



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Centro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CCQA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

GIOVANA GATTI LOPES

**Microbiota do cacau durante a fermentação e processamento “bean to
bar” e seu efeito no chocolate**

CAMPINAS -SP

2023

GIOVANA GATTI LOPES

Microbiota do cacau durante a fermentação e processamento “bean to bar” e seu efeito no chocolate

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aluno: Giovana Gatti Lopes

Orientador: Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Giovana Gatti Lopes e orientada pelo Prof(a). Dr(a). Marta Hiromi Taniwaki

CAMPINAS

2023

Agência(s): O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Nº do processo: 2020/04096-6, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

L864m Lopes, Giovana Gatti

Microbiota do cacau durante a fermentação e processamento "bean to bar" e seu efeito no chocolate. / Giovana Gatti Lopes. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: Ital, 2023.

102 f.

Orientadora: Dra. Marta Hiromi Taniwaki

1. Cacau. 2. Bean to bar. 3. Microbiota. 4. Aflatoxinas. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Lopes, Giovana Gatti. III. Título.

Título em inglês: Cocoa microbiota during bean to bar fermentation and processing and its effect on chocolate

Key-words: Cocoa, mycobiota, fungi, aflatoxins.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Marta Hiromi Taniwaki, Valdecir Luccas, Neusely da Silva, Marcelo Morgano, Beatriz Thie Iamanaka (suplente)

Data da Defesa: 28 de fevereiro de 2023

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Giovana Gatti Lopes, aprovada pela Comissão Julgadora em 28/02/2023.

**Profa Dra Marta Hiromi Taniwaki
ITAL/CCQA - (Presidente)**

**Prof. Dr. Valdecir Luccas
Cereal Chocotec (titular)**

**Dra Neusely da Silva
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos – CCQA
(titular)**

**Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano (suplente)
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos – CCQA
(suplente)**

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico à minha vó Benedita (in memoriam),
aos meus pais Marta e Ailson por
me ajudarem e incentivarem meus estudos,
ao meu marido por me apoiar e consolar,
e ao povo Brasileiro dedicado a preservação ambiental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Dra. Marta Hiromi Taniwaki por todo apoio durante o projeto. Por todas as dúvidas esclarecidas, incentivos, críticas e apoio as minhas aventuras pelo cacau. Pude ver um pouco do amor de Deus comigo através de você.

A Dra Beatriz Thie Iamanaka e a Tamara Oliveira, pela paciência e dedicação em me ensinarem a metodologia para aflatoxinas. Além de passarem dias quebrando a cabeça comigo para solucionar os mistérios do HPLC. Gratidão!

Ao meu marido João, por todo apoio e consolo durante os momentos difíceis. Paciência com as minhas crises e cuidado durante todos esses anos. Obrigado por fazer tanto por mim. Te amo!

Aos meus pais, Marta e Ailson, por todo incentivo aos meus estudos. Não deixaram nunca me faltar nada, sempre me ajudando a continuar minha vida acadêmica. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão.

Ao árduo trabalho do Dr. Marcelo Morgano, por ajudar em todo o processo para conseguirmos o financiamento da Fapesp. Permitindo que nossas viagens ocorressem para coleta de amostras pelo Brasil.

As minhas companheiras de laboratório, Gabi, Josimara, Josiane, Adelaide, Silvia, Fabiana, Patrícia, Dri, Júlia e Caio. Por me ajudarem nos perrengues do laboratório e me proporcionar ótimas risadas durante o expediente.

Agradeço também a todo suporte e apoio da FAPESP pelo processo 2020/161706 e do ITAL, pela oportunidade de seguir meu sonho de realizar um mestrado. Bem como contribuir financeiramente com o auxílio da pesquisa.

Sem vocês nada disso seria possível! Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Atendendo ao mercado de chocolates finos, artesanais e agroecológicos surgem empresas denominadas *bean to bar*, com controle total sobre a cadeia produtiva, estabelecendo níveis criteriosos para compra de cacau. A principal etapa para formação de sabores é a fermentação, que ocorre de forma espontânea através dos microrganismos do ambiente, do fruto, do cocho e dos utensílios. Nestas condições, os objetivos do projeto foram identificar os microrganismos presentes na fermentação de diferentes *terroirs* dos estados do Pará, Bahia e Amazonas. Além de avaliar a ocorrência de aflatoxinas nos chocolates *bean to bar* do comércio. Foram coletadas 46 amostras de cacau em diferentes estágios: fruto do pé, da fermentação e da secagem nos estados da Bahia e Pará e 94 amostras de chocolates *bean to bar* do comércio. A contagem total de bolores e leveduras foi realizada por plaqueamento direto no meio ágar DG18. A contagem total de bactérias lácticas e acéticas foi realizada no meio MRS e PDA acidificado, respectivamente. As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram extraídas e a limpeza foi realizada em coluna de imunoafinidade específica. A detecção foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HLPC). O número de colônias fúngicas isoladas foi de 421, sendo a maior representatividade no processo primário de produção. As espécies de maior ocorrência foram: *Absidia corymbifera*, *Byssochlamys* sp., *Penicillium roquefort*, *Aspergillus* section *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* e leveduras. Durante a fermentação das amêndoas da cidade de Mocajuba-PA, a contagem de bactérias lácticas, acéticas e leveduras variou de $2,1 \times 10^5$ a $3,0 \times 10^2$; $3,0 \times 10^5$ a <10 e $7,3 \times 10^5$ a <10 durante os 5 dias de fermentação, respectivamente. A presença de bolores só ocorreu no primeiro dia com contagem de $2,0 \times 10^2$. Já na fermentação das amêndoas da cidade de Arataca-BA a contagem de bactérias lácticas, acéticas e leveduras variou de $6,2 \times 10^5$ a $5,8 \times 10^2$, $16,7 \times 10^5$ a 1×10^2 e 12×10^5 a 4×10^2 nos 5 dias de fermentação, respectivamente. A presença de bolores só ocorreu no primeiro dia com contagem de $4,9 \times 10^2$. As amostras de chocolate *bean to bar* do mercado apresentaram níveis de aflatoxinas dentro do valor permitido. Foi constatado que quanto maior o teor de cacau no chocolate, maior é a contaminação por aflatoxinas.

Palavras chave: Cacau; bean to bar; microbiota; aflatoxinas.

ABSTRACT

Attending the market of fine, artisanal and agroecological chocolates, some companies called “*bean to bar*” have appeared, with total control over the production chain, establishing careful criteria for purchasing cocoa beans. The main stage for the formation of flavors is fermentation, which occurs spontaneously through microorganisms from the environment, cocoa fruits and through the utensils. Under these conditions, the objectives of the present project were to identify the microorganisms present in the fermentation of different *terroirs* from the states of Pará, Bahia and Amazonas. Besides that, the project analyzed 94 samples of bean to bar chocolate from the market. Forty-four samples of different stages of cocoa were collected: fresh fruits from tree, at fermentation and at drying in the states of Bahia and Pará were collected. The total count of molds and yeasts was performed by direct plating on DG18 agar medium. The total count of lactic and acetic bacteria was performed on MRS and acidified PDA medium, respectively. The aflatoxins B1, B2, G1 and G2 was extracted and cleaned up through specific immunoaffinity column. The detection was performed on a high-performance liquid chromatograph (HPLC). The number of isolated fungal colonies was 421, with the highest representation at the primary production process. The most frequent species were: *Absidia corymbifera*, *Byssochlamys* sp., *Penicillium roquefort*, *Aspergillus* section *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* and yeasts. During the bean fermentation in Mocajuba-PA city, the count of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts ranged from 2.1×10^5 to 3.0×10^2 ; 3.0×10^5 to <10 and 7.3×10^5 to <10 during the 5 days of fermentation, respectively. The presence of molds only occurred on the first day with a count of 2.0×10^2 . In the bean fermentation in Arataca-BA city, the count of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts ranged from 6.2×10^5 to 5.8×10^2 , 16.7×10^5 to 1.0×10^2 and 12×10^5 to 4×10^2 during the 5 days of fermentation, respectively. The presence of mold only occurred on the first day with a count of 4.9×10^2 . Samples of bean to bar chocolate on the market showed levels of aflatoxins within the permitted value. It was found that the higher the cocoa content in chocolate, the greater the contamination by aflatoxins.

Keywords: Cocoa; bean to bar; microbiota; aflatoxins.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 O CACAUEIRO	3
3.1.1 O FRUTO CACAU	4
3.1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMÊNDOAS	4
3.1.3 COMPOSIÇÃO DO FRUTO MADURO.....	6
3.1.4 DEFINIÇÃO DO FRUTO E PRODUTOS	6
3.1.5 TERROIR.....	7
3.2 PROCESSAMENTO PRIMÁRIO	8
3.2.1 Colheita e abertura dos frutos	8
3.2.2 Fermentação.....	10
3.2.3 PROVA DE CORTE DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	13
3.2.4 SECAGEM.....	14
3.2.5 PROVA DE CORTE PÓS SECAGEM.....	16
3.3 <i>BEAN TO BAR</i> (Da amêndoa a barra)	17
3.3.1 CARACTERÍSTICAS.....	18
3.3.2 EQUIPAMENTOS.....	19
3.4 PROCESSAMENTO SECUNDÁRIO – CHOCOLATE	20
3.4.1 Seleção manual das amêndoas	20
3.4.2 Torrefação das amêndoas.....	21
3.4.3 Quebra das amêndoas e separação da testa	22
3.4.4 Moagem.....	22
3.4.5 Mistura e refino.....	22
3.4.6 Conchagem	23
3.4.7 Maturação.....	24
3.4.8 Tempera, moldagem e resfriamento	24
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS E COPRODUTOS.....	25
3.6 PÚBLICO ALVO.....	26
3.7 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO	27

3.7.1	Leveduras	27
3.7.2	Bactérias ácido lácticas	28
3.7.3	Bactérias acéticas	29
3.8	Associação entre leveduras e bactérias durante a fermentação	30
3.9	Precusores de sabor e aroma	31
4.	CAPÍTULO I	34
4.1	PROCESSAMENTO DO CHOCOLATE <i>BEAN TO BAR</i>	34
4.1.1	INTRODUÇÃO.....	35
4.1.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1.3	RESULTADOS	40
4.1.4	CONCLUSÃO	47
5.	CAPÍTULO II	48
5.1	MICROBIOTA DO CACAU	48
5.1.1	RESUMO	49
5.1.2	INTRODUÇÃO.....	49
5.1.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
5.1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1.5	CONCLUSÃO	67
6.	CAPÍTULO III	68
6.1	METODOLOGIA E ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA EM CHOCOLATE	68
6.1.1	RESUMO	69
6.1.2	INTRODUÇÃO.....	69
6.1.3	MATERIAS E MÉTODOS.....	72
6.1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.1.5	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS.....	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

Tendo em vista a crescente busca pela saudabilidade dos alimentos e a preocupação com a sustentabilidade, a população está buscando cada dia mais rótulos limpos e empresas com comércio justo. Foi assim que se deu início a uma nova cadeia produtiva artesanal de chocolates, denominada “*bean to bar*” (da amêndoa à barra), com apelo de ser mais saudável e sustentável.

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore de clima tropical e de pequeno porte, podendo atingir até 8 metros de altura (Figura 1). Produz de 10 a 60 frutos por ano, variando de acordo com o tipo de cultivo, solo e clima.



Figura 1. O cacauieiro – Fonte: próprio autor

Atualmente a África é a maior produtora de cacau do mundo com 76,3% da produção, seguido da América com 17,4% e Oceania e Ásia com 6,3%. Na escala de produtividade por país, o Brasil se encontra na 7^o posição, produzindo cerca de 255.184 T (FAOSTAT (2020)). Hoje em dia apenas três estados possuem significativa produção de cacau no Brasil. O principal deles é o Pará, seguido da Bahia e do Espírito santo.

O cacau, é de suma importância econômico-social e dentre seus derivados o produto mais comercializado é o chocolate. Visando a produção deste, alguns processos pós-colheita são essenciais para qualidade do produto final. Sendo que uma das etapas mais críticas deste processo é a fermentação, que ocorre de forma espontânea ainda nas fazendas (COPETTI, 2009).

Os microrganismos presentes no ambiente, no fruto e nos utensílios, implicam diretamente na qualidade da fermentação e por sua vez no chocolate. Alguns estudos apontam diferenças sensoriais nas amêndoas de acordo com o *terroir* (SANTOS et al., 2012). Visto que a fermentação é a etapa mais crítica e que a mesma só ocorre na presença de determinados microrganismos, o presente estudo visa analisar amostras de três estados brasileiros, Bahia, Pará e Amazonas, além de verificar a ocorrência de aflatoxinas em amostras do comércio.

2. OBJETIVOS

- Analisar e comparar a microbiota autóctone do cacau durante a fermentação e secagem de duas regiões produtoras de cacau, Bahia e Pará;
- Analisar fungos e aflatoxinas em amêndoas de três estados, Bahia, Pará e Amazonas;
- Processar as amêndoas de cacau após a fermentação e secagem para produção de chocolate;
- Verificar a ocorrência de aflatoxinas em chocolate *bean to bar* vendidos comercialmente;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O CACAUEIRO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore perene, que dá origem ao fruto chamado cacau. É nativo de florestas úmidas da América Tropical e cresce nas sombras de outras árvores. Cada fruto dá em média 30-40 sementes, recobertas por uma polpa branca de mucilagem, rica em glicose, frutose e sacarose, apresentando alto teor de ácido cítrico, além de possuir ácidos orgânicos, ácido acético e ácido láctico. Essas sementes darão origem futuramente as amêndoas de cacau, onde sua polpa será fermentada por microrganismos, e após a morte do germen será seca e transformada em amêndoas que darão origem ao chocolate (BATISTA, 2008).

Existem três variedades de cacau, *Criollo*, *Forasteiro* e *Trinitário* (híbrido das anteriores), sendo que esses diferem em formato, produtividade e características físico-químicas (Figura 2). O *Criollo* é raro e possui baixa produtividade, suas sementes não possuem antocianinas, portanto apresentam coloração branca, no entanto essa variedade é muito aromática e de rápida fermentação (48h-72h), sendo destinado à produção de chocolates finos. Já o *Forasteiro* é o mais produtivo, correspondendo a cerca de 70% da produção mundial, todavia é pouco aromático e necessita de cerca de 168h para fermentação. O *Trinitário* por ser um híbrido é mais resistente a pragas e também possui aromas florais e frutados (ALVAREZ, 2017).



Figura 2. Variedades de cacau (FRALIA, 2020)

3.1.1 O FRUTO CACAU

O cacau é economicamente relevante pois suas amêndoas dão origem ao chocolate, produto mundialmente consumido. O Brasil se encontra como sétimo maior produtor de cacau do mundo (4,6%), ficando atrás da Costa do Marfim com (39%), Gana (14,5%), Indonésia (14%), Nigéria (6,3%), Equador (5,1%) e Camarões (5%). Totalizando 5,6 milhões de toneladas no ano de 2019, segundo dados da FAOSTAT (2020). Sendo que o Brasil já ocupou a posição de maior produtor de cacau do mundo. No entanto a produção de cacau foi dizimada em 1989 na Bahia, por uma doença chamada vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. Causando a perda de 90% da produção de cacau do Brasil, já que os frutos uma vez infectados entram em estado de apodrecimento, deformação e empedramento dos frutos.

A produção de cacau brasileira se concentra principalmente na Bahia e no Pará, representando 90% da produção nacional (AIPC, 2022). O cacau brasileiro possui forte apelo sustentável e histórico, devido parte da produção ser agroflorestal, preservando biomas como a Mata Atlântica e a Amazônia. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas (ABICAB), existem vários tipos de amêndoas de cacau no Brasil, sendo diferenciados não só pela variação da espécie, como também pela região produzida e pela qualidade empregada no processo. Refletindo em dois tipos de cacau: o cacau industrial commodity, chamado de *bulk* e o cacau fino, destinado normalmente a produções artesanais.

3.1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMÊNDOAS

A principal distinção entre o cacau *bulk* e o fino não se deve pela espécie ou cultivar. Mas sim pelo processo empregado na fase primária de produção, realizada ainda nas fazendas. O cacau *bulk* ou ordinário não possui colheita seletiva, sendo assim os frutos verdes, deteriorados ou infectados por fungos são utilizados na produção (Figura 3). Além disso, a fermentação na maioria das

vezes que é a principal etapa para produção de sabor e aroma, não é realizada de forma adequada. Desta forma, o cacau perde as suas características sensoriais especiais, e mantém apenas os *off flavours*. Nesse caso, o cacau precisa passar por processos de torra mais bruscos, a fim de mascarar os defeitos, além de se utilizar alto teor de açúcar e aromatizantes para corrigir e padronizar essas imperfeições.



Figura 3. Cacau *bulk* (Fonte: Próprio autor)

Já o cacau fino prove de amêndoas selecionadas desde o início da colheita, descartando os frutos infectados e colhendo somente os frutos em estágio de maturação adequados (Figura 4). Esses frutos passam pela principal etapa formadora dos *flavours*, a fermentação. É nela que todo o potencial da variação genética e *torroir* do cacau será ressaltado em características sensoriais únicas.



Figura 4. Cacau fino (Fonte: próprio autor)

3.1.3 COMPOSIÇÃO DO FRUTO MADURO

O cacau, fruto do cacaueiro, possui de 15 a 30 centímetros. Possui um formato oval e se forma nos troncos do cacaueiro. Possui de 30 a 40 sementes, envoltas em uma polpa mucilaginosa (Figura 5). Os cotilédones apresentam cor violácea, devido a presença de antocianinas. A polpa é rica em açúcares, apresenta cerca de 10 a 15% de sacarose, frutose e glicose.

Possui viscosidade elevada devido ao alto teor de pectina. Além de ser ácida, já que seu pH gira em torno de 3 a 4, devido ao alto teor de ácido cítrico. Com o decorrer do processo de fermentação a polpa vai sendo degradada e perde o seu líquido, e o cotilédone começa a adquirir uma cor marrom devido aos processos bioquímicos. A partir desse momento iniciam-se as reações essenciais para formação do sabor e aroma da amêndoa (Ferrão, 2002).



Figura 5. Sementes e polpa do cacau (Fonte: próprio autor)

3.1.4 DEFINIÇÃO DO FRUTO E PRODUTOS

Cacau: É o fruto do cacaueiro, que se desenvolve nos troncos e possui formato alongado. Sua coloração varia de verde a roxo ao amarelo e laranja, variando conforme a variedade, possui de 30 a 40 sementes, envolvidas por uma mucilagem branca, chamada de polpa (ALMEIDA, 2018).

