Biochemical studies on the effects of polyphenols from fermented and unfermented acetone extracts of *Theobroma Cacao* L. (cocoa) seeds on antioxidant enzymes of streptozotocin-induced diabetic rats. **Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 1-2, p. 44-58, 2013.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, através da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura de bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. 226p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 110p. 2004. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2004.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 30, Supl.1, p. 142-50, 2010.

ELWERS, S.; ZAMBRANO, A.; ROHSIUS, C.; LIEBEREI, R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 60, p. 937-48, 2009.

FERRAZZANO, G. F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; DE NATALE, A.; POLLIO, A. Review: Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). **Fitoterapia**, v. 80, p. 255-262, 2009.

FERREIRA, A. C. R.; AHNERT, D.; NETO, B. A. M.; MELLO, D. L. N. **Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade**. Instituto Cabruca. Ilhéus, Bahia: 2013. 52p.

FIGUEIRA, A.; LAMBERT, S.; CARPENTER, D.; PIRES, J. L.; CASCARDO, J. C. M.; ROMANCZYK, L. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. from Brazil and Malaysia. **Tropical Agriculture**, v. 74, p. 132-9, 1997.

FOWLER, M. S. Cocoa Beans: From Tree to Factory (Book style with paper title and editor). In: BECKETT, S. T. (ed.). **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 4 ed. Blackwell Publishing Ltd. 2009. p. 10-47.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 1, p. 72-7, 1968.

GANESWARI, I.; KHAIRUL BARIAH, S.; AMIZI, M. A.; SIM, K. Y. Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, p. 70-6, 2015.

GARCÍA-ALAMILLA, P.; LAGUNES-GÁLVEZ, L. M.; BARAJAS-FERNÁNDEZ, J.; GARCÍA-ALAMILLA, R. Physicochemical changes of cocoa beans during roasting process. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017.

GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. da S.. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 810-4, 2009.

GOURIEVA, K. B.; TSEREVINOV, O.B. **Methods of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans**. USSR Patent 64654, 1979.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical Dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. 2ed. London, United Kingdom: Taylor and Francis, 1999.

HASHIM, P.; SELAMAT, J.; MUHAMMAD, S. K. S.; ALI, A. Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78, Issue 4, p. 535-42, 1998.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, C.; VIERA-ALCAIDE, I.; SILLERO, A. M. M.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G. Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. **Food Chemistry**, v. 240, p. 831-9, 2018.

HERTOG, M. G.; FESKENS, E. J.; HOLLMAN, P. C. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **The Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007-11, 1993.

HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 54-67, 2015.

HOLT, R. R.; LAZARUS, S. A.; SULLARDS, M. Procyanidin dimer B2 (epicatechin-4-8)- epicatechin) in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 798-804, 2002.

JESPERSEN, L.; NIELSEN, D. S.; HØNHOLT, S.; JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n 4-5, p. 441-53, 2005.

- JOLIC, S. M.; REDOVNIKOVIC, I. R.; MARKOVIC, K.; SIPUSIC, D. I.; DELONGA, K. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1793-800, 2011.
- JONFIA-ESSIEN, W. A.; WEST, G.; ALDERSON, P.G.; TUCKER, G. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1155-9, 2008.
- KEEN, C. L.; HOLT, R. R.; OTEIZA, P. I.; FRAGA, C. G.; SCHMITZ, H. H. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, Suppl.1, p. 298-303, 2005.
- KELI, S. O.; HERTOOG, M. G.; FESKENS, E. J. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 156, n. 6, p. 637-42, 1996.
- KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1090-2, 1984.
- KONGOR, J. E.; TAKRAMA, J. F.; BUDU, A. S.; MENSAH-BROWN, H.; AFOAKWA, E. O. Effects of fermentation and drying on the fermentation index and cut test of pulp pre- conditioned Ghanaian cocoa beans (*Theobroma cacao*). **Journal of Food Science and Engineering**, p. 625-634, 2013.
- KRÄHMER, A.; ENGEL, A.; KADOW, D.; ALI, N.; UMAHARAN, P.; KROH, L. W.; SCHULZ, H. Fast and neat — Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 181, p. 152-9, 2015.
- KRATZER, U.; FRANK, R.; KALBACHER, H.; BIEHL, B.; WOSTEMEYER, J.; VOIGT, J. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 113, p. 903-13, 2009.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; KEEN, C. L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, p. 41-9, 2002.
- LAGUNES-GALVEZ, S.; LOISEAU, G.; PAREDES, J. L.; BAREL, M.; GIRAUD, J. P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 124-30, 2007.
- LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TORNERO, A. Review: Health effects of cocoa flavonoids. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 3, p. 159-76, 2005.
- LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7292-5, 2003.

