



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos



TÁBATA TÓRMENA

**QUANTIFICAÇÃO DE FUROSINA EM AMÊNDOAS DE CACAU POR
CLAE: EFEITO DAS CONDIÇÕES DE TORRAÇÃO**

Salvador
2016

TÁBATA TÓRMENA

**QUANTIFICAÇÃO DE FUROSINA EM AMÊNDOAS DE CACAU POR
CLAE: EFEITO DAS CONDIÇÕES DE TORRAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliete da Silva Bispo

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares

Salvador

2016

Ficha catalográfica elaborada por: Rita de Cássia M. da Silva, **CRB-5**: BA-001697/O.

T627q Tórmena, Tábata

Quantificação de furosina em amêndoas de cacau por CLAE: efeito das condições de torração / Tábata Tórmena. – Salvador, 2016.

71 f.: il. color.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliete da Silva Bispo
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares

Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

Inclui referências.

1. ϵ -N-2-furoilmetil-L-lisina. 2. Cromatografia líquida. 3. Theobroma cacao L. I. Faculdade de Farmácia. II. Bispo, Eliete da Silva. III. Soares, Sérgio Eduardo. VI. Título.

CDD: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

TÁBATA TÓRMENA

QUANTIFICAÇÃO DE FUROSINA EM AMÊNDOAS DE CACAU POR CLAE: EFEITO DAS CONDIÇÕES DE TORRAÇÃO

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 28 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr^a. Janice Izabel Druzian
Universidade Federal da Bahia

Dr^a. Priscilla Efraim
Universidade Estadual de Campinas

Dedico

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Força Superior, que me impulsiona a seguir em frente.

Aos meus pais Celina e Walter e ao meu irmão, Tadeu, pelo amor incondicional, pela confiança que depositam em mim, por sempre me incentivarem, acreditando sempre em tudo o que faço.

Ao meu namorado, Rubens, pelo amor, por tolerar meus humores, por me entender e pelos momentos compartilhados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pelo conhecimento adquirido.

À Prof.^a Dr.^a Eliete da Silva Bispo pela orientação, confiança e paciência. Por ser sempre tão generosa, pelas sábias e calmas palavras e pelo apoio irrestrito.

Ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares pela coorientação e confiança.

À Prof.^a Dr.^a Janice pela ajuda e por ter cedido o laboratório para o desenvolvimento prático do projeto.

Aos meus colegas de mestrado e de laboratório pela amizade, companheirismo e ajuda, em especial à Lorena, Túlio, Rejane, Denilson, Adriana e Carolina, que foram muito importantes nesse processo.

À minha amiga Lorena, quem divide comigo momentos de alegria e tristeza.

Aos meus amigos de vida, que mesmo distantes continuam presentes no coração e são parte importante na minha vida.

À Universidade Federal da Bahia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho.

“Ensinar e aprender não podem dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria. A alegria não chega apenas com o encontro do achado, mas faz parte do processo da busca.”

Paulo Freire

RESUMO

A partir das sementes de cacau se produz o chocolate, alimento apreciado no mundo todo. O sabor que as amêndoas do cacau conferem a este produto está diretamente relacionado com diversos fatores, um dos mais importante deles envolve a tecnologia de processamento das sementes. Durante o beneficiamento, é na etapa de torração das amêndoas que o sabor e o aroma do cacau se desenvolvem. Esses sabor e aroma são resultados da Reação de Maillard. A furosina é um composto dessa Reação, amplamente utilizado como indicador térmico da fase inicial da mesma. Neste trabalho, a proposta foi quantificar o teor de furosina em amêndoas de cacau torradas em diferentes condições de tempo e temperatura, para avaliar a influência da torração sob a mesma, possibilitando a avaliação da formação dos produtos da Reação de Maillard, bem como a determinação de um parâmetro como indicador térmico para a torração do cacau. As amostras foram hidrolisadas com HCl 8 M a 110°C durante 23 h, clarificadas por extração em fase sólida e a furosina foi quantificada por CLAE. A separação foi realizada com eluição isocrática de uma fase móvel compreendendo heptano-sulfonato de sódio 5mM, incluindo 20% de acetonitrila e 0,2% de ácido fórmico numa coluna analítica C18, (25 cm x 4,6 mm, 5 µm). A taxa de fluxo foi ajustada para 1 ml min⁻¹ e a detecção foi realizada a 280 nm. Não tendo sido encontrados estudos e dados científicos sobre este indicador no cacau, a metodologia desta análise foi avaliada através de alguns parâmetros analíticos, como seletividade, linearidade, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e precisão intradia e interdia. Os resultados obtidos apresentaram uma boa recuperação (89% a 108%). A avaliação da precisão mostrou que o desvio padrão relativo (DPR%) dos tempos de retenção e as concentrações dos picos das amostras foram inferiores a 0,25% e 0,54%, respectivamente. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram 0,00076 e 0,00231 mg kg⁻¹, respectivamente, e a resposta foi linear entre as faixas aplicadas, 0,12-2,00 mg kg⁻¹. Os resultados mostraram uma ligeira redução do teor de furosina com o aumento do tempo e mantendo a mesma temperatura, e mostraram uma abrupta redução do teor de furosina com o aumento da temperatura considerando fixa a variável tempo. Deste modo, o estudo contribui para um melhor entendimento sobre a Reação de Maillard no cacau e colabora com a padronização dos processos para obtenção de produtos finais de qualidade superior.

Palavras-chave: ε-N-2-furoilmetil-L-lisina. Produtos da Reação de Maillard. Cromatografia líquida. *Theobroma cacao* L.

ABSTRACT

From the cocoa beans are produced chocolate, food appreciated worldwide. The flavor that cocoa beans give to this product is directly related to several factors, the most important of these involves the seed processing technology. During processing, it is in the roasting step that the flavor of cocoa beans develops. These flavor and aroma are the result of the Maillard Reaction. The furosine is a compound of this reaction, widely used as thermal indicator of early stage thereof. In this work, the proposal was to quantify the furosine content in cocoa beans roasted in different time and temperature conditions and to evaluate the influence of roasting under the compound, allowing the evaluation of the formation of products of the Maillard reaction, and the determination a thermal indicator parameter for roasting cocoa. The samples were hydrolysed with 8 M HCl at 110 °C for 23 hrs, clarified by solid phase extraction and furosine was quantified by HPLC. The separation was performed with isocratic elution in a mobile phase comprising sodium heptane-sulphonate 5 mM, including 20% acetonitrile and 0.2% formic acid in an analytical C18 column (25 cm x 4.6 mm, 5 µm). The flow rate was adjusted to 1ml min⁻¹ and detection was performed at 280 nm. It has not been found and studies and scientific datas about this indicator in cocoa, so the methodology of this analysis was assessed using some analytical parameters such as selectivity, linearity, accuracy, detection and quantification limit, robustness and intraday and interday precision. The results obtained showed good recovery (89% to 108%). The evaluation showed that the precision of the relative standard deviation (RSD%) of the retention times and peak concentrations of the samples were below 0.25% and 0.54%, respectively. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.00076 and 0.00231 mg kg⁻¹, respectively, and the response was linear between range applied, 0.12 to 2.00 mg kg⁻¹. The results showed a slight reduction of furosine content according to the increase in time and maintaining the same temperature, and showed an abrupt reduction in the content of furosine with increasing temperature whereas the time variable fixed. Thus, the study contributes to the scientific community for a better understanding of the Maillard Reaction in cocoa and collaborates with the standardization of processes for obtaining final products of superior quality.

Keywords: ε-N-2-furoilmetil-L-lisina. Maillard Reaction Products. Liquid Chromatography. *Theobroma cacao* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

- Figura 1** – Zona de cultivo do cacau. **19**
- Figura 2** – Corte transversal de um fruto de cacau, A: Polpa mucilaginosa; B: Placenta; C: Semente. **20**
- Figura 3** – Interior de uma semente de cacau com detalhes do cotilédone (A), polpa (B) gérmen (C) e testa (D). **20**
- Figura 4** – Fluxograma de pré-processamento e processamento de amêndoas de cacau e chocolate. **25**
- Figura 5** – Estágio inicial da Reação de Maillard com formação da furosina. **32**

Capítulo II

- Figura 1** – Estrutura química da furosina (ϵ -N-2-furoilmetil-L-lisina). **53**
- Figura 2** – Box-whisker plot da concentração de furosina na análise de precisão interdia. **54**
- Figura 3** – Perfil de eluição para 20 μ L da amostra “C1” de amêndoa de cacau (A); Cromatograma típico obtido para solução padrão de furosina a 3,88 μ g mL⁻¹ (B). **56**
- Figura 4** – Perfil de CLAE para o padrão de furosina 1,94 mg L⁻¹ (A), amostra “C6” com dopagem de 0,01mg de furosina (B), e amostra “C6” (C). **58**
- Figura 5** – Concentração média de furosina em amostras de amêndoas de cacau torradas sobre diferentes tempos e temperaturas. **60**
- Figura 6** – Box-whisker plot da concentração de furosina em amostras de amêndoas de cacau. **62**

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1** – Produção mundial de amêndoas de cacau para 2012/13, 2013/14 e 2014/15. **18**

Capítulo II

- Tabela 1** – Condições empregadas na torração das amostras de amêndoas de cacau. **45**
- Tabela 2** – Composição química da amostra de cacau sem torração. **50**
- Tabela 3** – Efeito das condições de torração sobre a composição química das amostras de cacau. **50**
- Tabela 4** – Condições instrumentais estabelecidas para a determinação de furosina em amêndoas de cacau usando extração em fase sólida (EFS). **52**
- Tabela 5** – Recuperações da adição de furosina nas amostras e estudo de precisão (intradia) para furosina. **53**
- Tabela 6** – Estudo de precisão (interdia) para furosina. **55**
- Tabela 7** – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para furosina. **55**
- Tabela 8** – Estudo da robustez para variação da temperatura do forno e da fase móvel. **57**
- Tabela 9** – Efeito das condições de torração sobre o teor de furosina das amêndoas de cacau. **59**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO I	16
1 CACAU	17
1.1 ORIGEM E PRODUÇÃO DO CACAU	17
1.2 O CACAUEIRO: GRUPOS, VARIEDADES E CARACTERÍSTICAS	19
1.3 QUALIDADE DO CACAU (FINO X BULK) E COMPOSIÇÃO	22
1.4 PROCESSAMENTO DAS AMÊNDOAS	25
1.4.1 <i>Torração</i>	28
2 DESENVOLVIMENTO DA REAÇÃO DE MAILLARD	30
2.1 REAÇÃO DE MAILLARD	30
2.2 FUSOSINA	31
3 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO	34
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO II	40
RESUMO	41
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	44
2.2 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE AMÊNDOAS DE CACAU	44
2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS	45
2.3.1 <i>Composição centesimal</i>	45
2.3.2 <i>Atividade de água</i>	46
2.3.3 <i>Fusosina em cacau: extração e determinação por CLAE</i>	46
2.4 PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	47
2.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO	47
2.5.1 <i>Linearidade</i>	47
2.5.2 <i>Exatidão</i>	47
2.5.3 <i>Precisão</i>	48

2.5.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	48
2.5.5 Seletividade.....	49
2.5.6 Robustez.....	49
2.6 DETERMINAÇÃO DA FUROSINA EM AMÊNDOAS DE CACAU TORRADAS	49
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE AMÊNDOAS DE CACAU TORRADAS.....	49
3.2 EXTRAÇÃO DA FUROSINA EM FASE SÓLIDA E SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	52
3.3 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO	53
3.3.1 Exatidão.....	53
3.3.2 Precisão.....	54
3.3.3 Linearidade.....	55
3.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação	55
3.3.5 Seletividade.....	56
3.3.6 Robustez.....	57
3.4 APLICAÇÃO.....	58
4 CONCLUSÃO.....	65
AGRADECIMENTOS	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A partir das sementes do cacau, obtém-se um dos alimentos mais apreciados do mundo: o chocolate. Este é um alimento que, durante o consumo, evoca uma variedade de estímulos que ativam os centros de prazer do cérebro humano. Seu sabor é condicionado a atributos genéticos do cacau utilizado como matéria-prima, bem como às modificações que advém do processo de beneficiamento. O mesmo é composto pelas etapas de: colheita do fruto, abertura do cacau (quebra), fermentação das sementes juntamente com a polpa que as envolve, secagem e torração das amêndoas (BECKETT, 2009; EFRAIM et al., 2010).

As sementes, com composição adequada, passando pelos tratamentos de pós-colheita controlados e subsequentes tecnologias de processamento empregadas, podem desenvolver amêndoas com sabor de elevada qualidade. A fermentação é fundamental para a formação de frações voláteis chave (alcoóis, ésteres e ácidos graxos) e dos precursores do aroma (aminoácidos livres e açúcares redutores). Na secagem, os ácidos voláteis e os polifenóis totais são reduzidos, conseqüentemente a acidez e a adstringência são diminuídas. Durante a torração, a Reação de Maillard converte esses precursores do aroma em duas classes principais de compostos ativos do aroma: os aldeídos e as pirazinas (AFOAKWA, 2010). Após o processo de torração, os *nibs* são moídos e uma massa de cacau é obtida (também chamada de *liquor* de cacau). A massa de cacau é a matéria-prima para obtenção dos chocolates, manteiga de cacau, pó de cacau, dentre outros produtos (EFRAIM et al., 2010).

A furosina, os compostos fluorescentes, o hidroximetilfurfural e a carboximetilisina, produtos da Reação de Maillard, desenvolvidos durante a etapa de torração do cacau, são compostos empregados como indicadores do processamento térmico de alimentos (BASTOS et al., 2011).

Apesar de se saber que durante a fabricação há vários fatores que desempenham um papel importante na formação do comportamento reológico, propriedades de textura, características de fusão e percepção sensorial do chocolate, a ciência e as tecnologias envolvidas ainda não são completamente compreendidas. Com o objetivo de melhorias na qualidade do produto final, possivelmente através de melhoras na cadeia de produção e beneficiamento, há necessidade de uma maior compreensão das variáveis envolvidas, bem como a ciência e tecnologias empregadas no processo (AFOAKWA, 2010).

Neste contexto, faz-se necessário um maior conhecimento do tempo e temperatura envolvidos no processo de torração de amêndoas de cacau e suas influências na qualidade da amêndoa final. Sendo a furosina um composto amplamente utilizado como indicador térmico

da Reação de Maillard e não tendo sido encontrados dados na literatura sobre o teor de furosina em amêndos de cacau torradas em diferentes condições, faz-se juz o estudo em questão; em que o teor de furosina foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência. Dada a importância do resultado desta pesquisa, há espera-se contribuir com uma melhor compreensão sobre a Reação de Maillard no cacau, contribuir para o desenvolvimento de um padrão para os parâmetros de tempo e temperatura mais adequados de torração e contribuir para o conhecimento, no âmbito de melhorar o entendimento sobre o impacto na saúde humana em relação ao consumo dos Produtos da Reação de Maillard (PRM) (BRUNETTO et al., 2007; BASTOS et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Implementar a metodologia de análise da furosina em amêndoas de cacau por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e quantificar o teor de furosina nas amostras de amêndoas de cacau processadas em diferentes tempos e temperaturas de torração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar metodologia de extração da furosina em amêndoas de cacau torradas;
- Atingir resultados satisfatórios para os parâmetros estabelecidos de: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão (recuperação), precisão (intradia e interdia) e robustez para satisfatório desenvolvimento da metodologia;
- Quantificar o teor de furosina em nove amostras de amêndoas de cacau processadas em diferentes tempos e temperaturas de torração por CLAE;
- Estudar a influência do tempo de torração das amêndoas de cacau na formação de furosina;
- Estudar a influência da temperatura de torração das amêndoas de cacau na formação de furosina;
- Estudar a influência do tempo e da temperatura de torração, concomitantemente, na formação de furosina em amêndoas de cacau;
- Analisar o teor de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos e atividade de água das amêndoas de cacau torradas;
- Contribuir para um melhor entendimento do comportamento da furosina durante a Reação de Maillard no processamento de amêndoas de cacau.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 CACAU

1.1 ORIGEM E PRODUÇÃO DO CACAU

Segundo uma lenda asteca, o Deus da lua roubou uma árvore de cacau da terra do rei do sol para presentear seus amigos humanos com a delícia dos Deuses. *Theobroma cacao* = *Theo* (Deus) + *broma* (alimento) (FERREIRA et al., 2013).

O uso de sementes de cacau ocorre desde, pelo menos, o ano 1400, quando astecas e incas usavam os grãos como moeda para o comércio ou para produzir o chamado *chocolatl*, uma bebida feita pela torração e moagem dos *nibs* de cacau, onde eram esmagados com água e, muitas vezes, adicionados de outros ingredientes, tais como baunilha, especiarias ou mel. Na década de 1520, a bebida foi introduzida na Espanha, embora se diga que os recém-chegados europeus no novo mundo, incluindo Cristóvão Colombo e Hernán Cortes, não se impressionaram com a mesma. No entanto, os conquistadores familiarizaram a bebida de chocolate por toda a Europa e, sendo esta cara, ela foi inicialmente reservada para consumo pelas classes sociais mais altas, só no século XVII que o consumo se espalhou pela Europa (AFOAKWA, 2010).

O cacau é normalmente cultivado por pequenos agricultores em países do terceiro mundo. Seu cultivo estende-se da Colômbia, para a Venezuela, América Central e México. O cultivo se dispersa ao longo do rio Amazonas e alcança também as Guianas. Saindo das Américas, cerca de 70% da produção mundial provêm da África Ocidental, principalmente da Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões (LOPES et al., 2011).

Desde a década de 60 a Costa do Marfim lidera a produção mundial de cacau em amêndoas secas, seguida por Gana e Indonésia. O Brasil apareceu em 6º lugar na produção referente a 2012/2013 e de 2013/2014 e em 5º lugar em relação a produção de 2014/2015, sendo responsável por 5,45% do total da produção mundial. Mais de 90% da oferta mundial é concentrada por um rol de oito países (Tabela 1). Até a década de 80 o Brasil ocupava o 2º lugar desse ranking, após isso, houve uma queda da posição causada pela diminuição progressiva da área plantada e do padrão tecnológico seguido, como resposta à queda dos preços internacionais, e do alastramento da doença conhecida como vassoura de bruxa nos cacauais da Bahia, o principal Estado produtor. Em virtude disso, na década de 90 o Brasil passou de exportador de cacau em amêndoas para importador do produto (SUFRAMA, 2013).

Tabela 1 – Produção mundial de amêndoas de cacau em 2012/13, 2013/14 e 2014/15.

