



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEONARDO FONSECA MACIEL

**CARACTERIZAÇÃO DE CLONES, COMPOSTOS  
BIOATIVOS E MICOTOXINAS EM CACAU (*Theobroma cacao*  
L.)**

---

Londrina  
2015

LEONARDO FONSECA MACIEL

**CARACTERIZAÇÃO DE CLONES, COMPOSTOS  
BIOATIVOS E MICOTOXINAS EM CACAU (*Theobroma cacao*  
L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de  
Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka.

Co-orientador: Prof. Dr. Douglas Fernandes Barbin.

Londrina  
2015

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M152c Maciel, Leonardo Fonseca.  
Caracterização de clones, compostos bioativos e micotoxinas em cacau (*Theobroma cacao* L.) / Jefferson Tadeu de Campos. - Londrina, 2015.  
100 f.: il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.  
Coorientador: Douglas Fernandes Barbin.  
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Análise. - Teses. 2. Compostos bioativos. - Teses. 3. Cacaueiro – Clonagem. - Teses. 4. Análise de componentes principais. - Teses. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Barbin, Douglas Fernandes. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641:633.74

LEONARDO FONSECA MACIEL

**CARACTERIZAÇÃO DE CLONES, COMPOSTOS BIOATIVOS E  
MICOTOXINAS EM CACAU (*Theobroma cacao* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de  
Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann  
Universidade Federal de Santa Maria - UFMS

---

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Wagner Ezequiel Risso  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dra. Cássia Reika Takabayashi Yamashita  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Maria Spínola Miranda  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Londrina, 24 de setembro de 2015.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia – Micotoxinas e Ficotoxinas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias) sob orientação da Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka / Universidade Estadual de Londrina e co-orientação do Prof. Dr. Douglas Fernandes Barbin / Universidade Estadual de Campinas.

O apoio contou com Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (concessora da bolsa de doutorado); Projeto no.23 – Rede Nanobiotec-Brasil, CAPES.

*Ao Lhu*  
*À lua*  
*Ao amor*  
*À vida*  
*Ao mar*  
*À natureza*  
*Aos Orixás*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos e aos funcionários, pela dedicação e apoio;

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação, incentivo e compreensão;

Ao Prof. Dr. Douglas Fernandes Barbin pela colaboração e co-orientação;

À Coordenação do Curso de Pós-graduação, em nome das coordenadoras Profas. Dra. Elza Ida e Marta Benassi, pela atenção e colaboração;

À Universidade Federal da Bahia, especialmente às diretoras da Faculdade de Farmácia, Profa. Dra. Maria Spínola Miranda (2009-2013) e Profa. Dra. Eliete da Silva Bispo (em exercício);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro - Projeto no.23 – Rede Nanobiotec-Brasil;

Às Fazendas Lajedo do Ouro e Riachuelo pela confiança e pelo fornecimento de amostras para a condução deste estudo;

A Profa. Dra. Rosemary Duarte Sales Carvalho pelo apoio, colaboração, confiança e pelo fornecimento de amostras para a condução deste estudo;

À Ana Lúcia de Souza Madureira pela amizade; e companheirismo durante a nossa vivência no laboratório e na condução das análises;

Às parceiras de laboratório e amigas Cassia Reika Takabayashi Yamashita, Angélica Tieme Ishikawa, Livia Montanheiro Médici e Renata Sobotka;

Aos estagiários que dedicaram um pouco do seu tempo para colaborar com este trabalho: Luís Felipe Morozzini, Carlos Henrique Vidigal Bazoni, Herrison Yoshiki e Fernanda Ramos;

À minha família: Darcilene, Erika, Lidiane, Matheus e Henrique;

Aos amigos: Marcio André, Tatiane Dantas, Fábio Carvalho, Ana Claudia, Lilian Pitombo, Janine Gomes, Vicente Matheus, Maiana Teixeira, Vanessa Benevides, Carla Moura, Paula Marques;

Ao Henrique Machado pelo apoio e momentos de desconcentração;

A Valmir Marques e Margareth Ribeiro por todos os momentos felizes;

À Alessandra Bosso e Mariah Benine pelo imenso amor, amizade, apoio e dedicação, e por fazer da minha estadia em Londrina mais alegre e feliz;

Ao grande amigo, parceiro e companheiro Lucas Caldeirão por toda ajuda e todos os momentos de alegria e cumplicidade;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Quem tem vontade no coração  
Quem tem pela vida paixão  
Terá o seu dia de vencedor  
Verá sua consagração”*

*Nelson Rufino*

MACIA. Leandro Fonseca. **Caracterização de clones, compostos bioativos e micotoxinas em cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2015. 100 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O Brasil é o sexto produtor mundial de cacau, atrás de Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões. A região sul da Bahia se destaca por ser a maior produtora do país com cerca de 60% da produção. Devido aos prejuízos causados pela infestação da lavoura cacauzeira pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que provoca a doença “vassoura de bruxa”, os órgãos de controle e pesquisa em cacau iniciaram a clonagem de espécies resistentes à doença. A contaminação por aflatoxinas (AFs) e ocratoxina A (OTA) foi determinada em cento e trinta amostras de treze clones de cacau desenvolvido no sul da Bahia por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de fluorescência (UPLC-FLD) (Limite de detecção (LOD): 0,100, 0,040, 0,125, 0,050 e 0,900 µg.kg<sup>-1</sup>; Limite de quantificação (LOQ): 0,375, 0,100, 0,400, 0,125 e 2,500 µg.kg<sup>-1</sup>; Recuperação: 94,7, 90,7, 95,8, 91,7, 89,4 µg.kg<sup>-1</sup> para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA respectivamente). A contaminação por aflatoxinas foi detectada em 38% das amostras, com ênfase em AFB1 com 25% das amostras positivas, ao passo que a ocratoxina A foi positiva em 18%. O teor de compostos fenólicos totais de flavonoides totais, antocianinas totais, ácido cafeico, cafeína, teobromina, catequina e epicatequina foram determinados em doze clones de cacau. Os compostos foram determinados por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos (UPLC-PDA). Entre os clones analisados, observou-se uma variação no seu conteúdo de compostos bioativos. O clone SRN apresentou o maior conteúdo para os compostos fenólicos, flavonoides, cafeína, catequina e epicatequina. O clone CC apresentou o menor conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides, catequina e epicatequina. A análise de componente principal (PCA) mostrou que todos os clones têm características relacionadas com a sua composição de compostos bioativos, classificando cada clone de forma bem definida. Métodos eficazes e rápidos são importantes para distinguir clones de cacau no campo e na indústria de transformação. Foi proposta a aplicação da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS), como um método analítico potencial para classificar diferentes clones e prever a composição química de cacau. A análise da composição química e características de cor foram determinados por métodos oficiais e, em seguida, relacionado com a informação espectral por modelos de mínimos quadrados parciais e de regressão. Vários pré-tratamentos matemáticos foram aplicados para estudar a influência das variações espectrais na previsão dos atributos físicos e químicos do cacau. Os resultados das análises de composição química e as medições colorimétricas apresentaram diferenças significativas entre os clones. Os espectros NIRS de amostras exibiram perfis característicos para cada clone e análise de componentes principais mostrou diferentes clones de acordo com características espectrais.

**Palavras-chave:** Alimentos - Análise. Compostos bioativos. Cacaueiro. Clonagem. Análise de componentes principais.

MACIA. Leandro Fonseca. **Characterization of clones, bioactive compounds and mycotoxins in cocoa (*Theobroma cacao* L.)**. 2015. 100 p. Thesis (Doctoral degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

Brazil is classified at the sixth rank in the world cocoa producer, with the Southern Bahia state producing 60% of cocoa bean in the country. Such a decrease in position was due to fungal damage named “witch’s broom disease” caused by *Moniliophthora perniciosa* in plantation. Nevertheless, it should be emphasized that 90% of Brazilian cocoa bean has been exported in worldwide, which requires immediate control of disease. The local research has been targeted on cloning of disease resistant species; such an improvement should be concomitantly coupled with food safety regarding the mycotoxin production by tropical *Aspergillus* sp. as aflatoxin (AFS) and ochratoxin A (OTA A), as well as the quality evaluation concerning bioactive compounds, and possibility of introduction of NIRS – near infrared reflectance that is rapid non-destructive physical method. Aflatoxin and ochratoxin contamination were evaluated in one hundred and thirty samples harvested from thirteen cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in Southern state of Bahia by Ultra Performance Liquid Chromatography with fluorescence detector (UPLC-FLD) (Limit of detection (LOD): 0.100, 0.040, 0.125, 0.050 and 0.900  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; Limit of quantification (LOQ): 0.375, 0.100, 0.400, 0.125 and 2,500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; Recovery: 94.7, 90.7, 95.8, 91.7, 89.4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  – AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 and OTA respectively). Aflatoxin contamination was detected in 38% samples, with emphasis on AFB1 in 25%, whereas ochratoxin A was positive in 18%. The bioactive compounds analysis (twelve clones) were targeted on main cocoa components, i.e. content of total phenolic compounds, total flavonoids, total anthocyanins, caffeic acid, caffeine, theobromine, catechin and epicatechin. The compounds were determined by UPLC with photodiode array detector (UPLC-PDA). There is considerable variation between the clones analyzed for their content of bioactive compounds. The SRN clone showed the highest values for phenolic compounds, flavonoids, caffeine, catechin and epicatechin. The CC clone had the lowest values of phenolic compounds, flavonoids, catechin and epicatechin. The PCA analysis showed that all of the clones have related characteristics to their composition in bioactive compounds, classifying each well-defined clone. Effective and fast methods are important for distinguishing cocoa clones in the field and in the processing industry. This work proposes the application of NIRS as a potential analytical method to classify different clones and predict the chemical composition of cocoa. Chemical composition analysis and colour features were determined by traditional methods and then related with the spectral information by partial leastsquares regression models. Several mathematical pre-treatments were applied to study the influence of spectral variations in predicting cocoa physical and chemical attributes. The results of chemical composition analyses and colorimetric measurements show significant differences between clones. NIR spectra of samples exhibited characteristic profiles for each clone and principal component analysis showed different clones in according to spectral features.

**Keywords:** Food - Analysis. Bioactive compounds. Cacao tree. Cloning. Principal component analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Fluxograma do pré-processamento do cacau .....	22
Fig. 2 – Caixa de fermentação de cacau com temperatura controlada.....	22
Fig. 3 – Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 .....	25
Fig. 4 – Estruturas química da ocratoxina A .....	27
Fig. 5 – Principais compostos bioativos encontrados no cacau .....	29

### CAPÍTULO 1

Fig. 1 – Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 .....	45
Fig. 2 – Estrutura química da ocratoxina A .....	45
Fig. 3 – Perfil cromatográfico de aflatoxinas (A – solução padrão; B – amostra naturalmente contaminada) e ocratoxina A (C – solução padrão; D – amostra naturalmente contaminada) em cacau .....	51
Fig. 4 – Histograma das médias de micotoxinas em clones de cacau. 1 – TSH 1188; 2 – TSH 516; 3 – BN 34; 4 – CC; 5 – CCN 51; 6 – SRN; 7 – VB 1151; 8 – BN 34; 9 – CEPC 2002; 10 – PH 16; 11 – PP; 12 – SR 162; 13 – PH 16.....	56

### CAPÍTULO 2

Fig. 1 – Estrutura química da catequina e epicatequina .....	63
Fig. 2 – Estrutura química da cafeína e teobromina.....	64
Fig. 3 – Perfil cromatográfico de teobromina, catequina, cafeína e epicatequina (A – solução padrão; B – amostra) e ácido cafeico (C – solução padrão; D – amostra) em cacau. 71	
Fig. 4 – Loading (A) e PCA (B) realizado para cada composto bioativo.....	74
Fig. 5 – PCA dos diferentes clones de cacao.....	75

### CAPÍTULO 3

Fig. 1 – a) Average spectra of each cocoa clone (whole beans); b) Average spectra of each cocoa clone (ground beans) (1. PH 16, 2. PP, 3. SR 162, 4. CEPC 2002, 5. BN 34); c) Score plots for the first three PCS (whole samples); d) Loadings for the PCA carried out for the whole cocoa samples; e) Score plots for the first three PCS (ground samples); f) Loadings for the PCA carried out for the ground cocoa samples (1. PH16, 2. BN34, 3. SR162, 4. CEPC2002, 5. PP).....	88
---	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1: Occurrence of aflatoxin and ochratoxin A in cocoa clone developed by CEPLAC, Southern Bahia state, Brazil (crop 2013) .....	50
---	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1: Teor de compostos bioativos em clones de cacau .....	70
--	----

### CAPÍTULO 3

Table 1: Chemical composition (g.100g <sup>-1</sup> ) and colour parameters for different clones of cocoa samples .....	87
Table 2: Confusion matrix for linear discriminant analyses of whole beans .....	90
Table 3: Comparison of prediction ability for spectral pre-processing methods applied to prediction models of chemical composition for whole cocoa beans.....	92
Table 4: Comparison of prediction ability for spectral pre-processing methods applied to prediction models of chemical composition for ground cocoa beans .....	93
Table 5. Comparison of prediction ability for spectral pre-processing methods applied to prediction models of colour parameters for ground cocoa beans.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	redness
AFs	Aflatoxinas
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B1
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B2
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G1
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b*	yellowness
CC	Cacau Comum
CE	Comunidade Europeia
CFIA	The Canadian Food Inspection Agency
CEPEC	Centro de Pesquisas do Cacau
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COABISCO	The Association of Chocolate, Biscuit and Confectionery Industries of the European Union
ECA	European Cocoa Association
FCC	Federation for Cocoa Comercy
FLD	Fluorescence Detector
FLR	Detector de Fluorescência
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer
ICCO	International Cocoa Organization
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants
L*	lightness
LDA	Linear Discriminant Analyses
LMT	Limites Máximos Tolerados
LV	Latent Variables
MLR	Multiple Linear Regression
MSC	Multiplicative scatter correction
NIRS	Near Infrared Spectroscopy
NO	Oxido Nítrico
OTA	Ocratoxina A

PLS	Partial Least Squares
PRESS	Predicted Residual Error Sum of Squares
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake
R2C	Coefficient of Determination in Calibration
R2CV	Cross-Validation
RER	Ratio of Error Range
RMSE	Root Mean Square Error
RPD	Ratio of Performance Deviation
SD	Standard Deviation
SNV	Standard Normal Variate
SRN	Scravine
TFA	Ácido Trifluoroacético
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	8
2.	Revisão de Literatura.....	19
2.1	O cacau.....	19
2.2	Pré processamento do cacau.....	21
2.3	Micotoxinas.....	24
2.4	Aflatoxinas.....	25
2.5	Ocratoxinas.....	26
2.6	Compostos Bioativos.....	28
2.7	NIRS.....	31
3.	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33

REFERÊNCIAS:.....	34
-------------------	----

Aflatoxina e ocratoxina: estudo em clones de cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L.) desenvolvidos na região Sul de Bahia-Brasil.....	43
---	----

### Resumo 43

1.	Introdução.....	44
2.	Material e Métodos.....	46
2.1	Material.....	46
2.2	Amostras.....	46
2.3	Atividade de água.....	47
2.4	Extração e clean-up.....	47
2.4.1	Extração de aflatoxinas.....	47
2.4.2	Extração de ocratoxina A.....	48
2.5	Parâmetros de análise em UPLC para detecção de aflatoxinas em cacau.....	48
2.6	Parâmetros de análise em UPLC para detecção de ocratoxina A em cacau.....	49
3.	Resultados e Discussão.....	49

<b>4.</b>	<b>Conclusão</b> .....	57
	<b>Agradecimentos</b> .....	57
	<b>Referências</b> .....	57

	<b>Compostos Bioativos em clones de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.) desenvolvidos na região Sul de Bahia-Brasil</b> .....	61
--	---	----

**Resumo** 61

<b>1.</b>	<b>Introdução</b> .....	62
<b>2.</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	64
<b>2.1</b>	<b>Materia</b> .....	64
<b>2.2</b>	<b>Amostras</b> .....	64
<b>2.3</b>	<b>Compostos Fenólicos Totais</b> .....	65
<b>2.3.1</b>	<b>Extração dos compostos de interesse</b> .....	65
<b>2.3.2</b>	<b>Metodologia de Análise</b> .....	65
<b>2.4</b>	<b>Flavonoides Totais</b> .....	66
<b>2.4.1</b>	<b>Extração dos compostos de interesse</b> .....	66
<b>2.4.2</b>	<b>Metodologia de Análise</b> .....	66
<b>2.5</b>	<b>Antocianinas Totais</b> .....	67
<b>2.5.1</b>	<b>Extração dos compostos de interesse</b> .....	67
<b>2.5.2</b>	<b>Metodologia de Análise</b> .....	67
<b>2.6</b>	<b>Determinação de Ácido Cafeico, Catequina, Epicatequina, Cafeína e Teobromina</b> .....	68
<b>2.6.1</b>	<b>Extração dos compostos de interesse</b> .....	68
<b>2.6.2</b>	<b>Metodologia de Análise</b> .....	68
<b>2.7</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	68
<b>3.</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	69
<b>4.</b>	<b>Conclusão</b> .....	75
	<b>Agradecimentos</b> .....	76
	<b>Referências</b> .....	76

	<b>Near infrared spectroscopy and pattern recognition methods for classification and compositional characterization of Brazilian cocoa clones.</b> .....	79
--	--	----

**Abstract** 79

<b>1.</b>	<b>Introduction</b> .....	80
-----------	---------------------------	----

<b>2.</b>	<b>Material and Methods</b> .....	81
2.1	<i>Cocoa samples</i> .....	81
2.2	<i>Spectral analyses</i> .....	81
2.3	<i>Chemical analyses</i> .....	82
2.4	<i>Colour measurement</i> .....	82
2.5	<i>Statistical data analysis</i> .....	82
2.5.1	<i>Chemical analyses</i> .....	83
2.5.2	<i>Principal componente analyses (PCA)</i> .....	83
2.5.3	<i>Linear discriminant analyses (LDA)</i> .....	83
2.5.4	<i>Spectral pre-processing methods</i> .....	84
2.5.5	<i>Prediction models</i> .....	85
<b>3.</b>	<b>Results and discussion</b> .....	86
3.1	<b>Cocoa chemical composition</b> .....	86
3.2	<b>Spectral information of cocoa samples</b> .....	88
3.3	<b>Principal componente analyses</b> .....	89
3.4	<b>Linear discriminant analyses</b> .....	90
3.5	<b>PLS regression models for predicting chemical composition and colour features</b> .....	91
	<b>Conclusion</b> .....	95
	<b>Acknowledgements</b> .....	96
	<b>References</b> .....	96
	 <b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	 100

## 1. Introdução

O Brasil é o sexto maior produtor de cacau, atrás de Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões (ICCO, 2015). A região Sul da Bahia se destaca por ser a maior produtora do país com 60% de todo o cacau produzido. Devido aos prejuízos causados pela infestação da lavoura cacauzeira pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que provoca a doença “vassoura-de-bruxa”, os órgãos de controle e pesquisa em cacau iniciaram a clonagem de espécies resistentes à doença.

Após a introdução da vassoura-de-bruxa na Bahia, o Centro de Pesquisas do Cacau da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPEC/CEPLAC) reorientou o seu programa de melhoramento para o desenvolvimento de variedades resistentes, e passou a enfatizar métodos de seleção recorrente, visando acumular genes de resistência e de outros caracteres de interesse agrônomo em um material para posteriormente disponibilizá-lo como clone.

A diversidade de clones produz frutos com características diferentes que podem comprometer a qualidade do cacau, com alterações nas suas características próprias. As etapas de fermentação e secagem são cruciais para a formação dos precursores do sabor do cacau, mas também são etapas críticas para a contaminação com espécies de fungos micotoxigênicos.

Micotoxinas, tais como, as aflatoxinas e a ocratoxina A têm sido detectadas em diferentes matérias-primas vegetais e alguns estudos mostram a ocorrência dessas toxinas em cacau. As micotoxinas representam um risco à saúde pública e, tanto no Brasil quanto no exterior, a vigilância em torno delas vêm aumentando.

O cacau é conhecido por ser um fruto com grande quantidade de compostos com atividade biológica. Os principais compostos encontrados são os flavonoides - catequina e epicatequina - com poder antioxidante e as metilxantinas - teobromina e cafeína. O cacau é a principal fonte de teobromina, que é um estimulante do sistema nervoso central mais leve do que a cafeína, tem ação diurética e contribui para o controle da pressão arterial (WEISBURGER; CHUNG, 2002).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), é um método analítico sensível, rápido e não destrutivo que necessita de pouco ou nenhum preparo das amostras antes das leituras. Associado a um conjunto com análises multivariadas de dados fornece informações sobre diversos parâmetros químicos e físicos

simultaneamente. Esta técnica pode ser utilizada para caracterizar e classificar as amêndoas de cacau de acordo com a sua variedade.

O uso do NIRS para a classificação dos clones é uma opção a identificação de um determinado clone para o beneficiamento e fabricação dos produtos a base de cacau, já que cada clone apresenta características próprias de composição centesimal, composição em relação aos compostos bioativos, resistência a pragas e doenças; e sensoriais.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 O cacau

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), descrito por Lineu em 1737, pertence à ordem Malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma* (SOUNIGO *et al.*, 2003). A árvore do cacau é uma espécie nativa da floresta tropical úmida americana, provavelmente originária das bacias do Amazonas e do Orinoco. É uma árvore que se desenvolve em clima quente e úmido numa faixa geográfica compreendida entre os paralelos 20°N e 20°S (BATALHA, 2009). Os Incas consideravam as bebidas preparadas com o cacau como a “bebida dos deuses”, e esta associação deu origem ao nome científico da árvore do cacau, *Theobroma cacao* (HENDERSON *et. al.*, 2007).

O cacauieiro atinge entre 5 a 10 metros de altura, e os primeiros frutos são colhidos cerca de 5 anos após a plantação. O fruto tem forma oval com 15 a 20 cm de comprimento, e cor que vai do amarelo ao vermelho quando maduro. O cotilédone e um pequeno gérmen de planta embrionária são recobertos por uma película denominada testa, e a semente é revestida por uma polpa branca com tons rosados, mucilaginosos e adocicada (BECKETT, 1994; MARTINI, 2004; BATALHA, 2009).

A introdução da cultura de cacau no Sul da Bahia data de 1746, quando sementes trazidas do Pará foram plantadas no município de Canavieiras, expandindo-se para diferentes zonas da região (CABALA-ROSAND, 1998). Essa cultura requer temperatura máxima e mínima de 32 e 18°C, respectivamente, um período de seca inferior a três meses e um índice pluviométrico entre 1000 e 4000 mm ao ano, o solo deve ser profundo e fértil, sendo muito susceptível a pragas e fungos (CRUZ, 2012).

Existem três variedades de cacau: Forastero, Criollo e Trinitário. A variedade Forastero possui cotilédones de cor púrpura, devido à presença de antocianinas e é,

comercialmente, a variedade mais abundante. O cacau Criollo, classificado como mais suave, possui cotilédones brancos sendo considerado de qualidade superior; entretanto, é menos vigoroso e mais vulnerável a doenças que o primeiro. A terceira variedade, Trinitário, é um híbrido entre o Forastero e o Criollo e seus cotilédones possuem coloração que varia do branco à púrpura (HANCOCK, 1994; BARTPLANGE; BARYEH, 2003).