Polpa de cacau: Mucilagem branca que envolve as sementes e cacau. Rica em carboidratos e açúcares. Servem como substrato para os microrganismos, cruciais para o processo de fermentação (ALMEIDA, 2018).

Semente de cacau: Possui formato ovalado de 3 a 5 centímetros, diferindo conforme a variedade. Dispõe de dois cotilédones, gérmen e testa, película fina que reveste a semente (CRUZ, 2012).

Amêndoa de cacau: Após a fermentação a semente perde sua capacidade de germinação. Com a morte do embrião a semente passa a ser chamada de amêndoa (SILVA, 2013).

Nibs de cacau: Amêndoa fragmentada, sem a testa. Utilizada como principal produto para produção do chocolate (COPETTI, 2009).

Manteiga de cacau: Fração oleica da amêndoa de cacau, representando 50% da composição total. É obtida através da prensagem hidráulica, processo realizado industrialmente. Pode ser desodorizada e clarificada (CRUZ, 2012).

3.1.5 TERROIR

A palavra “terroir” é de origem francesa e carrega um significado múltiplo, representando a interação do meio em que um produto é produzido. Sendo associado ao conjunto de características do ambiente, como o solo, clima, vegetação e relevo do local. Além da tradição de produzir um determinado produto, utilizando uma habilidade específica e conhecimento empírico de um povo empregado na confecção e produção (CROS & JEANJEAN, 1989).

Esse conjunto de fatores definem um produto específico que passa a ter uma Identificação Geográfica (IG), que seria o local de origem do produto, no qual se atribui uma identidade própria e por vez o “terroir”, se distinguindo dos produtos do mercado. Exemplos de IG com identidade local são o Queijo Roquefort, Champagne, Vinho Verde entre outros. Esses produtos só podem ser produzidos em uma determinada região, pois os fatores climáticos e modo de

produção devem ser preservados, pois, eles impactam diretamente no sabor e características sensoriais dos alimentos (LOCATELLI, 2007).

No caso do cacau fino, cada produtor de uma determinada região emprega um processo de colheita, fermentação e secagem. Os microrganismos presentes em cada ambiente são diferentes entre as localidades, interferindo diretamente na fermentação. Existem também os fatores físicos como tipo de variedade genética, espécie, exposição ao sol, vegetação local, ou se a origem é uma plantação ou se o cacau é coletado de forma extrativista na mata. Esse conjunto de fatores gera nas amêndoas de cacau características únicas, que serão distintas entre cada localidade produtora (AFOAKWA, et al., 2008).

3.2 PROCESSAMENTO PRIMÁRIO

O processamento primário se dá pelas etapas de processamento realizadas em campo. Sendo assim é o agricultor que se encarrega desse processo, colhendo e processando o cacau até se tornar uma amêndoa fermentada e seca.

3.2.1 Colheita e abertura dos frutos

A colheita deve ser realizada com o auxílio de ferramentas chamadas podões, somente quando os frutos estiverem maduros, pois somente esses têm quantidade suficiente de açúcar fermentável em sua polpa (Figura 6). A maturação depende de cada variedade e estação, ficando a critério do produtor determinar o grau de maturação padrão para coleta.



Figura 6. Colheita dos frutos (Fonte: próprio autor)

A colheita do cacau fino é realizada manualmente afim de coletar somente os frutos maduros, não havendo mistura de frutos ainda verdes, que causam adstringência e amargor indesejado ao chocolate, prejudicando a fermentação. Os frutos são abertos manualmente com o auxílio de facões ainda na plantação (Figura 7). A placenta contendo a polpa e as sementes é retirada com as mãos, e na maioria das vezes acondicionada sobre folhas de bananeira no solo. Após a colheita, a abertura dos frutos não deve exceder 24 horas, já que o fruto entra em processo de deterioração, prejudicando a fermentação (SILVA, 2018).



Figura 7. Abertura das amêndoas

3.2.2 Fermentação

No mercado do cacau as amêndoas são classificadas em dois tipos, *bulk* ou comum e “*flavor*” ou fino. As amêndoas classificadas como *bulk* são derivadas a partir do cacau commodity, geralmente da variedade *Forasteiro* ou produto de uma fermentação incorreta ou incompleta, não ocorrendo o desenvolvimento de aroma e sabor. O cacau tipo *bulk* é amplamente utilizado para a elaboração do chocolate industrial, pois além de ser barato, este não necessita dos aromas finos, já que haverá adição de outros insumos.

Já o cacau tipo *flavor* normalmente vem das variedades *Criollo* e *Trinitário* ou qualquer variedade, desde que as amêndoas sejam bem fermentadas, desenvolvendo assim seus compostos aromáticos e sabor (SILVA, 2013). O cacau fino possui alto valor agregado, já que esses podem apresentar compostos florais, notas cítricas, de tabaco e outras, sendo destinado à produção de chocolate fino ou *gourmet*.

Seguindo essa classificação a fermentação é a etapa mais importante para obtenção de um cacau fino, é nela que os compostos precursores de aroma são formados e tornam o cacau especial. A fermentação é um processo de sucessão microbiológica espontânea, associada com fungos, leveduras, bactérias ácido lácticas e bactérias acéticas. Esses microrganismos são provenientes não somente da casca do fruto, mas dos utensílios, mãos dos coletores, do cocho de fermentação, do solo e do ar (ARDHANA, 2003).

A polpa dos frutos é levada após a colheita para cochos de fermentação de madeiras ou podem ser fermentadas em pilhas sobre folhas de bananeira, sendo que o último método não é muito interessante, já que a fermentação ocorre de forma desigual. As amêndoas são revolvidas e cobertas com folhas de bananeira ou sacos de juta, que evitam o ressecamento da camada superficial e retém o calor da massa de cacau.

A fermentação espontânea dura de 4 a 7 dias dependendo da variedade do cacau e das condições de processamento. Os cochos de fermentação possuem furos por onde escoam o sumo da polpa degradado do cacau, esse,

pode ser utilizado para fabricação de geleias, doces, sucos e outros (Figura 8). A fermentação é dividida em duas fases, a biológica e a química, a biológica consiste na degradação da polpa através da atividade microbiana e a segunda ocorre transformações dos ácidos e álcoois, gerando os *off-flavors*.



Figura 8. Cocho de fermentação vazio (fonte: próprio autor)

Devido ao alto teor de açúcares na polpa, o baixo pH 3,5-3,6 por conta do ácido cítrico e a escassez de oxigênio pela sobreposição das sementes, a primeira fermentação das sementes é anaeróbica, sendo que os primeiros microrganismos a surgirem são as leveduras. Através da fermentação, as leveduras convertem os carboidratos em etanol, diminuindo os açúcares fermentáveis. Sucede-se então a fermentação das bactérias ácido lácticas que também fermentam esses açúcares produzindo ácido lático, elevando ligeiramente o pH e a temperatura (COPETTI, 2009).

As leveduras e as bactérias ácido lácticas desempenham um importante papel na degradação da polpa, por meio da secreção de enzimas pectinolíticas, sendo que nessa etapa também é possível encontrar fungos filamentosos. A próxima etapa envolve o revolvimento das amêndoas no cocho de fermentação, onde o material é aerado (Figura 9). Iniciando-se a fermentação aeróbica, que favorece a sucessão de bactérias acéticas, promovendo a oxidação do etanol e consecutivamente produzindo uma reação exotérmica, elevando a temperatura para 45°-50°C (SILVA, 2007).



Figura 9. Revolvimento do cacau (Fonte: próprio autor)

Com o aumento da temperatura são produzidos ácidos orgânicos (ácidos oxálico, fosfórico, succínico e málico) que migram para a parte interna das sementes. Há também a produção de metabólitos secundários que darão origem ao sabor e aroma do chocolate (ALMEIDA, 2018). Com a produção de ácidos orgânicos, etanol e a elevada temperatura o embrião morre e a semente agora passa-se a chamar amêndoa (Figura 10). Após a inativação das células vegetativas surgem bactérias formadoras de esporos, que apresentam alta atividade enzimática e contribuem para formação de *off flavors* (SILVA, 2007).



Figura 10. Cocho com amêndoas (Fonte: próprio autor)

Estudos apontam diferenças sensoriais de acordo com o *terroir* de cada amêndoa, influenciadas não somente pela genética ou variedade, mas principalmente pelos diferentes microrganismos presentes em cada região (MOREIRA; MIGUEL; DUARTE; DIAS; SCHWAN, 2013).

3.2.3 PROVA DE CORTE DURANTE A FERMENTAÇÃO

É a principal metodologia para avaliar a fermentação das amêndoas de cacau, tanto no cocho como nas amêndoas já secas. O teste além de avaliar a qualidade também serve como indicador do grau de fermentação. Geralmente cada produtor estabelece um indicador de acordo com a coloração do centro da amêndoa.

Para avaliação das amêndoas durante o processo de fermentação, basta efetuar uma pequena amostragem de amêndoas em diferentes locais do cocho de fermentação, e realizar um corte longitudinal com auxílio de uma faca (Figura 11). Com o passar dos dias a semente começa a fermentar e perder a coloração violácea. Com a morte do embrião ela passa a se chamar amêndoa e sua cor vai ficando cada vez mais marrom, indicando que a fermentação está sendo realmente efetivada. Por se tratar de uma análise visual, é necessário um especialista ou a implementação de alguma tonalidade como padrão. Com o decorrer da fermentação a análise é realizada dia a dia, a fim de mensurar o grau de fermentação. É necessário cessar a fermentação quando os sulcos da amêndoa estão bem abertos e aparentes, além de apresentar uma cor marrom uniforme.

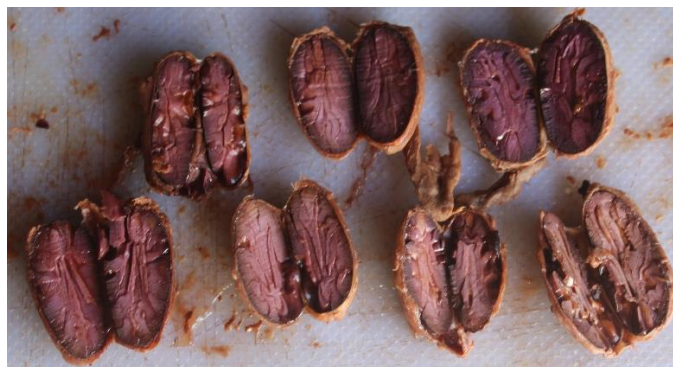


Figura 11. Prova de corte (Fonte: próprio autor)

3.2.4 SECAGEM

No geral existem dois tipos de secagem, a secagem artificial e a secagem natural ao sol, mais comumente utilizada, seja pelo menor custo, requerer apenas luz solar, além de ser mais simples e eficaz. Na secagem natural as amêndoas são transferidas para plataformas de cimento ou madeira, com teto móvel chamadas de barcaças, dispostas em camadas de até 5 cm. As amêndoas ficam expostas ao sol de 7 a 14 dias, dependendo da intensidade da luz solar (Figura 12). Devem ser realizados revolvimentos constantes com o auxílio de um rodo de madeira, a fim de distribuir uniformemente o calor e não gerar grumos. Ao anoitecer e em dias de chuva, o teto móvel da barcaça é acionado, protegendo as amêndoas do contato com a umidade. Sendo que a faixa de temperatura ideal para secagem deve ser de 35 a 40°C (Silva, 2007).



Figura 12. Barcaças de madeira sobre o rio (Fonte: próprio autor)

A secagem natural também pode ser realizada em estufas (Figura 13). Ambas além de serem mais versáteis, contribuem para a qualidade das amêndoas, tanto em sabor quanto em acidez, já que o processo lento contribui para uma maior volatilização do ácido acético, além de contribuir com as reações de oxidação e o escurecimento dos cotilédones, resultando na cor e odor característicos.



Figura 13. Estufas para secagem (Fonte: próprio autor)

No entanto o principal objetivo no processo de secagem é a redução da umidade e atividade de água, já que níveis baixos de ambos os fatores garantem maior conservação das amêndoas e retardam a proliferação de fungos. Quanto mais lenta for a secagem menor será a atividade de água, uma vez que numa secagem rápida apenas uma camada superficial da amêndoa é seca, perdendo a permeabilidade do interior da amêndoa e dificultando assim o processo de secagem.

A umidade final deve ser reduzida de 60% para em torno de 7%, garantindo maior segurança e qualidade do cacau, sendo que se a amêndoa for seca demasiadamente se tornará quebradiça (BASTOS, 2013).

A secagem artificial é realizada por sopradores de ar quente, que contribuem para uma secagem mais rápida. No entanto ela não forma tantos precursores de sabor, além de dificultar a remoção da umidade e diminuição da atividade de água, visto que sua velocidade de secagem é muito rápida e reduz a permeabilidade da amêndoa.

3.2.5 PROVA DE CORTE PÓS SECAGEM

A segunda prova de corte é realizada para verificar a qualidade das amêndoas pós processamento primário. Nessa análise uma amostragem de 100 amêndoas é disposta em uma tábua de corte, cortadas longitudinalmente com uma faca. Elas serão inspecionadas visualmente uma a uma, utilizando um padrão de cor previamente definido. Além da qualidade, o teste agora visa mensurar a quantidade de amêndoas fora do padrão, se estão infectadas com fungos, germinadas, achatadas ou contaminadas por pragas.

É estabelecido na INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 38, DE 23 DE JUNHO DE 2008 o padrão de classificação oficial, para determinar a qualidade e sanidade das amêndoas. A classificação avalia e cataloga as amêndoas em três tipos, 1, 2, 3 e fora do tipo de acordo com a Tabela 1. Defeitos em amêndoas de cacau. Sendo elas de acordo com os percentuais de tolerância como, mofo, amêndoas ardósias, achatadas, com odor de fumaça e infestada por pragas.

TABELA 1. Defeitos em amêndoas de cacau

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

Para o processamento *bean to bar*, a avaliação se torna muito mais rigorosa. Somando, todos os defeitos que não podem ultrapassar de 10%. Além de que na próxima etapa será realizada uma seleção manual, para que todas as amêndoas achatadas ou germinadas sejam retiradas, diminuindo ainda mais o percentual de defeitos do lote. Estes parâmetros são definidos pelos próprios produtores, sendo 10% uma deliberação conjunta de comum acordo entre os produtores.

3.3 BEAN TO BAR (Da amêndoa a barra)

O movimento *bean to bar* (da amêndoa à barra) surgiu nos anos 2000 em São Francisco nos Estados Unidos, cidade berço das novas tendências, marcada pelo desperdício zero, consumo de orgânicos e alimentos artesanais. Os chocolateiros da cidade decidiram desenvolver processos artesanais de produção, devido à falta de conhecimento das procedências das amêndoas ou dos chocolates que utilizavam, bem como do processo e os insumos. Neste processo *bean to bar* é importante conhecer a qualidade da matéria prima, os rótulos limpos, trabalhar com pequenos lotes, com alto teor de cacau e é preciso ter um contato direto com o produtor e saber o processamento primário.

São empresas que se preocupam com toda a cadeia do chocolate, desde as fazendas até a embalagem final. Todas seguem os preceitos do movimento “*slow food*”, que preza por alimentos bons, limpos, justos e que acima de tudo valorizam os pequenos produtores (TAPIE, 2019). Normalmente trabalham com equipamentos para uma pequena escala de produção, tendo como objetivo produzir chocolates finos de alta qualidade e valor agregado.

3.3.1 CARACTERÍSTICAS

Visando características únicas em seus produtos, essas empresas buscam pequenos produtores com sistemas mais sustentáveis de produção. No Brasil um desses sistemas é o Cabruca, um meio de cultivo agroflorestal de produção de cacau, concentrado especialmente na Bahia (Figura 14). É caracterizado pelo plantio do cacau em meio a vegetação da Mata Atlântica, preservando o ecossistema local e evitando o uso de pesticidas no controle de pragas (LOBÃO, 2007). O *terroir* de cada origem garante características únicas no cacau cultivado, por isso o cacau fino brasileiro é tão valorizado no mundo, pois sua legitimidade cultural possui alto valor agregado. Além de ter inúmeras variedades de cacau nativo, proporcionando notas sensoriais únicas ao produto (HECK et al., 2017).



Figura 14. Sistema Cabruca (Fonte: próprio autor)

A produção *bean to bar* por se tratar de empresas de pequeno porte e baixa produção, carece de equipamentos industriais e por consequência utiliza uma forma alternativa de produção de chocolate, diferente das empregadas nos chocolates industriais. A quebra das amêndoas é realizada em moinhos de quebra para cereais, em seguida é empregado o soprador de cascas e a partir

daí todo o processamento para obtenção da massa de chocolate será realizado em um equipamento chamado *melanger*.

3.3.2 EQUIPAMENTOS

O *melanger* é o equipamento utilizado como fonte alternativa para produção de chocolate, se trata de um moinho de pedras de bancada com rotatividade e aquecimento (60°C). O refino é realizado por duas pedras de granito cinza natural, que giram em direções opostas se atritando com o fundo do equipamento (mesmo material). Garantindo que as partículas sejam reduzidas a menos de 20 micrometros, resultando em um produto cremoso e sem areosidade (Figura 15).



Figura 15. Melanger (Fonte: Chocolatras, 2021)

O equipamento é responsável por realizar três etapas do processo de fabricação do chocolate, sendo que em escala industrial essas etapas seriam efetuadas em equipamentos distintos. A primeira aplicação é no refino dos *nibs* (amêndoas trituradas sem casca), que são diretamente inseridos no equipamento sem qualquer outro ingrediente até que se forme uma pasta. A segunda aplicabilidade é na mistura dos ingredientes secos, como o açúcar e leite, sendo adicionados diretamente a pasta de cacau, continuando o refino. Por último é empregado na etapa de conchagem, que consiste em revolver o

chocolate sob aquecimento (60°C) afim de atribuir brilho, cremosidade e eliminar ácidos indesejados originados na fermentação.

Geralmente esses equipamentos variam de capacidade desde 2 kg até 5 kg. É um equipamento acessível, já que seu custo gira em torno de R\$6.000 (seis mil reais), possibilitando a obtenção de um produto de altíssima qualidade sem o uso de tecnologias de alto custo.

3.4 PROCESSAMENTO SECUNDÁRIO – CHOCOLATE

Processamento realizado pelo *maker*, nessa etapa a amêndoa de cacau seca será transformada em chocolate fino como explicado abaixo.

3.4.1 Seleção manual das amêndoas

Todo o lote de cacau é inspecionado visualmente, as amêndoas defeituosas como achatadas, ardósia, quebradas ou germinadas serão selecionadas manualmente e retiradas do lote. Nesta etapa serão retirados qualquer corpo estranho ou sujidades, aumentando a seletividade e a qualidade do produto final, bem como reduzindo a contaminação (Figura 16).