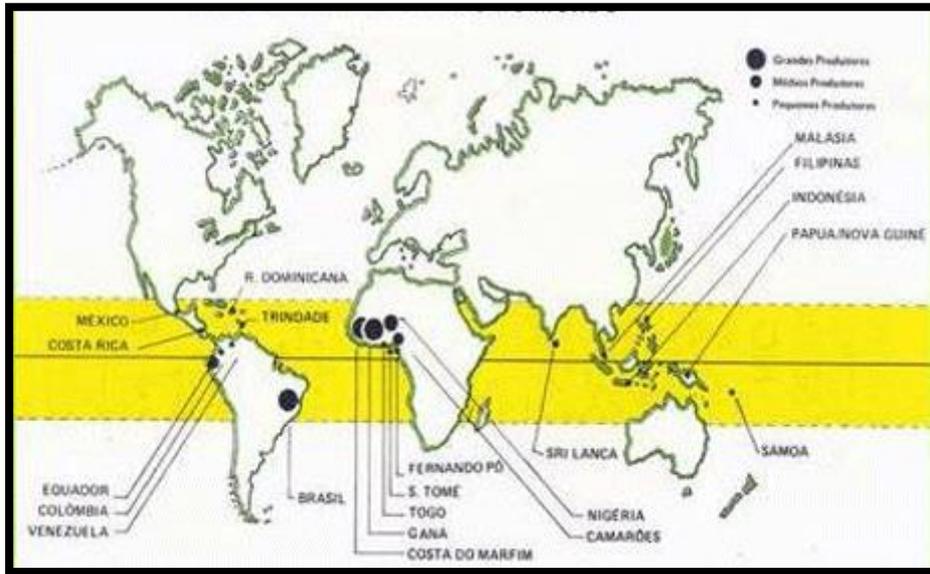
Produção de amêndoas de cacau (x10 ³ toneladas)						
	Produção	(%)	Estimativa	(%)	Estimativa	(%)
	2012/13		2013/14		2014/15	
África	2836	71,93	3199	73,17	3051	72,65
Camarões	225		211		232	
Costa do Marfim	1449		1746		1794	
Gana	835		897		740	
Nigéria	238		248		190	
Outros	89		97		95	
Américas	622	15,77	726	16,61	747	17,78
Brasil	185		228		229	
Equador	192		234		250	
Outros	246		264		268	
Ásia e Oceania	485	12,30	447	10,22	402	9,57
Indonésia	410		375		320	
Papua Nova Guiné	41		36		42	
Outros	34		36		40	
Total Mundial	3943	100,0	4372	100,0	4201	100,0

Fonte: ICCO, 2015.

Da oferta brasileira de produção nacional de cacau em amêndoas, 83% está concentrada no sul da Bahia, especialmente nos municípios de Itabuna, Camacã e Ilhéus. Em escala bem inferior a essa se encontra o Pará, com 9,9% da oferta brasileira, focalizada nos municípios de Medicilândia, Uruará, Altamira e Tomé-Açú, e Rondônia, com 5,4% da produção brasileira, concentrada nas cidades que se situam ao longo da rodovia BR-364 ou Transamazônica (SUFRAMA, 2013).

O cacau cresce entre os trópicos de Câncer e Capricórnio. O Forasteiro, cacau comum, cresce principalmente no Brasil e na África Ocidental, enquanto cacaos de melhor *flavor* (tipo fino) são em grande parte híbridos e são cultivados nas Américas Central e do Sul (AFOAKWA, 2010).

Figura 1 – Zona de cultivo do cacau.



Fonte: Planeta Cacau. Disponível em <<http://www.planetacacau.com.br/o-cacau/images/tabela-producao2.gif>>

1.2 O CACAUEIRO: GRUPOS, VARIEDADES E CARACTERÍSTICAS

O cacaveiro é uma planta nativa das florestas úmidas das Américas, provavelmente originária das bacias dos rios Amazonas e Orinoco. Para o cultivo do cacau necessita-se de chuvas regulares, média de 25°C de temperatura, 2000 horas de sol por ano e entre 1500 e 2000 mm de precipitação anual. A planta cresce à sombra de outras árvores e se desenvolve em clima quente e úmido. O solo deve ser profundo e fértil, o que o torna muito susceptível a pragas e fungos. Os primeiros frutos são colhidos cerca de cinco anos após a plantação e a árvore chega a atingir 5 a 10 metros de altura. O fruto do cacaveiro tem forma oval com 15 a 20 cm de comprimento e cor amarela quando maduro. Na semente, 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 com tons rosados, sendo esta uma mucilagem doce (BECKETT, 2009).

Esta polpa, que revolve as sementes de cacau, é rica em açúcares (10-15%), sendo estes: glicose, frutose e sacarose, além de possuírem: 82-87% de água, 2-3% de pentosonas, 1-3% de ácido cítrico e 1-1,5% de pectina (FERREIRA et al., 2013).

A Figura 2 mostra um corte transversal do fruto do cacau demonstrando a semente, polpa e placenta da fruta e, na Figura 3, uma semente de cacau cortada no sentido longitudinal, em que é possível verificar a testa, polpa, cotilédone e gérmen.

Figura 2 – Corte transversal de um fruto de cacau, A: Polpa mucilaginosa; B: Placenta; C: Semente.



Fonte: Goethe Institut. Disponível em <<http://www.goethe.de/ins/br/sab/ver/kao/bdk/ptindex.htm>>

Figura 3 – Interior de uma semente de cacau com detalhes do cotilédone (A), polpa (B) gérmen (C) e testa (D).



Fonte: Cacao Bahia. Disponível em <<https://cacaobahia.wordpress.com/gallery/>>

A testa representa 10-14% do peso seco da semente de cacau, enquanto o núcleo ou cotilédone é constituído pela maior parte restante, 86-90%. O cotilédone é responsável por, após o beneficiamento, conferir sabores e aromas característicos de chocolate e é composto por dois tipos de células de armazenamento de parênquima. Células polifenólicas (14-20% do peso seco das amêndoas) contêm um único vacúolo grande, compostas por polifenóis e alcalóides, incluindo cafeína, teobromina e teofilina. Os polifenóis pigmentados, antes de serem

processados, conferem cor púrpura para cotilédones frescos (*in natura*) de variedades do grupo Forasteiro. Por outro lado, células de lipídio-proteína têm citoplasma fortemente acondicionado com múltiplos vacúolos pequenos de proteínas e de lipídios e outros componentes, tais como grânulos de amido - que desempenham um papel na definição das características de sabor e aroma de cacau (OSMAN; NAZARUDDIN; LEE, 2004; AFOAKWA, 2010).

O cacau pertence à ordem Malvales, família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L. Entre as 22 espécies conhecidas do gênero *Theobroma*, a *Theobroma cacao* é uma das poucas que é economicamente explorada. Sementes de cacau, principal produto desta espécie, são consideradas como um estimulante, devido à presença de metilxantinas (alcaloides de purina), tais como a teobromina e cafeína. Extraído das amêndoas, sementes processadas, o chocolate tem alto valor nutricional e alimentar, especialmente devido à sua alta concentração de carboidratos, lipídios, proteínas e mais de 300 outros compostos quimicamente ativos (ARAUJO et al., 2014).

A partir das cabeceiras dos rios Orinoco e Amazonas, os botânicos acreditam que o cacau se expandiu em duas vias principais, dando origem a dois grupos importantes, sendo: Criolo, da América Central e do Sul, e Forasteiro, da Amazônia (América do Sul). Os Trinitários são um grupo formado a partir da hibridação espontânea entre Criolos e Forasteiros ou Amazônicos (FERREIRA et al., 2013).

Aproximadamente 95% da produção mundial de cacau provém do tipo ‘comum’, sendo a maior parte dessa porcentagem proveniente do grupo Forasteiro, podendo a menor parcela ser de variedades do grupo Trinitário. Portanto, cerca de 5% da produção mundial de cacau é proveniente de cacau do grupo Criolo. O Forasteiro é o mais comum, com sementes menores, mais achatadas e mais roxas. Já o Trinitário, é um híbrido mais resistente a doenças do que o Criolo e o Forasteiro e, assim como o Criolo, também é reconhecido por ter semente muito aromática (FOWLER, 2009).

O cacau do grupo Criolo ocorre no sul do México em direção à América Central até chegar no norte da Venezuela e Colômbia. Variedades desse grupo produzem frutos grandes com superfície enrugada e sulcos pronunciados, possuem sementes grandes, sendo seu interior branco ou violeta pálido. Variedades de cacau desse grupo foram as cultivadas pelos índios Astecas e Maias. É menos resistente às pragas e possui um tempo menor de fermentação (2 a 3 dias), além de possui sabor mais suave e frutado, sendo pouco amargo (FERREIRA et al., 2013).

O cacau Forasteiro se difundiu pela bacia amazônica abaixo e em direção às Guianas. Atualmente é cultivado na América do Sul, no Oeste da África e na Ásia. É considerado o

verdadeiro cacau brasileiro. Possui frutos ovóides e é caracterizado pela sua superfície lisa, com sulcos quase imperceptíveis. O interior de suas sementes é violeta escuro, algumas vezes quase preto, podendo também ser branco como no caso do cultivar “Catongo”. De maneira geral, tem maior resistência às pragas e possui um tempo de fermentação mais longo (5 a 7 dias), além de possuir sabor mais amargo e adstringente (BECKETT, 2009).

O cacau Trinitário possui uma mistura de características entre o cacau Forasteiro e o Criolo. Originário de Trinidad, ilha próxima a costa oriental da Venezuela. O interior de suas sementes pode ser tanto da cor branca quanto violácea. Ele é cultivado principalmente na América Central, em Camarões e na Indonésia e a produção mundial desse tipo de cacau representa cerca de 10-15%. No Brasil ele foi introduzido em programas de melhoramento: híbridos TSH e TSA (FERREIRA et al., 2013).

O cacau dos grupos Criolo e o Forasteiro contribuem de formas diferentes para a qualidade final do chocolate na indústria. Os chocolates finos, ou de aroma e sabor mais suaves, são produzidos de forma geral com as amêndoas provenientes de variedades de cacau do grupo Criolo e Trinitário, como é o caso do cacau Porcelana da Venezuela e o Marfim de Java. Já os chocolates terrosos e mais encorpados, são produzidos com as amêndoas de cacau Forasteiro, as variedades como Maranhão, Nacional do Equador e o Catongo brasileiro possuem sabores diferenciados e apreciados no mercado internacional. Do consumo mundial de chocolate, aproximadamente 80% advém de amêndoas de cacau Forasteiro (BECKETT, 2009; FERREIRA et al., 2013).

1.3 QUALIDADE DO CACAU (FINO X BULK) E COMPOSIÇÃO

Perante o mercado internacional, as amêndoas de cacau são qualificadas como comuns (“*bulk*”) e finas ou especiais (o chamado cacau “fino”). Não há uma definição consensual para esses termos, pois o conceito de cacau fino possui diversas vertentes, a depender dos grupos de interesse (BECKETT, 2009).

Para a Organização Internacional do Cacau (ICCO), o cacau fino é proveniente de variedades dos grupos Criolo e Trinitário e é produzido em países selecionados por um comitê especializado, que reavalia periodicamente a lista dos países produtores. Já para as indústrias, é o cacau que apresenta aromas originais e agradáveis, podendo ser notas de frutas frescas, secas, de castanhas, floral, picante, nozes, madeira e caramelo (FOWLER, 2009). Para os pesquisadores da área, é um cacau que apresenta um aroma de constituição, presente nas

amêndoas frescas, ou aromas que surgem a partir da fermentação, ou após esta etapa (SILVA, 2013).

Na indústria, esse tipo de cacau é utilizado para a fabricação de chocolate com maiores teores de cacau, onde o sabor especial (“fino”) pode ser apreciado. Sendo mais valorizadas no mercado internacional, as amêndoas do cacau tipo fino atingem preços até três vezes maiores que o tipo comum. Geralmente, este cacau fino pertence às variedades de Criolo ou Trinitário. Porém, se a fermentação das amêndoas não for bem conduzida, não haverá o desenvolvimento do sabor considerado especial e, assim sendo, nem todos os cacaos pertencentes a estas variedades serão classificados como especiais. O cacau tipo “*bulk*” normalmente é do grupo Forasteiro. As indústrias utilizam as amêndoas de cacau tipo comum para produção de chocolates convencionais, sobretudo do tipo “ao leite”, já que estas não apresentam sabor diferenciado considerado fino (CEPLAC, 2010; SUKHA et al., 2007; FOWLER, 2009).

Na formulação de chocolate, os principais ingredientes são: nibs torrados de cacau, manteiga de cacau), açúcar e lecitina como emulsificante. No entanto, a grande diversidade de produtos disponíveis no mercado é o resultado da incorporação de outros compostos às formulações, tais como nozes, frutas ou cereais. As principais categorias de chocolates comerciais são escuro, ao leite e branco, diferindo em seu conteúdo de sólidos de cacau, gordura do leite e manteiga de cacau (TORRES-MORENO, TORRESCASANA, SALAS-SALVADÓ, & BLANCH, 2015).

O chocolate apresenta um conjunto peculiar de características sensoriais, como sabor, textura e aroma e é isso que o faz ser apreciado por consumidores de todo o mundo. A intensidade do sabor característico, amargor, adstringência e acidez são atributos sensoriais que os chocolates podem apresentar de maneiras diferentes. A qualidade das amêndoas de cacau depende de muitos fatores, como o genótipo, o manejo agrônomico, os fatores de solo, as condições climáticas e, o mais importante: a tecnologia pós-colheita. Desta forma, a qualidade das amêndoas – sabor e aroma – dependerá das habilidades e cuidados tomados nas técnicas durante o beneficiamento (BRUNETTO et al., 2007).

Durante a fermentação, a degradação das proteínas ocorre em parte por hidrólise de peptídeos, e em parte pela conversão para formas insolúveis pela ação dos polifenóis. As reações dos polifenóis com açúcares e aminoácidos contribuem com o aroma e a cor das amêndoas de cacau, já os alcalóides contribuem com o amargor, durante a torração. A polifenoloxidase promove o escurecimento oxidativo, e proporciona a cor marrom característica de chocolate nas amêndoas de Forasteiro bem fermentadas (AFOAKWA, 2010).

Amêndoas naturais do grupo Forasteiro, contendo 15-20% de teor de polifenóis, tem esse teor diminuído para 5% após a fermentação. Teor acima de 10% é considerado sinal de uma fermentação pobre. Altos níveis de polifenóis conduzem a um chocolate com sabor mais adstringente. Amêndoas de cacau do grupo Criolo possuem aproximadamente dois terços deste teor de polifenóis e antocianinas não são encontradas (AFOAKWA, 2010).

As principais etapas responsáveis, no processo de fabricação, pela qualidade das amêndoas do cacau são: colheita, fermentação, secagem das amêndoas, torração e conchagem. A fermentação microbiana, o processo de secagem e a torração são essenciais na formação de sabor, o que as torna etapas importantes e muito significativas do processamento da amêndoa de cacau, sendo assim um parâmetro importante da qualidade (CAMPOS et al., 2012). Portanto, as propriedades sensoriais do chocolate podem variar utilizando amêndoas de um mesmo grupo (por exemplo, lotes diferentes de variedade do grupo Forasteiro) ou variando o tipo de cacau utilizado (por exemplo, variedades de Forasteiro e Trinitário). Assim sendo, as indústrias processadoras devem adotar protocolos e padrões de identidade e qualidade para possibilitar a padronização do produto final (CAMPOS et al., 2012; SILVA, 2013).

A falta de um protocolo padrão para avaliação sensorial de cacau e chocolates, por meio de equipes treinadas, é um impasse, o que prejudica a colaboração efetiva entre instituições de pesquisas e fabricantes de chocolate. Os critérios de qualidade e medidas atuais não refletem objetivamente os atributos que caracterizam o cacau fino. Atualmente, os protocolos utilizados pelas processadoras de cacau somente identificam defeitos específicos em amêndoas de cacau e *liquor*, como aroma de fumaça, presença de mofo e outros defeitos. Devido a isso, é necessário avaliar os parâmetros físicos, químicos e organolépticos, os quais permitem determinar a qualidade do cacau em relação ao genótipo, meio ambiente e processamento. Neste contexto, medidas de melhor qualidade poderão ser implantadas e, assim, a competitividade do cacau será aumentada (BRUNETTO et al., 2007).

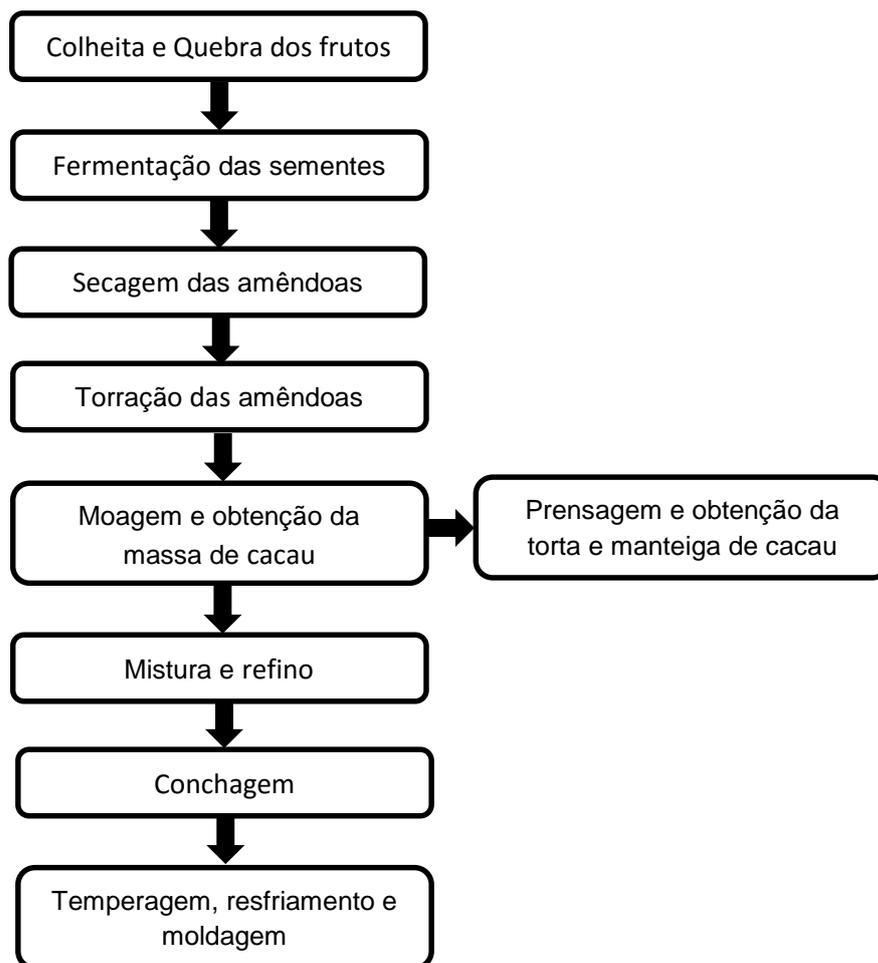
A química das amêndoas de cacau na fermentação e sua contribuição para a torração, alcalinização e conchagem, ainda está em estudo. Compostos de aromas chaves no chocolate têm sido identificados. No entanto, os processos químicos e bioquímicos que levam ao desenvolvimento e formação do *flavor* de chocolate e suas relações com o caráter final e percepções de qualidade, ainda não são totalmente compreendidos (AFOAKWA, 2010).