O grupo Forastero corresponde a 80% da produção mundial, sendo este predominante nas plantações da Bahia, Amazônia, e nos países produtores da África. Esse grupo é amplamente cultivado na zona cacauera da Bahia, onde houve uma mutação genética natural, originando o cacau Catongo e o Almeida, que se caracterizam por possuírem sementes brancas (MARITA *et al.*, 2001; LEMUS *et al.*, 2002).

A atividade cacauera está associada, de maneira geral, às etapas de produção do cacau, desde a preparação da terra, implantação da cultura até a produção do cacau em amêndoas secas; comercialização, relacionada com a compra e venda de amêndoas secas e transporte até as indústrias; processamento e beneficiamento nas indústrias; comercialização dos subprodutos das amêndoas (GOMES *et al.*, 2010).

Os principais países produtores localizam-se em uma região de 15° a 20° de latitude em torno da linha do equador, onde as condições climáticas encontram-se mais favoráveis ao desenvolvimento do fruto (THOMPSON *et al.*, 2001; MCSHEA *et al.*, 2008).

De acordo com o *International Cocoa Organization* (ICCO), os maiores produtores mundiais de cacau são a Costa do Marfim, seguida por Gana, Indonésia, Nigéria, Camarões, Brasil, Equador e Papua Nova Guiné (ICCO, 2015). A Bahia ainda é o maior produtor de cacau no Brasil, com 60,1% do total produzido, seguido por Pará (30,4%), Rondônia (5,8%), Espírito Santo (1,8%), Amazonas (1,7%) e Mato Grosso (0,2%) (IBGE, 2013).

A produção na região Sul da Bahia abrange cerca de 90 municípios e gerava, nos primeiros anos da década de 1990, aproximadamente 85% de todo o cacau nacional. Até os anos 1970 o cacau foi o principal gerador de divisas do estado, responsável por quase 60% de toda a sua arrecadação (MENEZES; CARMO-NETO, 1993).

O Brasil, até a chegada da vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, era o segundo maior produtor de cacau do mundo, atrás

somente da Casta do Marfim (MARTINI, 2004). O primeiro foco conhecido de vassoura-de-bruxa no Sul da Bahia foi encontrado em 1989 no município de Uruçuca. Apesar de originário da Amazônia, o fungo *M. pernicioso* encontrou nessa região condições adequadas para infecção das plantas. Nessa região a chuva é distribuída uniformemente durante todo o ano, condição essencial para a sua proliferação (SCARPARI, 2005).

A partir da década de 90, por causa do declínio da produção de cacau ocasionada pelo avanço da vassoura-de-bruxa, o plantio de clones resistentes foi adotado. Muitos desses clones consistiram em seleções locais, feitas em condições de fazenda pelos agricultores, extensionistas e pesquisadores de instituições governamentais da região (LEAL *et al.*, 2008). Clones de cacau estão sendo recomendados pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), unidade de geração de tecnologia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) aos cacaucultores baianos objetivando a formação de novas lavouras mais produtivas e com maior uniformidade (CEPLAC, 2010).

A CEPLAC vem ampliando a variabilidade genética, criando a fundamentação necessária ao programa de melhoramento genético, com estudos das características individuais dos genótipos, identificando novas fontes e genes de resistência ao fungo *M. pernicioso* estabelecendo populações base para o melhoramento. As seleções de clones resistentes à vassoura-de-bruxa com boas características gerais para a inclusão em ensaios de larga escala e a identificação de genótipos promissores para a constituição de populações para os ciclos seguintes de seleção são realizadas com o apoio dos produtores (REHEM, 2006; CEPLAC, 2010).

O controle da vassoura-de-bruxa consiste na utilização de cacaueiros geneticamente resistentes, associados às medidas de controle cultural e químico (REHEM, 2006). O emprego de variedades resistentes é a forma mais econômica, estável e ambientalmente desejável de controle da vassoura-de-bruxa. No entanto, a seleção de cultivares clonais resistentes é baseada em informações limitadas sobre a variabilidade genética do patógeno e do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2007).

## **2.2 Pré-processamento do cacau**

A Figura 1 apresenta um fluxograma com as etapas envolvidas durante o pré-processamento do cacau nas fazendas.

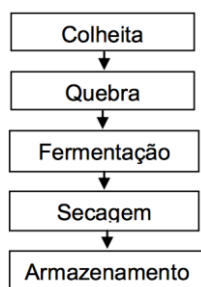


Fig. 1 – Fluxograma do pré-processamento do cacau.

O pré-processamento do cacau inicia-se com a colheita dos frutos maduros, que é feita manualmente nas regiões produtoras. A época de colheita depende das condições climáticas de cada região. No Brasil o cacau é colhido praticamente durante o ano inteiro, distinguindo-se dois períodos de safra: o principal de outubro a janeiro e o secundário de maio a agosto. O cacau colhido no segundo período da safra é conhecido como cacau temporão (CRUZ, 2002).

Posteriormente, os frutos são partidos, evitando-se que as sementes sejam danificadas. As sementes envoltas em uma polpa mucilaginosa são então submetidas à fermentação, que é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de boa qualidade (HANCOCK; FOWLER, 1994).

O sistema mais comum para a fermentação são as caixas de madeira (Fig. 2). Segundo Zamalloa (1994) e Brito (2000), há duas fases definidas e distintas de reações que ocorrem no interior do cotilédone durante a fermentação: fase de hidrólise anaeróbica e fase de condensação oxidativa. Ambas as fases são diferenciadas, entre outros aspectos, pelos microrganismos que estão envolvidos. De acordo com Beckett (2009) durante a fermentação os microrganismos decompõem a celulose que envolve as sementes, resultando na morte do gérmen e criando um ambiente que permite a formação dos precursores do sabor do cacau.



Fig. 2 – Caixa de fermentação de cacau com temperatura controlada. (Arquivo pessoal).

A fermentação pode ser realizada de 2 a 7 dias, dependendo da variedade de cacau utilizada. Finalizada a fermentação, o material deve ter sua umidade reduzida de 40-50% para 6-7%. Isso pode ser feito naturalmente, ao sol ou artificialmente, em secadores rotativos ou fornos (HANCOCK; FOWLER, 1994).

O desenvolvimento dos precursores do sabor do cacau ocorre nos cotilédones durante as etapas de fermentação e secagem. Existem dois tipos importantes de células dentro dos cotilédones: células de armazenamento contendo gorduras e proteínas, e as células de pigmento contendo compostos polifenólicos e metilxantinas. Após a morte do gérmen da semente, as paredes celulares e membranas se rompem permitindo reações entre os diversos compostos e enzimas (BECKETT, 2009).

As amêndoas devem ser secas imediatamente para reduzir as perdas de massa e evitar a deterioração. A secagem pode ser efetuada utilizando métodos naturais ou artificiais. A etapa de secagem deve ser iniciada logo após a fermentação. A secagem natural, consiste em dispor o cacau fermentado em áreas cimentadas ou assoalhadas, bandejas, plásticos ou no próprio solo (PONTILLON, 2009).

O método mais utilizado no Brasil é a secagem feita em barcaças, que são construções típicas constituídas por um lastro de madeira erguido sobre pilares de alvenaria, e uma cobertura que desliza sobre trilhos. A cobertura, geralmente feita de chapas de alumínio corrugado ou de zinco, é afastada para expor as amêndoas ao sol e, quando fechada, protege contra chuva, sereno e calor excessivo. As amêndoas são espalhadas sobre o lastro da barcaça em uma camada uniforme com cerca de 5 cm de espessura. O revolvimento constante é feito com um instrumento de madeira, principalmente no início da secagem, a fim de evitar aglomerados e formação de colônias fúngicas (OETTERER, 2006).

As amêndoas fermentadas e secas são submetidas à etapa de limpeza para remoção de sujidades mais grosseiras. Em seguida, podem ser submetidas diretamente à torrefação ou quebradas em pequenos fragmentos, denominados *nibs*, que devem ser separados da testa e do gérmen previamente à torrefação. A torrefação é fundamental na obtenção das características de qualidade do chocolate (KLEINERT, 1994).

Segundo Brito (2000), as condições de torrefação dependem de vários fatores: origem e tipo de amêndoa, período de colheita, tratamentos anteriores à torrefação, umidade, tamanho das amêndoas e dos *nibs*. Após a torrefação, o material deve ser moído para a obtenção da massa de cacau, também, conhecida como *liquor*, a qual é

prensada obtendo-se, assim, a manteiga de cacau e a torta, sendo que esta última origina o cacau em pó natural. Esses produtos são as principais matérias-primas utilizadas na fabricação de chocolates e produtos a base de cacau.

### 2.3 Micotoxinas

O termo micotoxina é proveniente do termo grego ‘mykes’ que significa fungo e do Latim ‘toxicum’ que significa veneno. As pesquisas sobre micotoxinas foram iniciadas na década de sessenta em consequência de uma epidemia em 400.000 perus ocorrida na Inglaterra. Estudos epidemiológicos revelaram que a síndrome estava relacionada com a farinha de amendoim contida na ração das aves (SPENSLEY, 1963).

Nesta época foram iniciadas várias pesquisas em alimentos visando a detecção de fungos toxigênicos, e o período entre 1960 e 1975 tem sido denominado “The mycotoxin gold rush” devido a grande quantidade de pesquisadores que se uniram para estudar estes agentes toxigênicos bem como de seus produtos de metabolismo secundário, em especial as micotoxinas (MAGGON *et al.*, 1977). Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, ocorrendo em diferentes regiões do mundo e representam um risco potencial para a saúde do homem e dos animais quando presentes nos alimentos e rações (NORDIN; LUCHESE, 1998).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimentos é uma questão de saúde pública em todo o mundo. A contaminação dos alimentos depende de crescimento fúngico e pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (SABINO, 1996). Uma vez produzidas em condições específicas, esses metabólitos secundários persistem no armazenamento, assim como resistem ao processamento, constituindo num risco natural de maior frequência na cadeia produtiva de alimentos, já que o fungo constitui principal agente de doença em plantas (ANKLAM *et al.*, 2002; TAVČAR-KALCHER, *et al.*, 2007; MUSCARELLA *et al.*, 2007; GORYACHEVA *et al.*, 2007).

A contaminação por micotoxinas é um assunto relevante na segurança de alimentos devido ao seu efeito tóxico, carcinogênico, teratogênico e imunossupressivo em humanos e animais (SAHA *et al.*, 2007; TAVČAR-KALCHER, *et al.*, 2007).

Ao serem ingeridas, as micotoxinas, podem se fixar aos tecidos, apesar da maior parte ser metabolizada e eliminada através de fluidos biológicos. Uma característica importante é sua capacidade de afetar órgãos específicos sem provocar

alterações evidentes nos demais, e cuja gravidade depende da toxidez da micotoxina, do nível de exposição, idade, sexo e estado nutricional e dos possíveis efeitos sinérgicos com outros compostos químicos (PERAICA *et al.*, 1999).

A crescente preocupação dos países importadores em relação à presença de micotoxinas nos alimentos tem levado à elaboração de legislações cada vez mais rígidas, no que concerne aos níveis máximos permitidos (FREIRE *et al.*, 2007).

## 2.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas pertencem ao grupo das micotoxinas e são resultantes do metabolismo secundário de fungos. O grupo de aflatoxinas é produzido principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* e destaca-se, não somente pela maior toxidez, mas também pelo perigo de produção, desde o estágio de campo, colheita, secagem, processamento e armazenamento (CARLSON *et al.*, 2000; JAIMEZ *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2008; DORNER, 2008; LI *et al.*, 2009). Existem mais de 20 análogos de AFs, sendo os principais B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> conforme ocorrência e patogenia (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As aflatoxinas são bisfurano cumarinas derivadas de decacetídeo, sintetizada pela via de policetídeos. A série G difere quimicamente da série B pela presença do anel 3-lactona, ao invés do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação entre carbono 8 e 9 ocorre como vinil éter no terminal de anel furano em AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, mas não em AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>. Essa pequena diferença estrutural afeta drasticamente a atividade, aumentando a carcinogenicidade e toxidez de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> em relação aos respectivos análogos AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> (JAIMEZ *et al.*, 2000).

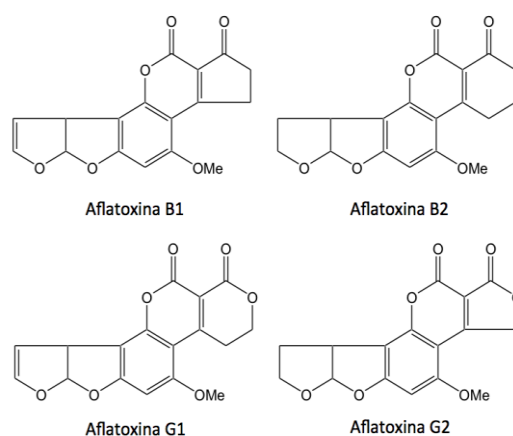


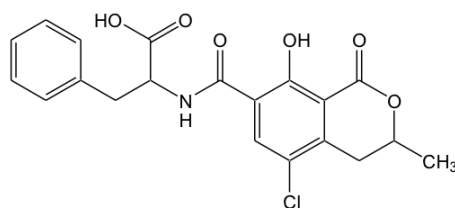
Fig. 3 – Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal e sua biotransformação ocorre primariamente no fígado (OGIDO, 2003). A biotransformação da AFB<sub>1</sub>, particularmente, tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica. Existe um consenso entre grande número de especialistas, de que a AFB<sub>1</sub> é, na verdade, um pró-carcinogênico, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; OGIDO, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece, em sua Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 07, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe de limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, o limite de 10 µg.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina total e de 10 µg.kg<sup>-1</sup> de ocratoxina para amêndoas de cacau (BRASIL, 2011). O regulamento da Comunidade Europeia (CE) N° 1881/2006 da comissão de 19 de Dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios, fixa em 5 µg.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina B<sub>1</sub> e 10 µg.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina total para frutos de casca rija destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de gêneros alimentícios (COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA, 2006).

## 2.5 Ocratoxinas

Ocratoxinas são metabólitos secundários produzidas principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, geralmente presentes em cereais, uvas café, pimentas e cacau (MATEO *et al.*, 2007; AMÉZQUETA *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2010). O grupo das micotoxinas designadas como ocratoxinas (ocratoxina A, B e C), caracteriza-se por possuírem uma estrutura molecular (Figura 5) que consiste basicamente de uma β-fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma ligação amida. O grupo de ocratoxinas, além da OTA, apresenta análogos denominados ocratoxina B, C, α, β, metiléster de OTα, 4-hidroxi-OTA entre outros, apresentando cromóforo fluorescente a 335 nm (KAWAMURA *et al.*, 1989; DUARTE *et al.*, 2010) e possui uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo caráter tóxico (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002).



Ocratoxina A

Fig. 4 – Estruturas química da ocratoxina A.

A OTA possui a fórmula empírica  $C_{20}H_{18}O_6NCl$  com um peso molecular de 403.822 Da. É altamente solúvel em solventes orgânicos polares, solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio, fracamente solúvel em água e termoestável (COLE *et al.*, 2003). Sua estrutura é similar ao aminoácido fenilalanina e por esta razão a OTA apresenta um efeito inibitório sobre inúmeras enzimas que utilizam fenilalanina como substrato, o que pode resultar na inibição da síntese proteica e também aumento na peroxidação de lipídios (IARC, 1993).

A contaminação por OTA pode ocorrer principalmente na pré-colheita e em condições de pós-colheita em cereais como trigo, milho, centeio, cevada, aveia, amendoim, cacau, café, pão, arroz e frutas secas. A presença de OTA nos produtos alimentares tais como café, vinho, cerveja e carnes, é devido à sua relativa estabilidade química durante o processamento industrial (AL-ANATI; PETZINGER, 2006). Outros itens alimentares, como leite, tecidos animais, músculos, órgãos e ovos também podem ser contaminados (DINIS *et al.*, 2007).

A espécie ocratoxigênicas de *Aspergillus* são responsáveis pelo acúmulo de OTA em regiões tropicais, ao passo que é atribuído às espécies de *Penicillium* a ocorrência de OTA em climas temperados (PITT; HOCKING, 1997; PITT, 2000; TANIWAKI *et al.*, 2003; SAMSON *et al.*, 2007).

A OTA é conhecida por suas características carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, genotóxicas e imunotóxicas em células animais (IARC, 1993). Os seres humanos são mais sensíveis aos efeitos nefrotóxicos (BIANCARDI; RIBERZANI, 1996). A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1993) classificou a ocratoxina A como um agente possivelmente carcinogênico para humanos (grupo 2B), por existirem limitados estudos nesta população. Humanos e animais podem absorver essa toxina através do trato gastrointestinal após a ingestão de produtos contaminados e inalação de ocratoxina ambiental. A *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants* (JECFA) estabeleceu um limite

tolerável provisório de ingestão semanal (PTWI) em  $100 \text{ ng.kg}^{-1}$  de peso corpóreo (WHO, 2008).

Os dados de ocorrência de OTA em cacau e derivados ainda são limitados, especialmente no que se refere às etapas de pré-processamento. A etapa crítica para a contaminação do cacau por OTA e as condições que estimulam ou suprimem a produção desta toxina ainda não se encontram estabelecidas (GILMOUR; LINDBLUM, 2008).

Gilmour e Lindblom (2008) conduziram uma extensa pesquisa com apoio da COABISCO (*The Association of Chocolate, Biscuit and Confectionery Industries of the European Union*), ECA (*European Cocoa Association*) e FCC (*Federation for Cocoa Comercy*), na tentativa de elucidar os principais fatores envolvidos na ocorrência de OTA em cacau, a qual esteve concentrada principalmente na Costa do Marfim. Os resultados preliminares do estudo revelaram que, sob as condições de processamento africanas, a contaminação já se inicia entre a colheita dos frutos e fermentação, residindo nos frutos danificados a maior parte do problema. Foi verificada variação no grau de contaminação conforme o período da colheita, devido principalmente às práticas de pós-colheita aplicadas pelos agricultores como por exemplo durante a estocagem dos frutos colhidos.

## **2.6 Compostos Bioativos**

Os compostos bioativos são substâncias encontradas em alimentos e classificados como ingredientes com atividade biológica. Alguns deles são nutrientes já reconhecidos como tal e outros parecem não ter função como nutriente, mas são extremamente importantes para a manutenção da saúde humana. Dentre os compostos bioativos mais estudados em cacau estão os compostos fenólicos e as metilxantinas.

Os compostos fenólicos e metilxantinas são produtos naturais, conhecidos como metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, apresentando funções ecológicas importantes como proteção contra herbívoros e patógenos, ação alelopática, além de agir como atrativos para animais polinizadores (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau pertencem as classes dos taninos e dos flavonoides. Os flavonoides presentes incluem flavonóis, flavanóis, antocianinas, flavonas e flavanonas. Entre estes, os flavanóis são

os mais abundantes, sendo a (+)-catequina e a (-)-epicatequina os principais representantes. A (-)-epicatequina tem sido reportada como o principal flavanol monomérico do cacau (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; EFRAIM *et al*, 2006).

Os flavonoides podem agir como antibióticos, pesticidas naturais, atraentes para polinizadores, agentes protetores contra a luz ultravioleta e constituem materiais para tornar a parede celular impermeável ao gás e à água e como material estrutural para dar estabilidade à planta. Em alimentos, os fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, pigmentação, sabor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os derivados do cacau são conhecidos por serem fontes de compostos fenólicos, especialmente procianidinas, as concentrações variam dependendo da origem do cacau e das condições de processamento. As procianidinas identificadas no cacau podem variar de tamanho, desde monômeros até polímeros de cadeia longa, como os taninos (ORTEGA *et al.*, 2010).

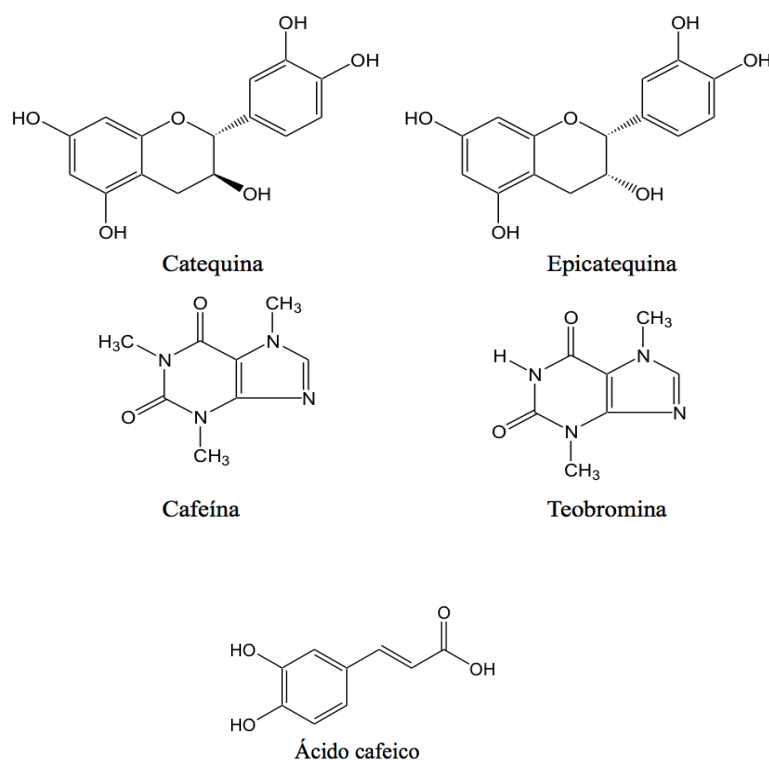


Fig. 5 – Principais compostos bioativos encontrados no cacau.

O cacau apresenta também antocianinas monoméricas (delfinidina, cianidina, peonidina, petunidina e malvidina monoglicosídeos) e fenóis poliméricos (dímeros de procianidina, antocianinas poliméricas e taninos) (HOWARD *et al.*, 2002). Entre as antocianinas identificadas em sementes de cacau, encontram-se a cianidina-3-arabinosídeo e a cianidina-3-galactosídeo, as quais representam cerca de 4% do conteúdo total de polifenóis das sementes (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

Os benefícios nutricionais do cacau vêm sendo estudados, e a importância do seu consumo enfatizada, uma vez que as descobertas científicas têm sido positivas (THAMKE *et al.*, 2009). Pesquisas têm mostrado que no cacau encontra-se uma grande quantidade de compostos fenólicos em suas folhas e principalmente em suas sementes. Nas sementes de cacau, os compostos fenólicos são armazenados nas células de pigmentos. Dependendo da quantidade desses compostos, a coloração das células varia de branca a púrpura (OSMAN *et al.*, 2004).

As catequinas monoméricas predominantes no cacau são (+)-catequina e (-)-epicatequina. As procianidinas são uma classe de compostos fenólicos encontradas em várias espécies de plantas e podem estar presentes como monômeros individuais ou, em alguns casos, como unidades oligoméricas (OSMAN *et al.*, 2004). A catequina, a epicatequina e as procianidinas não são compostos exclusivos do cacau, aparecem também em outros produtos como cereja, pêssego, maçã, chá verde e uvas, mas é no cacau onde estão as maiores concentrações (FERNÁNDEZ-MURGA, 2011).

Os possíveis efeitos positivos sobre a saúde obtidos a partir do consumo de compostos fenólicos podem ser: melhora da função cardíaca, digestão e função renal, diminuição dos sintomas de angina pectoris e estímulo do sistema nervoso (DILLINGER *et al.*, 2000). Alguns mecanismos potenciais através do qual o cacau pode exercer benefícios sobre a saúde cardiovascular têm sido propostos, como: ativação e liberação do óxido nítrico (NO) endotelial, ação antioxidante, efeito antiinflamatório, efeito antiplaquetário, melhora do perfil lipídico, redução da pressão arterial e diminuição da resistência insulínica (DING *et al.*, 2006).