Figura 16. Seleção manual das amêndoas (Fonte: próprio autor)

3.4.2 Torrefação das amêndoas

A etapa de torra é de extrema importância já que é nela que ocorre o desenvolvimento dos sabores. As amêndoas de cacau possuem compostos aromáticos voláteis, por isso o tempo e a temperatura influenciam no sabor e nas notas do chocolate. Sendo assim os parâmetros de torração devem ser empregados conforme o tipo de produto que se deseja obter. Normalmente as amêndoas são torradas a 150°C por 45 minutos, entretanto quando se deseja obter um chocolate fino e preservar seus aromas, são empregadas temperaturas em torno de 120°C. Na torração podem ser utilizados fornos ou torradores. Além de ser uma etapa imprescindível para o desenvolvimento de sabor e coloração característica, é também uma etapa essencial para segurança do produto, pois é nela que acontece a redução dos microrganismos deteriorantes, já que normalmente ocorre em temperaturas superiores a 80°C (SILVA, 2013).

A torra pode ser realizada de três formas, diretamente nas amêndoas inteiras, nos *nibs* ou no *liquor* de cacau. Para a produção de chocolate *bean to bar* é realizada a torra nas amêndoas inteiras, com a finalidade de preservar os aromas e as notas frutais e florais, além de auxiliar na retirada da casca (testa) na etapa seguinte.

Além disso a torra tem a finalidade de reduzir os ácidos voláteis indesejáveis, como o ácido acético, valérico, butírico e propiônico. É nessa etapa onde ocorre a inativação das enzimas lipolíticas, que podem degradar a manteiga de cacau, causando rancidez. Outro fator importante é a redução da umidade das amêndoas de 8% para 2%, evitando a proliferação de microrganismos, principalmente os fungos.

O desenvolvimento de sabor não está somente ligado a essa etapa, sem uma boa fermentação não há o desenvolvimento dos precursores de sabores que irão se manifestar nessa etapa. A torra diminui a acidez do chocolate pela volatilização parcial do ácido acético. A alta temperatura desenvolve a reação de *Maillard* nas amêndoas, proporcionando notas de sabores mais pronunciadas. Além da caramelização dos açúcares, degradação de proteínas e síntese de

compostos de enxofre. Desta forma a torra é capaz de potencializar os sabores, formar novos compostos e minimizar os indesejáveis (COPETTI, 2009).

3.4.3 Quebra das amêndoas e separação da testa

As amêndoas de cacau já torradas são trituradas em moinhos de rolo ou cereais, a fim de romper a testa das amêndoas e liberar o cotilédone. Após a quebra é realizada a separação das cascas (testa) por meio de sopradores ou máquinas específicas. A casca é desprezada e o resultado são os chamados *nibs* (amêndoas sem casca trituradas), utilizado para a fabricação de chocolate (CHOCOLATE ALCHEMY, 2018).

3.4.4 Moagem

Após a quebra das amêndoas os *nibs* precisam ser triturados para obtenção do chocolate. A moagem tem como objetivo diminuir o tamanho das partículas em 25 micrometros ou menos, com a finalidade de gerar cremosidade e retirar a característica arenosa da massa. Além de extrair o máximo de gordura possível, melhorando a viscosidade do chocolate. Industrialmente essa etapa é realizada num moinho de rolos ou esferas, entretanto na fabricação do chocolate *bean to bar* é empregada o moinho de pedra *Melanger* (CHOCOLATE ALCHEMY, 2018).

3.4.5 Mistura e refino

São adicionados à massa de cacau os ingredientes da formulação, como o açúcar e leite em pó, necessários para homogeneização e obtenção de uma consistência plástica adequada para o refino. Essa etapa é realizada no mesmo equipamento de moagem, o *Melanger*, bem como o refino por aproximadamente 24 horas ou até obter partículas inferiores a 25 micrometros (Figura 17).



Figura 17. Melanger realizando refino e conchagem (Fonte: próprio autor)

3.4.6 Conchagem

A etapa de conchagem tem como objetivo arredondar o sabor do chocolate, eliminando ácidos indesejados (ácido acético), induzindo reações de *Maillard* (cor e sabor) e reduzindo a umidade. Nela o chocolate é agitado por um longo período de tempo sob temperaturas de 50 a 100°C. Quanto maior o tempo de conchagem mais cremoso será o chocolate, devido a dispersão dos sólidos na gordura fluída (manteiga de cacau). Industrialmente a conchagem é dividida em três partes: fase seca, fase plástica e fase líquida. Entretanto no chocolate *bean to bar* só há uma conchagem, já que não há a adição de manteiga de cacau sobressalente nem aditivos como a lecitina e o PGPR. Essa etapa ainda é realizada no *Melanger*, todavia o moinho de pedras é afrouxado, diminuindo o atrito das pedras, já que as partículas já foram refinadas por completo (SILVA, 2013).

3.4.7 Maturação

Ainda são poucos os estudos na área de maturação do chocolate. Normalmente, a maturação acontece ainda nas fazendas, quando as amêndoas ficam estocadas em sacas para arredondar seus sabores. No entanto os produtores de chocolate *bean to bar* notaram uma melhora significativa ao maturar o chocolate antes da tempera. Notas florais e frutadas se tornam mais pronunciadas e seu aroma mais intenso. Sabe-se que a interação intermolecular da mistura continua ocorrendo, no entanto, não há pesquisas elucidadas sobre o assunto. Sendo assim uma técnica praticada somente por produtores artesanais, que armazenam seus chocolates por um mês ou até mesmo um ano.

3.4.8 Tempera, moldagem e resfriamento

Em razão da natureza polimórfica da manteiga de cacau, é necessário realizar o processo de tempera ou pré-cristalização do chocolate. Afim de obter somente cristais beta (cristais mais estáveis) e consecutivamente adquirir características como brilho, fusão na boca, *snap*, dureza e sabor. A primeira etapa da tempera acontece elevando a temperatura do chocolate a 45°C para seu completo derretimento, seguido de um resfriamento de 2°C por minuto, que pode ser realizado em uma temperadeira ou numa mesa de mármore com revolvimento manual (Figura 18).



Figura 18. Temperagem (Fonte: próprio autor)

O chocolate deve ser resfriado até a temperatura adequada para o crescimento de cristais beta, isso varia de chocolate para chocolate, entretanto os valores se encontram dentro de 26 a 30°C. No resfriamento há também formação de cristais instáveis, então é necessário aquecer novamente o chocolate a 32°C para conferir as propriedades reológicas adequadas. Cerca de 2 a 4% da gordura presente é cristalizada na tempera, o processo de cristalização ainda continua nas etapas de resfriamento e armazenamento (LUCCAS, 2001).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS E COPRODUTOS

A caracterização dos produtos corresponde a RESOLUÇÃO – RDC Nº 723, DE 1º DE JULHO DE 2022 -ANVISA, que dispõe os requisitos necessários para a produção de chocolate. Os produtos são definidos como:

IX – Chocolate: produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa, pasta ou liquor de cacau, cacau em pó ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, podendo apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados;

X – Chocolate branco: produto obtido a partir da mistura de manteiga de cacau com outros ingredientes, podendo apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados;

Sendo que os requisitos básicos da composição dos produtos são:

Art. 5º O chocolate deve ser constituído de, no mínimo, 25% (vinte e cinco por cento) de sólidos totais de cacau.

Art. 6º O chocolate branco deve ser constituído de, no mínimo, 20% (vinte por cento) de sólidos totais de manteiga de cacau.

O chocolate também pode ser subdividido de acordo com a sua composição, sendo que a definição se baseia no *Codex Alimentarius* (2006). Sua composição também varia de acordo com os padrões alimentares dos

consumidores. Portanto, o percentual de cada ingrediente pode variar. Dentre os chocolates mais consumidos no Brasil, estão o chocolate ao leite, meio amargo e branco, sendo definidos pelo *Codex Alimentarius* (2006) como:

Chocolate Meio Amargo: contém, com base na matéria seca, não menos que 35% de sólidos de cacau, dos quais não menos que 18% devem ser manteiga de cacau e não menos que 14% devem ser sólidos de cacau livres de gordura.

Chocolate ao Leite: contém, com base na matéria seca, não menos que 25% de sólidos de cacau (incluindo um mínimo de 2,5% de sólidos de cacau livres de gordura) e um teor mínimo de sólidos derivados de leite entre 12 e 14% (incluindo um mínimo de gordura de leite entre 2,5 e 3,5%).

Chocolate Branco: contém, com base em matéria seca, não menos que 20% de manteiga de cacau e não menos que 14% de sólidos derivados de leite (incluindo um mínimo de gordura de leite entre 2,5 e 3,5%).

3.6 PÚBLICO ALVO

Segundo as estatísticas o consumo de chocolate vem aumentando no mundo, no entanto o perfil dos consumidores está mudando (Figura 19). Tendências como chocolates orgânicos, com baixo teor de açúcar, zero lactose e artesanais vem ganhando cada vez mais espaço. Grande parte dos consumidores mundiais vem se conscientizando a respeito dos impactos climáticos das grandes indústrias, bem como as formas de produção agrícola dos insumos.

Nestas condições, a procura de chocolates de origem também vem ganhando espaço, principalmente entre os consumidores das classes A e B. Estas classes procuram chocolates com teor de cacau mais elevado, visando degustar o produto e identificar características sensoriais de *terroir*. O chocolate está se tornando não só um produto, mas uma experiência, que leva o consumidor a visualizar e dar valor a toda a cadeia de processamento (ESTIVAL,

2010). Em função disto a demanda por amêndoas de cacau fino vem aumentando. Regiões como a Europa e a América do norte vem introduzindo em suas linhas produtos *premium* com cacau certificado a fim de manter os consumidores para as marcas artesanais.

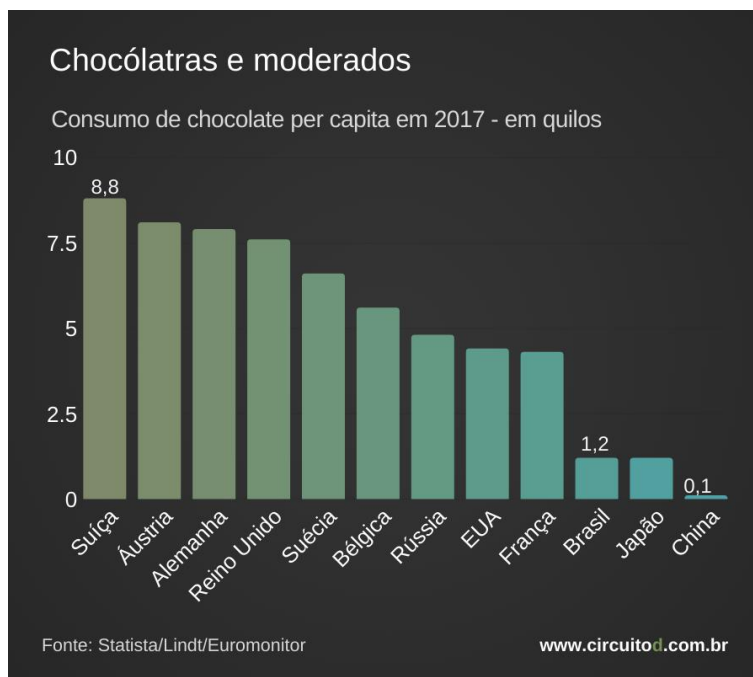


Figura 19. Consumo de chocolate per capita (Fonte: Statista, 2017)

3.7 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO

3.7.1 Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares, divididas em ascomicetos e basidiomicetos. São esféricas, ovais ou cilíndricas, e geralmente se reproduzem por brotamento. As leveduras estão presentes em quase todos os ambientes devido a sua capacidade de utilizar vários tipos de substrato para o seu desenvolvimento. Crescem principalmente na presença de açúcares, necessitando também de fontes de carbono e hidrogênio para o seu desenvolvimento. São predominantemente aeróbias e anaeróbias facultativas, com temperatura ótima de crescimento de 25 a 30°C e pH de 4 a 7. As leveduras mais associadas e descritas na fermentação do cacau são: *Candida bombi*, *C.*

pelliculosa, *C. rugopelliculosa*, *C. rugosa*, *C. humilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluveromyces marxianus*, *Kloeckera apiculata*, *K. thermotolerans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota pretoriensi* (SILVA, 2011).

3.7.2 Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) são caracterizadas por seu metabolismo estritamente fermentativo, tendo o ácido láctico como produto da fermentação dos açúcares. Sendo a principal fonte de probióticos em alimentos. São Gram-positivas, não produzem esporos, são ácido-tolerantes, fastidiosos, geralmente não móveis. No geral são mesófilas, crescendo em uma faixa de temperatura de 5 a 45°C, requerem aminoácidos, bases pirimídicas e púricas, bem como vitaminas do complexo B para o seu desenvolvimento. São anaeróbias facultativas, podendo fermentar em ambientes anaeróbicos e aeróbicos, porém de forma mais lenta. São compreendidas pela Ordem *Lactobacillales* e subdividida em seis famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*, contendo mais de 530 espécies e subespécies (EUZÉBY, 2009).

A classificação das BAL baseia-se em sua morfologia, do modo como fermentam a glicose, de faixa de temperatura adequada, da adaptação em diferentes meios e pH. Uma das diferenças entre os subgrupos das BAL são os produtos formados pela fermentação. Dentre eles, existem dois grupos, o denominado homofermentativo e o heterofermentativo. O homofermentativo produz exclusivamente ácido láctico, onde a enzima adolase fermenta a glicose diretamente em ácido láctico, isso inclui o gênero *Streptococcus* (L(+) lactato) e *Pediococcus* (D-L L lactato). Já o outro grupo, heterofermentativo, converte através da enzima fosfoacetolase as hexoses em pentoses, tendo como produto final ácido láctico, fórmico, butírico, etanol e CO₂; nesse processo há produção de diacetil e aldeídos, que são substâncias precursoras de aroma, muitos importantes na fabricação de chocolate (QUINATOIA, 2017).

3.7.3 Bactérias acéticas

As bactérias acéticas (BAA) desempenham um importante papel na fermentação das amêndoas de cacau. Sua multiplicação e produção de ácido acético é essencial para a hidrólise das proteínas no cotilédono. Ademais o ácido ajuda na permeabilização das enzimas excretadas pelas leveduras para o núcleo da amêndoa, além de que, juntamente com o ácido láctico reduzem o pH para que ocorram as reações enzimáticas na fase de quimio-fermentação. É nessa fase que as enzimas do interior da semente são ativadas, devido a mudança de pH e do espargimento do conteúdo celular, resultando na morte da semente, que agora passa a ser denominada amêndoa de cacau (BASTOS, 2016).

São microrganismos Gram negativo, aeróbios, catalase positiva e da família *Acetobacteriaceae*. Possuem forma de cocos ou bastonetes, podem ser móveis, não esporulam e oxidam açúcares de metabólitos secundários. A faixa de pH ótima para crescimento é de 5 a 6,5, entretanto podem crescer em pH de 3 a 4, sua temperatura ótima de multiplicação é de 30°C. Essa família de bactérias compreendem os seguintes gêneros: *Granulibacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Acetobacter*. Para realizar sua identificação a nível de espécie é necessário observar seu crescimento em etanol, sua produção de pigmentos e a forma como fermentam os carboidratos (ALMEIDA, 2013).

As BAA podem se desenvolver em ambientes alcoólicos, açucarados e pouco ácidos. Reagem nesses meios oxidando os açúcares e álcoois, resultando no acúmulo de ácidos orgânicos, produzindo ácido acético a partir do etanol. Segundo a literatura os gêneros mais recorrentes na fermentação do cacau são: *Acetobacter* e *Gluconobacter*, que apresentam mais de 40 espécies. Sendo que o *Acetobacter* preferencialmente metaboliza etanol e os demais açúcares como a glicose e frutose.

Dentre os dois gêneros, o *Acetobacter* é o mais comumente encontrado durante a fermentação, nas amostras de cacau da Indonésia e República Dominicana sendo a espécie *Acetobacter lovaniensis* a mais comum (ARDHANA; FLEET, 2003). Já em Gana as mais encontradas são *Acetobacter syzygii*, *A.*

tropicalis e *A. pasteurians* (NIELSEN et al., 2007). Na região da Amazônia brasileira as mais usualmente encontradas são as espécies *Acetobacter aceti* e *A. pasteurians* (ALMEIDA, 2013).

3.8 Associação entre leveduras e bactérias durante a fermentação

A polpa que recobre as sementes de cacau contém em média 84% de água, 13% de açúcares, 2% de ácido cítrico e 1% pectina. A difícil penetração de ar na massa pela compressão da polpa, ocasiona um baixo nível de oxigênio disponível, além do baixo pH (3,6) em virtude do ácido cítrico, gerando assim um ambiente com condições ideais para a proliferação de leveduras, responsáveis pela fermentação alcoólica (a primeira etapa da fermentação do cacau de 24 a 28 horas). Pesquisas realizadas no Brasil identificaram as seguintes leveduras associadas a fermentação do cacau brasileiro: *Candida bombi*, *C. pelliculosa*, *C. rugopelliculosa*, *C. rugosa*, *C. humilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluveromyces marxianus*, *Kloeckera apiculata*, *K. Thermotolerans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota pretoriensi* (SCHWAN & WHEALS, 2004).

As leveduras são encarregadas de metabolizar o ácido cítrico da polpa, aumentando o pH para 4, fornecendo assim as condições ideais para multiplicação das bactérias. São responsáveis pela produção da enzima pectinase, que reduz a viscosidade da polpa, produzindo como resultado um líquido exsudado, chamado popularmente de mel de cacau, contribuindo consecutivamente para a aeração da massa. Também produzem ácidos orgânicos como o ácido fosfórico, málico, oxálico, acético e succínico, responsáveis pela iniciação da morte do embrião e principalmente por contribuírem para a formação de precursores de sabor pela produção de compostos voláteis, como aldeídos, cetonas, terpenos e ésteres (ALMEIDA, 2013).

Por volta das 36 horas de fermentação, as bactérias ácido lácticas (BAL) começam a se multiplicar, devido as condições de microaerobiose da fase

anterior, aeração da massa devido ao revolvimento. Além da formação de álcool, aumento da temperatura da massa e elevação do pH para 4. As bactérias mais recorrentes mencionadas na literatura são: *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* e *Enterococcus casseliflavus*. Responsáveis por metabolizar os açúcares remanescentes, resultando na degradação da polpa e produção de ácido láctico e redução dos açúcares a 2%. Além de contribuir para a difusão de polifenóis com os líquidos celulares, sofrendo oxidação e complexação de alto peso molecular, especialmente dos taninos insolúveis.