1.4 PROCESSAMENTO DAS AMÊNDOAS

É compreendida em duas fases a produção dos ingredientes derivados de cacau (massa, manteiga e pó de cacau): o pré-processamento e o processamento do cacau. A fase de pré-processamento são as etapas executadas em campo, pelo produtor de cacau, como a colheita, abertura dos frutos, retirada das sementes com a polpa, fermentação, secagem das amêndoas e armazenamento. A etapa de torração pode ser realizada no pré-processamento ou processamento. Já a segunda fase, processamento, geralmente é realizada na indústria e envolve a obtenção dos ingredientes utilizados para a fabricação de chocolate e produtos derivados (SILVA, 2013).

O fluxograma apresentado na Figura 4 demonstra todas as etapas que envolvem a cadeia de beneficiamento do cacau e fabricação do chocolate:

Figura 4 – Fluxograma de pré-processamento e processamento de amêndoas de cacau e chocolate.



Fonte: Autoria própria.

Ao analisar amêndoas de cacau de diferentes países e do mesmo cultivar, verificou-se que vários atributos variam significativamente. Saltini, Akkerman, & Frosch (2013) acreditam que tal variação é causada pelas diferentes práticas agrícolas em uso. Como a maioria das atividades dos agricultores não são padronizadas, a qualidade dos grãos pode diferir significativamente entre eles (SALTINI, AKKERMAN, & FROSCH, 2013).

A colheita de cacau envolve a remoção do fruto das árvores e extração das amêndoas e polpa do interior do fruto. Enquanto o processo de amadurecimento ocorre num período de 7 a 10 dias, os frutos podem seguramente ser deixados nas árvores por até duas semanas antes da colheita. Há duas preocupações que ditam quão rápida a colheita deve ser concluída: o potencial para doenças no fruto e a possibilidade de germinação da amêndoa no fruto, se o atraso para a colheita for um tempo muito longo (AFOAKWA, 2010).

Durante a colheita, uma faca ou facão é normalmente usado para remover o fruto da árvore. Depois de retirar os frutos das árvores, eles podem ser reunidos em montes e abertos imediatamente, ou serem assentados por alguns dias antes da abertura, uma técnica conhecida como armazenamento dos frutos, a qual tem sido relatada ter efeitos benéficos significativos na qualidade do sabor das amêndoas durante a subsequente fermentação e processamento. A maior parte disso depende das práticas geográficas e históricas encontradas nas diversas regiões produtoras. O período entre a quebra e o início da fermentação não deve ser superior a 24 horas para que não ocorram reações químicas indesejáveis (AFOAKWA, 2010; SILVA, 2013).

Há de 30 a 40 sementes dentro dos frutos, ligadas a uma placenta central. As sementes são ovais e envoltas em uma polpa mucilaginosa, doce e branca. Após o rompimento do fruto (casca), as sementes são separadas à mão e a placenta é removida. A casca da semente, ou testa, separa os cotilédones da polpa. Estudos mostraram que sementes retiradas do fruto e conduzidas diretamente para testes de secagem controlada, sobre diferentes condições, praticamente não desenvolveram sabor de chocolate após o processamento; portanto, sementes *in natura* estão livres dos compostos necessários para o desenvolvimento do sabor chocolate. Sendo assim, o processo de fermentação é necessário para a formação de componentes ou precursores do *flavor*, que se submetem a um maior desenvolvimento durante o processo de torração, ou torrefação (AFOAKWA, 2010).

Os métodos de fermentação mais comuns são realizados em caixas, montes ou bandejas, e podem variar de acordo com o país ou a região. Na utilização da caixa, por exemplo, a parte inferior deve ser perfurada para possibilitar a drenagem da polpa liquefeita do cacau, o que acontece no decorrer da fermentação. A duração deste processo está ligada ao tipo de cacau a ser fermentado, às características ambientais, entre outros fatores. Durante esta etapa, os cacaos

são revolvidos periodicamente para penetração de ar na massa, bem como permitir a homogeneização do processo (FOWLER, 2009).

Para o desenvolvimento das leveduras, responsáveis pela fermentação alcoólica, há condições ideais de fermentação, as quais são: o baixo pH da polpa (próximo a 3,6), que é ocasionado pela presença de ácido cítrico, e o baixo nível de oxigênio disponível, devido à coesão da polpa entre as sementes no interior da caixa de fermentação. Consequente a isso, há a penetração de oxigênio na massa de fermentação, o que permite que as bactérias acéticas atuem sobre o álcool, convertendo-o em ácido acético. Com isso, há uma difusão dos ácidos na semente do cacau, o que culmina na morte do gérmen e subsequente formação dos precursores do sabor, os quais são os aminoácidos livres e peptídeos, e açúcares redutores; e a oxidação dos polifenóis, que formará complexo com proteínas e peptídeos, levando assim à redução da adstringência e do amargor (FOWLER, 2009; SALTINI, AKKERMAN, & FROSCH, 2013).

Na etapa subsequente à fermentação, está a secagem. Esta é essencial na preservação dos precursores de sabor formados durante a etapa anterior. A umidade da amêndoa deve ser reduzida de 60% para 6-7%, o que a torna estável para o armazenamento, pois só assim as alterações químicas que ocorrem na fermentação e continuam na secagem, serão cessadas. Na secagem também há continuidade das reações de oxidação que dão início na fase de fermentação, isto leva à redução do amargor, adstringência e acidez das amêndoas, além do escurecimento dos cotilédones, o que contribui para o desenvolvimento dos precursores de sabores desejáveis de chocolate e para reduzir o teor de ácido acético através da evaporação (BECKETT, 2009, OWUSU; PETERSE; HANNE, 2012).

Na torração, o feito mais importante e significativo é o desenvolvimento do *flavor* (sabor e aroma) de chocolate nas amêndoas do cacau. Nesta etapa, a temperatura e o tempo empregados são essenciais e estão diretamente relacionados com a concentração e com os tipos de compostos de *flavor* que são desenvolvidos. De acordo com o produto final que se pretende obter, aplicam-se parâmetros diferentes de tempo e temperatura (OWUSU; PETERSE; HANNE, 2012).

A fermentação e secagem das amêndoas de cacau contribuem para o desenvolvimento de aromas de chocolate no cacau, através do aumento dos níveis de aminoácidos livres e de açúcares redutores, os quais são precursores da Reação de Maillard que ocorre durante a torração. Por meio desses processos pós-colheita, os polifenóis são normalmente reduzidos por difusão, escurecimento e polimerização oxidativa (COUNET et al., 2004).

Os níveis de compostos do aroma do cacau, formados durante a torração, mostram variar diretamente com o tempo de fermentação das amêndoas e inversamente com o conteúdo residual de procianidina no *líquor* de cacau (COUNET et al., 2004).

1.4.1 Torração

A torração é uma das operações tecnológicas mais importantes no processamento de sementes de cacau. Por meio dela, ocorre a formação da cor característica marrom, aroma suave e textura das amêndoas torradas. Nesta fase, há perda de água nas amêndoas e traços de ácido acético por evaporação, sendo que ao final as amêndoas normalmente possuem em torno de 2,5% de umidade com uma perda total de peso de 6% (KRYSIK, 2006; ORACZ & NEBESNY, 2014).

Apesar de todos os processos de beneficiamento das amêndoas serem importantes, é na etapa de torração onde os precursores do *flavor*, formados durante a fermentação e secagem, vão desempenhar um papel significativo no desenvolvimento do aroma e sabor, por meio da Reação de Maillard, caramelização dos açúcares, degradação de proteínas e síntese de compostos de enxofre (BECKET, 2009).

Antecedendo a etapa de torração, as amêndoas podem apresentar diversas características, tais como: gosto ácido, amargo, mofado, sabor de nozes e adstringência. Após a torração, há diminuição da acidez, devido à redução nas concentrações de ácidos voláteis, como: propiônico, butírico e valérico, sendo o principal o ácido acético, os quais se tornam indesejáveis no sabor do produto final, se estiverem em excesso. O teor de ácidos não voláteis, como o cítrico, tartárico, láctico e oxálico, não é influenciado pela etapa de torração. Algumas substâncias passam apenas por alterações mínimas, são elas: as gorduras, os polifenóis e os alcalóides. Além disso, também ocorre o desenvolvimento da cor típica do chocolate e a inativação das enzimas, especialmente as lipolíticas, as quais tem capacidade de degradar a manteiga do cacau. Posteriormente à torração, as amêndoas passam a ter um intenso aroma de cacau (BECKET, 2009; OWUSU; PETERSE; HANNE, 2012).

Outras mudanças físicas e químicas que ocorrem durante esta etapa são: afrouxamento da testa (casca); os *nibs* (cotilédones) tornam-se mais quebradiços e escurecem; redução no número de micro-organismos presentes nas amêndoas, o que ajuda a atingir produtos de boa qualidade alimentar, tais como manteiga de cacau, cacau em pó e licor de cacau, que têm especificações microbiológicas rigorosas (AFOAKWA, 2010).

Ao final da torração, um grande número de compostos é detectado, incluindo pirazinas, aldeídos, cetonas, alcoóis e ésteres, sendo que o sabor encontrado advém da combinação desses compostos. Entre os principais produzidos estão as pirazinas e aldeídos, os quais se formam pela reação de aminoácidos e açúcares redutores durante a Reação de Maillard (AFOAKWA, 2010).

A composição química das amêndoas fermentadas e secas, e os parâmetros utilizados na torração, influenciam diretamente no desenvolvimento de sabor do cacau. Além disso, as propriedades de amêndoas torradas, como a concentração de compostos aromáticos voláteis, acidez total e teor de gordura também dependem das condições de torração, principalmente da temperatura e do tempo do processo. A torração por convecção é o método mais comumente usado de processamento térmico de amêndoas de cacau, que são expostas, normalmente, a temperaturas de 90-170°C por 15-45 min. Na Bahia, a temperatura utilizada é em torno de 120°C por 15 minutos a 2 horas dependendo da variedade de cacau a ser torrada. Outros parâmetros de processamento térmico de grãos de cacau, tais como umidade e fluxo de ar também parecem afetar a qualidade do produto final. Por exemplo, aplicação de ar com elevada umidade relativa facilita a circulação durante a torração e permite uma separação mais fácil da casca e do interior da semente (KRYSIK, 2006; OLIVEIRA, 2009; SILVA, 2013).

Em relação a aceitabilidade do sabor, vários estudos investigam a melhor combinação de tempo e temperatura de torração. No entanto, essas melhores combinações diferem bastante de estudo para estudo. Essa heterogeneidade é provavelmente causada pelo fato de que, mesmo com pequenas diferenças nas práticas dos agricultores, o cacau produzido tem diferentes combinações de tempo e temperatura para torração consideradas ideais. Por essa razão, acredita-se que é extremamente importante saber como as amêndoas foram manipuladas pelo agricultor, a fim de estar ciente do potencial de sabor, e, assim, definir os parâmetros de processamento ideais (SERRA BONVEHÍ & VENTURA COLL, 2002).

O cacau pode estar em diversas formas para ser torrado, sendo elas: amêndoas inteiras, *nibs* (os quais são amêndoas quebradas em porções menores, com separação dos cotilédones da casca) ou na forma de massa de cacau, que também é denominada de pasta de cacau ou *liquor* de cacau (SILVA, 2013).

Processos térmicos são frequentemente utilizados na fabricação de alimentos para obter produtos seguros com uma vida de prateleira prolongada, além de ter um forte impacto na qualidade final dos alimentos. Cozimento, fritura, torração, esterilização, etc, resultam em efeitos desejados e indesejados devido a várias reações químicas advindas da Reação de

Maillard (RM), caramelização e oxidação lipídica, as principais vias de escurecimento não enzimático (CAPUANO; FOGLIANO, 2011).

Um dos propósitos dos processos térmicos é melhorar as propriedades sensoriais dos alimentos, a sua palatabilidade e ampliar a gama de cores, sabores, aromas e texturas dos alimentos produzidos a partir de matérias-primas similares. O aquecimento também destrói as enzimas e micro-organismos e reduz a atividade de água preservando, assim, os alimentos. Por outro lado, é bem conhecido que algumas substâncias resultantes dos processos de aquecimento podem desempenhar um papel positivo na saúde humana. Muitos novos compostos formados apresentam efeitos antioxidante, antimicrobiano e antialérgico (VAN BOECKEL, 2010).

Ao lado desses efeitos positivos, algumas consequências prejudiciais de processos térmicos devem ser cuidadosamente avaliadas. A perda de compostos termolábeis, tais como as vitaminas e aminoácidos essenciais (lisina, triptofano) e/ou a formação de sabores e odores indesejáveis, são fenômenos bem estabelecidos que causam uma perda do valor nutricional e qualidade sensorial dos alimentos aquecidos (CAPUANO; FOGLIANO, 2011).

2 DESENVOLVIMENTO DA REAÇÃO DE MAILLARD

2.1 REAÇÃO DE MAILLARD

Processos de escurecimento não enzimático, como a Reação de Maillard e a caramelização, abrangem distintas reações químicas, as quais podem ocorrer nos organismos vivos (glicação) e nos alimentos. Muitos dos compostos responsáveis pelo sabor, aroma e cor dos alimentos, são originários das reações de escurecimento não enzimático, o que favorece a aceitação e consumo dos mesmos. Por isto, deve-se ponderar a importância destes compostos na aceitabilidade dos alimentos pelos consumidores, devido à contribuição destes para com o sabor, aroma, textura e cor, os quais são essenciais para pães, carnes e grãos como: cevada, amendoim, café e cacau, e que são submetidos ao tratamento térmico (BASTOS et al., 2011).

Porém, essas reações também podem dar origem à compostos com potencial tóxico, como acroleína e aminas heterocíclicas, e reduzir o valor nutricional dos alimentos, por causa do comprometimento de aminoácidos essenciais, especialmente a lisina (BASTOS et al., 2011).

A Reação de Maillard (RM) está estritamente ligada à qualidade e segurança dos alimentos tratados termicamente. Esta ocorre entre um composto carbonílico, principalmente advindo da porção carbonila de um açúcar redutor, e um grupo amina, o qual pode ser uma

amina, um aminoácido, um peptídeo ou uma proteína. Do ponto de vista químico, a RM pode ser dividida em três passos principais (TROISE; FOGLIANO, 2013).

Na fase inicial da RM, ocorre a condensação da carbolina de um açúcar redutor com um grupamento amina, o que leva a formação de glicosilaminas, as quais são seguidas pela formação de dois intermediários mais estáveis: 1-amino-1-desoxi-2-cetose, o produto de rearranjo de Amadori (PRA), e 2-amino-2-desoxialdose, os produtos de rearranjo de Heyns (PRH). Vários mecanismos e uma enorme variedade de vias têm sido propostos. A fragmentação do produto de Amadori depende do pH e dos reagentes disponíveis, e representa o ponto crucial para a formação do hidroximetilfurfural (HMF), acrilamida, furosina (FUR), N ϵ -carboximetilisina (CML) e outros produtos da Reação de Maillard (PRM). Alguns destes produtos são desejados por causa de suas propriedades sensoriais e fisiológicas, enquanto outros não são, porque apresentam um perigo potencial para a saúde dos consumidores (TROISE; FOGLIANO, 2013).

Em particular, o produto de Amadori (PRA) descarboxilado de asparagina com açúcares redutores é o precursor chave da acrilamida, como alternativa, cátions de glicose e frutofuranosil podem gerar HMF através da eliminação de duas e três moléculas de água, respectivamente. Glioxal e glicaldeído são precursores diretos para a formação de CML, N ϵ -carboxietilisina (CEL) e furosina via base de Schiff, juntamente com PRA através de clivagem oxidativa. Estes radicais intermediários são importantes na fase inicial da RM, e foram identificados como cátions radicais pirazínicos, que parecem ser os precursores-chave nas vias subsequentes da RM (VAN BOEKEL et al., 2010).