Além dos compostos fenólicos, tem-se a presença das metilxantinas que são responsáveis por alterações no organismo humano, agindo sobre os sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo. Os efeitos são qualitativamente semelhantes, mas quantitativamente diferentes, em função disso, são empregadas com diferentes finalidades terapêuticas (BRUNETON, 1991).

As metilxantinas, como teobromina e cafeína, são outro grupo de compostos bioativos encontrados no cacau. Esses alcaloides têm efeito estimulante no sistema nervoso central, sendo que alguns trabalhos relacionam a sua presença com efeitos como o hábito de consumo e dores de cabeça (BRUINSMA; TAREN, 1999). No cacau e no chocolate, a metilxantina predominantemente encontrada é a teobromina, seguida da cafeína, em quantidades menores (ROZIN *et al.*, 1991). Os efeitos fisiológicos na saúde humana mais comuns da cafeína incluem estimulação do sistema nervoso central, dos músculos cardíacos, do sistema respiratório e da secreção de ácido gástrico. Também é considerada como um diurético fraco e relaxante muscular. A teobromina (3,7-dimetilxantina), encontrada sobretudo, em produtos de cacau, tem ação diurética, estimulante, com menor efeito sobre o sistema nervoso central (ALVES; BRAGAGNOLO, 2002)

A teobromina diferentemente da cafeína estimula pouco o sistema nervoso central humano, além de suprimir a atividade do nervo sensorial e a tosse. A teobromina tem sido proposta para ajudar no tratamento dietético da aterosclerose, e pode contribuir positivamente para o controle da pressão arterial a partir do aumento no consumo do cacau e do chocolate amargo (WEISBURGER; CHUNG, 2002).

Estudos relacionados com algumas bebidas largamente consumidas, como café e chá, indicam a ação da cafeína sobre a musculatura estriada e como estimulante do sistema nervoso central, enquanto que a teobromina aumenta o fluxo sanguíneo renal e a filtração glomerular (SIMÕES *et al.*, 2004).

## 2.7 NIRS

Equipamentos de espectroscopia de infravermelho próximo ou *Near Infrared Spectroscopy* (NIRS) também têm sido utilizados como forma de estimar a qualidade de alimentos. Em contraste aos sistemas tradicionais de medidas de qualidade o NIRS é um método analítico sensível, rápido e não destrutivo que necessita de pouco ou nenhum preparo das amostras antes das leituras e que, em conjunto com análise multivariada de dados, pode fornecer informações sobre diversos parâmetros químicos e físicos simultaneamente (COZZOLINO; MURRAY, 2004; PRIETO *et al.*, 2008; WEERANANTANAPHAN *et al.*, 2011). Esta técnica está baseada no princípio de que diferentes ligações químicas na matéria orgânica, quando irradiadas, absorvem e emitem luz em diferentes comprimentos de onda (PREVOLNIK *et al.*, 2004).

O NIRS tem sido utilizado para determinar o teor de proteína, de umidade e de lipídios em cacau em pó (KAFFKA *et al.*, 1982), proteínas, gorduras, amido e proantocianidinas em cacau (WHITACRE *et al.*, 2003), cafeína, teobromina e epicatequina no cacau (ALVAREZ *et al.*, 2012) e sacarose no chocolate (COPIKOVA *et al.*, 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho objetivou caracterizar diferentes clones de cacau, procedentes da região sul da Bahia, em termos de contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A, compostos bioativos e classificação por NIRS.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar a ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em diferentes clones de cacau;
- Verificar a co-ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina em diferentes clones de cacau;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais em diferentes clones de cacau;
- Determinar o teor de ácido cafeico, catequina, epicatequina, cafeína e teobromina em diferentes clones de cacau;
- Utilizar a Análise de Componente Principal (PCA) para descrever a variabilidade entre os clones em relação ao teor de compostos bioativos;
- Utilizar o NIRS como método de classificação para diferentes clones de cacau;
- Classificar diferentes clones de cacau utilizando a Análise Discriminante Linear (LDA).

**REFERÊNCIAS:**

AL-ANATI, L., PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p.79-90, 2006.

ALVAREZ, C., PEREZ, E., CROS, E., LARES, M., ASSEMAT, S., BOULANGER, R., F. DAVRIEUX. The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and (-)-epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of criollo cocoa. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 20, p. 307–315, 2012.

ALVES, A. B., BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, 2002.

AMEZQUETA, S., GONZALEZ-PENAS, E., MURILLO-ARBIZU, M, CERAIN, A.L. Ochratoxin A decontamination: a review. **Food Control**, v. 20, p.326-333, 2009.

ANKLAM, E., STROKA, J., BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.13, p. 173-183, 2002.

BART-PLANGE, A., BARYEH, E. A. The physical properties of Category B cocoa beans. **Journal of Food Engineering**, v. 60, n. 3, p. 219-227, 2003.

BATALHA, P. G. Caracterização do cacau catongo de São Tomé e Príncipe. Lisboa. Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos – Tecnologia de Produtos vegetais) Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa – Portugal, 2009.

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

BECKETT, S. T. Industrial chocolate manufacture and use. 4 ed. London: **Chapman and Hall**, p.20-23, 2009.

BIANCARDI, A., RIBERZANI, A. Determination of ochratoxin A in cereals and feed by SAX-SPE clean up and LC fluorimetric detection. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technology**, v. 19, p. 2395-2401, 1996.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Resolução RDC no 07, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, n. 46, p.66, 9 mar 2011.

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

BRUINSMA, K. K., TAREN, D.L. Chocolate: Food or Drug? **Journal of the American Dietetic Association**, n. 99, p. 1249-1256, 1999.

BRUNETON, J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Zaragoza: **Acribia S. A.**, 1991.

CABALA-ROSAND, P., SANTANA, M. B. M., SANTANA, C. J. L., CHEPOTE, R. E., NAKAYAMA, L. H. Utilização de adubos e corretivos na cultura do cacau. In: Manual do extensionista. Ilhéus, Bahia, CEPLAC/CEPEC/Departamento de Extensão. P.1-22. 1998.

CARLSON, M. A., BARGERON, C. B., BENSON, R. C., FRASER, A. B., PHILLIPS, T. E., VELKY, J. T., GROOPMAN, J. D., STRICKLAND, P. T., KO, H. W. An automated, handheld biosensor for aflatoxin. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, p. 841–848, 2000.

CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Indicação de variedades de cacau para cultivo comercial – Rede de avaliação de clones em larga escala. Material cedido pela **CEPLAC**, 2010.

CHIAVARO, E., DALL’ASTA, C., GALAVERNA, G., BIANCARDI, A., GAMBARELLI, E., DOSSENA, A., MARCHELLI, R. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 31-40, 2001.

CHO, S. H.; LEE, C. H.; JANG, M. R.; SON, Y. W.; LEE, S. M.; CHOI, I. S.; KIM, S. H.; KIM, D. B. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, v. 107 p. 1283–1288, 2008.

COLE, R. J., JARVIS, B. B., SCHWEIKERT, M. A. Handbook of secondary fungal metabolites, vol. 3. **Academic Press**, San Diego, p. 1-672, 2003.

**COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA**. Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007, amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products.

COPIKOVA, J., NOVOTNA, M., SMIDOVA, I., SYNITSYA, A. & CERNA, M. Application of near infrared spectroscopy in chocolate analysis. **Chemcké Listy**, v. 97, p. 571-575, 2003.

COZZOLINO, D.; MURRAY, I. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v.37, p.447–452, 2004.

CRUZ, C. L. C. V. Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas. Campinas, 2002. 101p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP.

CRUZ, J. F. M. Caracterização das sementes de clones de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. Dissertação (Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA, 101p., 2012.

DILLINGER, T. L.; BARRIGA, P.; ESCÁRCEGA, S.; JIMENEZ, M.; LOWE, D. S.; GRIVETTI, L. E. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. **The Journal of Nutrition**, v. 130, supl. 8, p. 2057S-2072S, 2000.

DING, E. L., HUTFLESS, S. M., DING, X., GIROTRA, S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. **Nutrition and Metabolism**, p. 3-2, 2006.

DINIS, A. M. P., LINO, C. M., PENA, A. S. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 553-557, 2007.

DORNER, J.W. Management and prevention of in peanuts. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 203-208, 2008.

DUARTE, S. C., PENA, A., LINO, C.M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 187-198, 2010.

EDWARDS, S. G., O'CALLAGHAN, J., DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, London, v. 106, p. 1005- 1025, 2002.

EFRAIM, P., TUCCI, M. L., PEZOA-GARCÍA, N. H., HADDAD, R., EBERLIN, M. N. Teores de Compostos Fenólicos de Sementes de Cacaueiro de Diferentes Genótipos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229-236, 2006.

FERNÁNDEZ-MURGA, L., TARÍN, J. J., GARCÍA-PÉREZ, M. A., CANO, A. The impact os chocolate on cardiovascular health. **Maturitas**, v. 69, p.312-21, 2011.

FREIRE, F. C. O., VIEIRA, I. G. P., GUEDES, M. I. F., MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria**, Fortaleza, out. 2007.

GILMOUR, M; LINDBLOM, M. Management of Ochratoxin A in the Cocoa Supply Chain: A Summary of Work by the **CAOBISCO/ECA/FCC** Working Group on Ochratoxin A In: *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*. John F. Leslie, Ranajit Bandyopadhyay & Angelo Visconti, Eds, 2008.

GOMES, Andréia da Silva; PIRES, Mônica de Moura; FREIRE, Carla Regina Ferreira. A crise da atividade cacaueira e a agroindústria do cacau no Estado da Bahia, Brasil, 2010. **Asociación Latinoamericana de Sociología**. Disponível em: <http://www.alasru.org/>. Acesso em 10 de agosto de 2015.

GORYACHEVA, I. U., SAEGER, S., DELMULLE, B., LOBEAU, M., A. EREMIN, S.A., BARNA-VETRÓ, I., VAN PETEGHEM, C. Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, p. 118–124, 2007.

HANCOCK, B. L. (1994). Producción y transporte del haba de cacao. In: BECKETT, S. T. (Ed.). *Fabricación y utilización industrial del chocolate*. Zaragoza: **Acribia**, 1992, p. 9-32.

HANCOCK, B. L., FOWLER, M. S. Cocoa Bean production and transport. In: BECKETT, S. T. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 2° ed. London: **Black Academic & Professional**, p. 8-25, 1994.

HENDERSON, J. S., JOYCE, R. A., HALL, G. R., HURST, W. J., MCGOVERN, P. E. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, p. 18937–18940, 2007.

HOWARD, A., CHOPRA, M., THURNHAM, D., STRAIN, J., FUHRMAN, B., AVIRAM, Michael. Red wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components? **Medical Hypotheses**, v. 59, p. 101-104, 2002.

HUSSEIN, S. H., BRASEL, J. M Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-137, 2001.

IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol 56. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 1993, 571p.

IBGE (2013) – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Available in: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201309.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf) . Acessado em março 2014.

ICCO (**International Cocoa Organization**), Produção Mundial de cacau, 2015. Disponível em: <http://www.icco.org/>. Acesso em 16 de outubro de 2015.

JAIMEZ, J., FENTE, C. A., VAZQUEZ, B. I., FRANCO, C. M., CEPEDA, A., MAHUZIER, G., PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 1-10, 2000.

KAFFKA, K.J., NORRIS, K.H., KULCSAR, F., DRASKOVITS, I. Attempts to determine fat, protein and carbohydrate content in cocoa powder by the NIR technique. **Acta Alimentaria**, v. 11, p. 271–288, 1982.

KAWAMURA O., SATO S., KAJII H., NAGAYAMA S., OHTANI K., CHIBA J., UENO Y. A sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent assay of Ochratoxin A based on Monoclonal Antibodies. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 887-897, 1989.

- KLEINERT, J. Cleaning, roasting and winnowing. In: BECKETT, S.T. Industrial chocolate manufacture and use. London: **Blackie Academic and Professional**, p. 55-69, 1994.
- LEMUS, M., FARIÑAS, L. G., BERTORELLI, L. O., LEAL, A. T. Efecto del mezclado de cacaos tipos criollo y forastero de la localidad de cumboto sobre algunas características físicas de los granos durante la fermentación. **Agronomía Tropical**, v. 52, n. 1, p. 45-58, 2002.
- LEAL, J. B., SANTOS, L. M., SANTOS, C. A. P., PIRES, J. L., AHNERT, D., CORREA, R. X. Diversidade genética entre acessos de cacau de fazendas e de banco de germoplasma na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, 2008.
- LI, P., ZHANG, Q., ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115-1126, 2009.
- MAGGON, K. K., GUPTA, S. K., VENKITASUBRAMANIAN, T. A. Biosynthesis of aflatoxins. **Bacteriology Reviews**, v. 41, p. 822-855, 1977.
- MARTINI, M. H. Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao* L. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2004.
- MARITA, J. M., NIENHUIS, J., PIRES, J. L., AITKEN, W. M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. **Crop science**, v. 41, 2001.
- MATEO, R., MEDINA, A., MATEO, E. M., JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 79-83, 2007.
- MENEZES, S., CARMO NETO, D. A Modernização do agribusiness do cacau. Salvador: **CARGILL**, p. 180, 1993.
- MCSHEA, A., RAMIRO-PUIG, E., MUNRO, S. B., CASADESUS, G., CASTELL, M., SMITH, M. A. Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing. **Nutrition reviews**, v. 66, n. 11, p. 630-641, 2008.
- MUSCARELLA, M., LO MAGRO, S., PALERMO, C., CENTONZE, D. Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, p. 257-264, 2007.
- NACZK, M., SHAHIDI, F. Review: Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.
- NORDIN, N., LUCHESE, R. H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zeamays*), destinado à alimentação animal. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998.

OETTERER, M., REGITANO-D'ARCE, M.A.B., SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, SP: Manole, p.612, 2006.

OGIDO, Rony. Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B1 e fumonisina B1 em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos. Pirassununga, 2003. 109 f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, C. A. F, GERMANO P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**, v.31, n.4, p.417-424, 1997.

ORTEGA, N., ROMERO, M. P., MACIA, A., REGUANT, J., ANGLES, N., MORELLO, J. R., MOTILVA, M. J. Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 298–305, 2010.

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

PERAICA, M., RADIC, B., LUCIC, A., PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754-766, 1999.

PITT, J. I. HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. **Blackie Academic & Professional**: London, 593p., 1997.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v. 38, p. 17-22, Suplemento 1, 2000.

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

PREVOLNIK, M.; CANDEK-POTOKAR, M.; SKORJANC, D. Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality: a review. **Czechoslovak Journal of Animal Science**, v.49, p.500–510, 2004.

PRIETO N., et al. Ability of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to estimate physical parameters of adult steers (oxen) and young cattle meat samples. **Meat Science**, Oxon, v. 79, p. 692–699, 2008.

REHEM, B. C. Respostas fisiológicas de clones de *Theobroma cacao* L. ao alagamento do substrato. 79p. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus – Ba, 2006.

ROZIN, P., LEVINE, E., STOESS, C. Chocolate craving and liking. **Appetite**, London, n.17, p. 177–185, 1991.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, p. 461-472, 1996.

- SAHA, D., ACHARYA, D., ROY, D., SHRESTHA, D., DHAR, T. K. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B1 and ochratoxin A in chili samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p. 343–349, 2007.
- SAMSON, R. A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129–145, 2007.
- SCARPARI, L. M., MEINHARDT, L. W., MAZZAFERA, P., POMELLA, A. W. V., SCHIAVINATO, M. A., CASCARDO, J. C. M., PEREIRA, G. A. G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 865–877, 2005.
- SILVA, J. R. Q., FIGUEIRA, G. A. G.; ALBUQUERQUE, P. Development of novel microsatellites from *Moniliophthora pernicioso*, causal agent of the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Molecular Ecology Resources**, 2007.
- SIMÕES, M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 1102p., 2004.
- SOUNIGO, O., LACHENAUD, P., BASTIDE, P., CILAS, C., N'GORAN, J. A. J., LANAUD, C. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of Applied Genetics**, v. 44, n.3, p. 339-353, 2003.
- SPENSLEY, P.C. Aflatoxin, the active principle in turkey "X" disease. **Endeavour**, v. 22, p. 75-79, 1963.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal, 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 719p, 2004.
- TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., TEIXEIRA, A. A., IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 173–179, 2003.
- TAVČAR-KALCHER, G., VRTAČ, K., PESTEVŠEK, U., VENGUŠT, A. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B1 in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. **Food Control**, v. 18, p. 333-337, 2007.
- THAMKE, I., DURRSCHMID, K., ROHM, H. Sensory description of dark chocolates by consumers. **Food Science Technology**, v. 42, n. 2, p. 534-539, 2009.
- THOMPSON, S. S., MILLER, K. B., LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. Food Microbiology — Fundamentals and frontiers. Washington, DC: **ASM Press**, p. 721–733, 2001.
- WEERANANTANAPHAN, J., DOWNEY, G., DA-WEN SUN, P. A. A review of near infrared spectroscopy in muscle food analysis: 2005-2010. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, West Sussex, v.19, p.61-104, 2011.

WEISBURGER JH, CHUNG FL. Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n.8, p. 1145-54, 2002.

WHITACRE, E., OLIVER, J., VAN, D.B.R., VAN, E.P., KREMERS, B., VAN, D.H.B., STEWART, M. & JANSEN-BEUVINK, A. Predictive analysis of cocoa procyanidins using near-infrared spectroscopy techniques. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2618-2622, 2003.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Safety evaluation of certain food additives and contaminants, Prepared by the 68th. **WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 59**, Geneva: World Health Organisation, 2008.

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

**Este trabalho foi redigido sob forma de capítulos / artigos, listados abaixo:**

**CAPÍTULO 1:**

Aflatoxina e ocratoxina: estudo em clones de cacau (*Theobroma cacao* L.) desenvolvidos na região Sul de Bahia-Brasil

**CAPÍTULO 2:**

Compostos Bioativos em clones de cacau (*Theobroma cacao* L.) desenvolvidos na região Sul de Bahia-Brasil

**CAPÍTULO 3:**

Near infrared spectroscopy and pattern recognition methods for classification and compositional characterization of Brazilian cocoa clones

## **Aflatoxina e ocratoxina: estudo em clones de cacau (*Theobroma cacao* L.) desenvolvidos na região Sul de Bahia-Brasil**

### **Resumo**

O Brasil é o sexto produtor mundial de cacau, atrás de Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões. A região sul da Bahia se destaca por ser a maior produtora do país com cerca de 60% da produção. Devido aos prejuízos causados pela infestação da lavoura cacauífera pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que provoca a doença “vassoura de bruxa”, os órgãos de controle e pesquisa em cacau iniciaram a clonagem de espécies resistentes à doença. A contaminação por aflatoxinas (AFs) e ocratoxina A (OTA) foi determinada em cento e trinta amostras de treze clones de cacau desenvolvido no sul da Bahia por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de fluorescência (UPLC-FLD) (Limite de detecção (LOD): 0,100, 0,040, 0,125, 0,050 e 0,900  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; Limite de quantificação (LOQ): 0,375, 0,100, 0,400, 0,125 e 2,500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; Recuperação: 94,7, 90,7, 95,8, 91,7, 89,4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e OTA respectivamente). A contaminação por aflatoxinas foi detectada em 38% das amostras, com ênfase em AFB<sub>1</sub> com 25% das amostras positivas, ao passo que a ocratoxina A foi positiva em 18%.

**Palavras-chave:** micotoxinas, fluorescência, co-ocorrência.

## 1. Introdução

O Brasil é o sexto produtor mundial de cacau (*Theobroma cacao* L.) (ICCO, 2013), com a Região Sul da Bahia ocupando a posição de destaque com 60% da produção (IBGE, 2014). A região, anteriormente considerada livre de fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa, até o final da década de 80, sofreu brusca queda na produção.

Visando reverter o quadro de baixa produtividade, o Banco Ativo de Germoplasma da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) optou pela técnica de enxertia, obtendo variedades clonais de cacaueiro resistentes a vassoura-de-bruxa e com boa produtividade (MANDARINO; GOMES, 2009). Este procedimento tem sido fundamental, devido à ineficácia de controle químico e cultural de alto custo (PINTO; PIRES, 1998).

O clima tropical em regiões produtoras também propicia a proliferação de fungos micotoxigênicos do gênero *Aspergillus* no pré-processamento. A secagem de amêndoas ao sol constitui principal ponto crítico na produção de micotoxinas, aliado ao fator umidade adequado à toxigenicidade (COPETTI *et al.*, 2010; 2011).

*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* são os principais produtores de aflatoxinas (AFs), com relevância aos análogos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, sendo a ocorrência relatada em cacau e chocolate no Brasil (COPETTI *et al.*, 2011). A predominância de determinados análogos com pequena diferença estrutural em amêndoas poderia refletir em nível distinto de perigo ao consumidor. A série B (anel ciclopentanona) difere de G (anel 3-lactona), assim como a dupla ligação vinil éter C<sub>8</sub> = C<sub>9</sub> no anel furano terminal em AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> afeta drasticamente a genotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e imunossupressão, comparada aos respectivos análogos (JAIMEZ *et al.*, 2000; CARLSON *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; HUSSEIN; BRASEL, 2001; CHO *et al.*, 2008; DORNER, 2008; KARA, OZBEY; KABAK, 2015). A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) classifica a AFB<sub>1</sub> como grupo I (cancerígeno para os seres humanos) (IARC, 1993), com comprovado papel na etiologia de câncer de fígado (IARC, 2002).

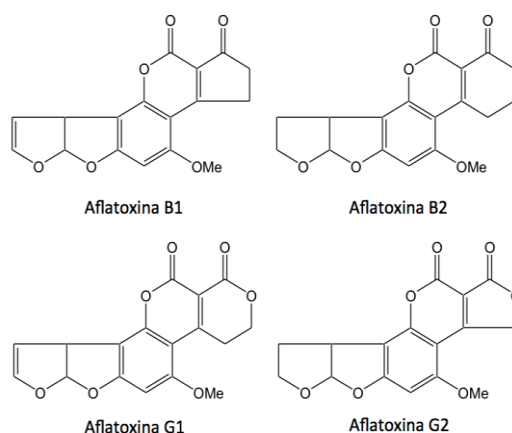


Fig. 1 – Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

Soma-se ainda o perigo de ocratoxina A (OTA) em clima tropical, produzida principalmente por *Aspergillus ochraceus*, e *Aspergillus* do grupo Nigri incluindo *Aspergillus carbonarius*. A OTA é o análogo mais abundante e tóxico do grupo, sendo dihidroisocumarina ligada a L-fenilalanina na posição 7-carbonila (7-[L-phenilalanil carbonil] carboxil-5-cloro-8 hidróxi-3,4 diidro-3R metil isocumarina) (Fig. 2) (BACALONI *et al.*, 2005; MECA *et al.*, 2010; KARA *et al.*, 2015). Classificada como grupo 2B (possível carcinógeno humano) pela IARC (IARC, 1993). A OTA tem sido relatada em pó de cacau oriundos da Costa do Marfim, Guiné, Nigéria e Camarões (BONVEHI, 2004); vendidos em lojas italianas (TAFURI *et al.*, 2004) e em amêndoas de cacau brasileiro (COPETTI *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011).