Os açúcares são hidrolisados juntamente com antocianinas, hidrolisadas em antocianidinas, resultando no clareamento da cor violácea do cotilédone. As polifenol oxidases (majoritariamente antocianidinas e epicatequinas) convertem os polifenóis em quinonas, que formam complexos com peptídeos e proteínas, diminuindo a adstringência e resultando na formação da coloração marrom na semente (SOARES, 2001).

O álcool formado nas primeiras 48 horas de fermentação, bem como o aumento do pH e aeração da massa, proporcionam um ambiente favorável para o desenvolvimento de BAA, iniciando-se então a fermentação aeróbica. Essas bactérias oxidam o álcool em ácido acético, fazendo com que a massa de cacau ganhe um odor avinagrado. Atuando em duas enzimas: álcool desidrogenase (AIDH) e acetato desidrogenase (ACIDH). Essa reação de oxidação é altamente exotérmica, elevando a temperatura da massa de cacau para entorno de 50°C (BASTOS, 2016).

A partir do terceiro dia de fermentação ocorre uma diminuição das bactérias formadoras de esporos, provocando o aparecimento de metabólitos que, se difundidos para o núcleo do cotilédone, influenciam diretamente no sabor e aroma das amêndoas.

3.9 Precusores de sabor e aroma

Os precusores de aroma e sabor do cacau estão envolvidos diretamente com o processamento primário dos grãos (fermentação e secagem). Esses

precursores estão diretamente relacionados com a microbiota presente na fermentação, bem como a ação de enzimas sobre as proteínas, carboidratos e polifenóis do grão de cacau. Sendo assim não há desenvolvimento de sabor nos grãos sem a fermentação. O papel desses microrganismos é exsudar a polpa do grão e a produção de metabólitos (BASTOS, 2016).

Sem dúvidas a estrutura protagonista para obtenção de sabor e aroma é o cotilédone do grão (Figura 20). São através de reações químicas ocorridas nessa estrutura que desenvolverão sabor, morte do embrião e quebra das barreiras extracelulares. O cotilédone é basicamente composto por 53% de gordura (manteiga de cacau) e formado por dois tipos de células, as pigmentativas que armazenam os polifenóis e metilxantinas, e as células do parênquima, responsáveis pela estocagem de proteínas, amido e lipídeos. A teobromina e a cafeínas somam 1,5% do peso seco do grão e são agentes de amargor. Os polifenóis totalizam de 11 a 20% do peso seco da amêndoa, sendo responsáveis pela adstringência do grão. São divididos em três tipos: protocianinas, catequinas e antocianinas. No entanto há uma significativa redução de amargor e adstringência resultado da difusão de alcalóides (queda de 30%) e polifenóis (queda de 20%) através da fermentação (CAMU et al., 2008).

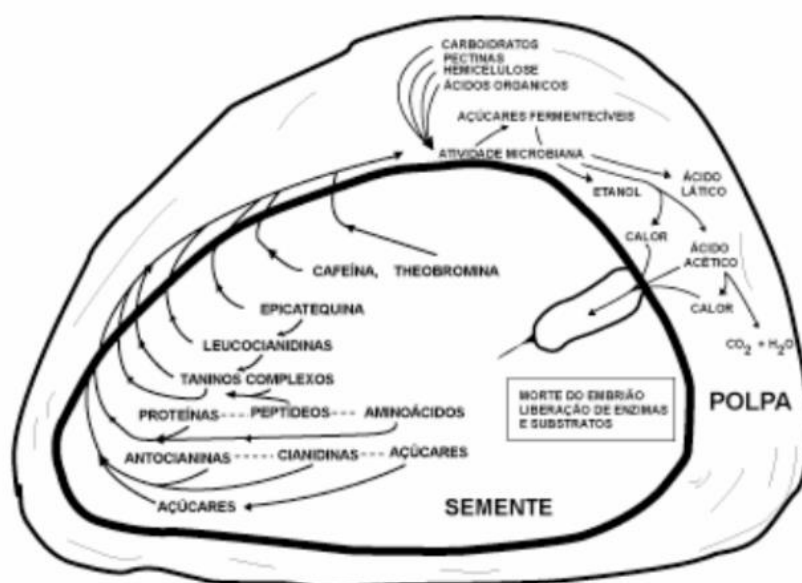


Figura 20. Alterações bioquímicas no cotilédone (Fonte: LOPEZ & DIMICK, 1995)

Os polifenóis ficam armazenados em células de pigmento com cotilédones, sendo que essas variam de coloração branca a roxa, dependendo da quantidade de antocianinas transformadas em antocianidinas, quanto maior a quantidade mais intenso é a coloração roxa. São degradadas e condensam em forma de taninos flavonólicos. As antocatequinas se condensam em taninos catéquicos que possuem coloração marrom, que combinados a aminoácidos e proteínas irão formar importantes precursores de sabor, que futuramente serão desenvolvidos na etapa de torração com a reação de Maillard. Para a transformação das antocianinas é necessário condições de anaerobiose, que só se desenvolvem com o emprego correto da primeira fase da fermentação. Já as antocatequinas são favorecidas em condição de aerobiose, por isso a etapa de revolvimento da massa é essencial (BASTOS, 2016).

As antocianidinas são muito importantes para a qualidade do cacau, a avaliação das antocianinas pela coloração ou popularmente chamada de prova de corte, é um importante teste utilizado como parâmetro de desenvolvimento de sabor e grau de fermentação das amêndoas de cacau, que se baseia na mudança de coloração do cotilédone de branco ou roxo para acastanhado (marrom).

4. CAPÍTULO I

4.1 PROCESSAMENTO DO CHOCOLATE *BEAN TO BAR*

4.1.1 INTRODUÇÃO

Como tratado na revisão, o processamento *bean to bar* do chocolate é realizado de forma artesanal, as etapas de processamento fogem das tradicionais empregadas pela indústria. Desta forma, se faz necessário o ajuste dos equipamentos e parâmetros utilizados, como a variação da temperatura de torrefação, moagem, refino, conchagem, maturação e moldagem. Visando obter a metodologia adequada para produção do chocolate utilizado na pesquisa, o objetivo deste capítulo foi estudar as etapas de processamento das amêndoas de cacau após a fermentação e secagem para produção de chocolate *bean to bar*.

4.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes foram feitos na planta piloto da empresa Nativo Cacau e seguiram a seguintes etapas.

4.1.2.1 Teste 1 de torrefação

Cem gramas de amêndoas de cacau foram dispostas sem sobreposição numa forma e levadas ao forno sob diferentes temperaturas e tempos, de acordo com a Tabela 2, baseadas em dados de torração de amêndoas do cacau artesanal e industrial obtidos na literatura. O fluxograma da Figura 21 apresenta esta etapa.

Tabela 2. Variâncias de temperatura e tempo testadas.

Amostra	Temperatura (° C)	Tempo (minutos)
A	80	45
B	110	45
C	150	30
D	170	30
E	190	20

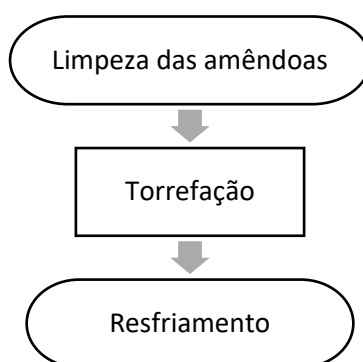


Figura 21. Fluxograma do processo de torração.

4.1.2.2 Teste 2 de processamento

No teste 2 de processamento, foram utilizadas 1.100 kg de amêndoa de cacau seco e limpo. A torração foi realizada em fornos (convecção térmica) a 110°C por 45 minutos (temperatura escolhida após o teste de torrefação). As amêndoas foram trituradas num moinho de rolo dentado a fim de descolar a testa do cotilédone. Com o uso de um soprador, a testa (casca) foi aspergida pela diferença de peso, resultando na obtenção dos *nibs*. Estes foram triturados no moinho *Melanger*, até se obter uma massa densa de cacau. Esta massa foi refinada a 60°C no moinho *Melanger* por 24h ou até se obter granulometria inferior a 20µm. Em seguida foi adicionado à essa massa, 300 g de açúcar demerara orgânico. O processo de conchagem foi feito com rolos do moinho afrouxados para iniciar o processo de agitação por 12 horas. O processamento seguiu o fluxograma da Figura 22.

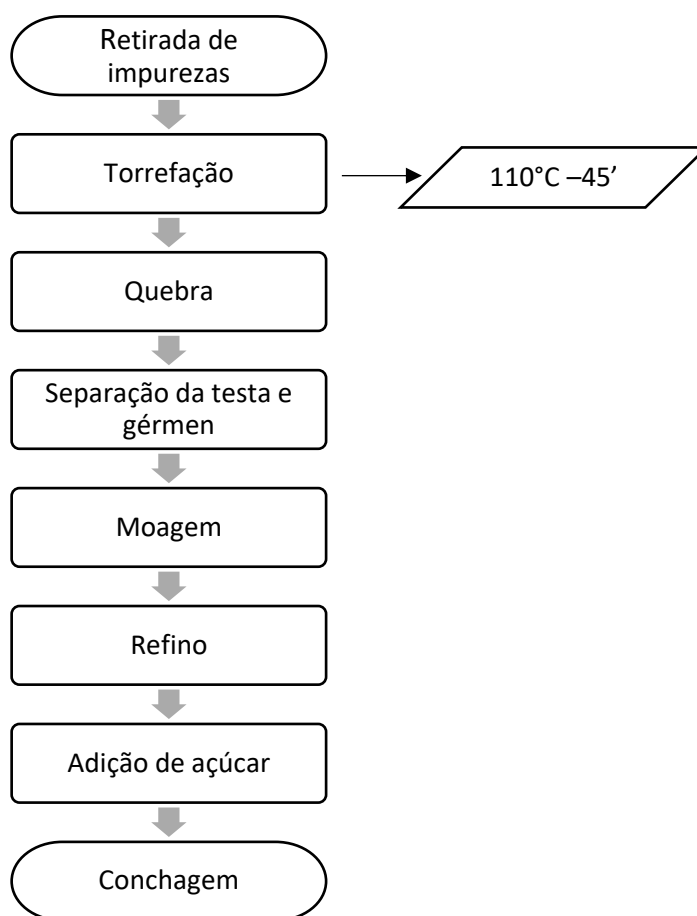


Figura 22. Fluxograma do processamento

4.1.2.3 Teste 3 de comparação

No teste 3 de comparação, foi adquirido 1.100 kg de amêndoas de cacau *bulk*, tendo como origem o Estado do Pará. Além disso, 1.100 kg de amêndoas de cacau fino foi adquirida do assentamento Dois Riachões, da cidade de Ipirapitanga, no Estado da Bahia. O processamento foi seguido de acordo com a Figura 2, com o tempo de conchagem de 24 horas.

4.1.2.4 Teste 4 de temperagem

A partir do chocolate obtido no teste 3 foi realizado um teste de temperagem pelo método de bancada de granito e pelo método *seeding*. No método de bancada, o chocolate foi derretido utilizando uma derreteadeira até atingir a temperatura de 45°C. Em seguida, a massa foi espalhada na pedra de granito fria e agitada com uma espátula sobre a superfície, até atingir a temperatura de 29°C. O chocolate foi aquecido novamente utilizando um soprador térmico até atingir a superfície de 32°C. O chocolate já temperado foi despejado sob o molde de polipropileno e feito batimentos para retirar o ar da massa (moldagem). O chocolate no molde foi levado ao refrigerador (14°C) por aproximadamente 15 minutos ou até atingir coloração opaca e a desmoldagem foi feita invertendo o molde para a retirada das barras de chocolate. As barras foram acondicionadas a 20°C. A Figura 23 mostra o fluxograma do método de bancada de granito.

No teste feito pelo método *seeding*, o chocolate foi derretido utilizando uma derreteadeira até atingir a temperatura de 45°C. Em seguida, a massa foi espalhada numa pedra de granito fria e agitada com uma espátula sobre a superfície, até atingir a temperatura de 34°C (resfriamento). Foi adicionado o *mycryo* a 34 °C e misturado até a completa dissolução, mantido a temperatura de 31° a 34°C. O chocolate já temperado foi despejado sob o molde de polipropileno, em seguida foram realizados batimentos para retirada do ar da massa (moldagem). O molde foi levado ao refrigerador (14°C) por aproximadamente 15 minutos ou até atingir uma coloração opaca e a desmoldagem foi feita invertendo o molde para a retirada das barras de chocolate. As barras foram acondicionadas a 20°C. A Figura 24 mostra o fluxograma do método de *seeding*.

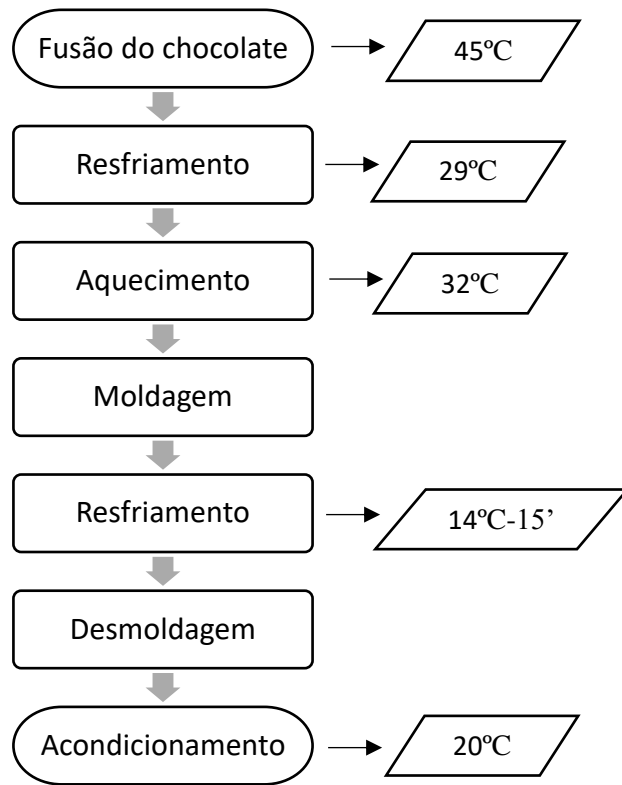


Figura 23. Fluxograma de tempera método por bancada de granito.

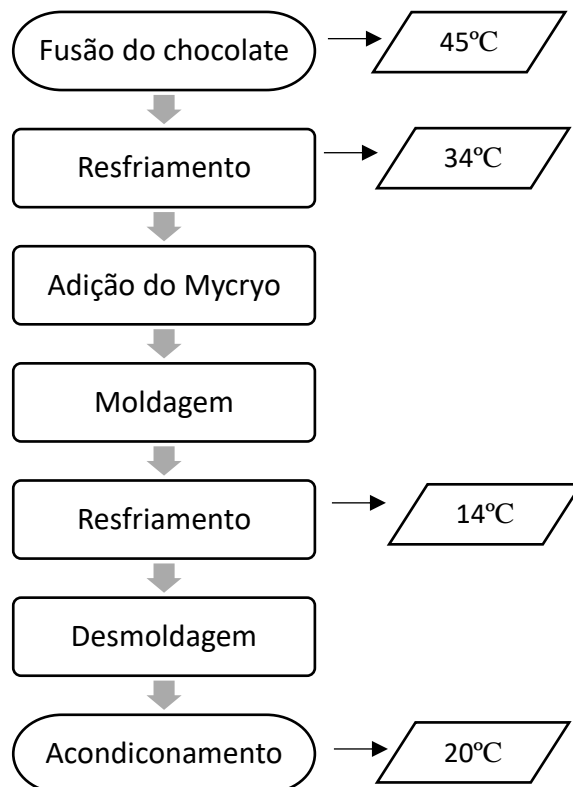


Figura 24. Fluxograma de tempera utilizando método *seeding*.

4.1.2.5 Teste 5 de maturação

O chocolate após ser moldado em barras foi resfriado à temperatura ambiente (23°C). Após a cristalização o chocolate foi armazenado a 20°C por 30 dias.

4.1.2.6 Análise sensorial

Nesta etapa de testes, uma amostra de chocolate foi analisada sensorialmente pela própria autora, segundo os atributos de cor, sabor, aroma e impressão global. Não foi possível montar um painel de avaliadores devido aos trabalhos suspensos durante a Covid 19.

4.1.3. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados dos testes de torração, processamento, comparação entre amêndoas de cacau *bulk* e cacau fino, temperagem e maturação.

4.1.3.1 Teste de torrefação

No teste de torra das amêndoas, foram utilizadas diferentes temperaturas e tempos. A amostra que apresentou as melhores características de cor, sabor e aroma foi a amostra submetida a temperatura de 110 °C por 45 minutos no forno elétrico (Amostra B). Este parâmetro foi utilizado para os testes seguintes. Os critérios utilizados para decisão foram a conservação dos aromas florais e frutais da amêndoa, desenvolvimento da reação de Maillard, eliminação parcial de *off-flavors* e desenvolvimento do sabor característico de chocolate. A Figura 25 apresenta a coloração das amêndoas após a torração a 110 °C por 45 min.



Figura 25. Amêndoas de cacau da amostra B, torrada a 110°C por 45 min, antes e após a torra (Fonte: próprio autor)

4.1.3.2 *Teste de processamento*

Neste teste, a separação da testa (casca) foi a etapa mais difícil do processo, ao utilizar o soprador para a retirada das cascas por aspersão, pequenas partículas de *nibs* também foram arrastadas, havendo um prejuízo de matéria prima durante o processo, resultando na perda de eficiência, desperdício de recursos e maior volume de resíduos.

O chocolate apresentou acidez volátil elevada (notas de vinagre), devido a presença de ácido acético remanescente da fermentação. Desta forma, foi necessário empregar um tempo maior de conchagem, afim de se obter uma maior evaporação do ácido acético, por ser um ácido volátil.

O chocolate obteve uma moagem efetiva, sem apresentar arenosidade no refino dos *nibs* no equipamento *Melanger*. Este equipamento foi eficaz para o processamento de chocolates. Além disso, a massa de chocolate apresentou um brilho intenso e alta cremosidade, devido a efetiva conchagem, atribuindo características positivas sensorialmente e visualmente ao produto como mostra a Figura 26. Entretanto o chocolate apresentou uma alta viscosidade, dificultando a temperagem e moldagem posterior.



Figura 26. Teste de processamento das amêndoas de cacau, mostrando o brilho e viscosidade do produto obtido (Fonte: próprio autor).