- LEITE, P. B.; MACIEL, L. F.; OPRETZKA, L. C. F.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from “witch broom disease” resistant and non resistant cocoa cultivars. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 3, p. 244-50, 2013.
- LI, Y.; FENG, Y.; ZHU, S.; LUO, C.; MA, J.; ZHONG, F. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 17-23, 2012.
- LOPEZ, A. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. **Revista Theobroma**, v. 13, n. 3, p. 233-248, 1983.
- LOPEZ, A.; DIMICK, P. S. Cocoa Fermentation. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. (eds). **Enzymes, biomass, food and feed**. 2 ed. v. 5. Weinheim: VCH. 1995. p. 561-577.
- MACIEL, L. F.; FELÍCIO, A. L. S. M.; HIROOKA, E. Y. Bioactive compounds by UPLC-PDA in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the Southern region of Bahia, Brazil. **British Food Journal**, V 119, Issue 9, p. 2117-27, 2017.
- MAMOT, S. Some methods to determine the degree of fermentation in cocoa beans. In: CHE MAN, Y. B.; ABDUL KARIM, M. N. B.; ASBI, B. A. (ed.). **Proc. Conf. of Food Processing – Prelude to 90’s**. 1989, p. 41-51.
- MENON, A. S.; HIL, C. L.; LAW, C. L.; SHARIFF, S.; DJAENI, M. Effects of drying on the production of polyphenol-rich cocoa beans. **Drying Technology**, v. 35, Issue 15, p. 1799-806, 2017.
- MISNAWI, S. Physico-chemical changes during cocoa fermentation and key enzymes involved. **Review Penelitian Kopi dan kakao**, v. 24, n. 1, p. 54-71, 2008.
- MISNAWI, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 38, p. 285-95, 2003.
- MITCHELL, E. S.; SLETTENAAR, M.; VD MEER, N.; TRANSLER, C.; JANS, L.; QUADT, F.; BERRY, M. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 816-22, 2011.
- NAZARUDDIN, R.; SENG, L.; HASSAN, O.; SAID, M. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 24, p. 87-94, 2006.
- NEHLIG, A. The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 716-727, 2013.

- NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; ELWERS, S.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 612-9, 2006.
- OLIVEIRA, C. S.; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. P. S.; BISPO, E. S. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, v. 113, n. 9, p. 1094-102, 2011.
- ONOMO, P. E.; NIEMENAK, N.; DJOCGOUE, P. F.; ONDOBO, M. L.; NDOUMOU, D. O. Heritability of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity of Cameroonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 36, p. 2672-82, 2015.
- ORACZ, J.; ZYZELEWICZ, D.; NEBESNY, E. Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups affected by roasting conditions. **European Food Research and Technology**, v. 24, n. 5, p. 663-81, 2015a.
- ORACZ, J.; ZYZELEWICZ, D.; NEBESNY, E. The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region, and processing operations: a review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 55, p. 1176-92, 2015b.
- OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; ABDUL GHANI, N.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1523-30, 2007.
- OTHMAN, A.; JALIL, A. M. M.; WENG, K. K.; ISMAIL, A.; ABD. GHANI, N.; ADENAN, I. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1052-9, 2010.
- PADILLA, F. C.; LIENDO, R.; QUINTANA, A. Characterization of cocoa butter extracted from hybrid cultivars of *Theobroma cacao* L. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, n. 2, p. 200-5, 2000.
- PAYNE, M. J.; HURST, W. J.; MILLER, K.; RANK, C.; STUART, D. A. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and Catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10518-27, 2010.
- PEREIRA, G. V. M.; MIGUEL, M. G. C. P.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. Microbiological physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5395-405, 2012.
- PETTIPHER, G. L. Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardized artificial cocoa pulp medium. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, 3^a ed., p. 297-309, 1986.