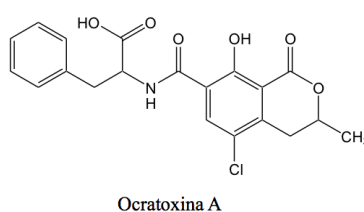


Fig. 2 – Estrutura química da ocratoxina A.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o limite de 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para aflatoxina total e de 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para ocratoxina em amêndoas de cacau (Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 07, de 18/Fev/2011). A Comunidade Europeia fixa AFB<sub>1</sub> em 5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e AF<sub>total</sub> em 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para frutos de casca rija destinados a método de triagem, ou outro tratamento físico pré-consumo humano, ou

uso como ingrediente em alimentos; não tem limite estabelecido para OTA em cacau (CE N° 1881/2006 da comissão de 19/Dez/2006).

O trabalho objetivou avaliar aflatoxinas e ocratoxina em grãos de cacau em clones desenvolvidos e cultivados em três microrregiões da Região Sul da Bahia (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector de fluorescência, UPLC-FLR), tendo em meta a contribuição ao direcionamento/estabelecimento de melhores cultivares em relação a segurança e qualidade.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material**

Cloreto de sódio grau P.A. (Synth, Brasil); bicarbonato de sódio grau P.A. (Synth, Brasil); metanol e acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, USA); água ultrapura (Purelab® Classic UF, Elga Labwater Global Operation, UK); Filtro de celulose Whatman n° 4 (Whatman International Ltda., UK); membrana Milex PFTE (politetrafluoroetileno) de 0,45µm; Coluna de imunoafinidade (AflaTest WB e Ochratest, Vicam Inc., Watertown, USA). Os padrões utilizados de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e ocratoxina A foram adquiridos da Sigma Chemical Co., USA.

Equipamentos: agitador magnético (Fisatom, Brasil); banho a 40°C; banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique, Brasil); espectrofotômetro UV-VIS (Libra S22, Biochrom Ltda., UK); cromatógrafo modelo Acquity UPLC (Waters®, EUA).

### **2.2 Amostras**

Cento e trinta amostras - secas em barcaças de madeira ao sol durante 7 a 10 dias (método tradicional) - foram coletadas em três fazendas na região Sul da Bahia, municípios de Ilhéus, Uruçuca e Ibirataia (raio de 160 km de distância), na safra de 2013. As fazendas foram denominadas como: Fazenda 1 (54 amostras), Fazenda 2 (44 amostras) e Fazenda 3 (32 amostras).

As amostras consistiram da variedade de cacau comum (CC), assim como variedades modificadas para resistência à vassoura de bruxa por clonagem (12). Foram coletadas amostras de sete clones da Fazenda 1 (denominadas: TSH 1188; TSH 516; BN 34; CC; CCN 51; scravine (SRN); VB 1151), cinco clones da Fazenda 2 (denominadas: BN 34; CEPC 2002; PH 16; pará-parazinho (PP); SR 162) e um clone da Fazenda 3 denominada de PH 16.

Os clones foram desenvolvidos pela CEPLAC – Comissão Executiva do Plano

de Lavoura Cacaueira – órgão do governo federal visando recuperar a lavoura cacaueira no Brasil. Estas amostras foram cultivadas, tratadas e armazenadas sob condições semelhantes na região produtora e transportadas para UEL – Londrina/PR.

As sementes recém-colhidas foram naturalmente fermentadas durante cinco dias em cocho de madeira para 80kg (temperatura em torno de 45°C, com máximo atingido de 48°C) e, secas naturalmente em barçaça sob sol durante sete dias com revolvimento diário (duas vezes por dia), até atingir a umidade em torno de 6%.

Cada amostragem consistiu em coleta com coletor apropriado (trado), sendo a barçaça dividida em partes iguais, sendo amostrado 20g cada. A amêndoa foi imediatamente acondicionada em saco plástico sob vácuo e, mantidas a -18°C até a realização das análises. A amostra foi transportada de Ilhéus-BA para Londrina-PR, triturada a 20 *mesh* e mantida a -18°C.

### **2.3 Atividade de água**

A atividade de água foi determinada através da quantificação da fugacidade de água através da constante dielétrica em equipamento AQUALAB Lite (Decagon Devices, USA), com exatidão  $\pm 0,015$  e resolução 0,001.

### **2.4 Extração e Clean-up**

O método utilizado baseou-se na Instrução Normativa Nº 09, de 24 de março de 2000 que Aprova os Métodos Analíticos de Referência para análise de Micotoxinas em Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Vegetal”, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA / BRASIL, 2000). A extração baseou-se no isolamento dos analitos de interesse empregando colunas de imunoafinidade com anticorpos específicos para aflatoxinas e ocratoxina A, através de cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de fluorescência, e foi desenvolvida com base em metodologias oficiais validadas em laboratório.

#### **2.4.1 Extração de aflatoxinas**

Dez gramas de amostra de cacau moído adicionado de um grama de cloreto de sódio (NaCl) foram extraídas com 40 mL de solução acetonitrila : água ultrapura (9:1 v/v). A suspensão foi agitada durante 30 minutos em homogeneizador de bancada (Red Rotor, HOEFER). Esta mistura homogeneizada foi duplamente filtrada por meio de papel filtro nº4 da Whatman e filtro de fibra de vidro Whatman. A seguir, 10 mL

do filtrado foram diluídos em 10 mL de água ultrapura e passado através de colunas de Imunoafinidade Aflatest WB (Vicom, USA), em um fluxo de 2-3 mL.min<sup>-1</sup>, seguindo-se a lavagem com 10 mL de água ultrapura. As aflatoxinas foram eluídas com 2 mL de metanol em um frasco âmbar e foram evaporadas sob um fluxo de nitrogênio a 40 °C. Os extratos secos foram armazenados a -18°C até a realização das análises. No momento das análises, as amostras foram derivatizadas com 10 µL de TFA (ácido trifluoroacético), mantidas em câmara escura por 20 minutos a 20°C. Após esse período, foram adicionados 90 µL de uma solução acetonitrila : água ultrapura (9:1 v/v), transferidas para o “vial” e levadas ao injetor do cromatógrafo (MAPA / BRASIL, 2000)..

#### **2.4.2 Extração de ocratoxina A**

Dez gramas de amostra de cacau moído foram extraídas com 80 mL de solução de metanol : bicarbonato de sódio 3% (8:2 v/v). A suspensão foi agitada durante 30 minutos em homogeneizador de bancada (Red Rotor, HOEFER). Esta mistura homogeneizada foi duplamente filtrada através de papel filtro n°4 da Whatman e filtro de fibra de vidro Whatman. A seguir, 4 mL do filtrado foram diluídos em 40 mL de tampão fosfato salino (PBS) e passado através de colunas de Imunoafinidade OchraTest (Vicom), em um fluxo de 2-3 mL.min<sup>-1</sup>, seguindo-se a lavagem com 20 mL de água ultrapura. A ocratoxina A foi eluída com 4 mL de metanol em um frasco âmbar e foi evaporada sob um fluxo de nitrogênio a 40°C. Os extratos secos foram armazenados a -18°C até a realização das análises. No momento das análises, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de metanol, levadas ao banho de ultrassom por 10 minutos, agitadas, filtradas em membrana de 0,45 µm e levadas ao injetor do cromatógrafo (MAPA / BRASIL, 2000).

#### **2.5 Parâmetros de análise em UPLC para detecção de aflatoxinas em cacau**

Foi utilizado um sistema Acquity UPLC (Waters®, EUA), com detector de fluorescência com comprimento de onda em 365 nm de excitação e 455 nm de emissão para detecção das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. O sistema é composto de amostrador automático com temperatura controlada em 10°C, bomba binária, forno com temperatura controlada em 40°C e sistema de degaseificação *on line*. Foi utilizada uma coluna Waters® BEH de 10cm com poro de 1,7 µm. A fase móvel foi composta de metanol : acetonitrila : água acidificada com ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

pH=2 (5:30:65 v/v/v), isocrática, com volume de injeção de 3  $\mu\text{L}$  e fluxo de 0,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O tempo de corrida foi de 4 minutos e o tempo de limpeza da coluna entre amostras foi de 2 minutos.

### **2.6 Parâmetros de análise em UPLC para detecção de ocratoxina A em cacau**

Foi utilizado um sistema Acquity UPLC (Waters<sup>®</sup>, EUA), com detector de fluorescência com comprimento de onda em 335 nm de excitação e 478 nm de emissão para detecção de ocratoxina A. O sistema é composto de amostrador automático com temperatura controlada em 10°C, bomba binária, forno com temperatura controlada em 40°C e sistema de desgaseificação on line. Foi utilizada uma coluna Waters<sup>®</sup> BEH de 10 cm com poro de 1,7  $\mu\text{m}$ . A fase móvel foi composta de água acidificada com ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) pH=2 : acetonitrila (40:60 v/v), isocrática, com volume de injeção de 3  $\mu\text{L}$  e fluxo de 0,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O tempo de corrida foi de 3,5 minutos e o tempo de limpeza da coluna entre amostras foi de 2 minutos.

## **3. Resultados e Discussão**

A Tabela 1 apresenta o limite de detecção, limite de quantificação, teste de recuperação do método para cada aflatoxina e ocratoxina A e os resultados obtidos a partir das análises realizadas nas amostras. As curvas de calibração de sete pontos foram lineares no intervalo de concentração de 0,15 a 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para  $\text{AFB}_1$  e  $\text{AFG}_1$ ; de 0,05 a 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para  $\text{AFB}_2$  e  $\text{AFG}_2$  e de 1 a 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para a OTA, com  $R^2$  variando de 0,964 a 0,999.

A fim de avaliar o efeito da matriz sobre os analitos, as curvas de calibração foram realizadas com matrizes fortificadas com o analito, conhecidas como curvas matrizadas. Os analitos de interesse foram adicionados à matriz e foi realizado todo o procedimento de extração e análise.

O método para determinação de aflatoxinas apresentou valores de recuperação que variaram de 91,7% a 95,8%. Para o método de determinação de ocratoxina A, o valor de recuperação foi de 89,4%. Estes valores estão de acordo com as exigências do Regulamento 401/2006 da Comissão Europeia (European Commission, 2006b), que estabelece que o teste de recuperação deve estar entre 70% e 110%, para analitos com concentração até 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Table 1: Occurrence of aflatoxin and ochratoxin A in cocoa clone developed by CEPLAC, Southern Bahia state, Brazil (crop 2013).

COCOA*		AFLATOXIN ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ )										OCHRATOXIN ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ )			
CLONE	N°	Samples		B1		B2		G1		G2		Samples			
		Positive	%	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Positive	%	Range	Mean
FARM - 1															
TSH 1188	06	02	33	$\leq$ LOQ	$\leq$ LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	01	17	<LOD-8.200	1.366
TSH 516	06	01	17	<LOD-1.415	0.236	<LOD-1.230	0.205	<LOD-2.015	0.336	<LOD-5.875	0.979	02	33	<LOD-90.10	28.42
BN 34	08	<LOD	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	05	62.5	<LOD-274.900	72.288
CC**	09	03	33	$\leq$ LOQ	$\leq$ LOQ	<LOD	<LOD	<LOD-1.410	0.278	$\leq$ LOQ	$\leq$ LOQ	06	75	<LOD-19.50	6.60
CCN 51	07	03	33	$\leq$ LOQ	$\leq$ LOQ	<LOD-0.348	0.05	$\leq$ LOQ	$\leq$ LOQ	<LOD	<LOD	01	14	<LOD-10.70	1.529
SRN**	09	<LOD	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	01	11	<LOD-38.83	4.311
VB 1151	09	01	11	<LOD-0.378	0.042	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-	<LOD	<LOD
FARM - 2															
BN 34	09	08	89	<LOD-0.405	0.089	<LOD-8.973	1.173	<LOD-8.830	1.609	<LOD-8.823	1.077	03	33	<LOD-26.300	5.222
CEPC2002	09	09	100	<LOD-5.875	2.009	<LOD-4.328	1.036	<LOD-6.247	2.219	<LOD-4.186	0.754	<LOD	-	<LOD	<LOD
PH 16	09	06	67	<LOD-0.680	0.214	<LOD	<LOD	<LOD-4.872	1.568	<LOD	<LOD	<LOD	-	<LOD	<LOD
PP**	09	08	89	<LOD-0.398	0.129	<LOD-16.370	1.854	<LOD-9.562	2.136	<LOD	<LOD	02	22	<LOD-28.1	5.478
SR 162	08	07	88	<LOD-0.463	0.360	<LOD	<LOD	<LOD-3.568	1.088	<LOD	<LOD	01	12	<LOD-8.80	8.80
FARM - 3															
PH 16***	32	05	15	<LOD-0.603	0.044	<LOD-0.425	0.022	<LOD-2.685	0.0839	$\leq$ LOQ	$\leq$ LOQ	01	3	<LOD-7.1	0.222
Limit of detection (LOD)				0.100		0.040		0.125		0.050		0.900			
Limit of quantification (LOQ)				0.375		0.100		0.400		0.125		2.500			
Recovery (%)				94.7		90.7		95.8		91.7		89.4			

\* : The freshly harvested cocoa beans were fermented (4-5 days) and naturally dried. The clones were developed by CEPLAC – Executive Planning Commission of Cocoa Farming.

\*\* : CC, common cocoa; SRN, Scravine; PP, Pará-parazinho.

\*\*\*: Clone cultivated in Farm-3 for production of 'fine cocoa'.

. Brazilian Health Surveillance Agency, RDC n° 07(ANVISA, 2011) established maximum levels of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> for cocoa (10.0  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ), and OTA for cocoa (10.0  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ).

. European Commission Regulation EC n° 1881(2006) established the maximum limit of aflatoxin allowed for cocoa in 5.0  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  (AFB<sub>1</sub>) and 10.0  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  (sum of B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>). The maximum levels refer to the edible part of groundnuts and nuts. If groundnuts and nuts 'in shell' are analysed, it is assumed when calculating the aflatoxin content all the contamination is on the edible part.

Os cromatogramas apresentaram boa resolução para os analitos estudados e sem a presença de picos de interferência. Os tempos de retenção para os analitos nas amostras (Fig. 3 - B e D) foram semelhantes aos picos das soluções padrão (Fig. 3 – A e C). A identificação dos analitos de interesse se deu por análise do tempo de retenção, comparação com os respectivos padrões e análise dos espectros.

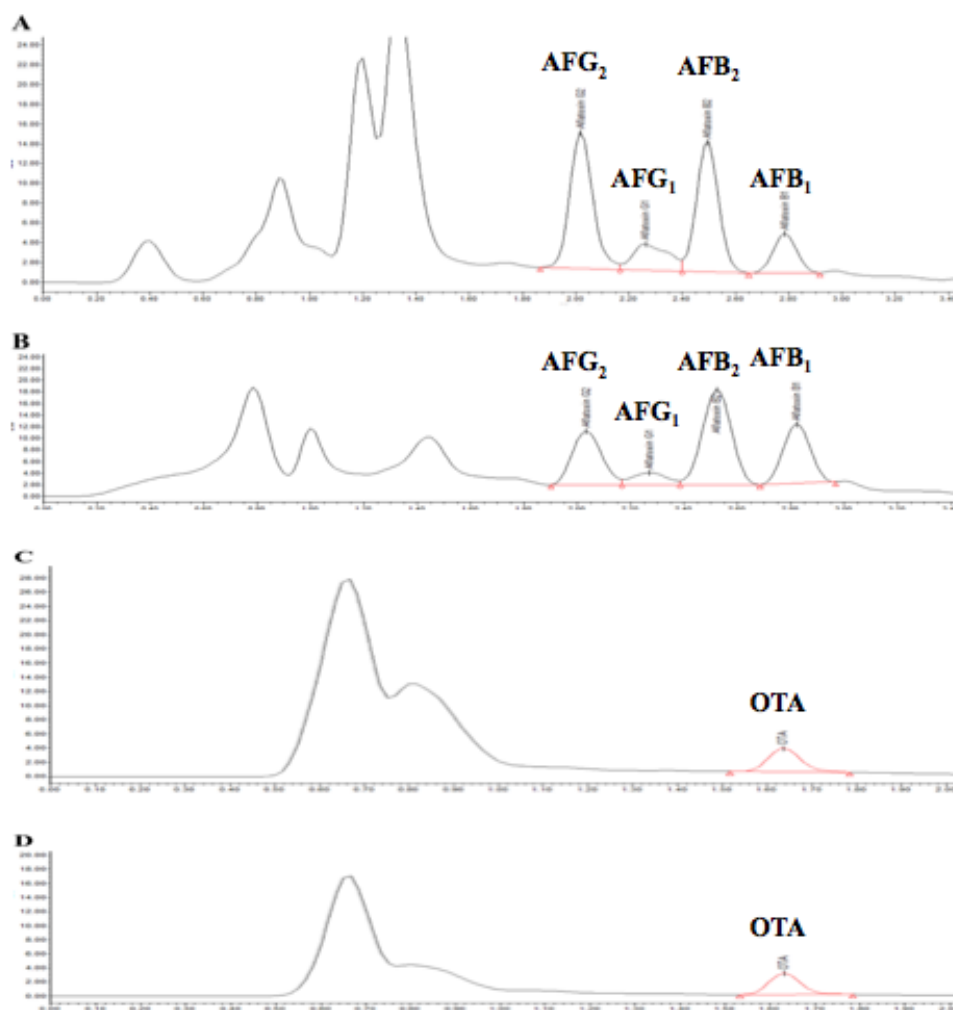


Fig. 3 – Perfil cromatográfico de aflatoxinas (A – solução padrão; B – amostra naturalmente contaminada) e ocratoxina A (C – solução padrão; D – amostra naturalmente contaminada) em cacau.

Dos sete clones avaliados da Fazenda 1, os clones BN 34 e SRN não apresentaram contaminação natural por aflatoxinas e o clone TSH 1188 apresentou duas amostras contaminadas naturalmente com aflatoxina B<sub>1</sub> abaixo do limite de quantificação (0,375  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

Cinco clones, TSH 1188 (33% das amostras), TSH 516 (17% das amostras), CC (11% das amostras), CCN 51 (14% das amostras), e VB 1151 (11% das amostras), apresentaram contaminação por aflatoxina B<sub>1</sub>, que é considerada a mais tóxica, com valores que variaram entre <LOD e 1,415 µg.kg<sup>-1</sup>. Dois clones apresentaram contaminação por aflatoxina B<sub>2</sub>: TSH 516 (17% das amostras) e CCN 51 (14% das amostras), variando de <LOD a 1,230 µg.kg<sup>-1</sup> e <LOD a 0,348 µg.kg<sup>-1</sup> respectivamente. Os clones TSH 516 (17% das amostras; <LOD a µg.kg<sup>-1</sup>), CC (22% das amostras; <LOD a 1,410 µg.kg<sup>-1</sup>) e CCN 51 (14% das amostras: ≤LOQ) apresentaram contaminação com aflatoxina G<sub>1</sub>, e os clones TSH 516 (17% das amostras; <LOD a 5,875 µg.kg<sup>-1</sup>) e CC (01 amostra ≤LOQ) estavam naturalmente contaminadas com aflatoxina G<sub>2</sub>. O clone TSH 516 apresentou as quatro formas de aflatoxina em uma única amostra, chegando ao valor de 10,535 µg.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina total, o que excede a legislação vigente no Brasil e na Comunidade Europeia. Os outros clones apresentaram valores de aflatoxina total que variaram de <LOD a 1,410 µg.kg<sup>-1</sup>.

Os valores de ocratoxina A variaram de <LOD a 274,90 µg.kg<sup>-1</sup>, excedendo a legislação vigente que é de 10 µg.kg<sup>-1</sup>. O único clone que não apresentou contaminação por OTA foi a VB 1151. Os clones TSH 516 (33% das amostras) e BN 34 (17% das amostras) apresentaram valores de contaminação além do permitido na legislação, variando de <LOD a 90,10 µg.kg<sup>-1</sup> e <LOD a 274,90 µg.kg<sup>-1</sup> respectivamente. Das 54 amostras analisadas, 16 apresentaram contaminação por OTA e 11 apresentaram valor maior do que o permitido pela ANVISA.

Dos clones procedentes da Fazenda 2 e da Fazenda 3 (PH 16\*\*), PH 16 e SR 162 não apresentaram AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> e o clone PP não apresentou contaminação por AFG<sub>2</sub>.

O clone BN 34 (89% das amostras) apresentou maior contaminação por aflatoxina total, chegando a valores de 17,795 µg.kg<sup>-1</sup>, seguida dos clones PP (89% das amostras; 0,395 a 12,501 µg.kg<sup>-1</sup>) e CEPC 2002 (100% das amostras; <LOD a 16,370 µg.kg<sup>-1</sup>). O clone CEPC 2002 também apresentou maior contaminação de AFB<sub>1</sub> (78% das amostras) com valor máximo de 5,875 µg.kg<sup>-1</sup>.

Os clones CEPC 2002 e PH 16 não apresentaram contaminação por OTA. Nos clones BN 34 e PP foram encontrados valores, acima do estabelecido em legislação de OTA pela ANVISA, de 26,300 e 28,100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  respectivamente. O clone SR 162 apresentou 01 amostra naturalmente contaminada (12% das amostras) com valores que variaram de <LOD a 8,800  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

O cacau coletado Fazenda 3 é um cacau mono varietal (clone PH 16\*\*) destinado a produção de “chocolate fino” ou “chocolate gourmet”. Os frutos são selecionados de acordo com um padrão de qualidade exigido pelos processadores. Leva-se em consideração o estágio de maturação do fruto e estado geral do fruto (sem doenças ou pragas). Além disso a casca deve estar íntegra e sem danos e após a abertura, o cacau será fermentado com seus parâmetros rigidamente controlados. Ao fim do processo de fermentação e antes de levar o cacau à etapa de secagem, as amêndoas são imersas numa solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos. Depois desse processo, o cacau é levado para as barcaças de madeira e tem sua secagem controlada com os parâmetros de umidade e atividade de água. Nesta etapa, o cacau é revolvido várias vezes ao dia para evitar a proliferação de fungos na camada mais interna.

O “cacau fino” ou “cacau gourmet” apresentou baixa contaminação natural por AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>1</sub> e não houve a presença de AFG<sub>2</sub>. Nenhuma das amostras analisadas ultrapassou os limites estabelecidos pela ANVISA e CE. Uma amostra, das trinta e duas analisadas, apresentou contaminação com OTA de 7,1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Na Fazenda 1, das 54 amostras analisadas, 01 amostra (1,85%) apresentou contaminação maior do que o estabelecido pela ANVISA e CE para aflatoxina total e 12 amostras (22%) apresentaram contaminação maior do que o permitido pela ANVISA para OTA. Na Fazenda 2, das 45 amostras analisadas, 03 amostras (6,7%) apresentaram contaminação maior do que o estabelecido pela legislação vigente para aflatoxina total, 02 amostras (4,4%) apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela CE para a AFB<sub>1</sub> e 04 amostras (8,9%) apresentaram contaminação maior do que o permitido para OTA. Nenhuma das 32 amostras analisadas procedentes da Fazenda 3, apresentou contaminação acima do permitido.

Copetti *et al.* (2011), em trabalho realizado com cacau seco no Brasil, encontrou valores máximos de 6,66  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub>, 0,37  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AFB<sub>2</sub> e 7,03  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AF total. Turcotte *et al.* (2013), analisaram 15 amostras de cacau seco

coletados pela Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (*The Canadian Food Inspection Agency - CFIA*), encontrando 2,60  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub>, 0,44  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AFB<sub>2</sub>, 0,43  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AFG<sub>1</sub>, 0,07  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AFG<sub>2</sub> e 3,52  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de AF total.