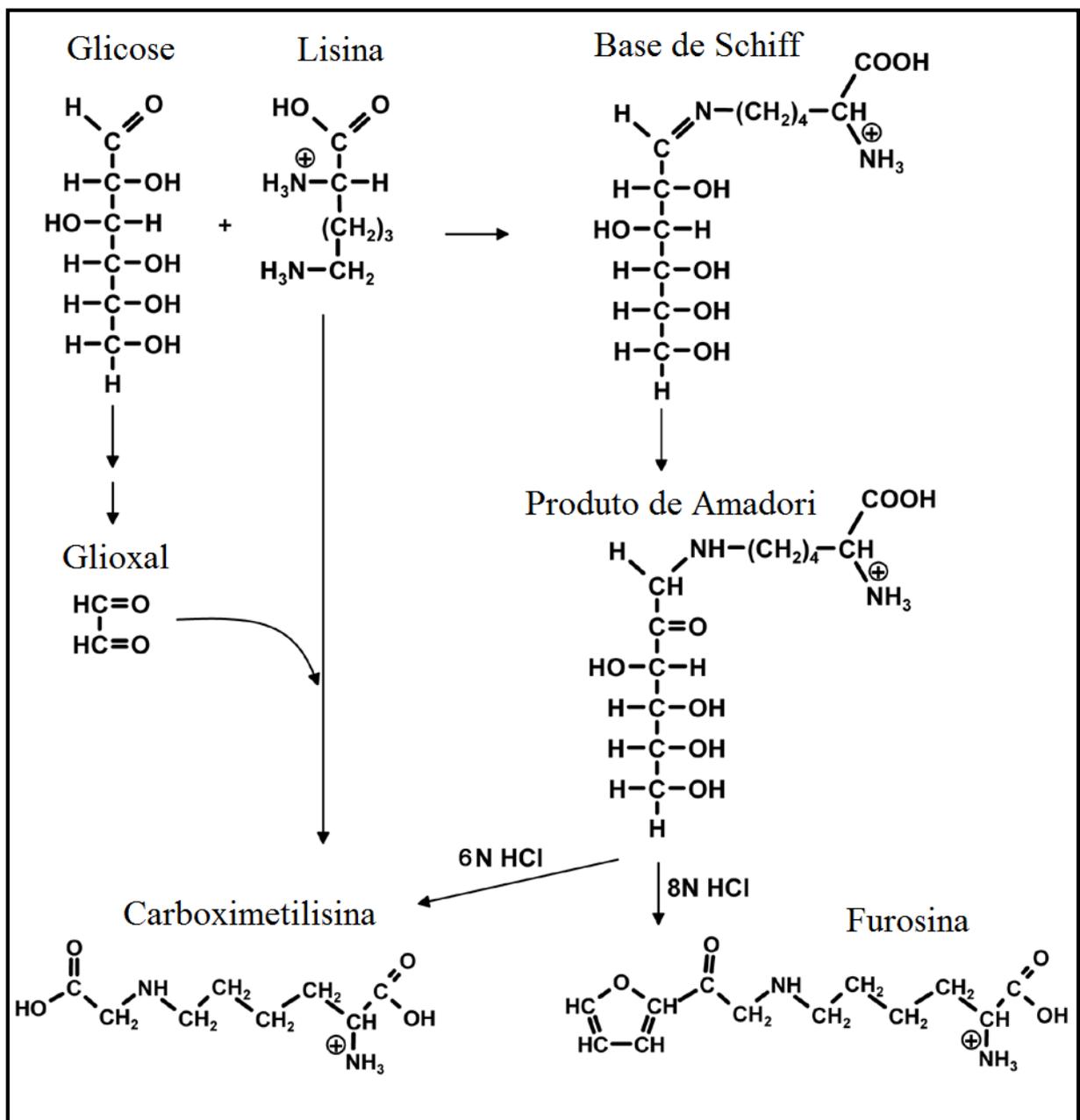
Através do monitoramento da formação de alguns compostos, é possível avaliar a extensão da Reação de Maillard em alimentos, a intensidade do processamento térmico e as alterações nutricionais relacionadas a ele. Entre estes compostos estão a furosina, o hidroximetilfurfural e a carboximetilisina. Estes indicadores são precursores dos pigmentos escuros que são formados na fase inicial da Reação de Maillard (RUFÍAN HENARES; DELGADO-ANDRADE; MORALES, 2009; DELGADO-ANDRADE et al., 2007b).

2.2 FUROSINA

A furosina (ϵ -N-2-furoilmetil-L-lisina), primeiramente detectada em leite e derivados, é um indicador bem conhecido e útil para mostrar o grau de danos durante os passos iniciais da RM em produtos de cereais, como massas, cereais infantis comerciais, pão, cereais matinais, dentre outros. A furosina é um aminoácido formado durante a hidrólise ácida dos compostos de

Amadori. Estes compostos, por sua vez, são formados entre o grupo ε-amino da lisina com lactose, glicose ou maltose, gerando, respectivamente, lactuloselisina, frutoselisina e maltuloselisina. É um dos parâmetros mais eficientes para avaliar a perda de disponibilidade de lisina em gêneros alimentícios tratados termicamente (RUFÍAN-HENARES; DELGADO-ANDRADE; MORALES, 2009; DELGADO-ANDRADE; RUFÍAN-HENARES; MORALES, 2005). A Figura 5 ilustra uma das vias do estágio inicial da Reação de Maillard, de forma geral, com a formação da furosina.

Figura 5 – Estágio inicial da Reação de Maillard com formação da furosina.



Fonte: Adaptado de Erbersdobler & Somoza, 2007.

Há tempos, a furosina vem sendo analisada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. No estudo de Giannetti et al. (2014), os pesquisadores avaliaram o teor de furosina em massa de trigo seca (macarrão) e verificaram que altos valores de furosina em amostras de massa de macarrão podem estar atribuídos a procesos de secagem feitos em “temperatura elevada e curto tempo” e “temperatura muito elevada e curto tempo”, enquanto baixos valores podem estar associados com tratamentos feitos em “temperatura baixa e longo tempo”. A análise de furosina envolve um processo complexo, o pré-tratamento demorado da amostra (hidrólise e purificação), seguida por uma determinação cromatográfica (GIANNETTI et al., 2014).

Bastos et al. (2011) analisaram produtos da Reação de Maillard em leite em pó, café, gelatina diet e cereais matinais. Para a extração da furosina, utilizou metodologia descrita por Delgado-Andrade; Rufian-Henares; Morales (2005) (BASTOS et al., 2011). Bastos et al. (2011) relatam sobre a furosina, onde esta é considerada o principal indicador da RM em leite, em que é empregado para estimar a lisina indisponível. Em condições moderadas de processamento térmico há formação de furosina, bem como na interrupção da Reação de Maillard, nos estágios finais. No estudo de Bastos et al. (2011), a granola apresentou maiores teores de furosina, o que é compatível com o tratamento térmico ao qual esse produto é submetido e à sua composição. Já no café, a furosina não foi detectada, o que é elucidado pelo fato do café sofrer tratamento térmico severo (200-250°C por 5-15 minutos), o que leva à sua degradação (BASTOS et al., 2011).

Rufián-Henares, Delgado-Andrade & Morales (2009) determinaram o teor de furosina em amostras de farinhas comerciais de trigo, trigo mole, milho, aveia, arroz e soja através da metodologia descrita anteriormente por Delgado-Andrade, Rufian-Henares, & Morales (2007a) (RUFÍAN-HENARES, DELGADO-ANDRADE & MORALES, 2009).

Diversas outras pesquisas vêm analisando o teor de furosina em uma gama considerável de produtos. Małgorzata, Konrad e Zieliński (2016), avaliaram o efeito do tempo de torração em trigo sarraceno na formação de furosina, Trevisan et al. (2016) verificaram a influência dos diferentes tipos de preparo de hambúrgueres na formação dos produtos da Reação de Maillard, e Michalska et al. (2016) averiguaram o efeito dos parâmetros de secagem de diferentes cultivares de ameixa na formação da furosina. Rufián-Henares, Guerra-Hernández, García-Villanova (2013) analisaram o efeito das condições de desidratação de pimenta vermelha doce na formação da furosina, e Gökmen et al. (2008), avaliaram a furosina como marcador térmico em cookies (MAŁGORZATA, KONRAD & ZIELIŃSKI, 2016; TREVISAN et al., 2016;

MICHALSKA et al., 2016; RUFÍAN-HENARES, GUERRA-HERNÁNDEZ, GARCÍA-VILLANOVA, 2013; GÖKMEN et al., 2008).

3 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO

Um novo método de análise garante a veracidade e confiabilidade das informações quando se comprova a qualidade das análises em relação a diversos parâmetros. Este fator está sendo cada vez mais exigido e reconhecido, pois dados analíticos que não apresentam confiança possivelmente conduzem a equivocadas decisões e perdas financeiras (RIBANI et al., 2004).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e outras técnicas de separação, se destacam na química analítica por serem capazes de executar análises qualitativas e quantitativas em amostras de diferentes naturezas, como em alimentos e fármacos (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e o INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, possuem documentos que sugerem uma diretriz a ser tomada para validação de métodos analíticos, estes são: documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 01 de março de 2003 e última revisão de 04 de julho de 2011, e Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Além destes, diversos outros órgãos redigiram documentos técnicos e guias com definições e parâmetros a serem seguidos em validação de métodos analíticos, como IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ICH (International Conference on Harmonization), ISO (International Standard Organization), FDA (Food and drug administration). Com isso, há diferenças entre as definições redigidas pelas organizações. Apesar da mudança de terminologia, o entendimento e significado da definição são praticamente os mesmos (RIBANI et al., 2014).

Os parâmetros analíticos, parâmetros de desempenho, ou características de desempenho, que normalmente se encontram para métodos de separação são: seletividade (especificidade), linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2014).

A seletividade ou especificidade é a capacidade de resposta a um determinado composto de interesse associado a uma matriz com várias substâncias químicas detectáveis ou não. O método instrumental de separação é chamado de específico quando produz resposta para um único elemento de interesse, ou seja, uma única substância e o método seletivo é assim chamado

quando produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum (INMETRO, 2011). Como existem poucos métodos que respondem a um único analito, o termo seletividade é usualmente o mais empregado (RIBANI et al., 2004).

A linearidade é expressa pela capacidade do método em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações do analito em amostras, correspondente à uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2011; ICH 2005).

A exatidão em procedimentos analíticos, refere-se à concordância entre o valor real (valor de referência) da concentração de um analito em uma amostra e o estimado pelo processo analítico. Uma baixa exatidão resulta de erros sistemáticos que contribuem para desvios ou tendências nos resultados (INMETRO, 2011).

O limite de detecção refere-se à menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, utilizando um determinado procedimento analítico ao qual se associa um nível de confiança especificado (INMETRO, 2011).

A robustez é a medida da sensibilidade que um método tem de permanecer inalterado frente a pequenas, mas deliberadas, variações dos parâmetros associados à ele, demonstrando sua confiabilidade durante seu uso na rotina de trabalho (INMETRO, 2011).

A precisão é a dispersão dos resultados entre análises independentes, tendo sido repetidas sobre as mesmas condições analíticas, podendo ser ensaios reproduzidos da mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões (RIBANI et al., 2004; ICH, 2005). Sendo que pode ser considerada em três diferentes níveis, sendo eles: repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade.

A repetitividade (INMETRO, 2011) ou Repetibilidade (precisão intra-dia) (ANVISA, 2003) refere-se ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, tendo mesmo mensurando, mesmo equipamento utilizado, análise nas mesmas condições, mesmo local e repetições efetuadas em um intervalo de tempo curto (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

A precisão intermediária denota a implicação das variações dentro do mesmo laboratório, variando os dias de análise, ou os analistas, ou os equipamentos, ou uma combinação desses parâmetros. O objetivo é verificar que, no mesmo local de análise, o método irá prover os mesmos resultados (ICH, 2005; RIBANI et al., 2004).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das análises de uma mesma amostra, mas efetuando-as, principalmente, em diferentes laboratórios e equipamentos (INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science And Technology**. England: Wiley-Blackwell, 2010, 311 p.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.
- ARAUJO, Q. R.; FERNANDES, C. A. F.; RIBEIRO, D. O.; EFRAIM, P.; STEINMACHER, D.; LIEBEREI, R.; BASTIDE, P.; ARAUJO, T.G. Cocoa Quality Index - a Proposal. **Food Control**, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.003, 2014.
- BASTOS, D. H. M.; SHIBAO, J.; FERREIRA, E. L.; BOMBO, A. J. Produtos da Reação de Maillard em alimentos. *Nutrire: Revista Socio Brasileira de Alimentos e Nutrição = Journal Brazilian Socio Food and Nutrition*, v. 36, n. 3, p. 63-78, 2011.
- BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4th ed. York, UK, 2009, 732p.
- 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.
- CAMPOS, J. R.; BUENDÍA, H.B. E.; RAMOS, S.M. C.; AVILA I. O.; FLORES, E. J.; CERVANTES, E. L. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 277-288, 2012.
- CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 793 e 810, 2011.
- CEPLAC. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Cacao Fino: oportunidade para a cacauicultura brasileira. **Jornal do Cacao, Informativo do MAPA/CEPLAC para as regiões produtoras de cacau da Bahia**. Bahia, n. 2, 2010, 3 p.
- COUNET, C.; OUWERX, C.; ROSOUX, D.; COLLIN, S. Relationship between Procyanidin and Flavor Contents of Cocoa Liquors from Different Origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6243-6249, 2004.
- DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIAN-HENARES, J.; MORALES, F. J. Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 5, p. 707-711, 2005.

- DELGADO-ANDRADE, C., RUFÍAN-HENARES, J. A., MORALES, F. J. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. **Food Chemistry**, v. 100, p. 725–731, 2007a.
- DELGADO-ANDRADE, C.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M. P.; MORALES, F. J. Maillard reaction indicators in diets usually consumed in adolescent population. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 3, p. 341-351, 2007b.
- EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 142-150, 2010.
- ERBERSDOBLER, H. F., & SOMOZA, V. Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. (2007). **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 423–430
- FERREIRA, A. C. R.; AHNERT, D.; NETO, B. A. M.; MELLO, D. L. N. Guia de beneficiamento de cacau de qualidade. **Instituto Cabruca**, 1ª ed, Ilhéus, Bahia, 2013, 52 p.
- FOWLER, M. S.; **Cocoa Beans: From Tree to Factory**. In: BECKETT, S. T. Industrial chocolate manufacture and use. 4 th ed. York, UK, 2009, 10-47 p.
- GIANNETTI, V.; MARIANI, M. B.; MANNINO, P.; TESTANI, E. Furosine and flavour compounds in durum wheat pasta produced under different manufacturing conditions: Multivariate chemometric characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 15-20, 2014.
- GÖKMEN, V., SERPEN, A., AÇAR, Ö. Ç., MORALES, F. J. Significance of furosine as heat-induced marker in cookies. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 843-847, 2008.
- HENLE, T., ZEHETNER, G., KLOSTERMEYER, H. Fast and sensitive determination of furosine. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-forschung**, v. 200, p. 235-237, 1995.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008 de 04 de julho de 2011**. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. INMETRO, 20 p., 2011.
- ICCO. International Cocoa Organization. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Cocoa year 2014/15**. Published: 27-11-2015, v. XLI, n. 4, 2015.
- ICH. Harmonised Tripartite Guideline: **Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1)**, Geneva, 2005.
- KRYSIAK, W. Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 449-453, 2006.

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.

MALGORZATA, W., KONRAD, P. M., ZIELIŃSKI, H. Effect of roasting time of buckwheat groats on the formation of Maillard reaction products and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 355-358, 2016.

MICHALSKA, A., HONKE, J., ŁYSIAK, G., ANDLAUER, W. Effect of drying parameters on the formation of early and intermediate stage products of the Maillard reaction in different plum (*Prunus domestica* L.) cultivars. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 932-938, 2016.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. S. Melanoidins from coffee infusions fraction, chemical, characterization, and effect of the degree of roast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3967-3977, 2007.

OLIVEIRA, C. S. **Propriedades químicas e sensoriais de cacau de Cultivo orgânico e convencional da região sul da Bahia**. 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos). Universidade Federal da Bahia. Salvador, BA, 2009.

ORACZ, J., NEBESNY, E. Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different *Theobroma cacao* cultivars. **Food Research International**, v. 55, p. 1-10, 2014.

OSMAN, H.; NAZARUDDIN, R.; LEE, S. L. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. **Food Chemistry**, v. 86, p. 41-45, 2004.

OWUSU, M.; PETERSE, M. A.; HANNE, H.; Effect of Fermentation Method, Roasting and Conching Conditions on the Aroma Volatiles of Dark Chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, n. 5, p. 446-456, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F. J. Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. **Food Chemistry**, v. 114, p. 93-99, 2009.

RUFÍAN-HENARES, J. A., GUERRA-HERNÁNDEZ, E., GARCÍA-VILLANOVA, B. Effect of red sweet pepper dehydration conditions on Maillard reaction, ascorbic acid and antioxidant activity. **Journal of Food Engineering**, v. 118, p. 150-156, 2013.

SALTINI, R., AKKERMAN, R., & FROSCH, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, p. 167-187, 2013.

- SERRA BONVEHÍ, J., & VENTURA COLL, F. Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalized cocoa powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3743-3750, 2002.
- SILVA, A. R. A. **Caracterização de amêndoas e chocolate de diferentes variedades de cacau visando a melhoria da qualidade tecnológica**. 2013. 136 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos). Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, SP, 2013.
- SUKHA D. A.; BUTLER, D.R.; UMAHARAN, P.; BOULT, E. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 3, p. 405-413, 2007.
- SUFRAMA. Superintendência da zona franca de Manaus. **Potencialidades regionais, Estudo de viabilidade econômica: cacau**. Sumário executivo. Ministério de desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Manaus, Amazonas. 2003, 18 p.
- TORRES-MORENO, M., TORRESCASANA, E., SALAS-SALVADÓ, J., & BLANCH, C. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. **Food Chemistry**, v. 166, p. 125-132, 2015.
- TREVISAN, A. J. B., LIMA, D. DE A., SAMPAIO, G. R., SOARES, R. A. M., BASTOS, D. H. M. Influence of home cooking conditions on Maillard reaction products in beef. **Food Chemistry**, v. 196, p. 161-169, 2016.
- TROISE, A. D.; FOGLIANO, V. Reactants encapsulation and Maillard Reaction. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, p. 63-74, 2013.
- VAN BOEKEL, M., FOGLIANO, V., PELLEGRINI, N., STANTON, C., SCHOLZ, G., LALLJIE, S. A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 1215-1247, 2010.

CAPÍTULO II

QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DE FUSOSINA EM
AMÊNDOAS DE CACAU PROCESSADAS EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE TORRAÇÃO

RESUMO

A furosina (ϵ -N-2-furoilmetil-L-lisina) é um dos produtos da Reação de Maillard. Neste trabalho, a proposta foi quantificar o teor de furosina em amêndoas de cacau torradas em diferentes condições de tempo e temperatura, para avaliar a influência da torração sob a mesma, possibilitando a avaliação da formação dos produtos da Reação de Maillard, bem como a determinação de um parâmetro como indicador térmico para a torração do cacau. As amostras foram hidrolisadas com HCl 8 M a 110°C durante 23 h, clarificadas por extração em fase sólida e a furosina foi quantificada por CLAE. A separação foi realizada com eluição isocrática de uma fase móvel compreendendo heptano-sulfonato de sódio 5mM, incluindo 20% de acetonitrila e 0,2% de ácido fórmico numa coluna analítica C18, (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m). A taxa de fluxo foi ajustada para 1 ml min⁻¹ e a detecção foi realizada a 280 nm. O método foi avaliado em relação a alguns parâmetros, e os resultados obtidos apresentaram uma boa recuperação (89% a 108%). A avaliação da precisão mostrou que o desvio padrão relativo (DPR%) dos tempos de retenção e as concentrações dos picos das amostras foram inferiores a 0,25% e 0,54%, respectivamente. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram 0,00076 e 0,00231 mg kg⁻¹, respectivamente, e a resposta foi linear entre as faixas aplicadas, 0,12-2,00 mg kg⁻¹. Além disso, o método foi aplicado de forma satisfatória para a análise de amostras de cacau torradas sobre diferentes condições. Os resultados mostraram que a manutenção do tempo fixo com a temperatura variável exerce um efeito mais pronunciado no teor de furosina, havendo uma abrupta redução no teor da mesma.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L., ϵ -N-2-furoilmetil-L-lisina, Produtos da Reação de Maillard.