- PORTER, L. J.; MA, Z.; CHEN, B.C. Cocoa procyanidins: Major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, v. 20, p. 1657-63, 1991.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-402, 2000.
- RICHELLE, M.; TAVAZZI, I; ENSLEN, M; OFFORD, E. A. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 22-6, 1999.
- ROELOFSEN, P. A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. **Advances in Food Research**, v. 8, p. 225-96, 1958.
- ROMERO-CORTES, T.; SALGADO-CERVANTES, M. A.; GARCIA-ALAMILLA, P.; GARCIA-ALVARADO, M. A.; DEL, C.; RODRIGUEZ-JIMENES, G.; HIDALGO-MORALES, M.; ROBLES-OLVERA, V. Relationship between fermentation index and other biochemical changes evaluated during the fermentation of Mexican cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 10, p. 2596-604, 2013.
- RUSCONI, M.; CONTI, A. Review: *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 5-13, 2010.
- SANDHYA, M. V. S.; YALLAPPA, B. S.; VARADARAJ, M. C.; PURANAİK, J. JAGANMOHAN RAO, L.; JANARDHAN, P.; MURTHY, P. S. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. **Food Science and Technology**, v. 65, p. 731-8, 2016.
- SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 205 -21, 2004.
- SELMİ, C.; COCCHI, C. A.; LANFREDINI, M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Chocolate at heart: The anti-inflammatory impact of cocoa flavanols. **Molecular Nutrition of Food Research**, v. 52, p. 1340-8, 2008.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications**. Lancaster PA: Technomic Publishing Company Inc. 1995. p. 231- 245.
- SHAHRIR, S.; DIMICK, P. S. Qualitative and quantitative measurements of cocoa beans fermentation. In: DIMICK, P. S. (ed.) **Proceedings of the Cocoa Biotechnology Symposium**; Pennsylvania: Pennsylvania State University USA; 1986. p. 55-78.
- SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**. v. 89, p. 191-8, 2005.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, p. 215-23, 2003.

SULAIMAN, K. B. Determination of fermentation index and ph. Kertas Kerja VII, Kursus Penggredan Biji Koko Kering (Lanjutan); Tawau, Sabah, Malaysia; 2006. Malay.

SULAIMAN, K. B. Impact of fermentation duration on the quality of malaysian cocoa beans using shallow box. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, v. 19, p. 74-80, 2014.

SULAIMAN, K. B.; YANG, T. A. Color characteristics of dried cocoa using shallow box fermentation technique. **International Journal of Nutrition and Food Engineering**, v. 9, n. 12, p. 1286-90, 2015.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of prunus domestica the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-8, 1959.

TALUKDAR, D. Antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of raw and processed legumes in Indian Himalayas. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 3, n. 3, p. 13-9, 2013.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. **Cocoa and coffee**. In: DOYLE, M. J., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. (Eds.), *Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers*. ASM Press: Washington, D.C. 2001. p. 721-33.

TAKRAMA, J. F.; ACULEY, P. C.; ANEANI, F. Fermentation of cocoa with placenta: A scientific study, in: *Proceedings of 15th International Cocoa Research Conference, Costa Rica, volume II, 2006*, pp. 1373-1379.

VAN DEN BOGAARD, B.; DRAIJER, R.; WESTERHOF, B. E.; VAN DEN MEIRACKER, A. H.; VAN MONTFRANS, G. A.; VAN DEN BORN, B. J. Effects on peripheral and central blood pressure of cocoa with natural or high-dose theobromine: a randomized, double-blind crossover trial. **Hypertension**, v. 56, n. 5, p. 839-46, 2010.

VINSON, J. A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G. A. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an anti-atherosclerotic agent in an animal model, and significant contributor to antioxidants in European and American diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 8071-6, 2006.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in different cocoa (Theobroma cacao L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 612-9, 2000.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4ed. Blackwell Science: Oxford. 2001. p. 620.

ZAMALLOA, C. W. A. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no estado de São Paulo.** 1994. 111p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ZIEGLEDER, G. Flavour development in cocoa and chocolate, In: **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, 4 ed., Blackwell Publishing Ltd. 2009. p. 169-174.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se a elaboração dos chocolates com a mistura de amêndoas proposta no trabalho a fim de obter um produto mais econômico e de maior qualidade, visto que o tempo de fermentação será reduzido.

Faz-se necessário um estudo tecnológico e sensorial dos produtos elaborados a partir da mistura.

Realizar análises de bioacessibilidade com as amêndoas parcialmente fermentadas e os chocolates produzidos a fim de comprovar os resultados obtidos em estudo.

ANEXOS

Anexo A- Certificado de edição do manuscrito para o idioma inglês.



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Establishment of parameters for the definition of unfermented cocoa beans in order to obtain raw material for functional chocolates

Authors:

Thamires Santos Melo, Tássia Cavalcante Pires, João Victor Pereira Engelman, Alana Lúcia Oliveira Monteiro, Leonardo Fonseca Maciel, Sergio Eduardo Soares, Eliete da Silva Bispo

Date Issued:

February 12, 2018

Certificate Verification Key:

1991-2697-E7B9-F1CF-2431



This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.aje.com.