Em um estudo realizado por Dongo *et al.* (2008) em cacau da Nigéria, 91,5% das amostras estavam contaminadas com OTA, com uma média de 40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e máximo de 277  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , valor semelhante ao encontrado neste estudo para a clone BN 34.

Em trabalho publicado por Amezqueta *et al.* (2004), 63% de amostras estavam contaminadas com OTA, entre 46 amostras analisadas, com uma média de 1,71  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e um máximo de 15  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Bonvehi (2004) relatou que 76% das 21 amostras analisadas estavam contaminadas com OTA, com uma média de 0,45  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e um máximo de 3,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Coulibaly *et al.* (2013), encontraram valores de ocratoxina em amêndoas de cacau, da Costa do Marfim, variando de 0,05 a 14,75  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Mounjouenpou *et al.* (2012), encontram concentração média de 20,75  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  em cacau coletado em Camarões durante os anos de 2005, 2006 e 2007.

Alguns estudos sobre a ocorrência de micotoxinas em amêndoas de cacau, pó de chocolate e em barras de chocolate têm relatado a presença de aflatoxinas e ocratoxina A (TAFURI *et al.*, 2004; COPETTI *et al.*, 2010; COPETTI *et al.* 2012). Em um estudo realizado por Tafuri *et al.* (2004) foi verificado que 50 % das amostras de cacau em pó analisadas foram positivas para ocratoxina A, com concentrações que variavam entre 0,22  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  e 0,77  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ . A ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em pelo menos 80% das amostras de chocolate avaliadas foi relatada por Turcotte *et al.* (2013) no Canadá. Copetti *et al.* (2012) observaram a ocorrência de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> e ocratoxina A em chocolate em pó e em barras de chocolate amargo, ao leite e branco comercializado no Brasil.

A adoção de práticas agrícolas que previnam a contaminação e o desenvolvimento de fungos é fundamental para garantir a obtenção de matéria-prima de boa qualidade (ROSMANINHO *et al.*, 2001).

A maioria das fazendas utiliza métodos próprios para decidir quando as amêndoas estão suficientemente secas para serem armazenadas e processadas. O processamento de cacau na fazenda, a partir da abertura do fruto até o armazenamento, resulta numa redução nos valores de atividade de água. A atividade de água é um parâmetro importante para a verificação do ponto de parada da secagem. O valor de  $a_w$  após a secagem, varia de acordo com o tempo de secagem, a

temperatura média e pluviosidade local. As amostras analisadas apresentaram valores de atividade de água que variaram de 0,491 até 0,567. Esses valores estão em acordo com os encontrados por Cruz (2012).

Apesar da pequena distância entre as fazendas (raio de 160 km), pode-se observar uma diferença na precipitação anual média, variando de 1110 a 2014 mm, o que pode influenciar diretamente na etapa de secagem das sementes. Todas as fazendas localizam-se ao nível do mar e as fazendas mais próximas da costa apresentam maiores índices pluviométricos. Não houve diferença entre a temperatura nas três fazendas onde as amostras foram coletadas. Os fatores climáticos podem ser determinantes para que ocorra a presença de fungos produtores de micotoxinas.

Na Figura 4, estão apresentados os valores médios de contaminação de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AF Total e OTA dos clones procedentes das três fazendas na forma de histograma. Para uma visualização global da contaminação por AFs e OTA, foi realizada a média das amostras positivas e negativas de cada clone. Nesta apresentação é possível observar que o cacau da Fazenda 1 (clones codificados de 1 a 7 – correspondência com o clone na legenda da figura) e o cacau da Fazenda 3 tem menor contaminação por AFs do que o cacau procedente da Fazenda 2. Pode-se observar, também, que a Fazenda 2 (clones codificados de 8 a 12) apresentam maior ocorrência AFG<sub>1</sub>. De todas as amostras analisadas, 25% estavam contaminadas com AFB<sub>1</sub>, 16% com AFB<sub>2</sub>, 24% com AFG<sub>1</sub> e 21% com AFG<sub>2</sub>.

Há ocorrência de AF total em todos os clones procedentes da Fazenda 2 (clones codificados de 8 a 12) e ocorrência de OTA em seis dos sete clones analisados procedentes da Fazenda 1 (clones codificados de 1 a 7).

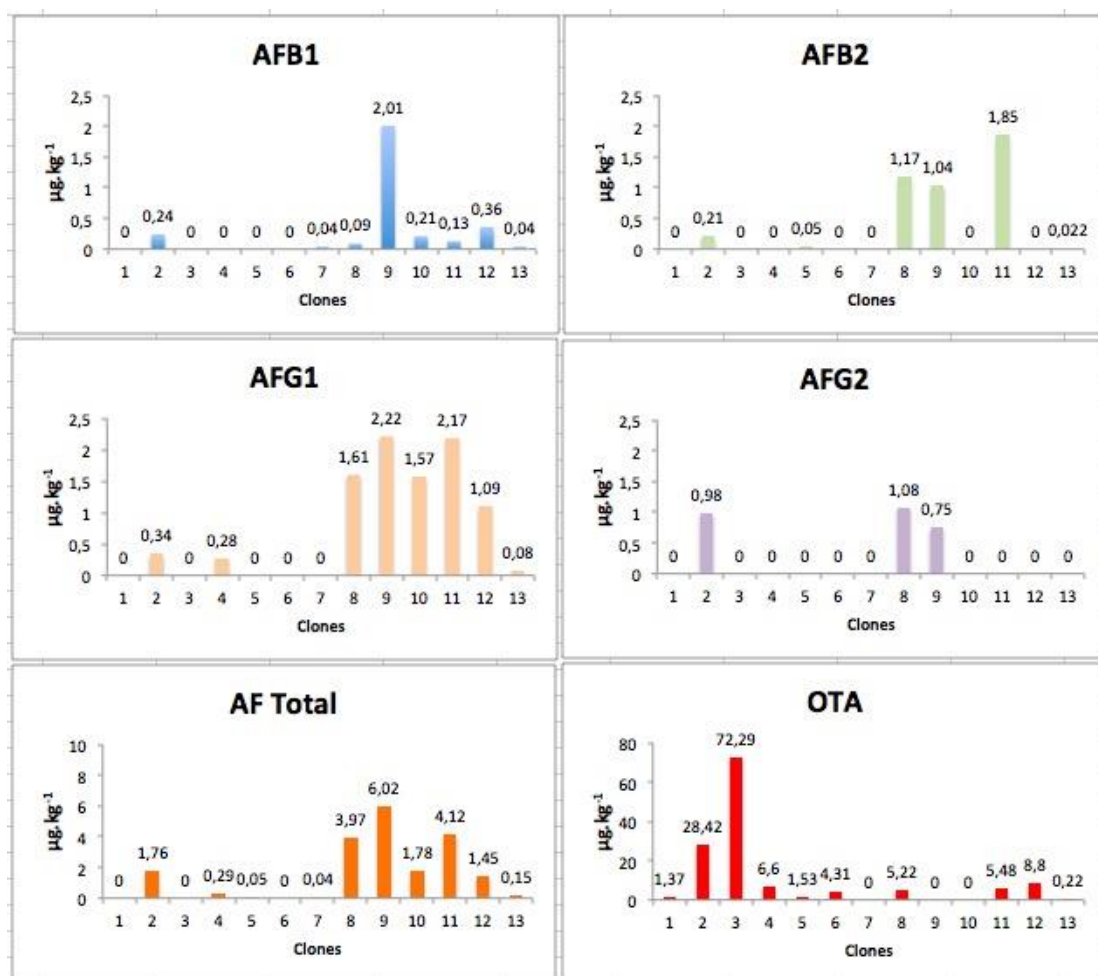


Fig. 4 – Histograma das médias de micotoxinas em clones de cacau. 1 – TSH 1188; 2 – TSH 516; 3 – BN 34; 4 – CC; 5 – CCN 51; 6 – SRN; 7 – VB 1151; 8 – BN 34; 9 – CEPC 2002; 10 – PH 16; 11 – PP; 12 – SR 162; 13 – PH 16.

Foi avaliada a co-ocorrência entre aflatoxinas e ocratoxina A. A ocorrência concomitante de micotoxinas pode levar a efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos. Em termos de avaliação do risco os efeitos sinérgicos são os mais preocupantes (SPEIJERS & SPEIJERS, 2004).

A co-ocorrência de AFs com OTA foi observada em apenas 4,6% de todas as amostras avaliadas. Analisando o coeficiente de correlação de Pearson percebe-se que a correlação é muito fraca para a AFB<sub>1</sub> (-0,1085), AFB<sub>2</sub> (0,1262), AFG<sub>1</sub> (0,1710) e AF total (0,1089) e moderada para a AFG<sub>2</sub> (0,4582). Não houve um padrão de dependência na co-ocorrência destas duas micotoxinas. Esse mesmo comportamento foi verificado por Copetti *et al.* (2012).

#### 4. Conclusão

De todas amostras analisadas 38% estavam contaminadas com AF total e 18% apresentaram contaminação por OTA. Uma amostra da Fazenda 1, clone TSH 516, apresentou valor superior ao estabelecido pela ANVISA e CE e três clones da Fazenda 2 ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação vigente: BN 34 (01 amostra), PP (01 amostra) e CEPC 2002 (01 amostra) para AF total. Cinco clones da Fazenda 1 apresentaram contaminação maior do que o permitido pela legislação para OTA: TSH 16 (02 amostras), BN 34 (04 amostras), CC (03 amostras), CCN 51 (01 amostra) e SRN (01 amostra). Na Fazenda 2, duas clones, BN 34 (02 amostras) e PP (02 amostras), ultrapassaram os limites permitidos para OTA. Não foi possível estabelecer padrão de dependência na co-ocorrência entre as aflatoxinas e OTA.

Alguns clones não apresentaram contaminação por aflatoxinas e OTA. Esses clones devem continuar sendo monitorados para estabelecer uma relação de resistência aos fungos produtores de micotoxinas. De acordo com os resultados obtidos na Fazenda 3, produtora de cacau denominado “cacau fino” ou “cacau gourmet”, pode-se inferir que a contaminação por micotoxinas está relacionada à adoção de boas práticas agrícolas e de processamento.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), uma iniciativa estratégica de investigação no âmbito do Ministério da Educação do Brasil, número do projeto 23038,019085 / 2009-14. Professora Elisa Yoko Hirooka é pesquisadora CNPq.

#### Referências

- AMEZQUETA, S., GONZALEZ-PENAS, E., MURILLO, M., LOPEZ DE CERAIN, A., (2004). Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 590–596.
- BACALONI, A.; CAVALIERE, C.; FABERI, A. (2005). Automated on-line solid-phase extraction- liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of ochratoxin A in wine and beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 5518- 5525.

BRASIL, (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 09, de 24 de março de 2000. Aprova os Métodos Analíticos de Referência para análise de Micotoxinas em Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Vegetal.

BRASIL, (2011). Ministério da Saúde. Resolução RDC no 07, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, n. 46, p.66, 9 mar 2011.

BONVEHI, J. S. (2004). Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6347-6352.

CARLSON, M.A; BARGERON, C.B.; BENSON, R.C.; FRASER, A.B.; PHILLIPS, T.E.; VELKY, J.T.; GROOPMAN, J.D.; STRICKLAND, P.T.; KO, H.W. (2000). An automated, handheld biosensor for aflatoxin. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, p. 841–848.

CHIAVARO, E.; DALL’ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GAMBARELLI, E.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. (2001). New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 31-40.

CHO, S. H.; LEE, C. H.; JANG, M. R.; SON, Y. W.; LEE, S. M.; CHOI, S.; KIM, S. H.; KIM, D. B. (2008). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, v. 107 p. 1283–1288.

COPETTI, M. V., IAMANAKA, B. Y., PEREIRA, J. L., LEMES, D.P., NAKANO, F., TANIWAKI, M. H. (2012). Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. **Food Control**, v. 26, p. 36-41.

COPETTI, M. V., IAMANAKA, B. T., PEREIRA, J. L., FUNGARO, M. H., & TANIWAKI, M. H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 141-144.

COPETTI, M. V., PEREIRA, J. L., IAMANAKA, B. T., PITT, J. I., & TANIWAKI, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 67-70.

COULIBALY, A., BIEGO, G. H. M., DEMBELE, A., BOHOUSSOU, K. M., TOURE, A. (2013). Cocoa Beans and Cocoa Derivatives from Cote-D’Ivoire: Investigating Ochratoxin A Level and Assessing Dietary Intake Adults. **Sustainable Agriculture Research**, v. 2, p. 173-180.

CRUZ, J. F. M. (2012). Caracterização das sementes de clones de cacau Theobroma cacao L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. Dissertação (Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA, 101p.

DONGO, L., BANDYOPADHYAY, R., KUMAR, M., OJIAMBO, P.S., (2008). Occurrence of ochratoxin A in Nigerian ready for sale cocoa beans. **Agricultural**

**Journal** v. 3, p. 4–9.

DORNER, J.W. Management and prevention of in peanuts. (2008). **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.203-208.

European Commission. (2006a). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L364/5.

European Commission. (2006b). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L70.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. (2001). Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134.

IARC, 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances, food items and constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56. **World Health Organization**, Lyon, France, p. 397-444.

IARC, 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Stryrene. **International Agency for Research on Cancer** v. 82, p. 171-300.

IBGE (2014) – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Available in: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201309.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf) . Accessed August 15, 2015.

JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. (2000). Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 1-10.

KARA, G. N., OZBEY, F., KABAK, B. (2015). Co-occurrence of aflatoxin and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. **Food Control**, v. 54, p. 275-281.

MAGALHÃES, J. T., SODRÉ, G. A., VISCOGLIOSI, H., GRENIER-LOUSTALOT, M-F. (2011). Occurrence of ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. **Food Control**, v. 22, p. 744-748.

MANDARINO, E. P.; GOMES, A. R. S. Produtividade do cacauieiro (*Theobroma cacao L.*) cultivado em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil. Boletim Técnico nº 197, **Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira**, Ilhéus – BA, 2009.

MECA, G.; BLAIOTTRA, G.; RITIENI, A. (2010). Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, p. 579-583.

MOUNJOUENPOU, P., MBANG, J. A. A., GUYOT, B., GUIRAUD, J. P. (2012).

Traditional procedures of cocoa processing and occurrence of ochratoxin - A in the derived products. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 1332-1339.

PINTO, L. R. M. & PIRES, J. L. (1998). Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. Ilhéus. CEPLAC/CEPEC. **Boletim Técnico**, n. 181, 35p.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. Comunicação Científica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 107-114, 2001.

SPEIJERS, G. J. A., & SPEIJERS, M. H. M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 91-98.

TAFURI, A., FERRACANE, R., & RITIENI, A. (2004). Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. **Food Chemistry**, v. 88, p. 487-494.

TURCOTTE, A. M., SCOTT, P. M., TAGUE, B. (2013). Analysis of cocoa products for ochratoxin A and aflatoxins. **Mycotoxin Res**, v. 29, p. 193–201.

## **Compostos Bioativos em clones de cacau (*Theobroma cacao* L.) desenvolvidos na região Sul de Bahia-Brasil**

### **Resumo**

O teor de compostos fenólicos totais de flavonoides totais, antocianinas totais, ácido cafeico, cafeína, teobromina, catequina e epicatequina foram determinados em doze clones de cacau. Os compostos foram determinados por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos (UPLC-PDA). Entre os clones analisados, observou-se uma variação no seu conteúdo de compostos bioativos. O clone SRN apresentou os maior conteúdo para os compostos fenólicos, flavonoides, cafeína, catequina e epicatequina. O clone CC apresentou o menor conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides, catequina e epicatequina. A análise de componente principal (PCA) mostrou que todos os clones têm características relacionadas com a sua composição de compostos bioativos, classificando cada clone de forma bem definida.

**Palavras-chave:** fenólicos, flavonóides, antioxidantes, teobromina, cafeína, catequina, epicatequina.

## 1. Introdução

O Brasil é o sexto produtor mundial de cacau (*Theobroma cacao* L.) (ICCO, 2013) e a região sul da Bahia é a principal produtora do país, sendo responsável por 60% da produção (IBGE, 2014). Até o final da década de 1980, esta região era livre da praga conhecida como vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, responsável pela queda da produção. A vassoura de bruxa, é uma das doenças mais importantes do cacau na América Latina e nas Ilhas do Caribe, causando perdas em grande escala. No Brasil, é encontrada em toda a bacia do Rio Amazonas e no sul da Bahia (SCARPARI *et al.*, 2005).

Após a introdução da vassoura-de-bruxa no estado da Bahia, o Centro de Pesquisas do Cacau da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPEC/CEPLAC) reorientou o seu programa de melhoramento para o desenvolvimento de variedades resistentes, e passou a enfatizar métodos de seleção recorrente, visando acumular genes de resistência e de outros caracteres de interesse agrônomo para disponibilizá-lo como clones (PEREIRA, 2001).

O clima, tempo, exposição à luz do sol, as chuvas, condições do solo, época de maturação, de colheita, e o tempo entre a colheita e a fermentação das sementes, são fatores que contribuem para variações na formação das características próprias de cada variedade, que apresentam sabor único (AFOAKWA, 2010).

O cacau é um fruto que tem sido considerado importante fonte de compostos bioativos, tais como metilxantinas, compostos fenólicos e ácidos fenólicos.

Os compostos fenólicos, apresentam efeitos benéficos à saúde, potente atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres, proteção contra danos ao DNA das células (WOLLGAST; ANKLAN, 2000b), propriedades anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiaterogênica, antitrombótica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora (WOLLGAST; ANKLAN, 2000a; GOTTI *et al.*, 2006). De acordo com Schroeter *et al.* (2006), a epicatequina é o componente ativo do cacau responsável pelos efeitos benéficos à saúde vascular a ele associados.

Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau pertencem às classes dos taninos e dos flavonoides. Os flavonoides presentes incluem flavanóis, flavonóis, antocianinas, flavonas e flavanonas (ENGLER *et al.*, 2004). Entre estes, os flavanóis são os mais abundantes no cacau, sendo a (+)-catequina e a

(-)-epicatequina os principais representantes (Fig. 1). A (-)-epicatequina tem sido reportada como o principal flavanol monomérico do cacau, representando aproximadamente 35% do conteúdo total dos compostos fenólicos (WOLLGAST; ANKLAM, 2000b).

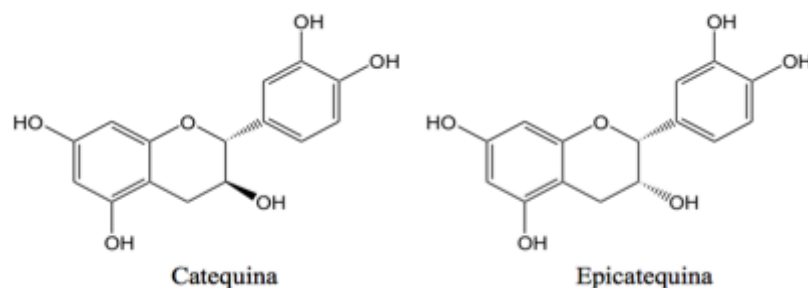


Fig. 1 – Estrutura química da catequina e epicatequina.

As substâncias fenólicas, da classe das antocianinas, estão armazenadas em células distribuídas em grupos através dos cotilédones da amêndoa de cacau (AMORES *et al.*, 2009). As antocianinas são pigmentos instáveis e apresentam maior estabilidade em condições ácidas (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). As antocianinas possuem a capacidade de funcionar como antioxidantes devido à deficiência de elétrons do núcleo flavílio e à presença de hidroxilas livres, assim como de outras estruturas químicas na molécula, podendo ocorrer variações quanto à intensidade da atividade antioxidante em função da antocianina, acilações e copigmentações (CRUZ, 2008). A ação antioxidante das antocianinas podem agir retardando o envelhecimento celular, aumentando as defesas imunológicas, propiciando uma melhor circulação sanguínea e protegendo o organismo contra o acúmulo de lipídeos nas artérias (RIBEIRO *et al.*, 2011).

As metilxantinas, como teobromina e cafeína (Fig. 2), são outro grupo de compostos bioativos encontrados no cacau. A teobromina e cafeína representam mais de 99 % dos alcaloides presentes nas amêndoas (AMORES, 2009). Segundo Wakao (2002), os teores finais de teobromina e cafeína estão relacionados com o genótipo de cacau, o grau de maturidade das amêndoas e o nível de fermentação.

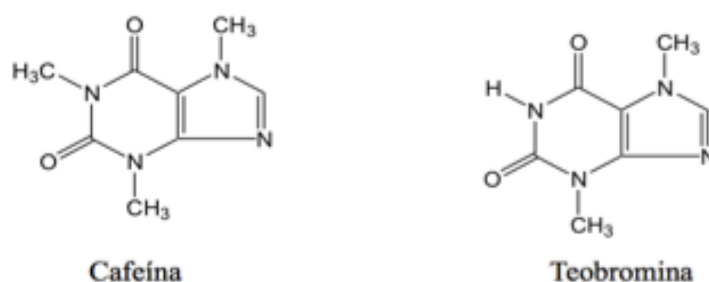


Fig. 2 – Estrutura química da cafeína e teobromina.

Esses alcaloides têm efeito estimulante no sistema nervoso central (BRUINSMA; TAREN, 1999). A amêndoa do cacau contém cerca de 2-3% de teobromina, 0,2% de cafeína e traços de teofilina, sem qualquer alteração quantitativa desta concentração ser relatada durante a fermentação e torrefação (CRUZ, 2013).

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de compostos bioativos de doze clones de cacau, produzidos na região Sul da Bahia, utilizando um sistema de UPLC-PDA (Liquid Chromatography Ultra Performance with Photodiode Array Detector) e utilizar a Análise de Componente Principal (PCA) para descrever a variabilidade entre os clones.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Material

Carbonato de sódio, cloreto de alumínio, hidróxido de sódio, nitrito de sódio, ácido clorídrico e etanol (grau P.A.; Synth, Brasil; metanol, acetonitrila e ácido fórmico grau HPLC (J.T. Baker, USA); água ultrapura (Purelab® Classic UF, Elga Labwater Global Operation, UK); Filtro de celulose Whatman nº 4 (Whatman International Ltd., UK); membrana Milex PFTE (politetrafluoroetileno) de 0,45µm. O reativo de Folin-Ciocalteu e os padrões de Ácido Caféico, Cafeína, Teobromina, Catequina e Epicatequina foram adquiridos da Sigma Chemical Co., USA.

Equipamentos: agitador magnético (Fisatom, Brasil); banho a 40°C; banho ultrassônico (Ultrasonic cleaner Unique, Brasil); espectrofotômetro UV-VIS (Libra S22, Biochrom Ltd, UK); cromatógrafo modelo Acquity UPLC (Waters, EUA).

## 2.2 Amostras

Cento e trinta amostras - secas em barcaças de madeira ao sol durante 7 a 10 dias (método tradicional) - foram coletadas em três fazendas na região sul da Bahia, municípios de Ilhéus, Uruçuca e Ibirataia (raio de 160 km de distância), na safra de 2013.

As amostras consistiram da variedade de cacau comum (CC), assim como variedades modificadas para resistência à vassoura-de-bruxa por clonagem. Foram coletadas amostras de doze clones, denominados: TSH 1188; TSH 516; cacau comum (CC); CCN 51; scravine (SRN); VB 1151; BN 34; CEPC 2002; PH 16; pará-parazinho (PP); SR 162 e PH 16 (destinado a produção de “cacau fino”).