1 INTRODUÇÃO

O chocolate é um produto obtido a partir das sementes do cacau, o fruto do cacaeiro (*Theobroma cacao* L.), que se divide em três grupos: Criolo, Forasteiro/Amazônico e Trinitário (MOTAMAYOR et al., 2002; N'GORAN, LAURENT, RISTERUCCI, & LANAUD, 1994; CARRILLO, LONDOÑO-LONDOÑO, & GIL, 2014).

Devido à Reação de Maillard, que ocorre durante o processo de torração, precursores de aromas são transformados em compostos aromáticos, como aldeídos e pirazinas. Estes

compostos aromáticos são responsáveis pelo perfil de aroma e sabor do chocolate acabado (DE BRITO ET AL., 2001; SALTINI, AKKERMAN, & FROSCH, 2013).

Durante a torração, as amêndoas de cacau são expostas a temperaturas que variam desde 110 a 160°C, considerando que as variedades de "fino" exigem temperaturas mais baixas do que as "comuns". Estudos anteriores revelaram que a temperatura e duração da torração afetaram substancialmente o caráter das alterações químicas e físicas que ocorrem nas amêndoas de cacau (RAMLI, HASSAN, SAID, SAMSUDIN, & IDRIS, 2006; FARAH, ZAIBUNNISA, & MISNAWI, 2012; ORACZ & NEBESNY, 2014).

A torração das amêndoas de cacau gera muitas transformações, como a mudança no conteúdo de água, ácidos voláteis, taninos, compostos fenólicos, cor, aroma e textura. Faltam estudos sobre amêndoas de cacau torradas trituradas sob diferentes condições de processo, incluindo a aplicação de condições variáveis durante o processamento térmico, a atmosfera "úmida" ou diferentes velocidades de ar na torração (KRYSIK, 2006; ŻYŻELEWICZ, KRYSIK, BUDRYN, ORACZ, & NEBESNY, 2014).

Após a torração das amêndoas com diferentes graus de fermentação, compostos da classe das pirazinas estão presentes, mas as suas concentrações relativas variam significativamente (Sukha et al., 2004). Como o atributo de aroma de cada composto da classe das pirazinas é conhecido, isto significa que, conhecendo as condições de fermentação e de torração aplicadas, deverá ser possível prever o perfil exato do aroma do chocolate final. Antes de tal modelo existir, mais estudos são necessários, mas seria uma revolução na maneira de produzir chocolate (SALTINI, AKKERMAN, & FROSCH, 2013).

É bem conhecido que as amêndoas submetidas a um procedimento de torração impróprio geram compostos de aroma indesejáveis; se as amêndoas de cacau não são torradas o suficiente, o chocolate resultante será muito amargo e, alternativamente, se as amêndoas são muito torradas, as mesmas serão queimadas e *off-flavors* serão desenvolvidos (JINAP et al., 1998; SERRA BONVEHÍ & VENTURA COLL, 2002).

Em geral, a literatura concorda que quanto maior o grau de torração, melhor será o perfil de sabor, até que o ponto de excesso de torração seja alcançado. No entanto, as condições de processo específicas listadas na literatura variam. Os parâmetros de torração ideais dependem fortemente da matéria-prima processada e o aroma pontencial das amêndoas pode ser aumentado por meio de parâmetros ótimos de torração (SALTINI, AKKERMAN, & FROSCH, 2013).

Se uma padronização maior for atingida, o lote será mais homogêneo, e o potencial de sabor de todas as amêndoas de cacau será aproveitado. Esta solução demandaria grandes

esforços para a normalização das práticas de agricultores (SALTINI, AKKERMAN, & FROSCHE, 2013).

Para essa padronização, a literatura sugere a utilização de alguns parâmetros de avaliação do processamento térmico, como os indicadores da Reação de Maillard; os quais são produtos intermediários dessa Reação. Os indicadores mais utilizados são a furosina, o hidroximetilfurfural, a carboximetilisina e os compostos fluorescentes. Os dados sobre os efeitos dos processos térmicos sobre a formação de furosina em alguns produtos ainda são limitados.

Não há estudos que investiguem a influência do tempo e temperatura de torração sobre os níveis de furosina formados durante a Reação de Maillard em amêndoas de cacau (DELGADO-ANDRADE, RUFÍAN-HENARES, & MORALES, 2007; DELGADO, CORZO, SANTA-MARÍA, JIMENO, & OLANO, 1992; RADA-MENDOZA, SANZ, OLANO, & VILLAMIEL, 2004).

A furosina ocorre como resultado da hidrólise ácida do produto de Amadori, frutose lisina, proveniente da reação entre glicose e grupo ϵ -amino da lisina. É avaliada como a molécula de maior importância para indicação do início da Reação de Maillard (TAŞ & GÖKMEN, 2015; ERBERSDOBLER & SOMOZA, 2007).

O conhecimento sobre as concentrações de furosina em amêndoas de cacau do grupo Forasteiro, bem como os fatores que afetam as alterações dos níveis deste composto durante a torração, podem fornecer uma estimativa mais precisa do consumo diário dos produtos da Reação de Maillard em produtos derivados do cacau, tais como pó de cacau e chocolate, além de contribuir para melhor entendimento da influência da torração no sabor e aroma finais do chocolate, de colaborar para a padronização da etapa de torração durante beneficiamento do cacau, e de cooperar com a formação de um perfil para identificar chocolates finos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar os teores de furosina em amêndoas de cacau de uma mistura de cultivares do grupo Forasteiro originários da região sul da Bahia e investigar os efeitos de diferentes condições de torração sobre as mudanças do conteúdo desse composto.

Neste estudo, um método sensível e de confiança para a extração e a separação de furosina em amêndoas de cacau torradas, empregando heptano-sulfonato de sódio, acetonitrila e ácido fórmico como fase móvel, foi utilizado. O método em questão foi previamente aplicado para detecção de furosina em cereais de café da manhã, leite, compotas, café, massas, alimentos fritos, e outros, separada por CLAE (DELGADO-ANDRADE, RUFÍAN-HENARES, &

MORALES, 2007; DELGADO, CORZO, SANTA-MARÍA, JIMENO, & OLANO, 1992; RADA-MENDOZA, SANZ, OLANO, & VILLAMIEL, 2004).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada obtida a partir de um sistema Milli-Q.

O ácido clorídrico para etapa da digestão, de grau analítico, foi comprado na empresa Vetec (Brasil). A acetonitrila e o ácido fórmico, de grau cromatográfico, foram adquiridos a partir da Merck (Alemanha). O ácido clorídrico para a extração em fase sólida e o metanol, ambos de grau cromatográfico, juntamente com o sal, heptano-sulfonato de sódio, foram obtidos a partir da Sigma Aldrich (Alemanha). O padrão de furosina foi obtido a partir da empresa PolyPeptide Group 97,5% (França). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de celulose regenerada de 0,45 μm (Millipore), para remover quaisquer impurezas. A solução estoque de furosina foi preparada a 1,0 mg ml^{-1} em HCl 0,1 M.

2.2 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE AMÊNDOAS DE CACAU

Um *blend* de amêndoas de cacau de diferentes variedades de Forasteiro, tipo comum, denominadas Pará, Parazinho e Maranhão, foram obtidas a partir da Fazenda Riachuelo, no sul da Bahia. Na Fazenda, esse blend, amostra, foi beneficiado nas mesmas condições nas etapas: colheita, quebra do fruto, fermentação e secagem; nas condições corriqueiras de processamento já comumente estabelecidas pelos produtores. Na fase final de tratamento dos grãos, as variáveis tempo e temperatura foram alteradas.

Os tempos e as temperaturas variaram de um ponto central, que foi de 120°C/40 minutos, uma vez que estes são os valores médios dos parâmetros utilizados pelos produtores para se obter um produto final de boa qualidade.

A amostra de amêndoas de cacau foi torrada sob diferentes condições, conforme especificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições empregadas na torração das amostras de amêndoas de cacau.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
C1	80	20
C2	80	40
C3	80	60
C4	120	20
C5	120	40
C6	120	60
C7	160	20
C8	160	40
C9	160	60

Foi realizado um delineamento experimental composto por dois fatores com três níveis cada, com delineamento (3²). Foram estabelecidas faixas de interesse experimental (níveis) para cada um dos fatores, tendo como variáveis independentes o tempo (t) e a temperatura (T) de torração das amêndoas de cacau de tamanhos médios e grandes, e tendo como variável dependente o produto da Reação de Maillard: furosina.

A torração foi realizada na Fazenda em lotes de 16 kg \pm 1 kg de sementes de cacau fermentadas e secas; onde foi usado um torrador elétrico rotativo Jaf Inox (Tambaú, São Paulo), com capacidade para 30 kg, equipado com controle de temperatura, com precisão de \pm 0,1°C. Após a torração, as amêndoas de cacau foram imediatamente arrefecidas, colocadas em embalagens plásticas de polietileno de alta densidade, hermeticamente fechados à vácuo (500 g) e armazenados em temperatura de 20 °C até a análise.

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.3.1 Composição centesimal

As amostras de amêndoas de cacau torradas foram analisadas em sextuplicata quanto a umidade, cinzas, proteínas e teor de lipídios seguindo os métodos da AOAC para amêndoas de cacau (AOAC, 2005). O conteúdo total de carboidratos foi calculado por diferença. O teor de umidade das amostras foi determinado por gravimetria, através da secagem de 2 g de amostra triturada em 105 °C até peso constante em estufa. O teor de cinzas foi determinado utilizando um forno mufla a 550 °C durante 4 h. A gordura foi determinada num aparelho de Soxhlet, utilizando éter etílico como solvente de extração. O nitrogênio orgânico total foi determinado utilizando o método de Kjeldahl. O teor de proteína das amostras foi calculado empregando-se 6,25 como o fator de conversão (proteína = nitrogênio*6,25) (AOAC, 2005).

2.3.2 Atividade de água

A atividade de água foi determinada através da quantificação da fugacidade da água através da constante dielétrica em equipamento modelo AQUALAB, com exatidão $\pm 0,015$ e resolução 0,001, devidamente calibrado.

2.3.3 Furosina em cacau: extração e determinação por CLAE

A extração da furosina foi realizada seguindo o método descrito por Delgado, Corzo, Santa-Maria, Jimeno, e Olano (1992) com algumas modificações. Resumidamente, 30 mg de amostra foram hidrolisados com 4,0 ml de HCl 8 M, a 110 °C durante 23 h num frasco Pyrex com tampa de rosca, com septos de politetrafluoretileno (PTFE). Os tubos de hidrólise foram selados sob nitrogênio. Os hidrolisados foram aerados e arrefecidos até à temperatura ambiente e, subsequentemente, centrifugados a 14.000 xg durante 10 min. Após agitação por 1 minuto em vortex, uma porção de 0,5ml do sobrenadante foi aplicado em um cartucho Sep-pak C18 (Waters), pré-acondicionado com 5ml de metanol e 10 ml de água deionizada e, em seguida, eluído com 3 ml de HCl 3 M. A amostra seca foi dissolvida em 1 ml de uma mistura de água, acetonitrila e ácido fórmico (94,8:5:0,2).

Para a determinação da furosina, uma fase móvel desgaseificada foi preparada com 5 mM de heptano-sulfonato de sódio, incluindo 20 % de acetonitrila e 0,2 % de ácido fórmico. Uma coluna analítica Brownlee Validated C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) foi utilizada a 32 °C. A eluição foi isocrática e a taxa de fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 μ l e a detecção a 280 nm.

As análises de separação da furosina foram realizadas em um cromatógrafo Series 200, composto por um sistema de bomba binária com degasser, um amostrador automático, um detector ultravioleta-visível, uma coluna, forno e o software TotalChrom Workstation v.6.3.1 para aquisição e tratamento de dados (Perkin-Elmer, Massachusetts, EUA). Um moedor de grãos Cadence MDR 301, uma balança analítica Shimadzu AY 220, um agitador tipo vortex Phoenix AP 56 e uma centrífuga refrigerada de alta velocidade Hitachi CR22G3 foram utilizados para o passo de extração e determinação da furosina.

2.4 PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A furosina foi quantificada pelo método do padrão externo. A curva de calibração de 8 pontos foi construída a partir de uma solução estoque ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de furosina). Dez miligramas do padrão de furosina 97,3 %, (PolyPeptide Group, França) foram dissolvidos em uma solução HCl 0,1 M e o volume ajustado à 10 ml para produzir uma solução mãe de concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. As soluções-padrão de trabalho foram preparadas por diluição em série a partir da solução-mãe para obter as oito concentrações que variaram de 0,03-3,88 mg L^{-1} . Cada solução de trabalho (1 ml) foi passada através de um filtro de membrana em seringa de nylon de 0,22 μm , 15 mm de diâmetro (Sartorius, Alemanha) e 20 μl foram injetados na coluna de CLAE em três repetições. As áreas dos picos de furosina foram utilizadas para construir a curva de calibração. A equação de regressão linear foi calculada através de $y = ax \pm b$, onde x é a concentração e y a área do pico de furosina.

2.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO

Para verificar a confiabilidade dos resultados, foram selecionados os parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (intradia, interdia) e robustez.

2.5.1 Linearidade

A análise da regressão linear foi realizada com a média de oito concentrações diferentes ($n=3$), e a equação da regressão calculada foi $y = 45.114x + 2.296,5$. A linearidade da curva de calibração para a concentração versus área do pico da furosina foi analisada através do r (coeficiente de correlação) de 1. Portanto, a equação de regressão linear foi utilizada para calcular as concentrações das áreas dos picos correspondentes à furosina.

2.5.2 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de recuperação (DHOOGHE et al., 2008). Uma solução mãe de furosina ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada com HCl 0,1 M. Soluções-padrão de trabalho foram preparadas por diluição em série da solução mãe em HCl 0,1 M. Amostras torradas de amêndoas de cacau (30 mg), "C6" (Tabela 1), foram fortificadas com 0,02, 0,01,

0,004, 0,002 e 0,001 mg de furosina em três replicatas. Após esta etapa, seguiu-se a metodologia para a extração descrita por Delgado, Corzo, Santa-Maria, Jimeno e Olano (1992). A amostra seca foi dissolvida em 1 ml de uma mistura de água, acetonitrila e ácido fórmico (95:5:0,2) e 20 µl foram injetados na coluna de CLAE, como descrito anteriormente. A porcentagem de recuperação foi calculada como a quantidade de furosina recuperada/quantidade de furosina acrescentada x 100.

2.5.3 Precisão

A precisão foi avaliada pela determinação da repetibilidade intradia e precisão intermediária (interdia) (Bae, Jayaprakasha, Jifon, & Patil, 2012). A precisão foi determinada pela análise das amostras fortificadas “C6” preparadas dentro de um dia (intradia), e amostras de cacau “C1” em três dias diferentes (interdia) (ver Tabela 1). Amostras de amêndoas de cacau torradas (30 mg), “C6”, foram fortificadas com 0,02, 0,01, 0,004, 0,002 e 0,001 mg de furosina em três replicatas. As amostras foram extraídas tal como descrito acima, filtradas e injetadas na coluna de CLAE. O desvio padrão relativo (DPR %) do tempo de retenção e da concentração com base na área do pico de furosina foram usados para avaliar a precisão (BONFATTI, GRIGOLETTO, CECCHINATO, GALLO, & CARNIER, 2008).

2.5.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram avaliados a partir do método baseado em parâmetros da curva analítica. O limite de detecção foi expresso como: $LD = 3,3 * \sigma / S$, onde σ é a estimativa do desvio padrão dos coeficientes lineares das equações (interceptos-y) e S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica. Para calcular estes dados, uma curva analítica foi desenvolvida utilizando a matriz contendo o analito de interesse na faixa de concentração de 0,12-2 mg kg⁻¹.

Os parâmetros da curva e a estimativa do desvio padrão foram calculados através do software Microsoft Excel 2016. Para o limite de quantificação, os mesmos critérios de LD foram adotados, sendo calculado utilizando a relação entre a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e a inclinação da curva analítica (S), a partir da equação: $LQ = 10 * \sigma / S$ (ICH, 2005).

2.5.5 Seletividade

Seletividade mostra a capacidade de um método de obter resultados verdadeiros através da avaliação de interferência na região, ou em resolução mais baixa do que 1,5, do pico de interesse (SHABIR, 2003; ARAÚJO, 2009). A seletividade foi demonstrada através da não existência de qualquer pico de interferência na região do tempo de retenção da furosina.

2.5.6 Robustez

As variáveis adotadas para avaliar a robustez durante a injeção da amostra (C6 + dopagem de 0,01 mg) foram: temperatura do forno e proporção da fase móvel. Cada um destes parâmetros teve três variações e cada experimento foi desenvolvido em três replicatas. O desvio padrão relativo (DPR%) do tempo de retenção e da concentração com base na área do pico de furosina foi empregado para avaliar a robustez.

2.6 DETERMINAÇÃO DA FUROSINA EM AMÊNDOAS DE CACAU TORRADAS

O método descrito foi aplicado às amostras de amêndoas de cacau torradas sobre diferentes condições de tempo e temperatura (Tabela 1).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através da aplicação do teste Kruskal-Wallis. Na avaliação dos parâmetros do método, quando a hipótese nula H_0 foi rejeitada (p -valor $< 0,05$), considerou-se haver diferença significativa entre ao menos duas das respostas e posteriormente foi aplicado o teste de comparações múltiplas não-paramétricas através do software R x64 versão 3.2.1. Para avaliar o efeito das condições de torração das amêndoas sobre o teor de furosina resultante, e para a composição centesimal, foi também utilizado-se Kruskal-Wallis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA DE CACAU TORRADA SOB DIFERENTES TRATAMENTOS

O resultado da análise da composição centesimal das amêndoas de cacau após a etapa de secagem, sem torração, está exposto na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química da amostra de cacau após secagem.

Composição centesimal em base úmida (g 100g ⁻¹)				
Umidade	Cinzas	Proteína total	Lipídios totais	Carboidratos
5,90 ± 0,09	3,30 ± 0,07	16,57 ± 0,17	33,76 ± 0,19	40,92 ± 0,16
Composição centesimal em base seca (g 100g ⁻¹)				
Cinzas	Proteína total	Lipídios totais	Carboidratos	
3,51 ± 0,07	17,61 ± 0,17	35,88 ± 0,19	43,49 ± 0,16	

Valores expressos em média ± DP (desvio padrão), valores por g 100g⁻¹ (n=6).

A composição química das amêndoas de cacau, torradas sobre diferentes condições de tempo e temperatura, é mostrada na Tabela 3. A composição variou de acordo com o tempo e a temperatura de torração.