4.1.3.3 Teste de comparação

Sensorialmente o chocolate formulado com cacau *bulk* apresentou forte sabor avinagrado, retro-gosto químico de borracha e aroma de queimado (fumaça). Enquanto o chocolate formulado com cacau fino apresentou notas de frutas secas, cítricos e aroma de madeira e fermento. Outra considerável diferença foi a aparência das amêndoas, que podem ser visualizadas na Figura 27. As amêndoas de cacau fino por serem bem fermentadas, apresentaram uma coloração marrom escuro uniforme, sem a presença visível de fungos. Já as amêndoas de cacau *bulk*, apresentaram coloração pálida e diversa, devido a fermentação mal feita e/ou secagem inadequada. Além de apresentarem colônias fúngicas visíveis na superfície de algumas amêndoas (Figura 27).



A. Amêndoas de cacau fino

B: Amêndoas de cacau *bulk*

Figura 27. Comparação das amêndoas de cacau fino (A) com amêndoas de cacau *bulk* (B) (Fonte: próprio autor)

Os parâmetros estabelecidos para o processamento do chocolate não se adequaram as amêndoas de cacau *bulk*, devido ao excesso de ácido acético residual resultante da má fermentação. A torração e conchagem não foram suficientes para eliminar os ácidos voláteis, resultando num chocolate com sabor avinagrado. Industrialmente a torrefação é mais intensa para mascarar esse tipo de *off-flavor*, quando se utilizam amêndoas de baixa qualidade. A baixa temperatura de torração e o curto período de tempo empregado, conservaram os aromas florais e frutados das amêndoas de cacau fino, no entanto nas amêndoas de cacau *bulk* os *off-flavors* foram mais evidenciados.

4.1.3.4 Teste de temperagem

Os resultados do teste de temperagem com relação a *snap*, fusão, brilho, cor, contração, no método de pedra de granito e no método *seeding* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação dos métodos de temperagem em pedra de granito e método *seeding*.

Tipo de tempera	Snap	Fusão	Brilho	Cor	Contração (molde)
Pedra de granito					
Seeding					

Verde= Bom; Amarelo= Médio; Vermelho = Ruim

As barras de chocolate de ambos testes apresentaram brilho intenso, sem bolhas de ar, rápida fusão e alta cremosidade. A análise sensorial das barras de chocolate após a temperagem através do método de pedra de granito e *seeding*, utilizando 1% de Mycryo podem ser observadas na Figura 28. O método *seeding* mostrou melhores parâmetros de qualidade. A Figura 29 mostra as barras de chocolate obtidas pelo método *seeding*.



Figura 28. Análise sensorial do chocolate

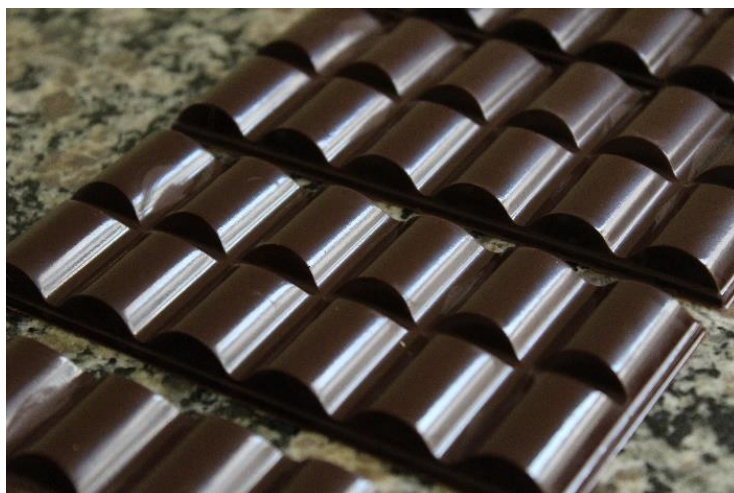


Figura 29. Barras de chocolate obtidas por *seeding* (Fonte: próprio autor).

Ambos os processos de temperagem se mostraram efetivos, no entanto o método *seeding* se mostrou mais satisfatório, quando comparamos as barras de chocolate quanto ao snap (som ao quebrar), fusão (derretimento na boca), brilho, cor e contração (facilidade ao sair do molde). Assim, de acordo com os resultados apresentados a melhor avaliação global foi da técnica *seeding*. As barras de chocolate apresentaram brilho intenso devido ao elevado tempo de conchagem, resultando em um produto visualmente atrativo. A coloração marrom escura se deve à elaboração feita com amêndoas bem fermentadas e ao elevado teor de cacau. O produto apresentou uma elevada viscosidade por se tratar de um produto não lecitinado e sem adição de manteiga de cacau, característico do tipo *bean to bar*. O sabor intenso decorreu em razão do elevado teor de cacau em sua composição, além de não conter aditivos que podem mascarar o sabor das amêndoas. O chocolate apresentou notas de frutas secas, cítricos e aroma amadeirado e fermentado e para verificar se esses sabores poderiam se tornar ainda mais acentuados após a maturação foi feito o teste de maturação usando o método de *seeding* para temperagem;

4.1.3.5 Teste de maturação

Após a maturação a 20°C por 30 dias, o chocolate foi avaliado sensorialmente utilizando os mesmos parâmetros do teste de temperagem e os

resultados podem ser visualizados na Figura 30. A aparência do chocolate maturado pode ser vista na Figura 31.

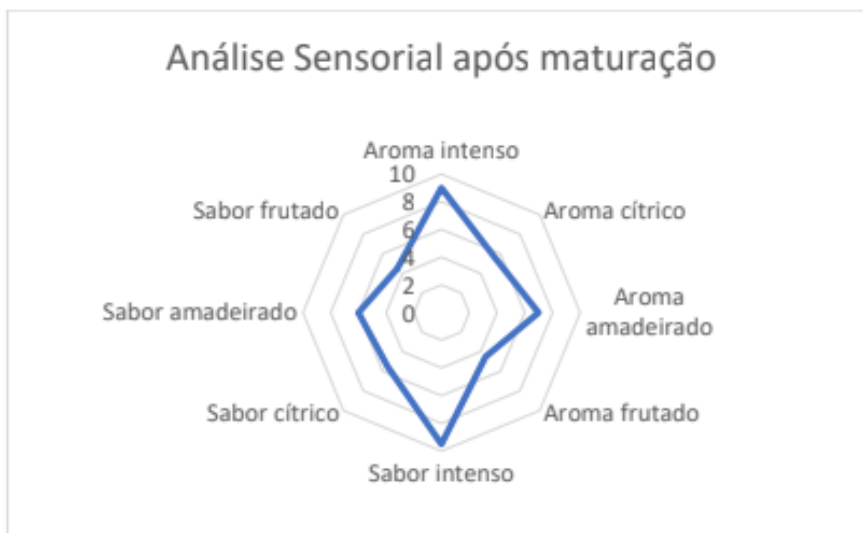


Figura 30. Análise sensorial do chocolate maturado.



Figura 31. Chocolate maturado (Fonte: próprio autor).

Ao compararmos a avaliação sensorial da barra sem maturação com a maturada, notamos uma real acentuação dos sabores e aromas. As características frutais, florais e amadeiradas, prevaleceram no chocolate, no entanto após a maturação estas se mostraram mais presentes. A partir dessas

análises, chegamos à conclusão de que a maturação é uma importante etapa no processamento, podendo ressaltar as características sensoriais de cada origem (*terroir*) do cacau. Embora essa etapa impacte expressamente no custo, esse beneficiamento torna o chocolate um produto com alto valor agregado.

4.1.4. CONCLUSÃO

De acordo com as análises de torração, processamento, comparação do cacau *bulk* com o cacau fino, temperagem comparando as técnicas de pedra de granito com o método *seeding* e teste de maturação, foi definido o processamento das amostras de amêndoas de cacau para produção do chocolate *bean to bar*. Conclui-se também que não há possibilidade de se produzir um chocolate fino a partir de amêndoas de cacau *bulk*, pois os parâmetros empregados na confecção não conseguem amenizar os *off-flavors* de amêndoas mal fermentadas e mofadas.

5. CAPÍTULO II

5.1 MICROBIOTA DO CACAU

5.1.1 RESUMO

Os resultados apresentados correspondem a 46 amostras de amêndoas de cacau coletadas, sendo 8 no estado do Amazonas, 21 na Bahia e 15 no Pará. As amostras foram divididas entre o processamento primário do cacau, fermentação e secagem, e amêndoas secas prontas para a fabricação de chocolate. O número de colônias fúngicas isoladas foi de 421, sendo a maior representatividade no processo primário de produção (abertura do fruto, fermentação e secagem). As espécies de maior ocorrência foram: *Absidia corymbifera*, *Byssochlamys* sp., *Penicillium roquefort*, *Aspergillus* section *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* e leveduras. Durante a fermentação das amêndoas da cidade de Mocajuba-PA, a contagem de bactérias lácticas, acéticas e leveduras variou de $2,1 \times 10^5$ a $3,0 \times 10^2$; $3,0 \times 10^5$ a <10 e $7,3 \times 10^5$ a <10 nos 5 dias de fermentação, respectivamente. A presença de bolores só ocorreu no primeiro dia com contagem de $2,0 \times 10^2$. Já durante a fermentação das amêndoas da cidade de Arataca-BA, a contagem de bactérias lácticas, acéticas e leveduras variou de $6,2 \times 10^5$ a $5,8 \times 10^2$, $16,7 \times 10^5$ a 1×10^2 e 12×10^5 a 4×10^2 nos 5 dias de fermentação, respectivamente. A presença de bolores só ocorreu no primeiro dia com contagem de $4,9 \times 10^2$.

5.1.2 INTRODUÇÃO

Microbiota é o conjunto de microrganismos (bactérias, bolores e leveduras), que habitam um ambiente. Cada ambiente ou *terroir* possui uma microbiota diferente, sendo assim os microrganismos da fermentação nem sempre são os mesmos (SOUZA et al., 2019). As diversas alterações que ocorrem nos grãos de cacau durante a fermentação são atribuídas ao desenvolvimento desta microbiota variada, proveniente da matéria-prima, meio ambiente e das práticas de fermentação. A polpa que envolve os grãos de cacau é quase estéril e rica em hidratos de carbono, mas é rapidamente contaminada após a abertura dos frutos (NIELSEN et al., 2005,

2007; CAMU et al., 2007, 2008a; THOMPSON et al., 2007; DE VUYST et al., 2010; PAPALEXANDRATOU et al., 2011a).

Alimentos que possuem contato direto com o solo são suscetíveis a contaminação por fungos, pois no solo podem ser encontradas diversas comunidades fúngicas. Como é o caso do cacau, que é colhido e depositado no solo antes do despulpamento (Figura 32). Estes microrganismos desempenham um papel importante nos processos de biodegradação e manutenção dos ecossistemas, entretanto, fungos presentes no solo podem contaminar a superfície do fruto, e penetrar em seus tecidos quando o cacau é aberto e despulpado (ADJOVI et al. 2015).



Figura 32. Corte e despulpamento das sementes (Fonte: próprio autor)

Sendo assim o papel dos microrganismos é de suma importância para o desenvolvimento das principais características sensoriais do chocolate, como a produção dos *flavors*, por outro lado, podem comprometer a qualidade do produto, ocasionando deterioração e surgimento de *off flavours*.

Pesquisas apontam que o surgimento dos fungos ocorre principalmente durante a fermentação, secagem e armazenamento. Em geral, os fungos filamentosos multiplicam com grande intensidade nos últimos dias de fermentação e geralmente são responsáveis pela formação de “*off flavors*”. A secagem também apresenta condições ideais para o desenvolvimento fúngico,

devido a diminuição gradativa da atividade de água das sementes de cacau, o que favorece o desenvolvimento de fungos filamentosos devido à diminuição da multiplicação de bactérias e leveduras.

Além da possível contaminação e deterioração do cacau, os fungos também representam um problema de saúde pública, devido a capacidade de produzir micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos gerados por alguns tipos de fungos filamentosos, sendo os principais do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (PITT e HOCKING, 2009). Estas toxinas podem causar doenças e morte em humanos e animais, dependendo da quantidade. Sua severidade depende da quantidade ingerida, imunidade e tempo de exposição.

Posto isso é de suma importância realizar estudos para avaliar os possíveis benefícios e malefícios dos fungos durante o processamento do chocolate. Visto que existe uma escassez de parâmetros de qualidade e segurança para este produto. Desta forma o objetivo desta pesquisa foi avaliar a microbiota presente durante a fermentação, e correlacionar com a atividade de água e *terroir*.

5.1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.3.1 Amostras

Foram avaliadas 46 amostras de cacau: fruto in natura (2), durante a fermentação (16), durante a secagem (11), amêndoas secas (17), dos estados do Pará, Bahia e Amazonas. As amêndoas do processo de fermentação foram coletadas na região de Mocajuba-PA e Arataca-BA. Cada amostra de cacau continha quantidade superior a 500g cada.

5.1.3.2 Histórico do processamento do cacau na região de Mocajuba-PA

O cacau utilizado para produção de chocolate *bean to bar* foi da espécie *Criollo*, mais conhecido como Maranhão pelos ribeirinhos. O cacau é colhido de forma extrativista, que consiste em extrair recursos naturais da Terra. Nenhum cacauero foi plantado pelos ribeirinhos, as árvores são centenárias e se reproduzem naturalmente. Estão localizados no bioma da Floresta Amazônica nas margens do rio Tocantins, na comunidade nomeada Taueré (Figura 33).



Figura 33. Comunidade do Taueré (Fonte: próprio autor).

Para coleta do cacau é necessário adentrar na mata, os frutos vão sendo coletados manualmente com auxílio de facões, e são depositados numa cesta de fibra de coqueiro, que fica pendurada nas costas dos trabalhadores. Em média 25% dos frutos são perdidos por conta da doença chamada de “podridão parda”. Em uma clareira na mata os ribeirinhos começam a quebra do cacau utilizando um facão, imediatamente uma outra pessoa realiza a retirada das sementes com as mãos, não higienizadas previamente. As sementes vão sendo depositadas em caixas plásticas forradas com plástico ou folha de bananeira, que cabem em média as sementes de 500 frutos.

Em seguida as caixas contendo as sementes dos frutos são depositadas em canoas de madeira (Figura 34), que seguem pelo rio adentro até chegar à Comunidade do Tauaré, localizada também às margens do rio Tocantins. Lá as sementes são depositadas manualmente em cochos de 1,8 metros, feitos de madeira Apari Amazônica, que não possui cheiro nem sabor. São depositados em média, 2.500 frutos por cocho, reservando um espaço de 20 cm até a borda, para facilitar o revolvimento nos próximos dias (Figura 35). As sementes são cobertas com plástico ou folha de bananeira para evitar que moscas e insetos entrem em contato com o cacau. Os cochos nunca são lavados, bem como não há higienização das mãos dos trabalhadores ou dos utensílios durante o processamento.



Figura 34. Canoas transportando cacau (Fonte: próprio autor)



Figura 35. Sementes de cacau indo para o cocho (Fonte: próprio autor)

As sementes são revolvidas a cada 24h após o segundo dia de fermentação, com o auxílio de uma pá de madeira. Essa etapa tem como objetivo a oxigenação das amêndoas, e será realizada por mais 4 dias, que somadas acumulam 6 dias de fermentação. A cada dia da fermentação foi coletado, aproximadamente 500g de amêndoas sendo congeladas a -10°C , afim de cessar a multiplicação microbiana e conservar a amostra.

Após a fermentação, as amêndoas seguem de barco para comunidade de Santana, também localizada nas margens do rio Tocantins. Lá as amêndoas são dispostas sem sobrepor em esteiras de Tupé, confeccionada em fibras de palmeira, para realizar a etapa de secagem (Figura 36). Esta etapa é realizada em barcaças de madeira. Nessa etapa as amêndoas são expostas ao sol e recolhidas ou cobertas durante a noite ou quando chove. O tempo de secagem, geralmente é de 6 dias, podendo variar conforme o clima.



Figura 36. Secagem em esteira de Tupé (Fonte: próprio autor).

A coleta na região de Mocajuba-PA ocorreu em maio de 2021, na época de safra. Foram coletadas amostras de frutos in natura e durante o processo de fermentação de 1 a 5 dias. Foram coletadas amostras do segundo, quarto e sexto dia de secagem (3), e da amêndoa seca (1).

5.1.3.3 Processamento e coleta das amostras de cacau nos municípios de Arataca-BA

Já a coleta no município de Arataca-BA foi realizada em abril de 2022, na época de safra. Foram coletadas 12 amostras de dois cochos de fermentação, sendo o primeiro cocho (7) e o segundo cocho (5), durante cada um dos dias de fermentação. Amostras do período de secagem em estufa (5) e amêndoa seca (1). O cacau foi coletado em Arataca-BA, na fazenda titulada de Vale do Putumuju, que conta com várias espécies de cacau forasteiro, inclusive novas espécies clonadas para melhor produção. O cacau é colhido conforme as safras, que variam de espécie para espécie, podendo ser realizado *blends* na hora da fermentação.

Para coleta do cacau os trabalhadores utilizam podões, ferramenta que possui uma haste longa com uma lâmina afiada na ponta, para que a coleta atinja até os lugares mais altos. Após a retirada do fruto das arvores, o cacau é colocado em uma cesta de palha localizada nas costas dos trabalhadores (Figura 37). Quando a cesta enche, os trabalhadores se dirigem a uma clareira na mata, onde estão outros trabalhadores que fazem a quebra e o despulpamento do fruto. No momento da quebra os trabalhadores selecionam o cacau, os podres, verdoengos, com pragas e doenças são amontoados e vendidos como cacau *commodity* ou ordinário (Figura 38). A quebra é realizada com auxílio de um facão, separando as duas metades do fruto.

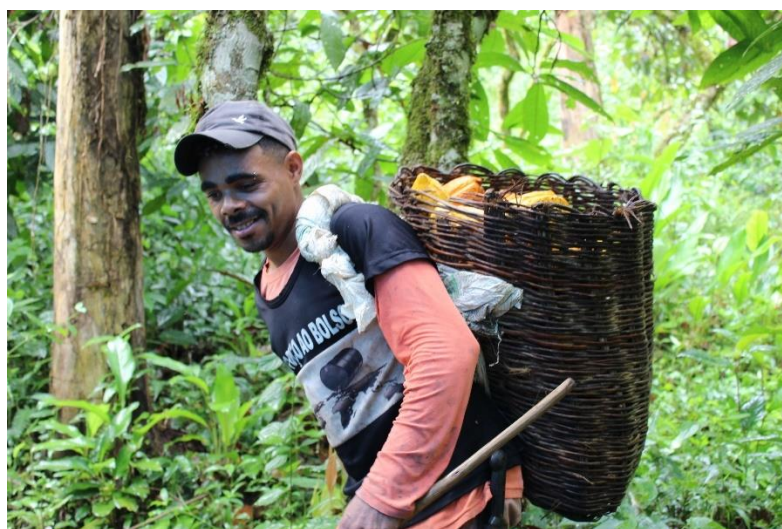


Figura 37. Transporte em cestos de palha (Fonte: próprio autor)



Figura 38. Seleção e quebra dos frutos (Fonte: próprio autor)

Outro trabalhador realiza o despulpamento com as mãos e deposita as sementes em uma caixa plástica, cada caixa cheia pesa aproximadamente 70kg. Ao encher duas caixas elas são depositadas em bombonas, que são amarradas em um burro, que segue viagem até a sede da fazenda. As sementes são depositadas num cocho de fermentação, sendo necessárias 20 caixas para encher um cocho. Após o enchimento do cocho, um funcionário insere um sensor de temperatura, portátil e calibrado no centro geométrico do mesmo. Em seguida as sementes são cobertas com folhas de bananeira para evitar contato com moscas ou insetos.