Os clones foram desenvolvidos pela CEPLAC – Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira – órgão do governo federal visando recuperar a lavoura cacaueira no Brasil. Estas amostras foram cultivadas, tratadas e armazenadas sob condições semelhantes na região produtora e transportadas para UEL – Londrina/PR.

As sementes recém-colhidas foram naturalmente fermentadas durante cinco dias em cocho de madeira para 80kg (temperatura em torno de 45°C, com máximo atingido de 48°C) e, secas naturalmente em barcaça sob sol durante sete dias com revolvimento diário (duas vezes por dia), até atingir a umidade em torno de 6%.

Cada amostragem consistiu em coleta com coletor apropriado (trado), sendo a barcaça dividida em partes iguais, sendo amostrado 20g cada. A amêndoa foi imediatamente acondicionada em saco plástico sob vácuo e, mantidas a -18°C até a realização das análises. A amostra foi transportada de Ilhéus-BA para Londrina-PR, triturada a 20 *mesh* e mantida a -18°C.

## 2.3 Compostos Fenólicos Totais

### 2.3.1 Extração dos compostos de interesse

Foram utilizados 10 g de cacau moído para a extração dos compostos de interesse. A extração foi realizada utilizando 80 mL de uma solução de metanol : água (80:20 v/v) conforme Oliveira *et al.* (2011). A suspensão foi agitada durante 30 minutos em homogeneizador de bancada (Red Rotor, HOEFER). Esta mistura homogeneizada foi duplamente filtrada por meio de papel filtro n°4 da Whatman e filtro de fibra de vidro Whatman. O extrato foi armazenado em frasco âmbar e armazenado a -18°C até a realização das análises.

### 2.3.2 Metodologia de Análise

O método de Folin-Ciocalteu adotado para quantificar compostos fenólicos consiste na redução do reagente por estes compostos com a formação de um complexo azul pela mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico, que em meio básico se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, originando óxidos azuis de volfrâmio ( $W_8O_{23}$ ) e molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ) (MOYER *et al.*, 2002). Este complexo pode ser medido a 760 nm contra um padrão (IMEH; KHOKHAR, 2002).

A quantidade total de compostos fenólicos foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com catequina ( $R^2 = 0,9999$ ). Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL da solução aquosa de extrato (concentração  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e, posteriormente, a absorbância foi medida a 765 nm (espectrofotômetro UV-VIS; Libra S22, Biochrom Ltd, UK), usando-se o branco como referência. A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos das amostras foi realizada em triplicata.

## 2.4 Flavonoides Totais

### 2.4.1 Extração dos compostos de interesse

Foram utilizados 10 g de cacau moído para a extração dos compostos de interesse. A extração foi realizada utilizando 80 mL de uma solução de metanol : água (80:20 v/v) conforme Oliveira *et al.* (2011). A suspensão foi agitada durante 30 minutos em homogeneizador de bancada (Red Rotor, HOEFER). Esta mistura homogeneizada foi duplamente filtrada por meio de papel filtro nº4 da Whatman e filtro de fibra de vidro Whatman. O extrato foi armazenado em frasco âmbar e armazenado a  $-18^\circ\text{C}$  até a realização das análises.

### 2.4.2 Metodologia de Análise

Para a determinação do teor de flavonoides totais, foi utilizado 1 mL do extrato, que foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL contendo previamente 4 mL de água ultrapura. Foram adicionados 0,3 mL de nitrito de sódio 5 %. Após exatos 5 minutos, foram adicionados 0,3 mL de cloreto de alumínio 10% e após 1 minuto foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 1 M. O balão

volumétrico foi completado com água destilada e agitado manualmente. A absorbância foi medida a 510 nm (espectrofotômetro UV-VIS; Libra S22, Biochrom Ltd, UK), e a quantificação feita através de uma curva de calibração construída pela diluição de uma solução padrão de epicatequina (R=0,9997), os resultados foram expressos em mg.100g (LEE *et al.*, 2003; MACIEL, 2011).

## 2.5 Antocianinas Totais

### 2.5.1 Extração dos compostos de interesse

A metodologia utilizada foi a descrita por Cruz (2008). Dois gramas de amostra foram pesados e adicionou-se 50 mL de solução de etanol: HCl 1,5N (85:15, v/v). Após agitação por 30 minutos (Red Rotor, HOEFER), a amostra ficou em repouso sob refrigeração por 12 horas. Ao término desta etapa a mistura homogeneizada foi duplamente filtrada por meio de papel filtro nº4 da Whatman e filtro de fibra de vidro Whatman, e o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, avolumado com a solução de etanol: HCl 1,5 N (85:15, v/v) e colocado em repouso por 60 minutos, para a estabilização (RIBEIRO *et al.*, 2011).

### 2.5.2 Metodologia de Análise

A absorbância foi medida a 528 nm (espectrofotômetro UV-VIS; Libra S22, Biochrom Ltd, UK), contra o branco da solução alcoólica de HCl. A quantificação foi feita por meio da equação descrita abaixo e o resultado expresso em equivalente da antocianina principal, cianidina- 3-glucosídeo.

$$AT = \left( \frac{Abs_{528} \times PM_{cianidina-3-glucosídeo} \times fd}{\epsilon} \right) \times 100$$

Onde: AT são as antocianinas totais expressas em mg da antocianina predominante em 100g de amostra; Abs<sub>528</sub> é a absorbância do extrato filtrado lida a 528 nm; PM é o peso molecular da cianidina-3-glucosídeo (445,2); fd é o fator de diluição dado pela razão volume : massa; ε é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glucosídeo em solução etanólica acidificada à 528 nm, e 100 é utilizado para expressar o valor por 100 gramas de amostra.

## **2.6 Determinação de Ácido Caféico, Catequina, Epicatequina Cafeína e Teobromina.**

### **2.6.1 Extração dos compostos de interesse**

Foram utilizados 10 g de cacau moído para a extração dos compostos de interesse. A extração foi realizada utilizando 80 mL de uma solução de metanol : água (80:20 v/v) conforme Oliveira *et al.* (2011). A suspensão foi agitada durante 30 minutos em homogeneizador de bancada (Red Rotor, HOEFER). Esta mistura homogeneizada foi duplamente filtrada por meio de papel filtro nº4 da Whatman e filtro de fibra de vidro Whatman. O extrato foi armazenado em frasco âmbar e armazenado a -18°C até a realização das análises. No momento das análises, as amostras filtradas em membrana Millex PFTE (politetrafluoroetileno; Milipore, USA) de 0,45µm e levadas ao injetor do cromatógrafo.

### **2.6.2 Metodologia de Análise**

Foi utilizado um sistema Acquity UPLC (Waters<sup>®</sup>, EUA), com Detector de Arranjo de Diodos com comprimento de onda em 320 nm no canal 1 (detecção do Ácido Caféico) e 275nm no canal 2 (detecção de Cafeína, Teobromina, Catequina e Epicatequina). O sistema é composto de amostrador automático com temperatura controlada em 10°C, bomba binária, forno com temperatura controlada em 40°C e sistema de degaseificação *on line*. Foi utilizada uma coluna Waters<sup>®</sup> BEH de 10cm com poro de 1,7µm. A fase móvel foi composta de uma solução de metanol : acetonitrila (2 : 4 v/v) (A), e água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (B), numa proporção de 20% da solução A e 80% da solução B, isocrática, com volume de injeção de 3µL e fluxo de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de corrida foi de 4,5 minutos e o tempo de limpeza da coluna entre amostras foi de 2 minutos.

### **2.7 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica 8.0 (STATOSOFT<sup>®</sup>, USA, 2007). Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), para comparação entre as médias. Análise de componentes principais (PCA) foi realizado para descrever a variabilidade dos resultados encontrados em relação aos clones estudados utilizando o software Unscrambler (versão 9.7, CAMO, Trondheim, Noruega). Os gráficos foram plotados

utilizando o software Origin 8 (versão 8, OriginLab Corporation, Massachusetts, USA).

### 3. Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta os resultados das análises realizadas nas amostras, bem como limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e teste de recuperação dos métodos utilizados. As curvas de calibração de sete pontos foram lineares no intervalo de concentração de 0,6 a 70 mg.L<sup>-1</sup> para ácido cafeico, 5,7 a 680 mg.L<sup>-1</sup> para cafeína, 20 a 2400 mg.L<sup>-1</sup> para teobromina, 3 a 360 mg.L<sup>-1</sup> para catequina e 5,7 a 680 mg.L<sup>-1</sup> para epicatequina.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de todos os compostos analisados foi maior de que 0,99. Os valores de recuperação médio foram de 99,1% para Ácido cafeico, 98,7% para cafeína, 99,1% para teobromina, 94,8% para catequina e 96,7% para epicatequina.

Tabela 1: Teor de compostos bioativos em diferentes clones de cacau. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa para teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Clones	C. Fenólicos (mg.100g <sup>-1</sup> )	Flavonóides (mg.100g <sup>-1</sup> )	Antocianinas (μg.g <sup>-1</sup> )	Ác. Cafêico (μg.g <sup>-1</sup> )	Cafeína (μg.g <sup>-1</sup> )	Teobromina (μg.g <sup>-1</sup> )	Catequina (μg.g <sup>-1</sup> )	Epicatequina (μg.g <sup>-1</sup> )
TSH 1188	152,78±1,90 <sup>c</sup>	69,74±1,54 <sup>b</sup>	764,86±10,85 <sup>g</sup>	3,77±0,19 <sup>f</sup>	83,29±3,05 <sup>a</sup>	1379,12±13,55 <sup>a,b</sup>	112,03±7,18 <sup>b,c</sup>	87,13±3,93 <sup>a,b</sup>
TSH 516	201,08±2,76 <sup>g</sup>	130,85±2,69 <sup>e</sup>	703,61±5,19 <sup>f</sup>	3,13±0,13 <sup>e</sup>	92,14±10,60 <sup>a</sup>	1573,54±22,65 <sup>e,d,e</sup>	147,93±6,79 <sup>c</sup>	370,46±8,48 <sup>c</sup>
CC*	106,42±1,72 <sup>a</sup>	40,94±1,44 <sup>a</sup>	801,39±3,00 <sup>h</sup>	1,81±0,07 <sup>b,c</sup>	139,61±4,59 <sup>b,c</sup>	1591,13±10,18 <sup>d,e</sup>	52,70±8,97 <sup>a</sup>	65,44±6,82 <sup>a</sup>
CCN 51	254,87±3,54 <sup>h</sup>	176,69±3,04 <sup>f</sup>	653,01±9,43 <sup>e</sup>	2,51±0,11 <sup>d</sup>	192,93±6,39 <sup>d,e</sup>	1741,39±6,89 <sup>f,g</sup>	260,76±6,67 <sup>d</sup>	464,47±26,86 <sup>d,e</sup>
SRN*	342,39±4,83 <sup>k</sup>	234,07±4,28 <sup>i</sup>	888,97±7,72 <sup>i</sup>	2,25±0,16 <sup>c,d</sup>	229,09±13,74 <sup>e,g</sup>	1450,72±20,20 <sup>b,c</sup>	303,15±17,92 <sup>e,f</sup>	552,20±21,31 <sup>f</sup>
VB 1151	296,37±3,34 <sup>i</sup>	182,42±5,05 <sup>f,g</sup>	953,71±1,96 <sup>j</sup>	2,50±0,23 <sup>d</sup>	157,36±4,92 <sup>c</sup>	1652,72±30,26 <sup>e,f</sup>	241,81±11,51 <sup>d</sup>	415,81±10,88 <sup>c,d</sup>
BN 34	191,60±3,81 <sup>f</sup>	108,57±2,28 <sup>d</sup>	181,26±4,02 <sup>d</sup>	1,68±0,16 <sup>a,b</sup>	188,05±16,00 <sup>d</sup>	1476,01±9,49 <sup>b,c,d</sup>	120,09±8,70 <sup>b,c</sup>	129,97±2,24 <sup>b</sup>
CEPC 2002	168,55±2,06 <sup>e</sup>	100,54±1,89 <sup>d</sup>	124,72±5,27 <sup>c</sup>	1,31±0,24 <sup>a</sup>	99,54±7,34 <sup>a</sup>	1391,42±20,68 <sup>a,b</sup>	108,42±17,92 <sup>b</sup>	114,05±17,31 <sup>a,b</sup>
PH 16	324,41±2,28 <sup>j</sup>	189,80±5,28 <sup>g,h</sup>	94,93±6,52 <sup>b</sup>	3,23±0,28 <sup>e</sup>	244,30±5,78 <sup>g</sup>	1807,23±86,06 <sup>g</sup>	336,35±37,20 <sup>f</sup>	525,40±68,10 <sup>e,f</sup>
PP*	159,76±0,91 <sup>d</sup>	80,14±1,45 <sup>c</sup>	159,37±4,35 <sup>d</sup>	1,73±0,13 <sup>a,b</sup>	131,56±9,28 <sup>b</sup>	1269,70±59,28 <sup>a</sup>	64,20±11,39 <sup>a</sup>	91,97±18,55 <sup>a,b</sup>
SR 162	132,74±1,63 <sup>b</sup>	64,20±2,47 <sup>b</sup>	58,98±5,37 <sup>a</sup>	2,12±0,11 <sup>b,c,d</sup>	216,50±16,62 <sup>e,f</sup>	1562,07±26,95 <sup>e,d,e</sup>	55,83±5,07 <sup>a</sup>	77,81±12,94 <sup>a,b</sup>
PH 16**	301,27±1,31 <sup>i</sup>	193,67±5,98 <sup>h</sup>	181,45±27,00 <sup>d</sup>	2,55±0,19 <sup>d</sup>	216,90±8,21 <sup>e,f</sup>	1864,19±132,39 <sup>g</sup>	274,75±20,03 <sup>d,e</sup>	421,01±21,78 <sup>c,d</sup>
Limite de detecção (LOD)				0,2	0,5	2,0	1,0	2,0
Limite de quantificação (LOQ)				0,6	5,0	5,0	3,0	5,0
Recuperação (%)				99,1	98,7	99,1	94,8	96,7

\*CC = Cacau comum; SRN = Scravine; PP = Pará-parazinho.

\*\*Amostra mono-varietal denominada “cacau fino”.

Os cromatogramas mostraram uma boa resolução para os analitos estudados e sem a presença de picos de interferência. Os tempos de retenção para os analitos nas amostras foram semelhantes aos picos das soluções padrão (Fig. 3). A identificação dos analitos de interesse se deu por análise do tempo de retenção, comparação com os respectivos padrões e análise dos espectros.

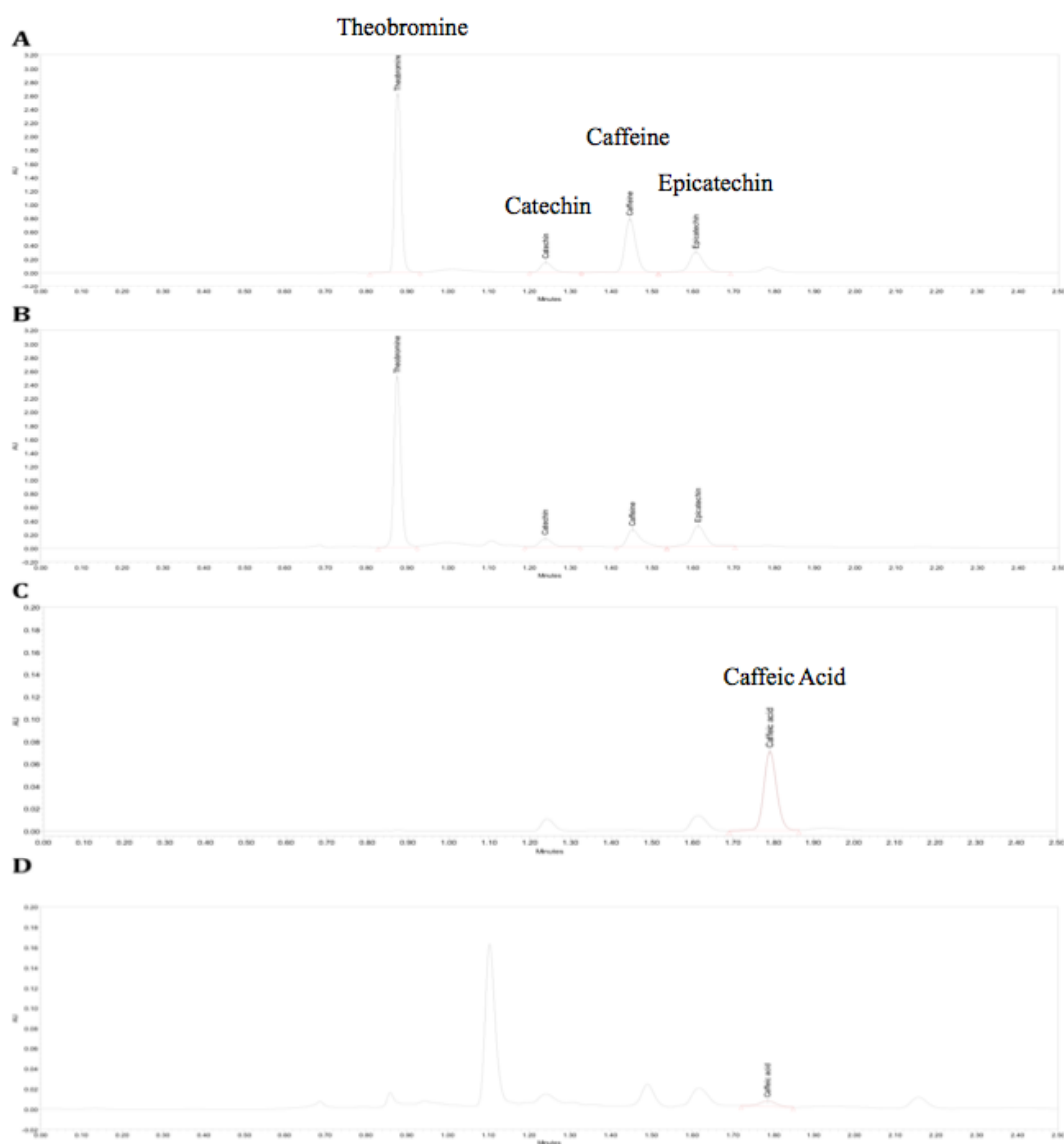


Fig. 3 – Perfil cromatográfico de teobromina, catequina, cafeína e epicatequina (A – solução padrão; B – amostra) e ácido cafeico (C – solução padrão; D – amostra) em cacau.

O teor de compostos fenólicos totais variou de 106,42 a 342,39 mg.100g<sup>-1</sup>, para os clones CC e SRN respectivamente. Todos os clones apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). O clone SRN também apresentou o maior valor para flavonoides (234,07 mg.100g<sup>-1</sup>), e o clone CC apresentou 40,94 mg.100g<sup>-1</sup> de flavonoides, o menor valor entre os clones. Todos os doze clones estudados apresentaram a mesma tendência, com relação proporcional entre compostos fenólicos totais e flavonoides.

Oliveira *et al.* (2011), encontraram valores que variaram de 155,25 a 301,43 mg.100g<sup>-1</sup> de compostos fenólicos totais e de 100,70 a 214,03 mg.100g<sup>-1</sup> de flavonoides em amêndoas cacau. Ortega *et al.*, (2008) em estudo com a caracterização de compostos fenólicos em diferentes amostras de cacau encontrou valor de 163,5 mg.100g<sup>-1</sup> valores próximos aos encontrados neste trabalho. NIEMENAK *et al.* (2006), encontrou valores de compostos fenólicos totais que variaram de 103,00 a 143,60 mg.100g<sup>-1</sup> em cinco clones de cacau fermentado.

Os valores de antocianinas variaram de 58,98 a 953,71 µg.g<sup>-1</sup>, nos clones SR 162 e VB 1151 respectivamente. Os clones BN 34, PH 16 e PP não diferiram estatisticamente, assim como os clones SRN e VC 1151. NIEMENAK *et al.* (2006), avaliaram o teor de antocianinas de cinco clones de cacau de Camarões, encontrando níveis que variaram entre 79 e 2817 µg.g<sup>-1</sup>.

Os teores de ácido cafeico variaram de 1,31 a 3,77 µg.g<sup>-1</sup>. O clone que apresentou o maior teor deste ácido fenólico foi o TSH 1188. Belščak *et al.* (2009), analisaram amostras de cacau em pó da Croácia e encontraram quantidades de ácido cafeico semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Onze dos doze clones analisados apresentaram teores de epicatequina superiores aos de catequina. De acordo com os resultados de alguns estudos, as catequinas possuem teores menores do que os teores de epicatequinas em amêndoas de cacau (CRUZ, 2012; KEEN, 2001; KWIK-URIBE, 2005)

Os clones PH 16 e SRN apresentaram os maiores teores de catequina e epicatequina. O clone PH 16 contém 336,35 µg.g<sup>-1</sup> de catequina e 525,40 µg.g<sup>-1</sup> de epicatequina e o clone SRN apresentou 303,15 µg.g<sup>-1</sup> e 552,20 µg.g<sup>-1</sup> de catequina e epicatequina, respectivamente. Esses dois clones não apresentaram diferença significativa para esses flavonoides. O clone CC (cacau comum) apresentou os menores teores de catequina (52,70 µg.g<sup>-1</sup>) e epicatequina (65,44 µg.g<sup>-1</sup>). Os clones

PH 16\*\*, CCN 51 e VB 1151 apresentarem teores de catequina de 274,75, 260,76 e 241,81  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente.

A epicatequina é o principal flavonoide monomérico do cacau e é considerada a responsável pelos benefícios à saúde (AMORES; JIMÉNEZ, 2007; ARAUJO *et al.*, 2013; WOLLGAST; ANKLAN, 2000b). Estudos têm mostrado que procianidinas, catequinas e epicatequinas são absorvidas no intestino de animais e humanos, sendo a epicatequina a mais biodisponível (KEEN, 2001). Os clones CCN 51 (464,47  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), PH 16\*\* (421,01  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), VB 1151 (415,81  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e TSH 516 (370,46  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) apresentaram maiores teores de epicatequina.

Em trabalho realizado com pó de cacau na Croácia foram encontrados 380  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de epicatequina e 40,00  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de catequina (BELŠČAK, 2009). NIEMENAK *et al.* (2006), encontram teores de catequina e de epicatequina em cacau fresco de Camarões, que variaram entre 125 e 1442  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e 14435 e 43903  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Esses teores diminuem drasticamente durante o processo de fermentação e secagem das amêndoas.

Os teores de cafeína variaram de 83,29 a 244,30  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  nos clones TSH 1188 e PH 16 respectivamente. Os clones TSH 1188, TSH 516 e CEPC 2002 apresentaram os menores teores de cafeína e os clones PH 16 e SRN apresentaram os maiores valores, não apresentando diferença significativa ( $p < 0,005$ ). Quatro clones apresentaram valores superiores a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

O clone que apresentou maior teor de teobromina foi o PH 16\*\* (mono varietal destinado a produção de “cacau fino”) com 1864,19  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , seguido pelos clones PH 16 (1807,23  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e CCN 51 (1741,39  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Os clones PP, TSH 1188 e CEPC 2002 apresentaram os menores valores de teobromina, 1269,70, 1379,12 e 1391,42 respectivamente.