Tabela 3 – Efeito das condições de torração sobre a composição química dos cotilédones de cacau.

Amostra	Composição centesimal em base úmida (g 100g ⁻¹)				
	Umidade	Cinzas	Proteína total	Lipídios totais	Carboidratos
C1	5,45 ± 0,09 ^h	3,26 ± 0,07 ^{a,b}	15,53 ± 0,56 ^e	32,11 ± 0,55 ^d	43,72 ± 1,30 ^b
C2	5,20 ± 0,00 ^g	3,19 ± 0,03 ^a	15,21 ± 0,40 ^{d,e}	33,45 ± 2,18 ^{d,e}	42,95 ± 2,25 ^b
C3	4,96 ± 0,08 ^f	3,24 ± 0,02 ^b	15,22 ± 0,14 ^e	36,57 ± 0,38 ^f	40,01 ± 0,53 ^a
C4	3,84 ± 0,02 ^e	3,37 ± 0,05 ^c	14,50 ± 0,15 ^c	27,99 ± 2,29 ^{a,b}	50,30 ± 2,31 ^{d,e}
C5	3,13 ± 0,07 ^d	3,50 ± 0,08 ^{d,e}	14,46 ± 0,41 ^c	29,95 ± 1,40 ^{b,c}	48,96 ± 1,19 ^d
C6	2,79 ± 0,07 ^c	3,42 ± 0,07 ^{c,d,e}	14,81 ± 0,28 ^{c,d}	33,09 ± 0,84 ^{d,e}	45,89 ± 1,35 ^c
C7	1,25 ± 0,03 ^b	3,47 ± 0,01 ^e	14,59 ± 0,30 ^c	33,99 ± 1,01 ^e	46,70 ± 0,81 ^c
C8	1,23 ± 0,03 ^b	3,45 ± 0,04 ^{d,e}	13,39 ± 0,26 ^b	30,49 ± 0,40 ^c	51,44 ± 0,51 ^e
C9	1,09 ± 0,02 ^a	3,42 ± 0,02 ^{c,d}	12,43 ± 0,15 ^a	25,50 ± 1,00 ^a	57,56 ± 0,91 ^f
Amostra	Composição centesimal em base seca (g 100g ⁻¹)				
	Cinzas	Proteína total	Lipídios totais	Carboidratos	
C1	3,45 ± 0,07	16,43 ± 0,56	33,96 ± 0,55	46,24 ± 1,30	
C2	3,36 ± 0,03	16,04 ± 0,40	35,28 ± 2,18	45,30 ± 2,25	
C3	3,41 ± 0,02	16,01 ± 0,14	38,48 ± 0,38	42,10 ± 0,53	
C4	3,50 ± 0,05	15,08 ± 0,15	29,11 ± 2,29	52,31 ± 2,31	
C5	3,61 ± 0,08	14,93 ± 0,41	30,92 ± 1,40	50,54 ± 1,19	
C6	3,51 ± 0,07	15,24 ± 0,28	34,03 ± 0,84	47,21 ± 1,35	
C7	3,51 ± 0,01	14,77 ± 0,30	34,42 ± 1,01	47,29 ± 0,81	
C8	3,50 ± 0,04	13,56 ± 0,26	30,87 ± 0,40	52,08 ± 0,51	
C9	3,46 ± 0,02	12,57 ± 0,15	25,78 ± 1,00	58,19 ± 0,91	

Valores expressos em média ± DP (desvio padrão), valores por g 100g⁻¹ (n=6).

Valores com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05) de acordo com teste de comparações múltiplas não paramétricas.

Ver Tabela 1 para descrição das amostras.

A composição química das amêndoas de cacau tem sido estudada extensivamente. As mesmas, quando frescas, apresentam composição aproximada de 32 a 39% de água, 30 a 32% de gordura, 10 a 15% de proteínas e 4 a 6% de amido (KONGOR ET AL. 2016). A Tabela 3 demonstra como há influência da etapa de torração, com o aumento da temperatura e do tempo de torração dos grãos, nos nutrientes analisados. As mudanças ocorridas nas concentrações dos nutrientes das amostras, se deve ao progresso da Reação de Maillard de acordo com o aumento da temperatura.

Da Tabela 3, ressalta-se o teor de umidade apresentado, onde é possível perceber que conforme os tempos e temperaturas de torração foram aumentados, os teores de umidade diminuíram e todas as amostras diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), com exceção das amostras C7 e C8, que contemplaram valores em comum dentro seus respectivos valores ao nível de 95% de confiança. Na análise de cinzas foi observado um comportamento aleatório em relação aos teores obtidos, sendo que os menores valores encontrados, em 95% de confiança, foram das amostras C1 e C2, torradas sob a mesma temperatura, porém em tempos diferentes; já o maior valor encontrado foi para amostra C5, torrada a 120 °C por 40 minutos.

Em relação à proteína total, observando as amostras C1, C2 e C3, que competem ao mesmo nível de temperatura (80°C), observa-se que as mesmas não apresentaram diferença significativa entre si; o mesmo ocorreu para o bloco das amostras C4, C5 e C6, torradas em temperatura de 120 °C, cujas amostras também não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Já para o bloco das amostras C7, C8 e C9, torradas a 160°C, observou-se uma ligeira diminuição no teor total de proteínas conforme o tempo de torração e todas as amostras diferiram significativamente entre si (Tabela 3).

Para análise de lipídios totais (Tabela 3), nota-se que nas amostras torradas a 80°C ocorreu um ligeiro aumento do teor de gordura conforme a duração da torração. O mesmo comportamento incidiu nas amostras torradas a 120°C. Porém, para as amostras torradas a 160°C, houve comportamento inverso, sendo que com o passar do tempo, as amostras reduziram o teor de gordura, diferindo estatisticamente entre si. Analisando o teor de carboidratos, ressalva-se comportamento contrário ao da gordura total, onde os blocos de amostras torradas a 80 e 120°C apresentaram redução nos teores de carboidrato de acordo com o prolongamento do tempo de torração, e no bloco de amostras torradas a 160°C, houve um aumento do teor dos carboidratos.

Torres-Moreno et al. (2015), analisaram amêndoas de cacau provenientes de Gana e Equador. A composição química de amêndoas de cacau secas, originadas desses países, apresentaram os lipídios como o principal nutriente (>40%), seguido dos carboidratos (>32%) e proteínas (12-13%). A faixa do teor de fibras se estabeleceu entre 11 e 19%, já os teores de cinzas e umidade foram menores do que 6%. A composição das amêndoas de cacau pode variar de acordo com a origem geográfica (TORRES-MORENO et al., 2015).

Apesar de haver influência do tempo e da temperatura nos resultados obtidos das amostras C1 a C9, considerando-se, de maneira isolada, os blocos de amostras em relação à temperatura e depois, em relação ao tempo, constata-se que a temperatura exerce maior influência sobre as respostas (Tabela 3).

Durante o processo de torração os precursores do sabor e aroma são transformados em compostos de sabor e aroma. A relação direta entre aminoácidos, degradação de açúcares redutores e temperatura de torração é bem conhecida. A redução de aminoácidos durante a torração pode variar entre 24,1 e 71,8%, e a diminuição do teor de açúcares pode variar entre 47 e 60%. As variações dependem do cultivar, do método de fermentação, e da temperatura e do tempo de torração (SALTINI, AKKERMAN & FROSCHE, 2013; DE BRITO et al., 2001; SERRA BONVEHÍ & VENTURA COLL, 2002).

O decréscimo no teor de aminoácidos não é constante durante todo processo de torração. Ocorre principalmente durante os primeiros 30 minutos do processo, e está diretamente relacionado com a temperatura utilizada. Por outro lado, o decréscimo da taxa de açúcar depende da temperatura, e o teor de açúcar é constantemente diminuído durante a torração, até que todo o açúcar seja degradado (ROHAN & STEWART, 1967).

Em alguns casos, pode ser estabelecido o término da torração quando o teor de umidade nas amêndoas cai para 2%. O tempo requerido para isso depende dos parâmetros aplicados no processo (ŻYŻELEWICZ et al., 2014).

Para atividade de água, os valores encontrados para as amostras C1 a C9 (Tabela 1) foram: C1=0,523, C2=0,396, C3=0,287, C4=0,315, C5=0,264, C6=0,219, C7=0,115, C8=0,103, C9=0,093; mostrando que quanto maior o tempo e a temperatura de torração, menor a atividade de água.

3.2 EXTRAÇÃO DA FUROSINA EM FASE SÓLIDA E SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

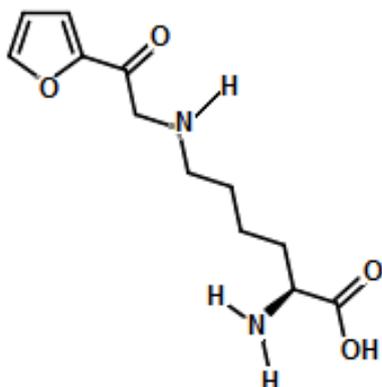
As condições da extração em fase sólida, realizada antes da injeção em CLAE, e as condições cromatográficas empregadas são demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições instrumentais estabelecidas para a determinação de furosina em amêndoas de cacau usando extração em fase sólida (EFS).

Volume da amostra EFS	500 µL
Coluna EFS	Sep-Pak C18 3mL (Waters)
Fase móvel	Ácido clorídrico 3M
Volume de amostra cromatográfica	20 µL
Coluna analítica	C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm)
Fase móvel	5mM de <i>heptano sulfonato de sódio com</i> 20% de acetonitrila e 0,2% de ácido fórmico
Fluxo	1.0 mL.min ⁻¹
Eluição	Isocrática
Temperatura	32°C
Deteção	UV a 280 nm

Do ponto de vista da estrutura molecular (Fig. 1), o aminoácido furosina pode ser separado por cromatografia líquida numa coluna C18 usando um detector ultravioleta (UV). O comprimento de onda de absorção utilizado foi de 280 nm.

Figura 1 – Estrutura química da furosina (ϵ -N-2-furoilmetil-L-lisina).



3.3 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO

3.3.1 Exatidão

A fim de avaliar a exatidão do método, um estudo de recuperação foi realizado pela adição do padrão de furosina em amostras de amêndoas de cacau C6 (Tabela 1), em cinco variações de massa (20, 10, 4, 2 e 1 μg). A média de recuperação para furosina variou de 89,29% a 108,92%, enquanto a porcentagem do desvio padrão relativo (DPR %) para a recuperação foi de 2,29 a 4,95 (Tabela 5).

Tabela 5 – Recuperações da adição de furosina nas amostras e estudo de precisão (intradia) para furosina.

Matriz	Recuperação da adição de furosina			Precisão Intradia (n=3)	
	Massa de furosina adicionada (μg)	Recuperação (%)	DPR (%)	Concentração (mg kg^{-1})	DPR (%)
Amêndoas de cacau	20	89,29 \pm 2,34 ^c	2,66	588,92 \pm 22,25	3,78
	10	101,97 \pm 4,14 ^{a, b}	4,06	301,84 \pm 9,50	3,15
	4	100,26 \pm 4,97 ^b	4,96	110,17 \pm 3,69	3,35
	2	108,93 \pm 2,51 ^a	2,30	58,12 \pm 0,76	1,30
	1	107,62 \pm 3,16 ^{a, b}	2,94	28,73 \pm 0,59	2,06

Valores de recuperação expressos em média \pm DP (desvio padrão), valores em % (n=3).

Valores de concentração expressos em média \pm DP (desvio padrão), valores em mg kg^{-1} (n=3).

Valores com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com teste de comparações múltiplas não-paramétricas.

DPR, desvio padrão relativo.

Os resultados indicam que o método foi exato para a determinação de furosina em amêndoas de cacau. Ao avaliar teobromonia, teofilina e cafeína em amêndoas de cacau,

Brunetto et al. (2007) encontraram valores de recuperação de 95 a 104%, com desvio padrão relativo de 3,20%, os quais consideraram como uma boa eficiência de extração.

Para Hube (1998), dopagens em concentrações em torno de 1 a 10 ppm aceitam uma recuperação de 80 a 110% do analito adicionado. As concentrações das dopagens utilizadas variaram de 0,123 a 2 ppm e obtiveram recuperação dentro da faixa estabelecida por Hube (1998).

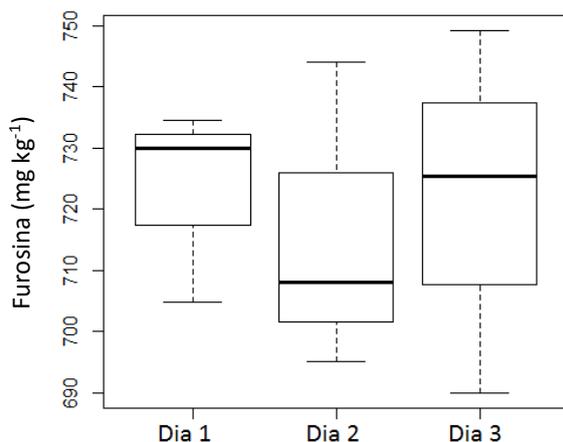
3.3.2 Precisão

A precisão do método intradia foi avaliada por meio de três repetições de dopagens em amostras C6 (Tabela 1) enriquecidas em cinco concentrações distintas de furosina. O DPR das respostas (n=3) variou de 1,29% a 3,77% (Tabela 5), o que demonstra boa concordância com os critérios de precisão de repetibilidade.

Brunetto et al. (2007), relatam valores de DPR < 2,98% para o caso de precisão intradia e interdia, o que confirmaram como uma boa precisão. Para Hube (1998), em amostras ambientais e de alimentos a precisão é muito dependente da matriz, da concentração do analito de interesse e da técnica de análise. Devido a esses fatores, o DPR pode variar entre 2% e mais de 20%.

Na Figura 2 é possível observar a demonstração gráfica, através do Box-whisker plot, dos valores da concentração de furosina para a análise de precisão intermediária.

Figura 2 – Box-whisker plot da concentração de furosina na análise de precisão interdia.



A precisão interdia do método foi avaliada utilizando a amostra C1 (Tabela 1), com três extrações em cada dia de análise. As mesmas foram conduzidas ao longo de um período de três dias de intervalo para cada injeção (n=3).

Tabela 6 – Estudo de precisão (interdia) para furosina.

	Interdia (n=3)			Média ± DP (Entre os dias)	DPR (%) (Entre os dias)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
Tempo de retenção (minutos)	8,67 ± 0,03 ^a	8,69 ± 0,03 ^a	8,71 ± 0,01 ^a	8,69 ± 0,02	0,25
Concentração furosina (mg kg ⁻¹)	723,05 ± 15,96 ^a	715,69 ± 25,34 ^a	721,53 ± 29,82 ^a	720,09 ± 3,89	0,54

Valores de tempo expressos em média ± DP (desvio padrão), valores em minutos (n=3).

Valores de concentração expressos em média ± DP (desvio padrão), valores em mg kg⁻¹ (n=3).

Valores com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com teste de comparações múltiplas não-paramétricas.

DPR, desvio padrão relativo.

O desvio padrão relativo para o tempo de retenção foi de 0,25% e da concentração de furosina foi de 0,54%. As variáveis analisadas, tempo de retenção e concentração de furosina, não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados (Tabela 6). Portanto, o método é exato e preciso para a detecção da furosina em amêndoas de cacau.

3.3.3 Linearidade

A análise de regressão linear foi realizada a partir da média (n = 3) de oito concentrações diferentes, e a equação de regressão foi obtida $y = 45.114x + 2.296,5$. A curva de calibração para a concentração versus área do pico de furosina (Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,9997$; coeficiente de correlação: $r = 1$) foi linear no intervalo de 0,03-3,88 mg kg⁻¹.

O coeficiente de correlação (r) próximo a um (Beer & Joubert, 2010) indica que a curva de calibração plotada foi linear sobre o intervalo de concentração utilizado. Portanto, a equação de regressão linear foi utilizada para calcular as concentrações das áreas dos picos.

3.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção correspondente foi 0,0007 mg kg⁻¹ e o limite de quantificação foi 0,002 mg kg⁻¹ (Tabela 7). As concentrações de furosina encontradas na quantificação das amostras, extraídas a partir de 30 mg, variaram na faixa de 0,003 a 3,06 mg kg⁻¹. Deste modo, os limites de quantificação e detecção apresentaram valores inferiores ao valor mínimo quantificado pelo método.

Tabela 7 – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para furosina.

Parâmetro	Concentração (mg kg ⁻¹)	r	Faixa de linearidade (mg kg ⁻¹)
LD	0,00076	0,9995	0,12-2,00
LQ	0,00236		

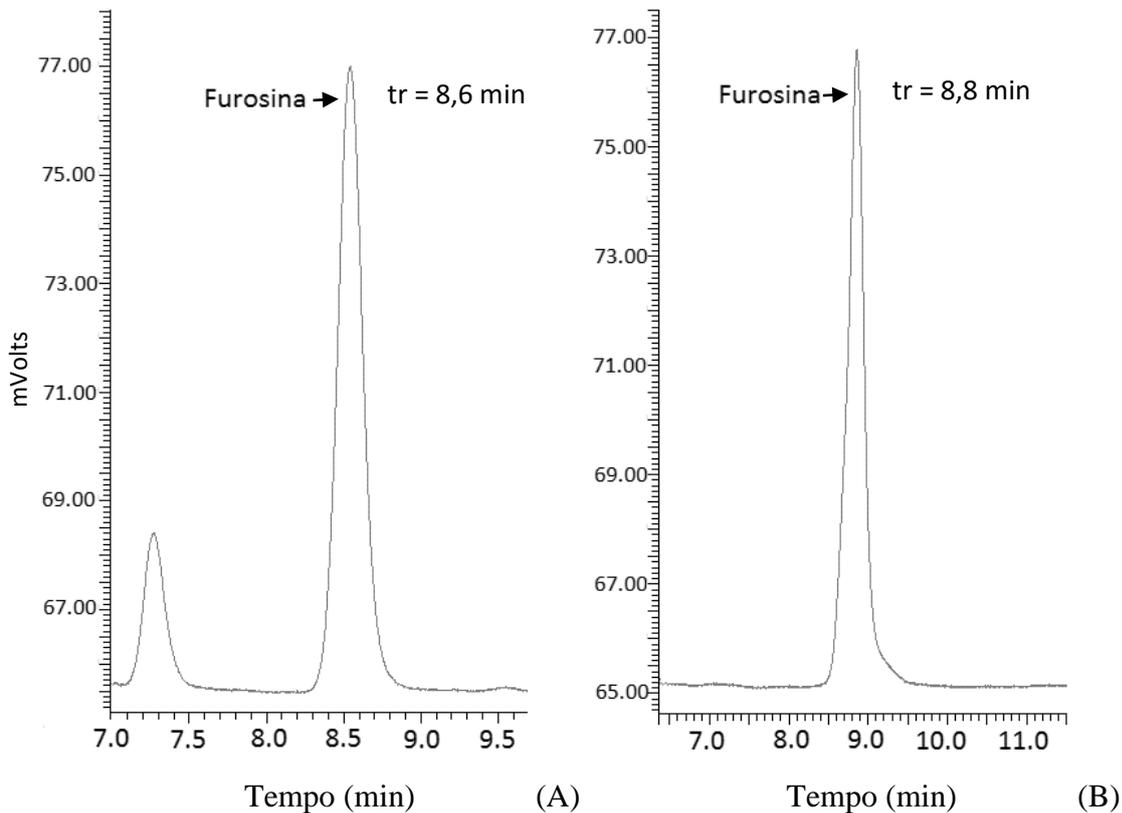
r, coeficiente de correlação.