A fermentação se inicia e após 24 horas o cacau é transferido para outro cocho, onde o meio é colocado nos cantos e os cantos no meio. Esse processo de transferência é chamado de revolvimento, tendo como objetivo a aeração da polpa e homogeneização da temperatura. O cacau então é coberto com as folhas de bananeira e só é revolvido após dois dias, e assim sucessivamente a cada 24 horas até completar os sete dias de fermentação (Figura 39).



Figura 39. Amêndoas de cacau no último dia de fermentação (Fonte: próprio autor)

Após a fermentação é realizada a prova de corte das amêndoas, que seguem para secagem em barcaças localizadas em uma estufa fechada. As amêndoas são espalhadas para receberem exposição controlada de luz. Com o passar de seis dias a umidade é aferida em 7,5%, o que indica que as amêndoas já estão prontas para estocagem e produção.

As amostras foram coletadas em diferentes pontos do cocho de fermentação, utilizando luvas e transferidas para sacos estéreis a partir do tempo zero a cada 24 horas. As amostras foram submetidas a congelamento a -10°C afim de cessar a multiplicação microbiana e preservar a amostra até a sede do ITAL, em Campinas-SP, local onde as análises foram realizadas.

5.1.3.5 *Análise de atividade de água*

A atividade de água das amostras foi determinada no aparelho Aqualab, modelo 3TE, (Decagon, USA). As leituras foram realizadas em triplicata à $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1$.

5.1.3.6 *Avaliação da microbiota do cacau*

Para análise de fungos, as amêndoas de cacau (amostras recém colhidas e nos primeiros dias da fermentação antes da morte do embrião) e amêndoas na fermentação, secagem e estocagem, foram desinfectadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos. Em seguida 5 amêndoas foram dispostas em 10 placas de Petri contendo ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) com cloranfenicol totalizando 50 amêndoas (Figura 40). As placas foram incubadas à 25°C por 7 dias e os resultados expressos em porcentagem de amêndoas infectadas internamente, conforme a metodologia de Pitt & Hocking (2009). As colônias de fungos foram isoladas no meio ágar Czapek Yeast Autolyzate (CYA) para identificação. As colônias foram identificadas segundo Pitt & HOCKING (2009) e SAMSON et al. (2010).



Figura 40. Plaqueamento direto das amêndoas (Fonte: próprio autor).

Para as amostras de chocolate foi realizada a técnica de diluição em placas. Asepticamente foram pesados 25g de cada amostra às quais foram adicionados 225mL de água peptonada 0,1%, estéril, em sacos de stomacher 400 e agitadas por 90 segundos. A seguir, alíquotas de 1mL da mistura foram adicionadas em 9mL de água peptonada 0,1%, realizando as diluições seriadas de 10^1 a 10^5 , logo em seguida foram inoculadas em placas contendo os meios DG18, para fungos e leveduras, ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS), para bactérias ácido lácticas (BAL) contendo 0,04% de cicloexamida, para inibir o crescimento de fungos. As placas de MRS foram incubadas invertidas em jarros de anaerobiose a 30°C por 72 horas. Para bactérias ácido acéticas (BAA) foi usado ágar Potato Dextrose acidificado (PDA acidificado) e incubadas a 30°C por 5 dias.

As placas de DG18 foram incubadas à 25°C por 7 dias e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g), conforme a metodologia de Pitt & Hocking (1997). Para contagem foram selecionadas as placas contendo entre 15 e 150 UFC/g ou foi considerada a menor diluição no caso de valores inferiores a esse mínimo. Após o período de incubação, as placas foram examinadas e todas as cepas fúngicas foram primeiramente isoladas em placas contendo ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) por 7 dias a 25°C, para posterior identificação.

5.1.3.7 Identificação dos fungos

Os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foram inoculados utilizando a técnica de três pontos no meio CYA e incubado a 25°C por 7 dias. O gênero *Penicillium* foi identificado de acordo com Pitt (2000) e Samson et al. (2002), já os gêneros *Aspergillus* foi utilizada a chave de Klich & Pitt (1988), Samson et al. (2004) e Frisvad et al. (2004). As cepas de *Aspergillus* section *Aspergillus* foram cultivadas em ágar Czapek Extrato de Levedura e 20% de Sacarose (CY20S) durante 14 dias a 25°C. As colônias de fungos foram identificadas de acordo com descrições de Pitt & Hocking (1997) e Samson et al. (2002), complementados com outras fontes quando necessário.

5.1.3.8 Identificação das bactérias lácticas

Após o crescimento das BAL em meio MRS a 30°C por 72 horas, foi feita a contagem total das colônias. Após a contagem foram realizados testes de microscopia, catalase e gram para confirmar e caracterizar as BAL, conforme SILVA et al. (2017). Sendo que para a confirmação foi adotado os parâmetros de catalase negativa, gram positivas e forma de batonetes ou cocos. Após a confirmação a contagem foi recalculada afim de obter o resultado total de BAL.

5.1.3.9 Identificação das bactérias ácido acéticas

Após o crescimento das BAA, as colônias foram isoladas em ágar etanol a 30°C por 3 dias. Em seguida as colônias que apresentaram halo (Figura 41) foram submetidas a teste de catalase, gram e oxidase, para confirmação das BAA, conforme a metodologia de Ramos et al. (2020).

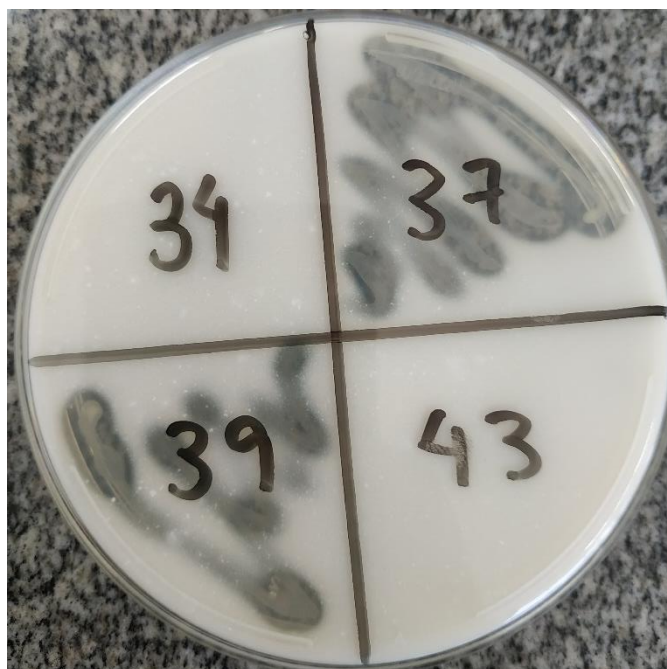


Figura 41. Halos formados por BAA (Fonte: próprio autor)

5.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação das amêndoas de cacau resultou na sucessão de leveduras, bactérias acéticas, bactérias lácticas e fungos filamentosos. Foi observada uma diversidade de fungos, leveduras e bactérias considerável durante a fermentação, secagem e estocagem. A Tabela 4 apresenta os valores de atividade de água, encontrados durante o processamento primário do cacau, nos estados do Pará e Bahia. A atividade de água (A_w) é de suma importância quando abordamos a atividade dos microrganismos, pois é possível correlacionar a quantidade de água livre no alimento, com a capacidade de determinados microrganismos se desenvolverem no mesmo.

Tabela 4. Atividade de água Mocajuba-PA

MOCAJUBA – PA			
FASE	Nº de AMOSTRAS	MÉDIA a_w	VARIAÇÃO A_w
Fruto in natura	1	0,974	0,974-0,978
Fermentação	6	0,969	0,964-0,973
Secagem	2	0,628	0,652-0,913
Amêndoa seca	1	0,628	0,628-0,630

Durante a fermentação das amêndoas da cidade de Mocajuba-PA, a contagem de bactérias lácticas, acéticas e leveduras variou de $2,1 \times 10^5$ a $3,0 \times 10^2$; $3,0 \times 10^5$ a <10 e $7,3 \times 10^5$ a <10 nos 5 dias de fermentação, respectivamente. A presença de bolores só ocorreu no primeiro dia com contagem de $2,0 \times 10^2$. A contagem total de bactérias e leveduras podem ser visualizadas no GRÁFICO 1, onde vemos a relação do tempo de fermentação e o crescimento expresso em log de 10. A atividade de água variou de 0,965 a 0,970, o pH de 3 a 5 e a temperatura de 31 a 52°C, durante a fermentação. Um total de 113 cepas de bolores foram isolados pela técnica de plaqueamento direto. A frequência, variação e média de infecção de bolores e leveduras durante o processo de fermentação, são apresentados na Tabela 5.

Gráfico 1. Sucessão microbiológica de Mocajuba-PA

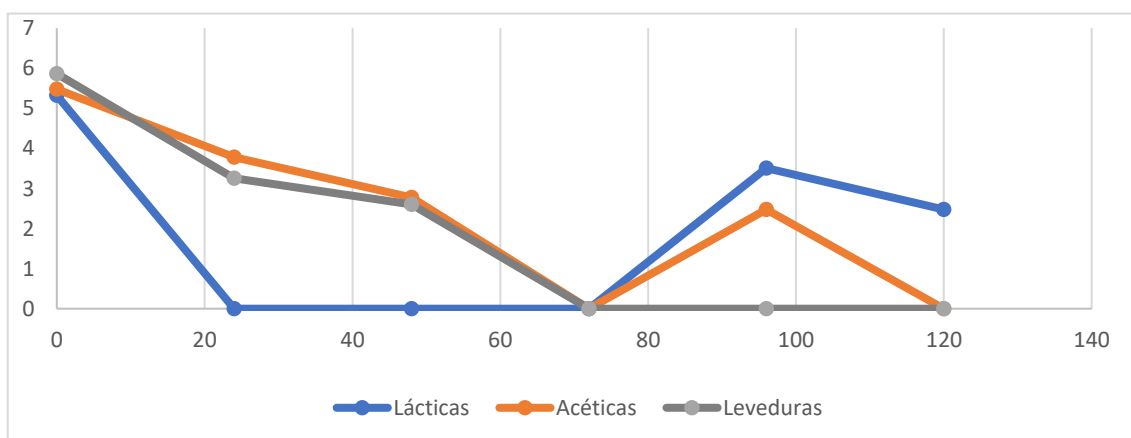


Tabela 5. Frequência, variação e média de infecção de bolores e leveduras durante o processo de fermentação em Mocajuba-PA

DURANTE A FERMENTAÇÃO - MOCAJUBA – PA			
Espécie	Frequência de ocorrência*	Média de infecção (%)	Varição de infecção (%)
<i>Absidia corymbifera</i>	2	10,7	0 - 94
<i>Aspergillus niger</i>	1	0,45	0 - 4
<i>Aspergillus flavus</i>	1	0,45	0 - 4
<i>Aspergillus section Aspergillus sp.</i>	2	3,1	0 - 24
<i>Monascus ruber</i>	2	1,3	0 - 10
<i>Mucor sp.</i>	1	0,2	0 - 2
<i>Paecilomyces sp.</i>	2	1,7	0 - 6
<i>Penicillium roquefort</i>	2	5,1	0 - 44
Leveduras	2	7,1	0 - 56

*Número de vezes em que a espécie/gênero ocorreu nas amostras.

Na cidade de Arataca-BA, durante a fermentação das amêndoas, a contagem de bactérias lácticas, acéticas e leveduras variou de $6,2 \times 10^5$ a $5,8 \times 10^2$; $16,7 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^2$ e 12×10^5 a 4×10^2 nos 5 dias de fermentação, respectivamente. A presença de bolores só ocorreu no primeiro dia com uma contagem de $4,9 \times 10^2$. A contagem total de bactérias e leveduras podem ser observadas no GRÁFICO 2. Onde vemos a relação do tempo de fermentação e

o crescimento expresso em log de 10. A atividade de água variou de 0,972 a 0,987 (Tabela 6), o pH de 3 a 5 e a temperatura de 25 a 45,5°C, durante a fermentação. Um total de 107 cepas de bolores foram isolados pela técnica de plaqueamento direto. A frequência, variação e média de infecção de bolores e leveduras durante o processo de fermentação, são mostrados na Tabela 7, respectivamente.

Gráfico 2. Sucessão microbiológica de Arataca-BA

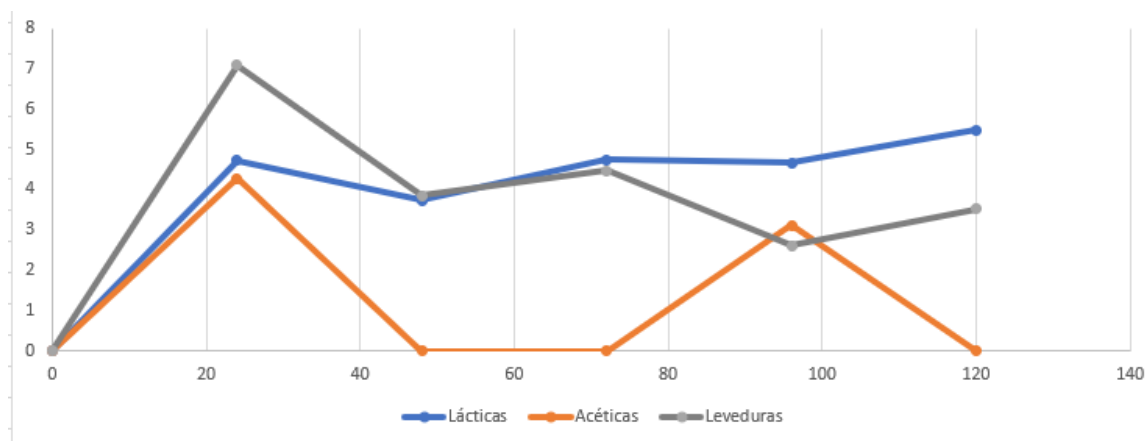


Tabela 6. Atividade de água das amostras de Arataca-BA.

ARATACA – BA			
FASE	Nº AMOSTRAS	MÉDIA aw	VARIAÇÃO Aw
Fruto in natura	1	0,991	0,991-0,993
Fermentação	12	0,977	0,972-0,987
Secagem	5	0,687	0,620-0,932
Amêndoa seca	1	0,615	0,615-0,618

Tabela 7. Frequência, variação e média de infecção de bolores e leveduras durante o processo de fermentação em Arataca-BA

DURANTE A FERMENTAÇÃO - ARATACA – BA			
Espécie	Frequência de ocorrência	Média de infecção	Varição de infecção
<i>Aspergillus candidus</i>	1	0,4	0 – 4
<i>Aspergillus niger</i>	1	0,4	0 – 4
<i>Byssochlamys</i> sp.	3	1	0 – 4
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0,4	0 – 4
<i>Aspergillus ruber</i>	1	1,4	0 - 14
<i>Penicillium roquefort</i>	4	5	0 – 26
<i>Syncephalastrum</i> sp.	1	0,4	0 – 4
Leveduras	2	2,6	0 – 18

*Número de vezes em que a espécie/gênero ocorreu nas amostras.

A presença de fungos filamentosos não é desejável, devido a capacidade de hidrolisar a polpa da semente, diminuindo a eficiência do processo de fermentação. Além de contribuir para geração de *off-flavors* e produção de micotoxinas.

No processo de fermentação ocorreu uma sucessão microbiológica, dos microrganismos encontrados nos utensílios, mãos dos trabalhadores e ambiente, visto que a polpa do cacau é estéril no momento da abertura. Assim foi confirmado através das análises microbiológicas, que a contaminação ocorreu após a abertura dos frutos.

As duas fermentações observadas durante o estudo foram espontâneas, sem a adição de inóculos. De acordo com a literatura a fermentação espontânea pode ocorrer de 5 a 7 dias, variando de acordo com a espécie do cacau e *terroir* (COCOLIN te al., 2000). No início desse processo, predominaram um grande número de espécies de leveduras, devido ao elevado teor de açúcar, baixo pH e baixa disponibilidade de oxigênio nas duas fermentações, que podem ser observados nos Gráficos 1 e 2. De acordo com a literatura as leveduras mais associadas à fermentação no Brasil são: *Candida bombi*, *C. pelliculosa*, *C. rugopelliculosa*, *C. rugosa*, *C. humilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluveromyces marxianus*, *Kloechera apiculata*, *K. thermotolerans*, *Lodderomyces elongisporus*,

Pichia fermentans, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Torulaspota pretoriensi* (PEREIRA et al., 2012, 2013; SCHWAN; WHEALS, 2004).

As leveduras são responsáveis pela produção de polifenóis, álcoois, ésteres e aldeídos, que estão diretamente associadas a formação de compostos precursores de sabor, aroma e cor das amêndoas. Além disso, contribuem no processo da sucessão microbiológica, já que apresentam elevada atividade pectinolítica, responsável por degradar a polpa e consecutivamente aumentar a oxigenação da massa, favorecendo a metabolização do ácido cítrico e aumentando o pH, possibilitando o desenvolvimento das bactérias lácticas e acéticas (THOMPSON *et al.*, 2001).

As leveduras encontradas no processo de fermentação são de suma utilidade para diminuir o tempo de fermentação. Quanto maior a quantidade de leveduras durante o processo de fermentação, maior a produção de ácido acético e etanol, que aumentam a drenagem do mel de cacau (polpa viscosa) e conseqüentemente diminuem o tempo de fermentação em até 24 horas (OLIVEIRA, 2015).

Sucedem-se então as bactérias lácticas, que contribuem para fermentar o restante dos açúcares da polpa em ácido láctico, elevando o pH e a temperatura. A primeira etapa da fermentação das sementes é anaeróbica, sendo que os primeiros microrganismos a surgirem são as leveduras que através da fermentação convertem os carboidratos em etanol, diminuindo os açúcares fermentáveis. Sucedem-se então as bactérias ácido lácticas que também fermentam esses açúcares produzindo ácido láctico, elevando ligeiramente o pH e a temperatura (COPETTI, 2009).