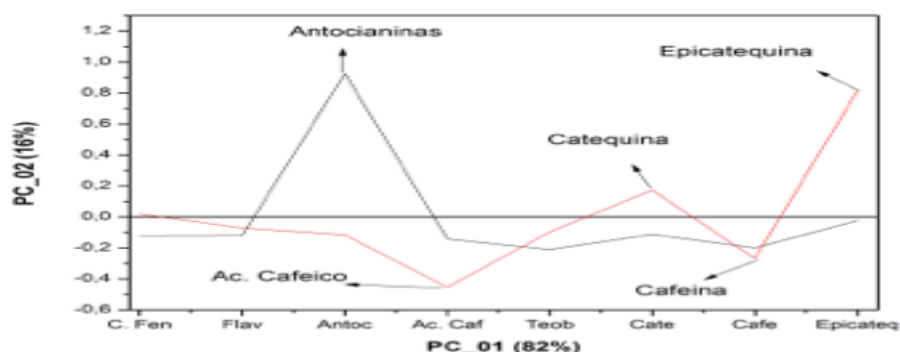
Foi realizada a análise de PCA sobre os dados de todos os clones estudados. O loading (Fig. 4 A) apresenta os compostos que mais contribuíram para a variabilidade dos clones analisados por ordem de importância. As antocianinas foi o composto que mais contribuiu, seguida da catequina e epicatequina.

Os dois primeiros componentes principais representam 98% da variabilidade total o teor de antocianinas é a característica dominante do primeiro componente principal (82% da variabilidade) e o teor de epicatequina e catequina tiveram maior contribuição no segundo componente principal (16% da variabilidade). Os resultados estão apresentados em Loadings e PCA para cada composto bioativo na figura 4.

A figura 5 representa a variabilidade dos doze clones de cacau estudados em relação ao seu conteúdo de compostos bioativos. As amostras apresentaram-se com agrupamento bem definido. Os clones CEPC 2002, BN 34 e PP apresentaram uma maior semelhança em relação aos compostos avaliados. Isso demonstra que cada clone tem uma identidade própria em relação à sua composição em termos dos compostos avaliados.

NIEMENAK *et al.* (2006), encontraram resultados semelhantes num estudo realizado com diferentes clones de cacau em Camarões. Os resultados de PCA deste trabalho classificou os diferentes clones de acordo com seus teores de antocianinas e compostos fenólicos.

**A**



**B**

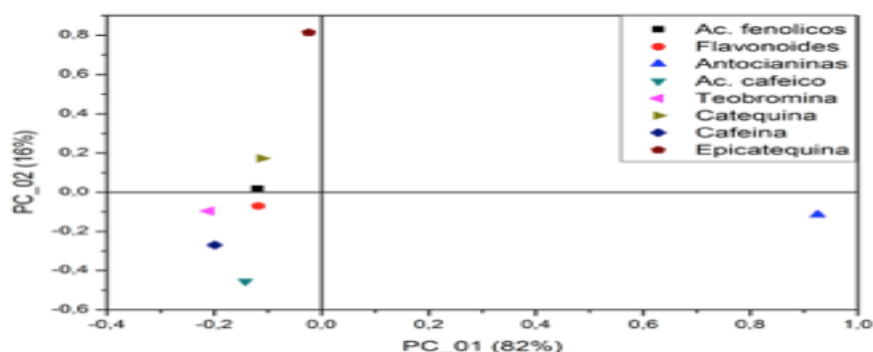


Fig. 4 - Loading (A) e PCA (B) realizado para cada composto bioativo.

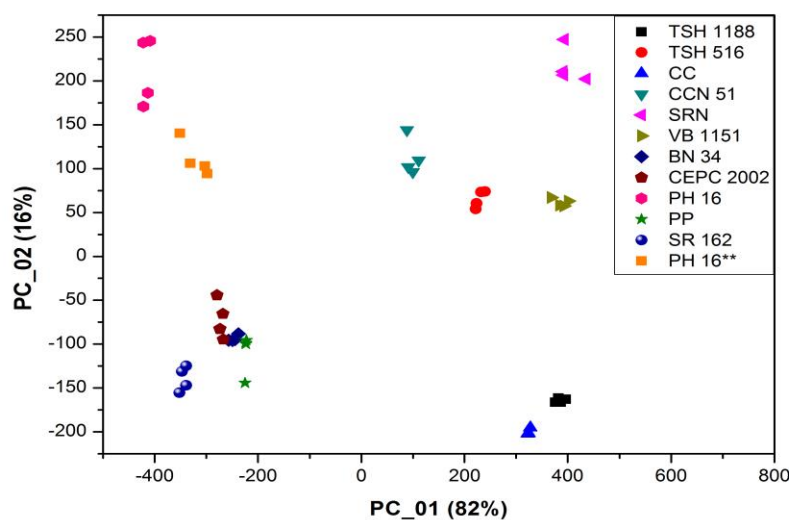


Fig. 5 – PCA dos diferentes clones de cacau.

Existem vários fatores internos e externos que afetam a qualidade e quantidade de compostos bioativos em plantas. As diferenças registradas poderiam ser explicadas, pelo menos em parte, pela interação de vários fatores genéticos, fisiológicos, agrônômicos, e fatores ambientais que modificam a concentração final destes compostos em cada clone.

#### 4. Conclusão

Constatou-se que há uma variabilidade entre os clones analisados em relação aos seus teores de compostos bioativos. O clone SRN apresentou os maiores valores para compostos fenólicos, flavonoides, cafeína, catequina e epicatequina. O clone CC apresentou os menores valores de compostos fenólicos, flavonoides, catequina e epicatequina. O clone PH 16\*\*, destinado à produção de “chocolate fino” apresentou o maior valor de teobromina entre as amostras analisadas.

As análises de PCA demonstraram que todos os clones apresentam características próprias referentes à sua composição em compostos bioativos, classificando cada clone de forma bem definida.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), uma iniciativa estratégica de investigação no âmbito do Ministério da Educação do Brasil, número do projeto 23038,019085 / 2009-14. Professora Elisa Yoko Hirooka é pesquisadora CNPq.

## Referências

AFOAKWA, E. O. (2010). *Chocolate Science and Technology*. England: **Wiley-Blackwell**, 234 p.

AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. (2007). Aspectos de la calidad de cacao. 2007, Quevedo, Equador: **INIAP** (Estación Experimental Tropical Pichilingue), p.1–3.

AMORES, F. (2009). Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor oriente de la provincia de esmeraldas. Quevedo, Los Ríos, Equador: INIAP, p. 120 (**Boletín Técnico**, 135).

ARAUJO, Q. R. et al. Cacao and Human Health: from Head to Foot - A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 24 ago. 2013.

BELŠČAK, A., KOMES, D., HORZIC, D., GANIC, K. G., KARLOVIC, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. **Food Research International**, v. 42, p. 707–716.

BRUINSMA, K.K. & TAREN, D.L. (1999). Chocolate: Food or Drug? **Journal of the American Dietetic Association**, n. 99, p. 1249-1256.

CRUZ, A. P. G. (2008). Avaliação da influência da extração e microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Rio de Janeiro) UFRJ/ IQ.

CRUZ, J. F. M. (2012). Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. Dissertação (Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA, 101p.

DING, E. L., HUTFLESS, S. M., DING, X., GIROTRA, S. (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. **Nutrition and Metabolism**. v. 3, p. 2.

ENGLER, M. B., ENGLER, M. M., CHEN, C. Y., MALLOY, M. J., BROWNE, A., CHIU, E. Y., KWAK, H. K., MILBURY, P., PAUL, S. M., BLUMBERG, J., MIETUS-SNYDER, M. L. (2004). Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. **Journal of American College of Nutrition**. v. 3, p. 197– 204.

GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S.; CAVRINI, V. (2006). Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin- modified micellareleetrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1112, p. 345-352.

IMEH, U.; KHOKHAR, S. (2002) Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6301–6306.

International Cocoa Organization (ICCO) Annual Report 2012/2013; **International Cocoa Organization** (ICCO): London, 13.

IBGE (2014) – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Available in: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201309.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf) . Accessed August 15, 2015.

KEEN, C. L. (2001) Chocolate: food as medicine/medicine as food. **Journal of American College of Nutrition**, v. 20, p.436S-439S.

KWIK-URIBE, C. Potential health benefits of cocoa flavanols. **The Manufacturing Confectioner**, v. 85, n. 10, p. 43–49 , 2005.

LEE, K.W., KIM, Y.J., LEE, H.J., LEE, C.Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Highest Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 7292-7295.

MACIEL, L. F., OLIVEIRA, C. S., BISPO, E. S., MIRANDA, M. S. (2011). Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from biodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. **British Food Journal**, v. 113, p.1103 – 1113.

MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROSTAD, R.E. (2002) Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 519-525.

NIEMENAK, N., ROHSIUS, C., ELWERS, S., NDOUMOU, D. O., LIEBEREI, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of American College of Nutrition**. v. 19, p. 612–619.

OLIVEIRA, C. S., MACIEL, L. F., MIRANDA, M. S., BISPO, E. S. (2011). Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, v. p.1094 – 1102.

ORTEGA, N., ROMERO, M.P., MACIA, A., REGUANT, J., ANGLÉS, N., MORELLO, J.R. AND MORTILVA, M.J. (2008), “Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources”, **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 56, p. 9621-7.

PEREIRA, A. B. (2001). Melhoramento clonal. In: DIAS, L.A.S. Melhoramento genético do cacauzeiro. Viçosa: **Folha de Viçosa**. p. 362-384.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. (2004). Química de Alimentos. 1º Ed. São Paulo: **Editora Edgard Blücher LTDA**, 184 p.

RIBEIRO, L. O., MENDES, M. F., PEREIRA, C. S. S. (2011). Avaliação da composição centesimal, mineral e teor de antocianinas da polpa de juçará (*Euterpe edulis Martius*). **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 4, p. 5-16.

SCARPARI, L. M.; MEINHARDT, L. W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A. W. V.; SCHIAVINATO, M. A.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. (2005). Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 865–877.

SCHROETER, H.; HEISS, C.; BALZER, J. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A)**, v. 103, p. 1024-1029.

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

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

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. (2000b). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, v. 33, p. 423-447.

## **Near infrared spectroscopy and pattern recognition methods for classification and compositional characterization of Brazilian cocoa clones.**

### **Abstract**

Effective and fast methods are important for distinguishing cocoa clones in the field and in the processing industry. This work proposes the application of NIR spectroscopy as a potential analytical method to classify different clones and predict the chemical composition of cocoa. Chemical composition analysis and colour features were determined by traditional methods and then related with the spectral information by partial least-squares (PLS) regression models, to characterize different sample clones. Several mathematical pre-treatments including first and second derivatives, standard normal variate (SNV) and multiplicative scatter correction (MSC) were applied to study the influence of spectral variations in predicting cocoa physical and chemical attributes. The results of chemical composition analyses and colourimetric measurements show significant differences between clones. NIR spectra of samples exhibited characteristic profiles for each clone and principal component analysis showed different clones in according to spectral features.

Keywords: chemical composition, principal component analyses, discrimination, process analytical technology.

## 1. Introduction

Cocoa is currently a valued product for chocolate processing, produced in several countries in Africa and America. Brazil is ranked sixth in world cocoa production, with cocoa beans being farmed in six main regions: Bahia (60,1% of national production), Pará (30,4%); Rondônia (5,8%), Espírito Santo (1,8%); Amazonas (1,7%) and Mato Grosso (0,2%) (IBGE, 2013). Cocoa farming has faced several challenges, including plant diseases that have harmed fruit production and quality control of cocoa beans. One of the most destructive diseases of cocoa is the fungus *Monilliophthora perniciosa*, which instigates the “witch’s broom disease”, causing ultimate plant damage. As an alternative to prevent this fungus occurrence, the use of resistant clones of high productivity has been developed by genetic breeding programs. However, these different clones present a wide range of diverse chemical composition, making it difficult for the processing industry to standardize parameters during processing (Leite *et al.*, 2013). A quick and comparatively accurate method is required to assess compositional information and differentiate cocoa beans from different clones for quality control and monitoring of post-harvest and processing activities.

Near-infrared spectroscopy (NIRS) is a very efficient technique for screening of agricultural and food products for their chemical characteristics. It is based on the vibrational properties of chemical bonds in organic molecules and their interactions with infrared radiation. The NIR spectrum is a fingerprint related to the chemical composition of the product (Cen & He, 2007; Pasquini, 2003). It is currently known to be an advanced analytical technique that has found its use for qualitative and quantitative analyses in food (Blanco & Villarroya, 2001; Roggo *et al.*, 2007). NIRS has been reported as fast and non-destructive method that requires minimal or no sample preparation for determination of major chemical compounds of food already used in various fields (Williams 2001; Christensen *et al.*, 2006), including cocoa characterization. For instance, it has been used to determine fat, nitrogen and moisture content of cocoa powder (Kaffka *et al.*, 1982), protein, fat, starch and proanthocyanidins in cocoa (Whitacre *et al.*, 2003), caffeine, theobromine and epicatechin in cocoa (Alvarez *et al.*, 2012) and sucrose in chocolate (Copikova *et al.*, 2003).

Multivariate statistical methods are usually required to analyze the large amount of data obtained by spectral analyses. As an unsupervised method, PCA

computes eigenvectors of the data covariance matrix and approximates the original data samples by linear combinations of the leading eigenvectors. In contrast, LDA (Linear Discriminant Analyses) takes the class labels into consideration and seeks a linear transformation that maximizes class separation in the reduced dimensional space (Yang & Wu, 2014). When additional reference information is available for comparison, partial least squares (PLS) and other regression models can be applied for prediction of reference measurements, using the spectral information as independent variables.

The current work proposes the application of NIR spectroscopy as an analytical method to classify different clones of cocoa beans and predict chemical and physical attributes of cocoa for both whole and ground samples. To our knowledge, no previous study was carried out for classification of cocoa samples into different clones using spectral information. Using the spectra as descriptors, PCA and LDA were applied in order to investigate possible differences among cocoa clones and establish classification models based on spectral information. PLS-R was applied to predict chemical composition and colour attributes from cocoa samples using spectral information as predictors. In addition, it was investigated the influence of spectral pre-processing methods to improve robustness of prediction models.

## **2. Material and Methods**

### ***2.1. Cocoa samples***

Five different clones of cocoa beans (PH16, SR162, CEPC-2002, Pará-Parazinho (PP) and BN-34) were used in the current study. All samples were obtained in the same region, under the same conditions and treatment from a farm in the city of Ibirataia, state of Bahia, Brazil. Cocoa fruits were broken and beans removed and kept for fermentation for five days. After this period cocoa beans were sun-dried for seven days. Samples were packed and taken to laboratory, stored at -18°C and protected from light until the time of analyzes. Before analyzed, samples were ground in a grain grinder and passed through stainless steel sieve of 20 mesh (850µm) for standardization of particle size for further analyses.

## **2.2. Spectral analyses**

Spectral analyses were performed with whole and ground samples. Spectral data were collected in reflectance mode and recorded as absorbance ( $\log 1/R$ ) using a XDS Near-Infrared model XM 1100 series – Rapid Content Analyser (Foss NIRSystems, Denmark) over the wavelength range of 400 to 2,498nm at 2nm intervals. Between samples, the sample cell analytical surface was brushed, washed with ethanol (70% v/v), rinsed with distilled water and dried using soft paper tissue. Spectra were acquired from whole samples and ground samples in order to establish the most adequate procedure for sample preparation. Whole samples were scanned in a grain sample cell. For ground samples, approximately 5g of ground cocoa samples were placed in an individual cell for solid samples (spinning cell) and compacted to eliminate air voids within the sample.

## **2.3. Chemical analysis**

The chemical parameters analyzed were protein, fat, moisture, ash and carbohydrates content. Protein was quantified based on total organic nitrogen of cocoa beans, determined by Kjeldahl procedure. Protein content of samples was calculated using 6.25 as the conversion factor (Protein = Nitrogen \* 6.25). Fat content was determined in a Soxhlet apparatus using petroleum ether as solvent of extraction. Moisture contents of the samples were determined by the gravimetric method after drying 2 g of sample at 105°C to constant weight in an air oven. Ash contents were determined by using a muffle furnace at 550°C for 12 h (AOAC, 1995). Total carbohydrates content was obtained by difference of components (100 - total grams of protein, lipids, moisture and ash). Final results were represented by the average of three replicates of each chemical constituent.

## **2.4. Colour measurement**

Colour determination was obtained as the average of four consecutive measurements at random locations of ground samples using a Minolta colourimeter (CM-2600d, D65 illuminant and 10° observer, Konica-Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) after calibration with a standard ceramic tile. Colour was expressed in terms of values for the parameters lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ), and yellowness ( $b^*$ ) using the Commission Internationale de l'Eclairage (CIE  $L^* a^* b^*$ ) colour system.

## **2.5. Statistical data analysis**

### **2.5.1. Chemical analysis**

Differences in protein, lipid, moisture, ash and carbohydrate content in beans from different cocoa clones were compared using analyses of variance (ANOVA), followed by the Tukey multiple-comparison test ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses were performed using Statistica software, Version 7.0 (Stat Soft, Inc., Tulsa).

### **2.5.2 Principal component analysis (PCA)**

PCA is an unsupervised pattern recognition method which is used for visualizing data trends in a dimensional space. It is a multivariate statistical analysis commonly applied to complex co-linear datasets, reducing the original set of predictors to a reduced number of ‘factors’ without neglecting functional information. PCA operates by condensing the most relevant information influencing the original data matrix into a new set of orthogonal variables called principal components (Luna et al., 2013). The matrix expression of the PCA model for the spectral data is:

$$A = SV + E \quad (1)$$

where  $A$  is the matrix of spectral data acquired from studied samples ( $n \times w$ );  $S$  is the score matrix ( $n \times p$ );  $V$  is the eigenvector matrix ( $p \times w$ );  $E$  is a residual matrix ( $n \times w$ );  $n$  is the number of samples;  $w$  is the number of wavelengths and  $p$  is the number of principal components (Park, 2001). PCA is often applied to the spectral data as an investigative instrument of data arrangement. Scores and loadings from PCA provide useful discernments about the most influencing features in the original dataset. In this study, PCA was carried out with the purpose to scrutinize the major influence of the different factors of cocoa clones in the spectral information.

### **2.5.3. Linear discriminant analyses (LDA)**

Linear discriminant analysis (LDA) is a linear and parametric technique often used as supervised pattern recognition method. LDA is applied for sample classification, in order to find discrimination functions which exposes the ratio between class variance and downgrades the ratio of within-class variance (Chen, Wan & Zhao, 2011). Due to the large amount of prediction variables (wavelengths) in the NIR spectral data set analyzed in the current work, it is necessary to select a few wavelengths to reduce the high dimension of the variable collection. Hence, the most prominent wavelengths observed in the loadings of PCA analyses were selected to be

used as predictors for the LDA model.

#### ***2.5.4. Spectral pre-processing methods***

Sample physical characteristics and inconsistencies in instrument performance can create light scattering effects in NIR measurements, triggering spectral variations that are not associated to chemical related light absorption and affecting the reliability of multivariate calibration models. Light scattering effects can be eliminated or minimized by some mathematical treatments such as derivation, Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) (Geladi, MacDougall & Martens, 1985; Isaksson & Naes, 1988; Pizarro et al., 2004; Windig, Shaver & Bro, 2008; Fearn et al, 2009).

First and second derivatives are commonly used to eliminate baseline offset variations in the spectra. The slope becomes a constant term when first derivative is applied, while second derivative is effective for eliminating both baseline offset and slope, in addition to resolving overlapping peaks (Osborn, Fearn & Hindle, 1993; Nicolai et al., 2007). MSC and SNV provide comparable results on the scatter level of all spectra in a data set for multiplicative (slope) and additive (offset) effects. While SNV standardizes each spectrum using only the data from that particular spectrum, MSC uses the calculated mean spectrum of the whole data set (Barnes et al., 1989; Dhanoa et al., 1994; Martens & Naes, 1989). As the current investigation reports on a novel application for NIR spectroscopy, there is no standard procedure to decide on which spectral pre-processing approach best suits the given samples, and the only approach is trial and error. Hence, MSC, SNV, 1<sup>st</sup> derivative and 2<sup>nd</sup> derivative were investigated for correction of light scattering and other undesired effects in the spectral data acquired from whole beans and ground cocoa samples, while preserving chemical information. The influence of the described pre-processing methods was studied in the dataset composed by the average spectra extracted from each sample. Before applying first and second derivatives, each spectrum was smoothed by a 9 point Savitzky–Golay smoothing operation, performing a local polynomial regression. This step aimed at avoiding noise enhancement caused by derivatives transformation, while preserving features such as relative maxima, minima and width, which are usually ‘leveled’ by other averaging techniques. The prediction ability of regression models obtained after application of each pre-processing technique was compared to

the prediction model for sample composition using the raw spectra. This step aimed at establishing a procedure that would provide a systematic approach for further studies.

### **2.5.5. Prediction models**

Partial least squares regression (PLS-R) is a regression method specifically effective in spectral analysis where the number of independent variables (wavelengths) is highly correlated and much greater than the number of observations. PLS-R works similarly to PCA, by diminishing the original number of independent variables (predictors) to a new dataset based on small number of orthogonal factors called latent variables. A residual value is calculated for each spectrum representing the information not covered by the factors, in a resulting model that has the following form:

$$y = Xb + e \quad (2)$$

where  $y$  is the response matrix of independent reference measurements ( $N$  samples  $\times$  1),  $X$  is the predictors matrix ( $N$  samples  $\times$   $W$  wavelengths),  $b$  is the outcome matrix of regression coefficients by PLS analysis, and  $e$  is the matrix of residual information not included in the factors.

In the current study, PLS-R was applied to the centered spectral data sets (1050 bands) to calculate independent prediction models for each compositional feature analyzed. In order to investigate the influence of spectra pre-processing techniques, prediction results using raw spectra were compared with those resulting from the spectral data set after treatment with different pre-processing methods (SNV, MSC, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> derivatives, MSC combined with 1<sup>st</sup> derivative and MSC combined with 2<sup>nd</sup> derivative).

While insufficient number of latent variables provides substandard predictive ability of regression models, increasing the number of latent variables can induce the inclusion of noise or other undesired information to the prediction models, causing overfitting (Burger & Geladi, 2006; Faber & Rajkó, 2007). The optimal number of latent variables (LV) for prediction model was determined at the lowest value of predicted residual error sum of squares (PRESS). Full cross-validation (leave-one out) was used for validation of the regression models and protection against overoptimistic results. Performance of the regression models was evaluated using the coefficient of determination in calibration and cross-validation ( $R^2_C$  and  $R^2_{CV}$ ), root mean square error (RMSE), the root mean square error of cross-validation (RMSECV), and

number of LV (Skibsted et al., 2004). Additionally, other parameters evaluated were the ratio of performance deviation (RPD), i.e. the ratio of the standard deviation of the reference values (SD) to the RMSE; and the ratio of error range (RER), which represents the ratio of the range of the reference chemistry values to RMSE (Dagneu, Crowe & Schoneau, 2005; Perez-Marin et al., 2004; Williams, 2001; Barbin et al., 2012; Barbin et al., 2013). PLS regression was performed using multivariate analysis software (Unscrambler version 9.7, CAMO, Trondheim, Norway).

### **3. Results and discussion**

#### ***3.1. Cocoa chemical composition***

Chemical composition results and colour attributes of the different cocoa clones are shown in Table 1. Results have shown that cocoa bean composition varies according to each clone. For all cocoa clones fat was the major component (over 40g.100g<sup>-1</sup> for all clones), followed by carbohydrates and proteins. Moisture, protein, and fat contents show statistical differences for all clones, with values ranging from 6.56 g.100g<sup>-1</sup> to 10.28 g.100g<sup>-1</sup>, 12.43 g.100g<sup>-1</sup> to 15.52 g.100g<sup>-1</sup>, 41.38 to 48.85 g.100g<sup>-1</sup>, respectively. Cocoa clone SR 162 presented higher ash and moisture content in comparison to the other clones. It was not observed any significant difference ( $p < 0.05$ ) between clones PP and PH 16, as well as BN 34 and CEPC 2002 clones. Regarding total carbohydrates, PP and PH16 clones showed no statistical differences among them, while CEPC 2002, SR 162 and BN 34 clones were statistically different ( $p < 0.05$ ).