O coeficiente de correlação entre os teores de furosina adicionados e as áreas correspondentes, utilizados para a construção da curva analítica, foi de 0,9995, o que demonstra uma forte correlação, evidenciando o bom desempenho do método nos termos aplicados.

3.3.5 Seletividade

A habilidade do método em produzir bons resultados foi demonstrada através da avaliação na região de interferência do pico de interesse. A ausência de quaisquer picos de interferência na região da furosina no cromatograma da amostra (Figura 3) suporta o bom desempenho do método desenvolvido para a extração e para a separação da furosina.

Figura 3 – Perfil de eluição para 20 μL da amostra “C1” de amêndoa de cacau (A); Cromatograma típico obtido para solução padrão de furosina a $3,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B).



Ver Tabela 1 para descrição das amostras.
Condições otimizadas na Tabela 4.

Na Figura 3 é apresentado um cromatograma com o perfil de eluição do comportamento do analito estudado, a furosina, na matriz de amêndoas de cacau, objeto deste estudo.

O pico da furosina se demonstra sem picos de interferência na região de detecção do composto, com boa resolução analítica. Também é apresentando um cromatograma típico obtido para solução padrão de furosina a $3,88 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.6 Robustez

Para robustez foram analisados os parâmetros de temperatura do forno e proporção da fase móvel, e avaliada a influência dos resultados na concentração de furosina e no tempo de retenção da mesma (Tabela 8). Na variação da temperatura do forno ($\pm 3^\circ\text{C}$), quando a mesma foi diminuída em relação à temperatura estabelecida pelo método utilizado, o valor da concentração de furosina diminuiu, esse decréscimo na concentração também foi observado quando a temperatura do forno foi aumentada em relação à temperatura de referência. Os valores das concentrações variaram estatisticamente ao nível de 5% de significância, sendo que o valor de temperatura que apresentou maior quantificação da furosina foi o estabelecido pelo método (32°C). O DPR em relação a concentração foi de 2,69 %, enquanto para o tempo de retenção foi de 3,43 %. Em relação ao tempo de retenção, os valores apresentaram comportamento contrário, ou seja, o tempo aumentou quando a temperatura do forno foi reduzida, e diminuiu quando a temperatura do forno foi elevada. Os valores apresentaram diferença significativa entre si ao nível de 5% de significância (Tabela 8).

Tabela 8 – Estudo da robustez para variação da temperatura do forno e da fase móvel.

Matriz amêndoas de cacau	Variação da temperatura do forno (n=3)			Média \pm DP	DPR (%)
	29°C	32°C	35°C		
Furosina (mg kg^{-1})	287,30 \pm 0,76 ^a	303,10 \pm 1,19 ^c	296,99 \pm 2,26 ^b	295,80 \pm 7,97	2,69
Tempo de retenção (min)	8,96 \pm 0,01 ^c	8,71 \pm 0,01 ^b	8,36 \pm 0,01 ^a	8,68 \pm 0,29	3,44
	Variação da fase móvel (FM) (n=3)				
	78%A 22%B	80%A 20%B	82%A 18%B	Média \pm DP	DPR (%)
Furosina (mg kg^{-1})	299,07 \pm 1,18 ^a	301,98 \pm 2,41 ^a	288,42 \pm 2,14 ^b	296,49 \pm 7,14	2,41
Tempo de retenção (min)	6,37 \pm 0,01 ^a	8,67 \pm 0,03 ^b	12,22 \pm 0,09 ^c	9,08 \pm 2,95	32,43

Valores de tempo e concentração de furosina expressos em média \pm DP (desvio padrão), valores por mg kg^{-1} (n=3).

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com teste de comparações múltiplas não-paramétricas.

DPR, desvio padrão relativo.

A fase móvel estabelecida pelo método é uma solução de 5mM de heptano sulfonato de sódio, incluindo 0,2% de ácido fórmico e 20% de acetonitrila. Para o parâmetro de robustez, a mesma foi dividida em duas soluções. Solução A: 6,25mM de heptano sulfonato de sódio, incluindo 0,2% de ácido fórmico, e solução B: acetonitrila. Quando se utilizou 80% da fase móvel A e 20% de B, ao passar na coluna de forma isocrática, a fase móvel se tornava composta por uma solução 5mM de heptano sulfonato de sódio, incluindo 0,2% de ácido fórmico e 20% de acetonitrila, como preconizado pelo método. Para a alteração da composição final da fase móvel, alterou-se a quantidade utilizada de A e de B.

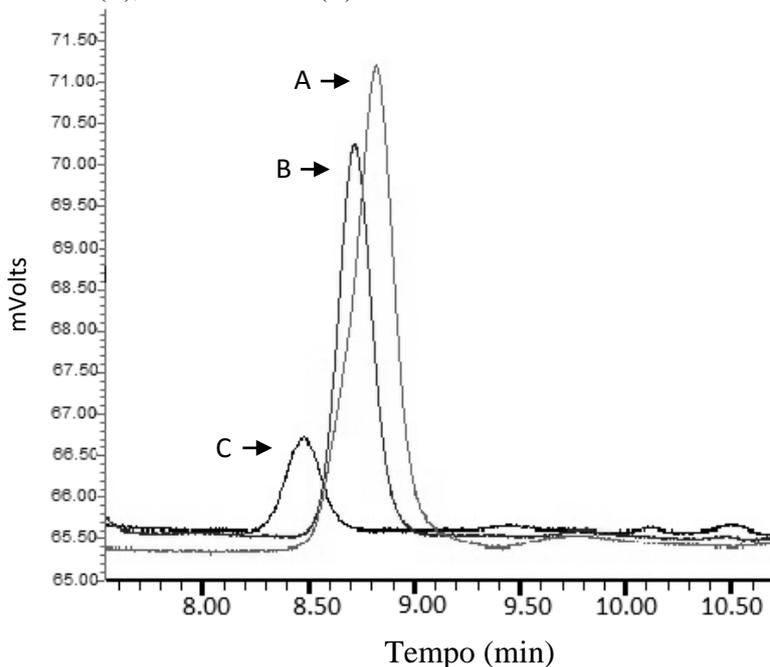
Na Tabela 8 são demonstrados os resultados para variação da proporção da fase móvel. O valor da concentração de furosina sofreu redução tanto quando a fase móvel A foi aumentada

quanto quando a mesma foi reduzida em relação ao valor estabelecido pelo método, porém, apenas a proporção da fase móvel 82%A e 18%B apresentou diferença significativa entre os valores ($p < 0,05$). O DPR entre as respostas para as três proporções estudadas foi de 2,41%. Em relação ao tempo de retenção, os valores diferiram drasticamente, tendo uma brusca diminuição quando a fase móvel A foi reduzida e um aumento quando a fase móvel A foi elevada, o DPR foi de 32,43% entre as médias dos tempos de retenção para as três proporções de fase móvel.

3.4 APLICAÇÃO

Através da Figura 4 é possível observar a sobreposição dos cromatogramas do padrão de furosina, da amostra C6 com dopagem e da amostra C6 pura, onde foi confirmado o pico de interesse e a ausência de picos de interferência na região do analito analisado.

Figura 4 – Perfil de CLAE para o padrão de furosina $1,94 \text{ mg L}^{-1}$ (A), amostra “C6” com dopagem de $0,01 \text{ mg}$ de furosina (B), e amostra “C6” (C).



Ver Tabela 1 para descrição das amostras.

Após verificar que o método apresentou parâmetros de avaliação aceitáveis, o mesmo foi aplicado em nove amostras de amêndoas de cacau torradas sobre diferentes condições (Tabela 1). A torração é a principal tecnologia de operação unitária durante o processamento do cacau; e determina as características dos processos químicos e físicos que ocorrem dentro das amêndoas em elevadas temperaturas, bem como a qualidade dos produtos finais em relação

ao aroma, sabor, cor e textura. Diversos estudos demonstraram que a temperatura e duração da torração afetam substancialmente as mudanças químicas e físicas ocorridas nas amêndoas de cacau (KONGOR et al., 2016).

As condições de torração das amêndoas de cacau geralmente variam entre 15 a 45 min com temperaturas entre 130 a 150°C (KRYSIK, 2006). O tempo e temperatura do processo de torração dependem de vários fatores, como a forma em que o cacau se encontra (amêndoas, nibs ou licor), o produto final desejado (chocolate escuro ou ao leite) e o tipo de cacau (Criolo ou Forasteiro) (KOTHE et al., 2013).

As condições ideais para o desenvolvimento da Reação de Maillard são altas temperaturas e baixo teor de umidade, e estas condições podem ser encontradas durante a torração (KONGOR et al., 2016; FENNEMA, 1996). O derivado de carbonila a partir da Reação de Maillard reage com os aminoácidos livres durante a degradação de Strecker. Isto causa a degradação de aminoácidos para aldeídos, os quais contribuem com o aroma. A degradação de Strecker de cada aminoácido específico produz um aldeído único com um aroma único (FENNEMA, 1996).

A formação de produtos da Reação de Maillard relacionada a sua fase inicial, os quais são geralmente produtos de rearranjo de Amadori, foi medida indiretamente através da análise de furosina (RESMINI, PELLEGRINO & BATTELLI, 1990; MAŁGORZATA, KONRAD & ZIELIŃSKI, 2016). A concentração da furosina analisada em amêndoas de cacau torradas sobre diferentes condições de tempo e temperatura, está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Efeito das condições de torração sobre o teor de furosina das amêndoas de cacau.

Amostra	Média	Desvio	DPR (%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
C1	717,21	23,56	3,28	699,59	703,83	708,06 ^a	726,01	743,96
C2	792,28	17,86	2,25	777,70	782,32	786,94 ^b	799,57	812,21
C3	748,26	33,49	4,48	715,05	731,37	747,69 ^{a,b}	764,87	782,04
C4	228,14	0,68	0,29	227,56	227,77	227,98 ^c	228,44	228,89
C5	157,59	2,33	1,48	154,92	156,79	158,67 ^d	158,93	159,19
C6	77,63	2,43	3,13	75,59	76,29	76,98 ^e	78,65	80,32
C7	3,47	0,14	3,97	3,358	3,39	3,42 ^f	3,52	3,62
C8	0,75	0,11	15,12	0,63	0,71	0,79 ^g	0,82	0,84
C9	1,02	0,30	29,46	0,69	0,89	1,08 ^g	1,18	1,28

Valores da concentração de furosina das amostras expressos em concentração mediana, valores por mg kg⁻¹ (n=3). Valores com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05), de acordo com teste de comparações múltiplas não-paramétricas.

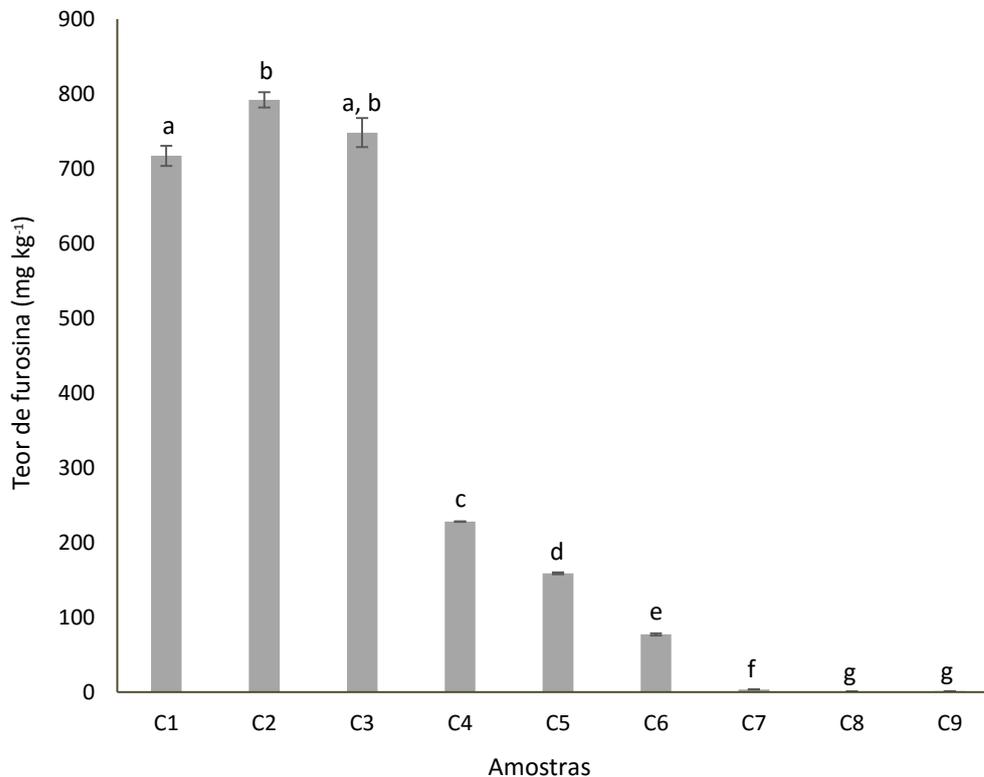
DPR, desvio padrão relativo (%).

Ver Tabela 1 para descrição das amostras.

O tempo de torração afetou o conteúdo total de furosina em alguns tratamentos e uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do conteúdo de furosina é observada de acordo com o aumento da temperatura.

Na Figura 5 observa-se um gráfico com distribuição em barras da concentração da furosina encontrada por tratamento (C1 a C9), onde é possível notar a influência, principalmente da temperatura, nessa concentração.

Figura 5 – Concentração média de furosina em amostras de amêndoas de cacau torradas sobre diferentes tempos e temperaturas.



Diferentes letras entre colunas demonstram que os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com teste de comparações múltiplas não-paramétricas. Erro padrão expresso por barra de erro vertical em cada coluna. (Ver Tabela 1 para descrição das amostras).

Analisando a Tabela 9, constata-se a grande influência da temperatura nos teores de furosina. Considerando o tempo de 20 minutos de maneira isolada e verificando a influência da torração nas temperaturas de 80, 120 e 160°C, todas as amostras, C1, C4 e C7, diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), (Tabela 9). O mesmo comportamento acontece quando o tempo de 40 minutos (C2, C5 e C8) e de 60 minutos (C3, C6 e C9) são isolados, a temperatura novamente apresenta extensiva ação sobre as concentrações. Por conseguinte, o controle da temperatura de torração exerce enorme influência nas concentrações de furosina.

Quando se analisa a Tabela 9 de maneira a isolar a temperatura e verificar a mudança nos teores de furosina em relação ao tempo, percebe-se que, apesar de haver diferença significativa entre algumas amostras ($p < 0,05$), as mesmas se encontram em uma faixa mais restrita de concentração. Quando se considera, por exemplo, o bloco C1, C2 e C3, torrados a 80°C por 20, 40 e 60 minutos, observa-se que a média das concentrações está na faixa média de 717 a 792 mg kg⁻¹, apesar das amostras apresentarem diferença significativa entre si ($p < 0,05$). Neste caso, a amostra C1 diferiu de C2 porém, a amostra C3 não diferiu de C1 ou de C2, pois compreende valores de intersecção ao nível de 95% confiança. Para o bloco de amostras C4, C5 e C6, todas as amostras diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$) e nota-se que houve uma maior variação entre os teores encontrados, estabelecendo-se as médias entre 77 e 228 mg kg⁻¹ (Tabela 9). Para o grupo de amostras torradas a 160°C, observa-se que apenas a amostra C7 diferiu das demais, enquanto que a C8 e C9 contemplam valores em comum em relação aos valores de intersecção ao nível de 95% de confiança. Constata-se também que as médias para essa temperatura de torração variaram entre 0,75 e 3,47 mg kg⁻¹, diferindo em grande escala das médias do primeiro e do segundo bloco de torração em relação à temperatura.

Quando se refere ao desvio padrão (Tabela 9), percebe-se que os mesmos diminuíram sua variação de acordo com a redução nos teores de furosina, ou seja, nos maiores teores encontrados, no bloco de temperatura de 80°C, o desvio padrão variou de 17 a 33, enquanto que no bloco a 120°C variou de 0,67 a 2,42 e no bloco de 160°C, variou de 0,11 a 0,30. Em contrapartida, as amostras C7 a C9 foram as que apresentaram maior desvio padrão relativo.

A furosina é o indicador mais específico e mais importante da fase inicial da Reação de Maillard e é frequentemente usado como um marcador para avaliar a severidade do tratamento térmico de alimentos, tais como leite esterilizado ou pasteurizado, cereais, mel, alimentos infantis, e suplementos de esporte (Erbersdobler & Somoza, 2007).

Małgorzata, Konrad & Zieliński (2016), observaram o aumento do teor de furosina em amostras de trigo sarraceno, torradas em temperatura de 160°C, com o passar do tempo (30, 40 e 50 minutos), e ausência de furosina em grãos do trigo sarraceno sem torração. Os valores encontrados em mg kg⁻¹ para as amostras foram de 37,85 para torração de 30 minutos, 51,22 para 40 minutos e 57,83 para 50 minutos.