As leveduras e as bactérias lácticas desempenham um importante papel na degradação da polpa, por meio da secreção de enzimas pectinolíticas, sendo que nessa etapa também é possível encontrar fungos filamentosos. A próxima etapa envolve o revolvimento das amêndoas no cocho de fermentação, onde o material é aerado. Iniciando-se a fermentação aeróbica, que favorece a sucessão de bactérias acéticas, promovendo a oxidação do etanol e

consecutivamente produzindo uma reação exotérmica com elevação da temperatura para 45°- 50°C (SILVA, 2007).

No final do processo de fermentação encontramos os fungos filamentosos, principalmente nas amêndoas do topo do cocho, onde existe maior disponibilidade de oxigênio e temperatura mais amena. A função dos fungos na fermentação ainda é pouco explorada, no entanto sabe-se que algumas espécies podem produzir micotoxinas e podem produzir ácidos que alteram o sabor da amêndoa. O surgimento dos fungos durante o processo de fermentação pode ser ainda mais negativo, já que na etapa de secagem esses inóculos podem voltar a atividade e produzir mais toxinas (PETITHUGUENIN, 2002).

Podemos observar que a fermentação das amêndoas de Mocajuba-PA iniciou com a multiplicação das leveduras, e em seguida apareceram as bactérias acéticas ao invés das BAL. Entende-se que essa mudança ocorreu porque no primeiro dia de fermentação o cocho foi revolvido e essa aeração contribuiu para o aparecimento das BAA. Também podemos notar as BAL se desenvolveram após mais de 96 horas de fermentação, devido a diminuição do pH para 3.

Também podemos observar uma quantidade superior de leveduras na fermentação de Arataca-BA em relação à Mocajuba-PA. Evidenciada pela quantidade de mel de cacau (polpa degradada em estado líquido) expelida em um curto período de tempo, já que o principal microrganismo responsável pela degradação da polpa são as leveduras.

Podemos observar que a sucessão dos microrganismos é similar ao do cacau bulk, entretanto sabemos que boa parte do cacau ordinário não passa pelo processo de fermentação. No trabalho em campo conseguimos observar que essas amêndoas mal fermentadas são misturadas com sementes secas, mofadas, com pragas e doenças, transformando-se em cacau commodity. Necessitando de uma sobretorra para mascarar os off-flavors, bem como adição de aromatizantes.

Sendo assim, o cacau fino não se trata do produto de uma fermentação atípica e inédita. A principal diferença se dá pelo cuidado com a matéria prima,

trabalhando de forma artesanal, mas zelando pelo primor de cada etapa do processo. São esses detalhes que evitam a formação de *off-flavors*, e essa é a principal diferença entre um cacau fino e um cacau *bulk*. Só é possível sentir as notas sensoriais cítricas, florais e herbais, se não houver a presença de odores desagradáveis, e o mais importante, que não precise levar nenhum tipo de aromatizante artificial para encobrir o sabor.

5.1.5 CONCLUSÃO

A microbiota encontrada durante ambas as fermentações foi diversa, contemplando pelo menos 15 gêneros de bolores. Foram encontrados todos os microrganismos típicos da fermentação do cacau, como BAL, BAA, bolores e leveduras. Assim podemos concluir que as amostras da fermentação de amêndoas de cacau fino, corresponderam às mesmas características da literatura, quando comparadas ao cacau *bulk*. Entretanto a principal diferença entre elas foi o cuidado durante o processo. Para se produzir um bom chocolate é necessário que se produza um cacau de qualidade, livre de *off-flavors*.

6. CAPÍTULO III

6.1 METODOLOGIA E ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA EM CHOCOLATE

6.1.1 RESUMO

Neste capítulo os resultados dos ensaios de otimização da metodologia para detecção e quantificação de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 em chocolates finos comerciais são descritos. A aflatoxina foi extraída com solução de metanol:água, filtrada, suspensa em PBS e purificada em coluna de imunoafinidade da marca VICAM. Consecutivamente ressuspensa em metanol:água e analisada em cromatografia de alta eficiência (HPLC). A otimização da metodologia analisou fatores como seletividade, linearidade, limite de detecção e nível de recuperação das amostras. Concluindo que a metodologia empregada foi adequada para detecção da aflatoxinas em chocolate. Foi avaliada a ocorrência de aflatoxinas em 94 amostras de chocolate fino *bean to bar* do mercado. Os maiores níveis de aflatoxinas estavam presentes nos chocolates que continham uma porcentagem maior de cacau.

6.1.2 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas espécies de fungos toxigênicos, que podem vir a causar efeitos tóxicos em humanos e animais, dependendo da quantidade ingerida. A toxicidade dessas micotoxinas podem ser potencializadas quando combinada com outras doenças, como por exemplo as doenças imunossupressoras (Hussein & Brassel, 2001). O monitoramento dessas toxinas é de suma importância, visto que existe uma ampla variedade de alimentos susceptíveis à contaminação fúngica (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Existem alterações desejáveis quando estudamos a atividade dos fungos, como por exemplo na fabricação de queijos, alimentos orientais como shoyu, misso, etc. Entretanto em muitos casos os bolores podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, como odores e sabores desagradáveis, comprometendo a sanidade dos produtos. Alguns desses gêneros de fungos podem produzir micotoxinas, destacando-se no presente estudo as aflatoxinas (Diniz, 2002).

Algumas espécies de fungos como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são produtoras de aflatoxinas e tem chamado a atenção mundial, por ser um grupo de micotoxinas com grande potencial tóxico e por ser comum em vários alimentos (TORREY *et al.* 1977).

Os alimentos mais susceptíveis à contaminação por espécies de *Aspergillus* section *Flavi* são amendoim, milho, algodão, castanha do Brasil, cacau entre outros. Tanto o substrato quando o meio ambiente de produção desses alimentos é propício para o desenvolvimento desse grupo de fungos. A atividade de água necessária para o crescimento do *A. flavus* é de 0,80 a >0,99 (ótimo 0,98). Para a produção das aflatoxinas os valores são de 0,82 a >0,99 e a atividade de água considerada mais favorável é de 0,95 a 0,99 (ICMFS, 1996).

Outro fator determinante para produção dessas toxinas é a temperatura. Segundo a ICMFS (1996), a temperatura de crescimento de *A. flavus* varia de 10 a 43°C, sendo que a temperatura ótima é de 33°C. Já a temperatura para produção das aflatoxinas é de 13 a 37°C.

De acordo com BUCHANAN e AYRES (1995), o pH é um outro fator determinante para multiplicação e produção das aflatoxinas. Seus estudos, revelam maior produção na faixa de pH entre 4 e 6. Sendo que o pH menor que 6, favorece principalmente a produção de aflatoxina B1, B2, G1 e G2.

Dentre os métodos de detecção e quantificação de aflatoxinas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência, tem sido a mais usado, por permitir a detecção de níveis baixos de toxinas.

Até o momento, dezoito espécies do gênero *Aspergillus* são considerados produtores de aflatoxinas: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. novoparasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. pseudocaelatus*, *A. luteovirescens*, *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola*, *A. sergii*, *A. transmontanensis*, *A. mottae*, *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii*, *A. pipericola* e *A. cerealis* (FRISVAD *et al.*, 2019). Todavia *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, têm sido os mais frequentes na natureza. As principais aflatoxinas produzidas e destacadas são B1, B2, G1 e G2, sendo B1 a mais comum de ser encontrada nos alimentos. Essas toxinas são encontradas principalmente em

alimentos como amendoim, castanha do brasil, pimenta, cacau, milho entre outros (TANIWAKI et al., 2014, PITT & HOCKING, 2009).

Os limites estabelecidos para aflatoxinas não seguem o mesmo padrão. Na maioria dos países a média varia de 0 a 50 µg/kg (ppb), porém em países da Europa o valor máximo é de 20 µg/kg, tendo um controle mais rigoroso. O Brasil segue o mesmo limite, sendo que o valor de aflatoxina total não pode exceder 20 µg/kg na maioria dos casos. Esses critérios foram desenvolvidos com base no Codex Alimentarius, e deve ser respeitado para venda e comercialização desses produtos, aplicando-se as indústrias e produtores.

Segundo os limites atuais fixados na RESOLUÇÃO Nº 722 e IN 160, DE 01 de julho de 2022, que define os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, os produtos de cacau e chocolate devem conter no máximo 5 µg/kg de aflatoxinas totais (BRASIL, 2022). No entanto, devido a carcinogenicidade das aflatoxinas, não existem valores toleráveis para ingestão semanal, sendo assim o consumo deve ser o mais baixo possível (JECFA, 1998). O chocolate por não ser um produto consumido em grandes quantidades diárias, a sua ingestão não se torna tão alarmante. Contudo o chocolate e produtos de chocolates são consumidos pelas crianças o que traz uma certa preocupação.

As aflatoxinas presentes no chocolate na maioria das vezes se devem pela contaminação fúngica durante o processamento primário das amêndoas. Tanto o desenvolvimento fúngico quanto a produção de micotoxinas, são regulados por fatores intrínsecos e extrínsecos. Como a viabilidade das cepas, atividade de água, substrato, umidade, temperatura e interação com outros microrganismos (PITT & HOCKING, 1997). No processo primário do cacau, as sementes ficam em contato com o solo, utensílios e colaboradores, além de possuir alta atividade de água e umidade. Estes fatores podem proporcionar um ótimo ambiente para o desenvolvimento fúngico e até mesmo para a produção de micotoxinas.

Nestas condições, o presente capítulo teve o objetivo de otimizar a metodologia e analisar quantitativamente os níveis de aflatoxinas em amêndoas de cacau e chocolate.

6.1.3 MATERIAS E MÉTODOS

6.1.3.1 Otimização da metodologia de aflatoxinas em cacau e chocolate

A metodologia desenvolvida foi baseada na metodologia de STROKA *et al.* (2000). Foi realizada a extração por metanol:água, a limpeza por uma coluna de imunoafinidade com anticorpos específicos para aflatoxina. Os compostos foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência.

6.1.3.2 Etapa de extração clean-up

Foram trituradas 20g de amostra em moinho elétrico, em seguida, foram adicionados 2g de NaCl e 120 mL de solução metanol:água (8:2, v/v). Esta mistura foi agitada em Shaker por uma hora. A solução foi filtrada primeiramente em um funil com papel de filtro qualitativo (Whatman nº 2) e em seguida, com papel de filtro de microfibras de vidro (Whatman A-H). Logo após a filtração, foi retirada uma alíquota de 4 mL, suspenso em 24 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e agitado manualmente. Duas colunas de imunoafinidade específicas para aflatoxinas, das marcas VICAM e R-Biopharm foram testadas (Figura 42). Uma seringa de 25 mL foi acoplada na coluna de imunoafinidade, onde a solução extraída foi filtrada com o auxílio de uma bomba de vácuo, com fluxo de 2 a 3 mL/ minuto. Em seguida foi realizada a lavagem da coluna com 30 mL de água ultrapura Milli-Q (Merck). Para a eluição das aflatoxinas da coluna de imunoafinidade, foi usado 4 mL de metanol grau HPLC. O extrato foi evaporado em fluxo de nitrogênio e ressuspenso em 1 mL de solução metanol:água (2/3, v/v) e filtrado em seringa acoplada de filtro de 45 µm (Millex PFTE). Por último o isolado foi transferido para um *vial* para ser injetado no cromatógrafo.



Figura 42. Colunas de imunoafinidade (Fonte: próprio autor)

6.1.3.3 Detecção e quantificação de aflatoxinas por HPLC

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da marca Agilent 1260 Infinity (California, EUA) com detector de fluorescência a 362 nm de excitação e 455 nm de emissão, acoplado a um KOBRA CELL (R-biopharm), ligado a uma corrente de 100 μ A, para derivatização das aflatoxinas B1 e G1. Uma coluna de guarda ODS (1,8 μ m, 40 x 15 mm) e uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 x 150 mm) foi utilizada para a separação dos compostos.

A fase móvel utilizada foi água:acetonitrila:metanol (6:2:3, v/v/v), adicionada de 119mg de KBr e 350 μ L de ácido nítrico 4M por litro, em um fluxo de 1mL/min. Um padrão de aflatoxinas (Sigma, EUA) foi utilizado para a construção da curva padrão com a área dos picos versus a concentração (μ g/L). A concentração das aflatoxinas no extrato da amostra foi determinada pela interpolação da área do pico resultante no gráfico de calibração seguindo a metodologia de COPETTI et al. (2009). O volume de injeção foi 50 μ L tanto para a solução padrão quanto para as amostras.

6.1.3.4 Limites de detecção e quantificação

Para estabelecer os valores de limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) foram realizadas 8 repetições utilizando amostras de chocolate e amêndoas de cacau trituradas que não apresentavam contaminação por aflatoxina. A recuperação foi calculada através da adição 0,50 µg/kg de uma solução padrão, contendo 0,5 mL de cada aflatoxina (B1, B2, G1 e G2) nas amostras. O limite de detecção e a otimização do método foi baseado nas recomendações do Eurachem Guides (2014).

6.1.3.5 Teste de recuperação

Para o teste de recuperação das aflatoxinas, foi realizada a mesma metodologia descrita acima. A amostra de 20 g de amêndoas de cacau foi contaminada com um padrão contendo 50 µL de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. A solução padrão (SIGMA, EUA) corresponde a 0,5 mL de cada aflatoxina, B1, B2, G1 e G2.

Os seguintes parâmetros foram empregados para avaliar a otimização do método: seletividade e especificidade (detector de fluorescência, colunas de imunoafinidade, teste de comparação nas amostras branco e contaminado, teste de confirmação das toxinas). Os testes foram realizados nas colunas de imunoafinidade VICAM e R- Biopharm.

6.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 8 e 9 mostram os valores de recuperação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 utilizando as colunas de imunoafinidade R-Biopharm e Vicam, respectivamente.

Tabela 8. Recuperação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 utilizando a coluna de imunoafinidade R- Biopharm.

COLUNA R-BIOPHARM			
AFLATOXINA B1			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	3,1602	141,35
B	50	3,1026	138,77
C	50	3,5626	159,35
	Média	3,2751	146,49
	Desvio padrão	0,19	
AFLATOXINA B2			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	2,3334	141,35
B	50	1,2855	138,77
C	50	2,6789	159,35
	Média	2,0993	146,49
	Desvio padrão	0,59	
AFLATOXINA G1			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	1,4460	118,11
B	50	0,8250	67,39
C	50	1,8960	154,87
	Média	1,3890	113,46
	Desvio padrão	0,44	
AFLATOXINA G2			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	0,1710	22,35
B	50	0,0579	7,53
C	50	0,1592	20,86
	Média	0,1294	16,91
	Desvio padrão	0,05	
AFLATOXINA TOTAL		MÉDIA	105,84

Tabela 9. Recuperação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 utilizando a coluna de imunoafinidade Vicam.

COLUNA VICAM			
AFLATOXINA B1			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	2,3850	102,74
B	50	2,2575	56,61
C	50	2,4270	50,12
	Média	2,3565	69,82
	Desvio padrão	0,07	
AFLATOXINA B2			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	2,7720	107,89
B	50	5,1300	134,81
C	50	5,4585	108,52
	Média	4,4535	117,07
	Desvio padrão	1,20	
AFLATOXINA G1			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	2,2662	108,59
B	50	2,2995	67,63
C	50	2,4378	57,35
	Média	2,3345	77,86
	Desvio padrão	0,07	
AFLATOXINA G2			
Repetição	Contaminação (µL)	Recuperação (ng/g)	Recuperação %
A	50	1,3920	98,44
B	50	2,1300	100,42
C	50	2,6970	95,37
	Média	2,0730	98,08
	Desvio padrão	0,53	
AFLATOXINA TOTAL		MÉDIA	90,71

A média total de recuperação das aflatoxinas utilizando a coluna R-Biopharm foi de 105,84% e da coluna Vicam foi de 90,7%. Sendo assim, quando olhamos apenas para a média total das aflatoxinas, ambas parecem estar dentro dos parâmetros permitidos. Entretanto quando observamos os resultados de recuperação de cada toxina isoladamente, podemos observar que a coluna R-

Biopharm excede os níveis de recuperação para B1 e B2, além de ter uma baixíssima recuperação para G2, chegando à média de 16,5%.

Já ao observarmos os níveis de recuperação da coluna Vicam, percebemos que os valores atentam para os critérios estabelecidos. Tendo uma linearidade melhor quando comparado a coluna R-Biopharm. Ambos os resultados foram comparados com a Diretiva da Comunidade Europeia 98/53/CE (1998), que determina faixa de recuperação ente 80 e 120% para níveis superiores a 10 µg/Kg, 70 e 110% para níveis entre 1 e 10µg/Kg e entre 50 e 120% em níveis menores que 1 µg/Kg. Sendo assim, a média de recuperação utilizando a coluna Vicam foi considerada mais próxima aos limites determinados.

Anteriormente a este teste, foi realizado um ensaio onde se utilizou uma solução de acetonitrila:água 8:2, para extração da toxina na etapa de *clean-up*, tendo como resultado uma baixíssima recuperação, entre 20 a 43% de aflatoxinas totais. Portanto, foi realizado um ajuste na metodologia, empregando o uso de metanol: água 8:2, que nos permitiu uma maior taxa de recuperação.

A análise para detecção e quantificação de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 foi realizada com a extração das toxinas e *clean up* em coluna de imunoafinidade específica da marca Vicam. A detecção foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HLPC), conforme a metodologia descrita no capítulo anterior.

De acordo com a Tabela 10, 11, 12, 13 e 14, podemos observar que as 94 amostras de chocolate fino, 100% cacau, 70% cacau, 50% cacau, ao leite e branco, estavam contaminadas com aflatoxinas. No entanto a maioria das amostras apresentaram níveis baixos de contaminação. O limite de detecção do método foi de 0,01 µg/kg para cada uma das aflatoxinas B1, B2, G1 e G1.