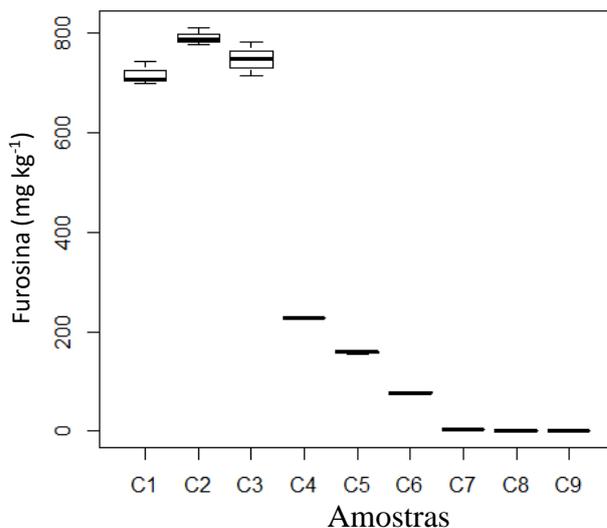
O estudo de Van Boekel (1998), mostrou que o teor de furosina em leite foi fortemente dependente do tempo e temperatura do processo e Žilić et al. (2014), encontraram um aumento significativo no teor de furosina durante a extrusão, aquecimento por infravermelho e micro-ondas em soja.

Trevisan et al. (2016), analisaram quatro preparações de hambúrgueres, sendo: grelhados, empanados fritos, assados e cozidos em água. Para a temperatura de 80 °C, altas concentrações de furosina foram observadas: 60,5 mg 100 g⁻¹ proteína (grelhados) e 77 mg 100 g⁻¹ proteína (fritos). Os hambúrgueres cozidos em água apresentaram um nível de furosina 10 vezes menor do que nas demais preparações. Os grelhados e fritos em temperatura interna abaixo de 90 °C foram os principais na formação da furosina. Quando a temperatura alcançou de 90 a 110 °C, o conteúdo de furosina caiu em 36%. Isso se deve a degradação da furosina de acordo com o progresso da Reação de Maillard, gerando os chamados produtos intermediários e finais da Reação. Os assados, que variaram de 180 a 300 °C, apresentaram valores inferiores aos grelhados e fritos. Porém, em condições mais intensas de aquecimento, produtos de Amadori sofrem degradação significativa e uma subsequente redução nos níveis de furosina é esperada (DELGADO-ANDRADE, SEIQUER, NAVARRO, & MORALES, 2007). Comportamento este que corrobora com o presente estudo.

Foi encontrada uma correlação entre o teor de furosina e o tempo prolongado de torração de pão de trigo no estudo de Ramírez-Jiménez, Garcia-Villanova, and Guerra-Hernandez (2000). Torrar fatias de pão por 7 minutos causou um aumento no nível de furosina, e o prolongamento desse tempo de torração resultou num decréscimo deste nível.

O box-whisker plot, demonstração gráfica exposta na Figura 6, evidencia os resultados da quantificação da furosina em 9 amostras de cacau, onde observa-se a dispersão dos dados organizados em blocos.

Figura 6 – Box-whisker plot da concentração de furosina em amostras de amêndoas de cacau.



Ver Tabela 1 para descrição das amostras.

Em um estudo recente, Masotti et al. (2016), encontraram valores de furosina de 328,2 mg 100g⁻¹ de proteína para concentrado proteico de soro microparticulado e 172,5 mg de furosina por 100g de proteína para concentrado proteico de leite. Para proteína isolada de soro foi encontrado valor de furosina de 18,8 mg 100g⁻¹ de proteína. Michalska et al. (2016), avaliaram o efeito dos parâmetros de secagem na formação de furosina em ameixas e demonstraram que o nível de furosina aumentou drasticamente de acordo com o aumento da temperatura de secagem. Boitz & Mayer (2015), analisaram o teor de furosina em amostras de creme de leite, como indicador térmico. Os teores de furosina foram de 47,8 ± 14,0, 72,2 ± 36,6, e 172,5 ± 17,7 mg 100g⁻¹ proteína para amostras de creme de leite pasteurizadas, com vida de prateleira estendida (ESL - extended shelf life), e ultra alta temperatura (UHT), respectivamente. Delgado-Andrade, Rufián-Henares & Morales (2007), analisaram o teor de furosina em cereais matinais (mg de furosina por 100g de proteína), e relataram valores de 152 ± 11,5 para cereal de milho, 313 ± 69,3 para cereal de trigo e 417 ± 71,3 para cereal de arroz.

Durante a torração, há evaporação dos ácidos voláteis das amêndoas causando uma redução na acidez. A alta temperatura de torração reduz a acidez, especificamente os ácidos voláteis com baixo ponto de ebulição, como o acético, fazendo as amêndoas de cacau menos ácidas. Os ácidos menos voláteis, como oxálico, cítrico, tartárico, succínico e láctico permanecem inalterados por um grande período durante o processo de torração (KONGOR et al., 2016; AFOAKWA et al., 2008).

Precusores de sabor como aminoácidos livres, peptídeos de cadeia curta, e açúcares redutores produzidos durante a fermentação e processo de secagem, sofrem a Reação de Maillard, degradação de Strecker, durante a torração para produzir compostos de sabor desejáveis, como pirazinas, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, furanos, triazoles, pironas, ácidos, aminas, iminas, oxazoles, pirroles e éteres (COUNET et al., 2002).

Ioannone et al. (2014), em seu estudo sobre amêndoas de cacau, apresentaram que as diferentes condições de processamento aplicadas durante a torração causaram diferenças drásticas nos teores de flavonoides, proantocianidinas e atividade antioxidante. Em particular, a alta temperatura e curto período de tempo (ATCT) de torração preservou melhor o teor de polifenóis do que a baixa temperatura por longo tempo (BTLT), enquanto que essa tendência não foi observada para a atividade antioxidante, que geralmente é maximizada por processos BTLT. Os autores afirmam que desde que a biodisponibilidade e função de polifenóis no metabolismo humano tem sido amplamente investigada e que a sua bio-eficácia é geralmente aceita, os processos de ATCT são recomendáveis por preservar as propriedades funcionais do

cacau a ser torrado; no entanto, outros índices de qualidade também devem ser tomados em consideração a fim de satisfazer a exigência do mercado (IOANNONE et al., 2014).

Quando se pondera diretamente para a aceitabilidade do aroma e sabor, vários estudos investigam a melhor combinação de tempo e temperatura de torração. No entanto, essas melhores combinações diferem bastante de estudo para estudo. Esta heterogeneidade é provavelmente causada pelo fato de que o cacau produzido, mesmo com pequenas diferenças nas práticas dos agricultores, apresentam diferentes melhores combinações de tempo e temperatura no processo de torração. Por esta razão, é extremamente importante conhecer como os grãos de cacau foram beneficiados pelo produtor, a fim de estar ciente do potencial de sabor, e, assim, definir os parâmetros de processamento ideais. Sabe-se que os grãos de cacau submetidos a um processo de torração impróprio geram compostos de sabor indesejáveis, por exemplo, se os grãos de cacau não forem torrados o suficiente, o chocolate resultante será muito amargo e se os grãos forem torrados demais, aromas de queimado e outros indesejados serão desenvolvidos (SALTINI, AKKERMAN & FROSCH, 2013; JINAP et al., 1998; SERRA BONVEHÍ & VENTURA COLL, 2002).

Rocha (2015), avaliou sensorialmente amostras de chocolates elaborados a partir de amêndoas de cacau torradas sob as mesmas condições deste estudo. A autora demonstrou, em relação à aceitação dos chocolates, que as amostras torradas sob as mesmas condições de C1 a C9 (Tabela 1) não apresentaram diferença significativa entre si em relação à aparência ($n=60$), e C1 a C6 não apresentaram diferença significativa entre si ($p<0,05$) em relação aos atributos aroma, sabor, textura e qualidade global porém, diferiram significativamente de C7 a C9, sendo que estas últimas apresentaram as menores notas para estes atributos ($p < 0,05$).

Torres-Moreno et al. (2011), corroboram com este resultado no que diz respeito à aceitabilidade do sabor e da qualidade global dos chocolates, onde os que foram produzidos com cacau submetido a maior tempo de torração foram os menos aceitos. Rocha (2015) também demonstrou, em relação à intenção de compra dos provadores, maior rejeição das amostras torradas a 160°C , as quais não diferiram em relação a este fator de amostras torradas a 80 e 120°C porém, os maiores percentuais de aceitação na avaliação da intenção de compra foram para as temperaturas de 120°C .

Rocha (2015) também retratou dados que se referem à análise descritiva quantitativa de chocolates elaborados com amêndoas referentes a torração C1 até C6 (Tabela 1), e demonstrou que as torradas a 80°C apresentaram maiores notas em relação aos atributos cor marrom e sabor adocicado, enquanto que as torradas a 120°C apontaram notas superiores para os atributos cor avermelhada e sabor amargo. Rocha (2015), também afirmou que as amostras de chocolate

desenvolvidas com amêndoas torradas nas condições de C1 a C6, não retrataram valores significativamente diferentes para os atributos brilho, aroma e sabor de chocolate, gosto ácido, firmeza, derretimento e fraturabilidade ($p < 0,05$). E demonstrou que as amostras torradas a 120°C apresentaram as maiores notas de aceitação em relação ao sabor. Ademais, Rocha (2015) explicitou que a temperatura teve mais efeito sobre as amostras do que o tempo de torração, corroborando assim com o presente estudo.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo revelaram que ambas as variáveis, ou seja, os parâmetros tempo e temperatura de torração, afetam a concentração do composto da Reação de Maillard, furosina, em amêndoas de cacau; havendo maior influência da temperatura sobre os teores encontrados. A formação desse composto deve ser levada em consideração para otimizar o processamento do cacau, juntamente com a formação do aroma e sabor do mesmo.

O processo para o aprimoramento da ciência sobre a influência dos graus de torração no desenvolvimento dos precursores de aroma do chocolate, desenvolvido durante o presente estudo, oferece a possibilidade de realizar importantes experimentos num futuro próximo. Considerando a alta variabilidade que o pré-processamento do cacau fornece, da forma como é realizado mundialmente, o presente estudo colabora para uma padronização no processo de torração de acordo com a melhor combinação do binômio tempo e temperatura, além de proporcionar informação sobre a formação dos produtos da Reação de Maillard (PRMs) em amêndoas de cacau e, conseqüentemente, colaborar com as pesquisas na área.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto “Estudo de fatores envolvidos no pré-processamento do cacau: uma contribuição para a padronização e melhoria de qualidade da matéria-prima na produção de chocolates” de número de processo 477403/2012-3, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa fornecida, possibilitando a realização do mestrado, ao Laboratório de Pescado (LAPESCA), sob coordenação da professora Janice Izabel Druzian, proporcionando a execução prática do projeto.

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O., PATERSON, A., FOWLER, M., & RYAN, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 840–857.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2005). **Official Methods of Analyses**. 18^a ed. Washington D.C.
- ARAÚJO, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224–2234.
- BAE, H., JAYAPRAKASHA, G. K., JIFON, J., & PATIL, B. S. (2012). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. **Food Chemistry**, v. 130, p. 751–758.
- BOITZ, L. I., MAYER, H. K. (2015). Evaluation of furosine, lactulose and acid-soluble β -lactoglobulin as time temperature integrators for whipping cream samples at retail in Austria. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 24-31.
- BONFATTI, V., GRIGOLETTO, L., CECCHINATO, A., GALLO, L., & CARNIER, P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 101–106.
- BRUNETTO, M. DEL R., GUTIÉRREZ, L., DELGADO, Y., GALLIGNANI, M., ZAMBRANO, A., GÓMEZ, A., RAMOS, G., ROMERO, C. (2007). 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.
- CARRILLO, L. C., LONDOÑO-LONDOÑO, J., & GIL, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. **Food Research International**, v. 60, p. 273-280.
- COUNET, C., CALLEMIEN, D., OUWERX, C., & COLLIN, S. (2002). Use of Gas Chromatography-Olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50(8), p. 2385–2391
- BEER, D. DE, & JOUBERT, E. (2010). Development of HPLC method for *Cyclopia subternata* phenolic compound analysis and application to other *Cyclopia* spp. **Journal of Food Composition and Analy**, v. 23, p. 289-297.
- DE BRITO, E. S., GARCÍA, N. H. P., GALLÃO, M., CORTELAZZO, A. L., FEVEREIRO, P.S., & BRAGA, M. R. (2001). Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 281–288.

DELGADO-ANDRADE, C., RUFÍAN-HENARES, J. A., & MORALES, F. J. (2007). Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. **Food Chemistry**, v. 100, p. 725-731.

DELGADO-ANDRADE, C., SEIQUER, I., NAVARRO, M. P., & MORALES, F. J. (2007). Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 341–351.

DELGADO, T., CORZO, N., SANTA-MARÍA, G., JIMENO, M. L., & OLANO, A. (1992). Determination of furosine in milk samples by ion-pair reversed phase liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 33, p. 374–376.

DHOOGHE, L., MESIA, K., KOHTALA, E., TONA, L., PIETERS, L., VLIETINCK, A. J., et al. (2008). Development and validation of an HPLC-method for the determination of alkaloids in the stem bark extract of *Nauclea pobeguinii*. **Talanta**, v. 76, p. 462–468.

ERBERSDOBLER, H. F., & SOMOZA, V. Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. (2007). **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 423–430

FARAH, D. M. H., ZAIBUNNISA, A. H., & MISNAWI (2012). Optimization of cocoa beans roasting process using Response Surface Methodology based on concentration of pyrazine and acrylamide. **International Food Research Journal**, v. 19, p. 1355–1359.

FENNEMA, O. R. (1996). Food Additives. **In Food chemistry**, 3rd edn. New York: Taylor and Francis. p. 768–823.

HUBE, L. (1998). Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. **LC/GC Magazine**, Version February, v. 21, p. 1-17.

IOANNONE, F., DI MATTIA, C.D., DE GREGORIO, M., SERGI, M., SERAFINI, M., SACCHETTI, G. (2014). Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. **Food Chemistry**, v. 174, p. 256-262.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. (2005). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**.

JINAP, S., ROSLI, W. I.W., RUSSLY, A. R., & NORDIN, L. M. (1998). Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 441-448.

KONGOR, J.E., HINNEH, M., DE WALLE, D.V., AFOAKWA, E.O., BOECKX, P. & DEWETTINCK, K., Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - a review, **Food Research International** (2016), doi: 10.1016/j.foodres.2016.01.012

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

- KRYSIAK, W. (2006). Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 449–453.
- MALGORZATA, W., KONRAD, P. M., ZIELIŃSKI, H. (2016). Effect of roasting time of buckwheat groats on the formation of Maillard reaction products and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 355-358.
- MASOTTI, F., CATTANEO, S., STUKNYTĚ, M., DE NONI, I. (2016). An analytical approach to reveal the addition of heat-denatured whey proteins in lab-scale cheese making. **Food Control**, v. 63, p. 28-33.
- MICHALSKA, A., HONKE, J., ŁYSIAK, G., ANDLAUER, W. (2016). Effect of drying parameters on the formation of early and intermediate stage products of the Maillard reaction in different plum (*Prunus domestica* L.) cultivars. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 932-938.
- MOTAMAYOR, J. C., RISTERUCCI, A. M., LOPEZ, P. A., ORTIZ, C. F., MORENO, A., & LANAUD, C. (2002). Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, v. 89, p. 380–386.
- N'GORAN, J. A. K., LAURENT, V., RISTERUCCI, A. M., & LANAUD, C. (1994). Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. Using RFLP and RADP markers. **Heredity**, v 73, p. 589–597.
- ORACZ, J., & NEBESNY, E. (2014). Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different *Theobroma cacao* cultivars. **Food Research International**, v. 55, p. 1-10.
- RADA-MENDOZA, M., SANZ, M. L., OLANO, A., & VILLAMIEL, M. (2004). Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. **Food Chemistry**, v. 85, p. 605–609.
- RAMLI, N., HASSAN, O., SAID, M., SAMSUDIN, W., & IDRIS, N. A. (2006). Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, p. 280–298.
- RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A., GARCIA-VILLANOVA, E., & GUERRA-HERNANDEZ, B. (2000). Browning Indicators in Bread. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4176–4181.
- RESMINI, P., PELLEGRINO, L., BATTELLI, G. (1990). Accurate quantitation of furosine in milk and dairy products by direct HPLC method. **Italian Journal of Food Science**, v. 2, p. 173–183.
- ROCHA, I. S. (2015). **Influência do tempo e temperatura de torração de amêndoas de cacau nas características sensoriais de chocolates**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, p. 47-70.
- ROHAN, T. A., & STEWART, T. (1967). Precursors of chocolate aroma: studies in the degradation of amino acids during the roasting of Accra cocoa beans. **Journal of Food Science**, v. 32, p. 625-629.

SALTINI, R., AKKERMAN, R., & FROSCHE, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, p. 167-187.

SERRA BONVEHÍ, J., & VENTURA COLL, F. (2002). Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalized cocoa powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3743-3750.

SHABIR, G. A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonisation. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57–66.

SUKHA, D. A., RAMNATH, N., & BUTLER, D. R. (2004). Trends in flavour profiles and pyrazine compounds of cocoa liquor samples evaluated over three growing seasons for the CFC/ICCO/INIAP flavour project. St. Augustine, Trinidad: Cocoa Research Unit, **U.W.I. Annual report**, p. 53-61.

TAŞ, N., G., & GÖKMEN, V. (2015). Effect of alkalization on the Maillard reaction products formed in cocoa during roasting. **Food Research International**, doi:10.1016/j.foodres.2015.12.021.

TORRES-MORENO, M., TORRESCASANA, E., SALAS-SALVADÓ, J., & BLANCH, C. (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. **Food Chemistry**, v. 166, p. 125-132.

TORRES-MORENO, M., TARREGA, A., COSTELL, E., & BLANCH, C. (2011). Dark chocolate acceptability: influence of cocoa origin and processing conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 404-411.

TREVISAN, A. J. B., LIMA, D. DE A., SAMPAIO, G. R., SOARES, R. A. M., BASTOS, D. H. M. (2016). Influence of home cooking conditions on Maillard reaction products in beef. **Food Chemistry**, v. 196, p. 161-169.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reaction in milk. **Food Chemistry**, v. 62, p. 403–414.

ŽILIĆ, S., MOGOL, B. A., AKILLIOĞLU, G., SERPEN, A., DELIĆ, N., & GÖKMEN, V. (2014). Effects of extrusion, infrared and microwave processing on Maillard reaction products and phenolic compounds in soybean. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 45–51.

ŻYŻELEWICZ, D., KRYSIAK, W., BUDRYN, G., ORACZ, J., & NEBESNY, E. (2014). Tocopherols in cocoa butter obtained from cocoa bean roasted in different forms and under various process parameters. **Food Research International**, v. 63, p. 390-399.

ŻYŻELEWICZ, D., BUDRYN, G., KRYSIAK, W., ORACZ, J., NEBESNY, E., & BOJCZUK, M. (2014). Influence of roasting conditions on fatty acid composition and

oxidative changes of cocoa butter extracted from cocoa bean of Forastero variety cultivated in Togo. **Food Research International**, v. 63, p. 328-343.