Tabela 10. Aflatoxinas em chocolates da Bahia

AMOSTRAS – BAHIA		AFLATOXINAS µg/kg				
		B1	B2	G1	G2	TOTAL
100% cacau (4)	Média	0,23	0,11	0,25	ND*	0,58
	Varição	0,06-0,41	0,04-0,25	0,05-0,66	ND	0,15-1,17
70% Cacau (21)	Média	0,15	0,17	0,15	0,01	0,45
	Varição	0,05-0,41	0,04-1,35	0,03-0,46	LOD-0,01	0,13-1,96

50% cacau (6)	Média	0,34	0,14	0,44	ND	0,92
	Varição	0,14-0,55	0,07-0,21	0,13-0,85	ND	0,34-1,61
Ao leite (6)	Média	0,14	0,11	0,13	0,01	0,46
	Varição	0,06-0,29	0,04-0,23	0,03-0,21	LOD-0,01	0,14-0,57
Branco (6)	Média	0,05	0,05	0,03	ND	0,12
	Varição	LOD-0,05	0,04-0,05	0,01-0,04	ND	0,11-0,13
<i>* Menor que o Limite de detecção (LOD) do método: 0,01 µ/kg</i>						

Tabela 11. Aflatoxinas em chocolates do Pará

AMOSTRAS – PARÁ		AFLATOXINAS µg/kg				
		B1	B2	G1	G2	TOTAL
100% cacau (2)	Média	0,23	0,13	0,11	ND*	0,46
	Varição	0,13-0,32	0,07-0,18	0,06-0,15	ND	0,26-0,65
70% Cacau (6)	Média	0,32	0,08	0,47	0,04	0,9
	Varição	0,06-1,15	0,04-0,13	0,04-2,19	LOD-0,07	0,17-0,64
50% cacau (4)	Média	0,32	0,09	0,13	ND	0,54
	Varição	0,18-0,36	0,05-0,13	0,04-0,26	ND	0,35-0,64
Ao leite (4)	Média	0,3	0,25	0,2	ND	0,74
	Varição	0,13-0,41	0,1-0,45	0,12-0,28	ND	0,6-0,97
Branco (2)	Média	0,16	0,11	0,1	ND	0,37
	Varição	0,09-0,23	0,06-0,15	0,06-0,14	ND	0,21-0,52
<i>* Menor que o Limite de detecção (LOD) do método: 0,01 µ/kg</i>						

Tabela 12. Aflatoxinas em chocolates do Amazonas

AMOSTRAS – AMAZONAS		AFLATOXINAS µg/kg				
		B1	B2	G1	G2	TOTAL
100% cacau (4)	Média	0,16	0,04	0,16	ND*	0,36
	Varição	0,13-0,2	0,04-0,08	0,12-0,21	ND	0,3-0,44
70% Cacau (7)	Média	0,26	0,12	0,24	ND	0,63
	Varição	0,08-0,38	0,09-0,24	0,02-0,42	ND	0,2-1,01
50% cacau (3)	Média	0,13	0,05	0,15	ND	0,32
	Varição	0,08-0,16	0,04-0,06	0,12-0,17	ND	0,29-0,34
Ao leite (2)	Média	0,38	0,14	0,33	ND	0,85
	Varição	0,34-0,41	0,12-0,16	0,31-0,35	ND	0,77-0,92
Branco (2)	Média	0,18	0,12	0,2	0,03	0,52
	Varição	0,15-0,21	0,1-0,13	0,15-0,25	0,01-0,04	0,47-0,56
<i>* Menor que o Limite de detecção (LOD) do método: 0,01 µ/kg</i>						

Tabela 13. Aflatoxinas em chocolates de Roraima

AMOSTRAS – RORAIMA		AFLATOXINAS µg/kg				
		B1	B2	G1	G2	TOTAL
70% Cacau (2)	Média	0,45	0,44	0,69	ND*	1,57
	Variação	0,26-0,64	0,25-0,62	0,39-0,98	ND	0,89-2,24
50% cacau (2)	Média	0,29	0,14	0,39	ND	0,82
	Variação	0,17-0,41	0,08-0,2	0,22-0,55	ND	0,47-1,17
<i>* Menor que o Limite de detecção (LOD) do método: 0,01 µ/kg</i>						

Tabela 14. Aflatoxinas em chocolates do Espírito Santo

AMOSTRAS - ESPIRIRTO SANTO		AFLATOXINAS µg/kg				
		B1	B2	G1	G2	TOTAL
70% Cacau (5)	Média	0,61	22,04	0,25	ND*	22,89
	Variação	LOD-2,74	0,15-62,74	0,01-0,75	ND	0,57-63,49
Ao leite (4)	Média	0,27	0,12	0,28	ND	0,66
	Variação	0,12-0,35	0,06-0,19	0,09-0,45	ND	0,26-0,91
<i>* Menor que o Limite de detecção (LOD) do método: 0,01 µ/kg</i>						

De acordo com os resultados, podemos observar que os níveis totais de aflatoxinas são ligeiramente maiores no estado de Roraima em seguida do Pará, quando comparados com o da Bahia e do Amazonas. Já no Espírito Santo os valores foram mais elevados por conta de algumas amostras. Duas amostras apresentaram valores discrepantes sendo analisadas novamente para verificação dos níveis de aflatoxinas. Todavia estas duas amostras permaneceram com os níveis acentuados de aflatoxinas, uma contendo 21,89 e outra 65,49 µg/kg. Ao investigarmos a razão desta elevada concentração, pudemos observar que se tratavam de amostras de chocolate com adição de amendoim, gergelim e folhas de ouro 24k. Este fato nos sugere que é possível que esses ingredientes utilizados na composição estavam contaminados com níveis elevados de aflatoxinas, interferindo diretamente no resultado.

As amostras de chocolate branco apresentaram os menores níveis de aflatoxinas, quando comparado aos demais tipos. Isso se deve ao fato de que esses produtos levam apenas manteiga de cacau em sua composição, sendo

ainda adicionado açúcar e leite em pó. As aflatoxinas geralmente ficam na porção não lipídica do produto, isto é, na torra do cacau e não na manteiga.

Os níveis de aflatoxinas apresentados são semelhantes aos descritos por COPETTI (2009), a pesquisa avaliou 100 amostras de chocolates industriais em pó e em barra, provenientes de cacau *bulk*. Os níveis de contaminação das amostras de chocolates ao leite e meio amargo variaram de 0,04 a 1,28 µg/kg, respectivamente. Podemos comparar os níveis de contaminação do meio amargo com os chocolates finos de 50%, 70% e 100% de cacau. Os níveis de aflatoxinas dessas amostras variaram de 0,45 a 1,57 µg/kg, valores similares ao estudo de COPETTI (2009).

Os chocolates industriais possuem teor de cacau entre 40 a 50%, passam por mais processos de refinamento e fracionamento, o que em tese poderia diminuir o teor de aflatoxinas. Os chocolates finos apresentaram um nível de contaminação menor quando comparado ao chocolate comercial. Isso se deve ao fato de o processamento primário do cacau fino ser muito mais rigoroso e cuidadoso. Os frutos contaminados por fungos são descartados e não são utilizados durante o processamento, já o chocolate industrial utiliza cacau *bulk*, que provem de frutos muitas vezes infectados por fungos. No processamento do cacau *bulk* não existe um controle rigoroso sobre a seleção e fermentação, fazendo com que as amêndoas se tornem mais infectadas, podendo aumentar a concentração de aflatoxinas.

Apesar de todas as amostras estarem contaminadas por aflatoxinas, os valores médios dos chocolates analisados foram baixos, portanto, o consumo desses produtos representa uma fração mínima de contaminação na dieta dos seres humanos.

6.1.5 CONCLUSÃO

A metodologia de extração e recuperação se mostrou eficaz, utilizando extração por metanol:água e coluna de imunoafinidade da marca Vican. Os valores de aflatoxinas encontrados nos chocolates finos analisados encontram-

se baixos, dentro do limite máximo de contaminação permitidos pela ANVISA (IN 161/22) de 5 µg/kg de aflatoxinas totais (BRASIL, 2022). As amostras com maior concentração de cacau apresentaram maior concentração de aflatoxinas, quando comparadas ao chocolate branco. Já que este possui apenas a fração líidica do cacau, e as aflatoxinas geralmente ficam na porção não lipídica do produto, isto é, na torra do cacau e não na manteiga. Os chocolates finos apresentaram um nível de contaminação menor quando comparado ao chocolate comercial analisado em estudos anteriores. Isso se deve ao fato de o processamento primário do cacau fino ser muito mais rigoroso e cuidadoso. Os frutos com infecções fúngicas não são utilizados durante o processamento, enquanto os chocolates feitos com cacau *bulk* levam em sua composição este tipo de matéria prima. Fazendo com que a concentração de aflatoxina se torne maior. Conclui-se que os chocolates *bean to bar* não representam uma grande fonte de aflatoxinas na dieta dos humanos. Entretanto, é um produto amplamente consumidos por crianças, desta forma é importante que seja feito um controle dos níveis e ocorrência.

REFERÊNCIAS

AFOAKWA, E. O. et al. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(9): 840-857. *Agrotropica*. <http://dx.doi.org/10.21757/0103-3816.2012v24n3p197-206>.

ALMEIDA, Silvana de Fátima Oliveira de. Leveduras da fermentação do cacau amazônico: caracterização molecular e perfil de enzimas extracelulares. 2018. 103 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

ALVAREZ, Lilian Gabriela Salazar. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE THEOBROMA CACAO L. DE LA VARIEDAD “CHUNCHO” OBTENIDA EN CUZCO, PERÚ. 2017. 93 f. TCC (Graduação) - Curso de Biología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 2017.

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

ARDHANA, M. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], v. 86, n. 1-2, p. 87-99, 1 set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00081-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00081-3).

BASTOS, Valdeci. SUCESSÃO MICROBIANA E DINÂMICA DE SUBSTRATOS E METABÓLITOS DURANTE A FERMENTAÇÃO ESPONTANEA DE GRÃOS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.), VARIEDADE CLONAL TSH 565,

CULTIVADO NO SUL A BAHIA. 2016. 133 p. Tese (Doutorado) - UFRJ, [S. l.], 2016. Disponível em: https://ppgcal.iq.ufrj.br/wpcontent/uploads/2017/06/Valdeci_Bastos_TESE.pdf. Acesso em: 4 ago. 2020.

BATISTA, Ana Paula Sabbag Amaral. CHOCOLATE: SUA HISTÓRIA E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS. 2008. 56 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Gastronomia, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2008.

Biodiversity Centre, Utrecht, 2010.

BRASILEIROS. RAE-Revista de Administração de Empresas | FGV EAESP, [s. l.], 26 dez. 2017. DOI <https://doi.org/10.1590/s0034-759020180307>. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rae/v58n3/pt_0034-7590-rae-58-03-0267.pdf. Acesso em: 18 set. 2020.

BUCHANAN JR, R. L.; AYRES, J. C. Effect of initial pH on aflatoxin production. *Applied Microbiology*, v. 30, n. 6, p.1050-1051, Dec. 1975.

CAMU, Nicholas et al. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [S. l.], p. 1, 10, 24 jun. 2008. Disponível em: DOI:10.1002/jsfa.3349. Acesso em: 4 ago. 2020

CHOCOLATE ALCHEMY. Associação bean to bar Brasil. [S. l.], 5 ago. 2018. Disponível em: <http://www.beantobarbrasil.com.br/>. Acesso em: 18 set. 2020.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 81-87, Aug. 2000.

COMO ESTRATÉGIA PARA ELEVAÇÃO DO PREÇO NO MERCADO
COPETTI, Marina Venturini. MICROBIOTA DO CACAU: FUNGOS E MICOTOXINAS DO CACAU COHOCOLATE. 2009. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2009.

CROS, E.; JEANJEAN, N. 1989. Formation de l'arôme cacao. In *Cacao et Chocolat: Production, Utilisation, Caractéristiques*. Paris, Tec & DocLavoisier. pp. 187-206.

CRUZ, Jaqueline Fontes Moreau. Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, A Universidade Federal da Bahia, Salvador-Ba, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/8794/1/Jaqueline%20Fontes%20Moreau%20Cruz.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.

CULTIVADO NO SUL A BAHIA. 2016. 133 p. Tese (Doutorado) - UFRJ, [S. l.], 2016.

DINIZ, S.P.S.S. *Mycotoxins – Biochemical Approach*. 1ed. Rio de Janeiro: Ed. Albatroz, 2015. 186p

EURACHEM GUIDES. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. LGC, Teddington, ed. 2, 2014.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus Lactobacillus. 2009. Disponível em: . Acesso em: 16 de setembro de 2020.

FERRÃO, José E. Mendes. Cacau: tecnologia pós-colheita. Tecnologia póscolheita. Lisboa: Instituto da Cooperação Portuguesa, 2002

FERREIRA/, Aguido. Brasil quer ganhar posições na produção mundial de cacau e chocolate. 2019. CEPLAC. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/brasil-quer-retomar-protagonismo-no-cenarioglobal-de-cacau-e-chocolate>. Acesso em: 08 jul. 2019.

GRANDA, Alana. **Brasil celebra Dia Mundial do Chocolate com 7º lugar em exportação.** 2022. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2022-07/brasil-celebra-dia-mundial-do-chocolate-com-7o-lugar-em-exportacao>. Acesso em: 07 jan. 2023.

HECK, Marina et al. LEGITIMIDADE COMO UMA BARREIRA: ANÁLISE DO PROCESSO DE LEGITIMAÇÃO DO CACAU E CHOCOLATE PREMIUM SILVA,

Hussein, S.H., Brasell, J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, v.167, n.2, p.101-134, 2001

ICMSF. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403- 428.

INTERNACIONAL. *Agrotropica (itabuna)*, [s.l.], v. 24, n. 3, p.197-206, 31 dez. 2012. *Agrotropica*. <http://dx.doi.org/10.21757/0103-3816.2012v24n3p197-206>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF COCOA. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*. 2019. Disponível em: <https://www.icco.org/about-us/icco-news/408-may2019-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>. Acesso em: 31 maio 2019.

LOCATELLI, Liliana. *Indicações geográficas: a proteção jurídica sob a perspectiva do desenvolvimento econômico*. Curitiba: Juruá, 2007.

LUCAS, V. *Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas a manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate*. 2001. 195 p. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP.

MARCILENE; ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU [http://tede2.uefs.br:8080/bitstream/tede/1090/2/disserta%c3%a7%c3%a3o_Marcielie.p df](http://tede2.uefs.br:8080/bitstream/tede/1090/2/disserta%c3%a7%c3%a3o_Marcielie.pdf). Acesso em: 20 ago. 2020.

MICOTOXINAS EM ALIMENTOS PRODUZIDOS NO BRASIL. Campina Grande: *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 01 jan. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Maike-Montanhini/publication/228448438_Micotoxinas_em_alimentos_produzidos_no_brasil/links/00b7d52783f1a49ee8000000/Micotoxinas-em-alimentos-produzidos-no-brasil.pdf. Acesso em: 05 dez. 2022.

MOREIRA, Igor Magalhães da Veiga; MIGUEL, Maria Gabriela da Cruz Pedrozo; DUARTE, Whasley Ferreira; DIAS, Disney Ribeiro; SCHWAN, Rosane Freitas. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, [s.l.], v. 54, n. 1, p. 9-17, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>.

NIELSEN, D. S et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods, Germany, *International Journal of Food Microbiology*, n. 114, p. 168-186, 2007.

OLIVEIRA, Marcos Pinto Monteiro de. Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau. Orientador: Luiz Humberto Gomes. 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2015

PEREIRA, G. V. de M. et al. Bacterial strains to develop a defined fermentations and screening of yeast and characterization of small-scale cocoa microbiological. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 78, n. 78, p. 5395-5405, Aug. 2012.

Petithuguenin, P. 2002. Causes and development of ochratoxin A on cocoa beans: Results of a research project conducted in 2001-2002 in Côte d'Ivoire. *International ZDS Symposium*.

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. New York:

QUINATOVA, Diana C. V. "AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (Theobroma cacao L.) TRINITARIO Y NACIONAL". 2017. 74 p. TCC (Graduação) - UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO, Mocache - Los Ríos - Ecuador, 2017. Disponível em: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2285/1/T-UTEQ-0048.pdf>. Acesso em: 15 set. 2020.

RAMOS et al. Influence of pulp on the microbial diversity during cupuaçu fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 318, 108465, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108465>

SAMSON, R.A. et al. 2010. Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal

SANTOS, A. M. dos et al. CACAU: A DIFERENCIAÇÃO PELA QUALIDADE

SANTOS, Almir Martins dos; SANTOS, Givago B . Martins dos; SANTOS, Pricilla B. M. dos. CACAU: a diferenciação pela qualidade como estratégia para elevação do preço no mercado internacional. *Agrotrópica (Itabuna)*, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 197-206, 31 dez. 2012. *Agrotrópica*

SCHWAN, R. F. and WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*. v.44, p.205-221, 2004.

SILVA, Adriana Reis de Andrade. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMÊNDOAS DE CACAU DA REGIÃO TRANSAMAZÔNICA-PARÁ/BRASIL

SILVA, Adriana Reis de Andrade. CARACTERIZAÇÃO DE AMÊNDOAS E CHOCOLATE DE DIFERENTES VARIEDADES DE CACAU VISANDO A MELHORIA DA QUALIDADE TECNOLÓGICA. 2013. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, 2013.

SILVA, Adriana Reis de Andrade. SILVA, Adriana Reis de Andrade. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMÊNDOAS DE CACAU DA REGIÃO TRANSAMAZÔNICA-PARÁ/BRASIL PRODUZIDAS POR MÉTODOS MAIS SUSTENTÁVEIS (ORGÂNICO E FAIR TRADE). 2018. 239 f. Tese (Doutorado- Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2018. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

SILVA, Marcielle S. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU. 2011. 83 p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, [S. I.], 2011.

SILVA, N. et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. São Paulo: Blucher. 5ed., 2017.

SOARES, Marilda S. ESTUDO DO MELHORAMENTO DO SABOR DE CACAU ATRAVÉS DA AÇÃO ENZIMÁTICA DURANTE A FERMENTAÇÃO. 2001. 121 p. Dissertação (Mestrado) - UNICAMP, Campinas - SP, 2001. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/255220/1/Soares_MarinaldadaSilva_M.pdf. Acesso em: 25 set. 2020.

SOUZA., Cezar Augustus Galvão de Carvalho. CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DO CACAU FINO: DO FRUTO AO CHOCOLATE. 2014. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Gastronomia, A Universidade Federal da Bahia, Salvador-Ba, 2014. Disponível em: https://repositoriodev.ufba.br/bitstream/ri/36714/1/18_02_2014_TCC_CD.pdf. Acesso em: 06 maio 2023.

Stroka, J., Anklam, E., Jorissen, U. & Gilbert, J. 2000. Immunoaffinity column cleanup 97 with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 83 (2): 320-340

SUSTENTÁVEIS (ORGÂNICO E FAIR TRADE). 2018. 239 f. Tese (Doutorado-Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2018. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

TEIXEIRA, E. et al. Análise sensorial de alimentos. Florianópolis: Ed. da UFSC, 1987. 180 p.

THEOBROMA CACAO L. DE LA VARIEDAD "CHUNCHO" OBTENIDA EN CUZCO, PERÚ. 2017. 93 f. TCC (Graduação) - Curso de Biología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 2017.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; and LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, p.721- 733, 2001.

TORREY, G. S.; MARTH, E. H. Temperature in home refrigerators and mold growth at refrigeration temperatures. *J. Food Protect.*, v. 40, n. 6, p. 393-397, 1977.