Colour of food products is an important attribute from the consumer point of view. In this study, ground cocoa beans were characterized by colour coordinates  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ . SR 162 clone showed the highest values for parameters  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ , which was characterized as a lighter sample due to the highest value for colour reflectance ( $L^*$ ). BN 34 sample showed the lowest values for  $L^*$  and  $b^*$ , which can characterize their cocoa beans as darker. Samples PP and PH 16 showed no significant differences for  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  parameters among them.

Table 1. Chemical composition (g.100g<sup>-1</sup>) and colour parameters for different clones of cocoa samples.

Cocoa clone	Moisture	Ash	Protein	Fat	Carbohydrates	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
BN 34	7.74±0.04 <sup>d</sup>	3.25±0.02 <sup>c</sup>	14.11±0.03 <sup>c</sup>	43.45±0.08 <sup>d</sup>	31.45±0.10 <sup>a</sup>	41.63±0.99 <sup>d</sup>	14.89±0.38 <sup>c</sup>	7.81±0.76 <sup>d</sup>
SR 162	10.28±0.04 <sup>a</sup>	4.13±0.03 <sup>a</sup>	14.29±0.06 <sup>b</sup>	41.38±0.09 <sup>c</sup>	29.92±0.13 <sup>b</sup>	47.68±1.22 <sup>a</sup>	16.91±0.41 <sup>a</sup>	15.35±1.02 <sup>a</sup>
CEPC 2002	8.88±0.06 <sup>b</sup>	3.25±0.02 <sup>c</sup>	13.38±0.04 <sup>d</sup>	46.42±0.05 <sup>c</sup>	28.07±0.11 <sup>c</sup>	45.19±0.66 <sup>b</sup>	15.79±0.35 <sup>b</sup>	11.90±0.54 <sup>b</sup>
PP	8.40±0.05 <sup>c</sup>	3.41±0.07 <sup>b</sup>	12.43±0.05 <sup>c</sup>	48.85±0.05 <sup>a</sup>	26.91±0.09 <sup>d</sup>	44.53±0.93 <sup>c</sup>	14.09±0.44 <sup>c</sup>	8.78±0.47 <sup>c</sup>
PH 16	6.56±0.04 <sup>c</sup>	3.41±0.03 <sup>b</sup>	15.52±0.06 <sup>a</sup>	47.86±0.04 <sup>b</sup>	26.65±0.06 <sup>d</sup>	44.00±1.21 <sup>c</sup>	14.49±0.68 <sup>c</sup>	8.49±0.93 <sup>c</sup>

\*Same letters indicate that there is no significant difference ( $p > 0.05$ ) among cocoa clones

### 3.2. Spectral information of cocoa samples

The average absorbance spectra obtained for whole and ground cocoa samples are presented in Figure 1a and 1b, respectively. Each spectrum represents the average for each cocoa clone. The different spectra showed similar patterns, but differed on the absorbance absolute values mainly in the range from 500 to 700 nm and from 1500 to 2500 nm. This implies that each cocoa clone have particular features that can be detected by spectral information. Absorption bands in the NIR region tend to be broad and generally overlap in various parts over the NIR spectra of biological samples due to its complex constitution, making the assignment of reflectance areas a difficult task (Murray & Williams, 2001). A few broad local absorption maxima are noticeable around 1190, 1460 and 1950 nm; absorption at these wavelengths correspond to O-H, C-H, N-H stretch first and second overtones and combination bands that could be attributed to water absorption and protein changes (Osborne & Fearn, 1986).

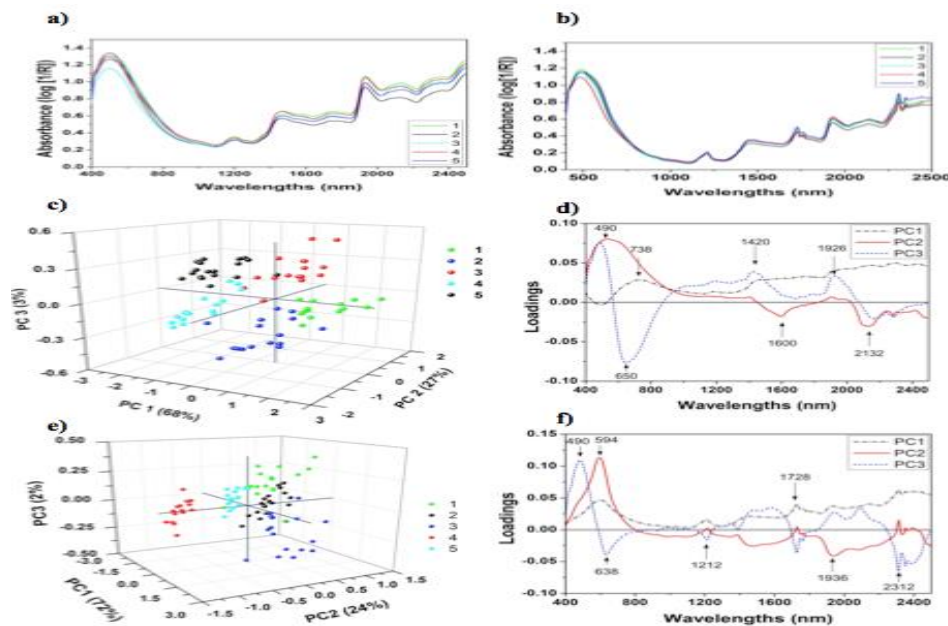


Fig. 1 – a) Average spectra of each cocoa clone (whole beans); b) Average spectra of each cocoa clone (ground beans) (1. PH 16, 2. PP, 3. SR 162, 4. CEPC 2002, 5. BN 34); c) Score plots for the first three PCS (whole samples); d) Loadings for the PCA carried out for the whole cocoa samples; e) Score plots for the first three PCS (ground samples); f) Loadings for the PCA carried out for the ground cocoa samples (1. PH16, 2. BN34, 3. SR162, 4. CEPC2002, 5. PP).

PP samples presented lower absorbance values in the region between 1600nm and 2500nm. This clone was the one with the highest fat content. According to Veselá *et al.* (2007), the most important bands related with fat content variation are located at 1744, 2322, 2334, and 2360nm. Moreover, PH 16 clone showed highest absorption and PP clone showed lower absorption in the range between 2000 and 2100 nm, and both clones presented highest and lowest protein contents, respectively. According to Veselá *et al.* (2007), the wavelength related to protein in cocoa powder is 2078 nm.

### ***3.3. Principal component analyses***

PCA tries to look for linear combinations of variables which best explain the data without taking into account any prior information about cocoa clones. PCA was carried out with a full (leave-one-out) cross-validation method on the spectral data to identify the qualitative discrimination in the spectra among samples. Results presented in Figure 1c, 1d, 1e and 1f showed that in general there was satisfactory discrimination between the five clones of cocoa investigated. The satisfactory group separation results obtained from PCA indicate that the data should provide enough information to develop classification models for cocoa clones (Reis, Franca & Oliveira, 2013).

For whole cocoa beans, the first three principal components were responsible for 68%, 27% and 3%, respectively, of the total variance among the whole cocoa samples. The scatter plot of the first three principal components shown in Figure 1e indicated that the five cocoa clones had different spectral patterns and can be distinguished into separate classes. Different classes of samples are subtly separated with five distinct groups, or clusters, observed in Figure 1c, meaning that the profiles of objects in the same cluster are very similar and the profiles of objects in different clusters are distinct.

The loadings resulting from PCA were used to identify most relevant wavelengths influencing cocoa samples (Figure 1d and Figure 1f). Some absorption maxima were observed in the region of 490 nm and 650 nm, associated to blue and red colours, respectively. Peaks of greater intensity in the NIR range were observed at 1420 nm, associated to the O-H first overtone, C-H stretching and deformation and N-H first overtone; 1600 nm, corresponding to O-H first overtone; 1926 nm (1920-1940, influenced by C=O second overtone, O-H stretching and deformation associated to water)

and 2132 nm (NH stretching and C=O stretching of amino acids) (Osborne & Fearn, 1986).

Regarding results of multivariate analyses for ground samples, the first three principal components were responsible for 72%, 24% and 2%, respectively; of the total spectral variance among the ground cocoa samples (Figure 1e and 1f).

Similar to the results obtained for whole grains, in Figure 1f it could be seen a high intensity peak of absorption in the visible range of 490 nm. In addition, bands around 1212 nm, 1728 nm and 2312 nm (C-H stretching 2<sup>nd</sup> overtone, 1<sup>st</sup> overtone and stretching and deformation associated to CH<sub>2</sub>) were observed, while the wavelength region of 1936 nm is associated to O-H stretching and deformation of water (Osborn & Fearn, 1986). Results from the principal components analysis indicate that the obtained spectra could provide enough information to develop classification models for cocoa clones.

### 3.4. Linear discriminant analyses

Selecting few wavelengths helps to reduce the data processing time by avoiding the collinearity of the original data. After identifying the optimal wavelengths presented in Figures 1d and 1f, spectral data was reduced to the most relevant wavelengths observed. LDA was employed in order to classify cocoa bean clones based on optimal bands selected from spectral information. Results obtained for LDA classification are presented in a confusion matrix (Table 2). For whole beans, LDA could discriminate all samples of five different clones with 100% accuracy.

Table 2. Confusion matrix for linear discriminant analyses of whole beans

Predicted clone	Actual clone				
	PH16	PP	CEPC 2002	SR 162	BN 34
PH16	14	0	0	0	0
PP	0	18	0	0	0
CEPC 2002	0	0	16	0	0
SR 162	0	0	0	16	0
BN 34	0	0	0	0	17
Total	14/14	18/18	16/16	16/16	17/17

### ***3.5. PLS regression models for predicting chemical composition and colour features***

The different clones of cocoa investigated provided a wide range of variation in analytical values to build a regression model for each chemical component. PLS-R is probably the least restrictive of the various extensions of the multiple linear regression (MLR) analysis, especially with a large number of predictors. The large number of pre-processing trials enabled to explore the performance of the PLS-R model for the given attributes. As shown in Table 3 and Table 4, the developed PLS regression models obtained for ground samples presented generally similar coefficients of determination ( $R^2$ ) compared to the models for whole samples. The developed PLS models for chemical composition of whole grain cocoa samples under cross validation had a reasonable accuracy with the coefficients of determination ( $R^2_{cv}$ ) of 0.93, 0.94, 0.91, 0.94 and 0.87 for protein, moisture, lipids, ash and carbohydrates, respectively.

All models obtained required 10 latent variables or less, which could possibly be an indication of good models without occurrence of overfitting or the presence of noise interfering in the model (Faber & Rajkó, 2007). Generally, including additional latent variables to the model reduced the values of RMSECV and PRESS to a position where these parameters either increased again or stabilised if more latent variables were added (Burger & Geladi, 2006).

Table 3. Comparison of prediction ability for spectral pre-processing methods applied to prediction models of chemical composition for whole cocoa beans.

Component	Pre-processing	LV	Calibration		Validation		RPD	RER
			RMSE	$R^2_c$	RMSE	$R^2_{CV}$		
Protein	NONE	8	0.18	0.97	0.27	0.93	3.83	11.99
	MSC	7	0.19	0.97	0.28	0.93	3.76	11.76
	SNV	9	0.14	0.98	0.24	0.95	4.35	13.61
	1 <sup>st</sup> derivative	7	0.13	0.99	0.18	0.97	5.95	18.64
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.14	0.98	0.21	0.96	4.90	15.34
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	6	0.15	0.98	0.22	0.95	4.65	14.56
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.19	0.97	0.26	0.94	4.01	12.57
Moisture	NONE	8	0.20	0.97	0.31	0.94	4.05	12.57
	MSC	7	0.19	0.98	0.31	0.95	4.14	12.85
	SNV	8	0.19	0.98	0.32	0.94	3.94	12.22
	1 <sup>st</sup> derivative	7	0.17	0.98	0.26	0.96	4.80	14.88
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.18	0.98	0.28	0.95	4.45	13.80
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	6	0.20	0.98	0.28	0.95	4.53	14.07
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.22	0.97	0.31	0.94	4.08	12.67
Lipids	NONE	7	0.58	0.96	0.90	0.91	3.20	8.67
	MSC	6	0.56	0.96	0.77	0.92	3.70	10.04
	SNV	6	0.56	0.96	0.80	0.93	3.58	9.70
	1 <sup>st</sup> derivative	7	0.42	0.98	0.67	0.95	4.26	11.54
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.48	0.97	0.74	0.93	3.89	10.55
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	6	0.48	0.97	0.73	0.94	3.94	10.67
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.56	0.96	0.72	0.94	3.98	10.80
Ash	NONE	6	0.07	0.96	0.08	0.94	4.05	11.58
	MSC	4	0.07	0.95	0.09	0.94	3.98	11.39
	SNV	4	0.07	0.95	0.08	0.94	4.07	11.65
	1 <sup>st</sup> derivative	4	0.06	0.96	0.08	0.94	4.10	11.74
	2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.06	0.97	0.08	0.94	4.08	11.68
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	4	0.06	0.96	0.08	0.95	4.49	12.85
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.05	0.97	0.08	0.94	4.24	12.13
Carbohydrates	NONE	8	0.49	0.93	0.69	0.87	2.67	7.35
	MSC	10	0.48	0.93	0.66	0.86	2.81	7.75
	SNV	7	0.48	0.93	0.67	0.87	2.74	7.56
	1 <sup>st</sup> derivative	8	0.36	0.96	0.59	0.90	3.13	8.62
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.40	0.95	0.59	0.90	3.11	8.58
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	6	0.43	0.94	0.59	0.91	3.16	8.71
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.40	0.95	0.57	0.91	3.24	8.94

Table 4. Comparison of prediction ability for spectral pre-processing methods applied to prediction models of chemical composition for ground cocoa beans.

Component	Pre-processing	LV	Calibration		Validation		RPD	RER
			RMSE	$R^2_c$	RMSE	$R^2_{cv}$		
Protein	NONE	10	0.21	0.96	0.32	0.91	3.17	10.05
	MSC	10	0.19	0.96	0.37	0.88	2.78	8.83
	SNV	6	0.36	0.87	0.46	0.81	2.25	7.12
	1 <sup>st</sup> derivative	8	0.18	0.97	0.30	0.91	3.40	10.79
	2 <sup>nd</sup> derivative	9	0.14	0.98	0.34	0.89	3.06	9.70
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	9	0.17	0.97	0.29	0.92	3.57	11.34
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	8	0.15	0.98	0.32	0.91	3.19	10.13
Moisture	NONE	8	0.21	0.97	0.29	0.95	4.34	13.33
	MSC	7	0.22	0.97	0.31	0.95	4.06	12.49
	SNV	9	0.17	0.98	0.28	0.95	4.47	13.74
	1 <sup>st</sup> derivative	5	0.22	0.97	0.27	0.95	4.63	14.22
	2 <sup>nd</sup> derivative	3	0.27	0.95	0.31	0.94	4.05	12.43
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	4	0.23	0.97	0.28	0.95	4.47	13.72
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	3	0.2907	0.95	0.33	0.94	3.82	11.74
Lipids	NONE	10	0.37	0.98	0.59	0.95	4.66	13.08
	MSC	9	0.38	0.98	0.56	0.96	4.95	13.89
	SNV	6	0.36	0.87	0.46	0.81	6.04	16.95
	1 <sup>st</sup> derivative	7	0.31	0.99	0.45	0.97	6.11	17.15
	2 <sup>nd</sup> derivative	8	0.25	0.99	0.51	0.96	5.41	15.18
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	7	0.35	0.98	0.53	0.97	5.22	14.66
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	7	0.27	0.99	0.50	0.97	5.48	15.38
Ash	NONE	4	0.08	0.94	0.10	0.92	3.48	10.20
	MSC	6	0.07	0.96	0.08	0.95	4.06	11.89
	SNV	5	0.07	0.95	0.09	0.93	3.65	10.70
	1 <sup>st</sup> derivative	6	0.06	0.96	0.08	0.94	4.10	12.03
	2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.06	0.96	0.08	0.95	4.24	12.41
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	5	0.07	0.95	0.09	0.92	3.66	10.71
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.05	0.97	0.07	0.95	4.44	13.01
Carbohydrates	NONE	10	0.29	0.98	0.43	0.95	4.32	11.97
	MSC	8	0.32	0.97	0.48	0.93	3.86	10.69
	SNV	9	0.29	0.97	0.43	0.94	4.25	11.77
	1 <sup>st</sup> derivative	7	0.28	0.98	0.39	0.96	4.66	12.91
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.33	0.97	0.44	0.95	4.18	11.58
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	7	0.28	0.98	0.39	0.96	4.78	13.24
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	7	0.22	0.99	0.40	0.95	2.86	7.93

PLS-R models were also developed on colour features ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), and the results are shown in Table 5. The difference between  $R^2_C$  and  $R^2_{CV}$  for the parameter ' $a^*$ ' could indicate the incidence of overfitting in the model. The coefficient of prediction values obtained for the calibration ( $R^2_C$ ) and full cross-validation ( $R^2_{CV}$ ) models were comparable in terms of prediction performance.

Table 5. Comparison of prediction ability for spectral pre-processing methods applied to prediction models of colour parameters for ground cocoa beans.

Attribute	Pre-processing	LV	Calibration		Validation		RPD	RER
			RMSE	$R^2_C$	RMSE	$R^2_{CV}$		
$L^*$	NONE	6	0.79	0.87	0.97	0.80	2.29	9.94
	MSC	5	0.90	0.83	1.12	0.76	1.98	8.63
	SNV	5	0.90	0.83	1.14	0.74	1.95	8.49
	1 <sup>st</sup> derivative	2	0.99	0.80	1.13	0.77	1.97	8.56
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.69	0.90	0.98	0.80	2.27	9.88
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	2	0.86	0.85	1.19	0.74	1.88	8.18
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.79	0.87	1.09	0.77	2.05	8.92
$a^*$	NONE	6	0.46	0.81	0.61	0.69	1.32	5.09
	MSC	6	0.46	0.81	0.60	0.70	1.79	6.92
	SNV	5	0.49	0.79	0.58	0.69	1.85	7.16
	1 <sup>st</sup> derivative	7	0.37	0.88	0.54	0.75	1.96	7.57
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.42	0.84	0.62	0.68	1.72	6.63
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	7	0.37	0.87	0.54	0.73	1.98	7.65
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.49	0.78	0.65	0.66	1.64	6.35
$b^*$	NONE	5	0.61	0.95	0.76	0.93	3.75	13.24
	MSC	4	0.69	0.94	0.85	0.91	3.32	11.74
	SNV	2	0.93	0.89	1.00	0.88	2.82	9.98
	1 <sup>st</sup> derivative	4	0.65	0.95	0.83	0.91	3.40	12.01
	2 <sup>nd</sup> derivative	6	0.56	0.96	0.76	0.93	3.72	13.16
	MSC + 1 <sup>st</sup> derivative	4	0.69	0.94	0.88	0.91	3.20	11.31
	MSC + 2 <sup>nd</sup> derivative	5	0.61	0.95	0.83	0.92	3.42	12.07

The undesirable influence of light scattering effects on the regression models was not confirmed, as results obtained show that regression models based on pre-processed spectra were similar to the models obtained for raw spectra. None of the spectral pre-treatment methods provided considerable improvement of the predictive ability compared to the original data. It can be assumed from these results that the applied pre-treatments were not effective for this particular dataset. Given that the complexity of the models was similar to that obtained with the original data; it is feasible to use the raw spectra to build prediction models for both whole beans and ground cocoa samples. In addition, results of RER and RPD indicated good predictability for all parameters tested using the spectral information as predictors. Values of RER in the range of 8–12 indicate the possibility of predicting quantitative data, while RER values above 12 represent models with good predictability ((Dagneu, Crowe & Schoneau, 2005). The RPD should ideally be at least three, although when the variance in the reference data is not large, the values for the  $R^2$  and the RPD are not very high ((Perez-Marín et al., 2004; Williams & Sobering, 1996). Protein and moisture content were the most accurately predicted parameters with RER values higher than 12. Moreover, it was not observed RPD values below 3 for any attribute except carbohydrates. It is suggested that prediction models with  $R^2$  values greater than 0.9, RPD greater than 3, and an RER greater than 10, would result in successful models obtained from samples with a complex composition ((Dagneu, Crowe & Schoneau, 2005).

The application of NIR spectroscopy could facilitate the development of a relatively simple and automatic method to sort cocoa beans according to different clones in addition to predict chemical composition and colour features of cocoa.

#### **4. Conclusion**

This work highlighted particular application of NIR spectroscopy for classification and differentiation of diverse cocoa clones, in addition to the determination of major chemical components in cocoa. Spectral information from cocoa had a reasonable accuracy in predicting major chemical components of cocoa such as protein, moisture, fat, ash and carbohydrates contents. Furthermore, near infrared spectroscopy

coupled with multivariate classification methods have proved to be a powerful tool for discriminating cocoa bean samples according to their clone.

NIR spectroscopic showed characteristic profiles for each clone and principal component analysis is able to separate the clones in defined groups. The linear discriminant analysis was applied and succeeded in separating the clones in cocoa beans at 100% using a few selected wavelengths. This procedure allows for the later introduction of cheaper multispectral NIR instruments for fast classification of cocoa.

The technique can be implemented as a key component of computer-integrated processing equipment, not only in post-harvest sorting but also in cocoa quality inspection, offering a number of potential advantages, including the elimination of subjective judgment and the creation of product data in a real time for classification, traceability, and labeling.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) strategic research initiative under the Brazilian Ministry of Education, project number 23038.019085/2009-14. Professor Elisa Yoko Hirooka is a CNPq research fellow.

### **References**

- Alvarez, C., Perez, E., Cros, E., Lares, M., Assemat, S., Boulanger, R. & F. Davrieux (2012). The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and (-)-epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of criollo cocoa. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, 20, 307–315.
- AOAC. Official Methods of Analysis (16th Ed.). (1995). Washington, DC: **Association of Official Analytical Chemists**.
- Barbin, D.F., ElMasry, G., Sun, D-W. & Allen, P. (2012). Predicting quality and sensory attributes of pork using near-infrared hyperspectral imaging. **Analytica Chimica Acta**, 719, 30-42.
- Barbin, D.F., ElMasry, G., Sun, D-W. & Allen, P. (2013). Non-destructive determination of chemical composition in whole and minced pork using near-infrared hyperspectral imaging. **Food Chemistry**, 138, 1162-1171.

Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. & Susan, J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. **Journal of Applied Spectroscopy**, 43 (5), 772–777.

Blanco, M. & Villarroya, I. (2001). NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**, 21, 240–250.

Burger, J. & Geladi, P. (2006). Hyperspectral NIR imaging for calibration and prediction: a comparison between image and spectrometer data for studying organic and biological samples. **Analyst**, 131, 1152–1160.

Cen, H.Y. & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science & Technology**, 18, 72–83.

Chen, Q., Cai, J., Wan, X. & Zhao, J. (2011). Application of linear/non-linear classification algorithms in discrimination of pork storage time using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. **Food Science and Technology**, 44, 2053–2058.

Copikova, J., Novotna, M., Smidova, I., Synytsya, A. & Cerna, M. (2003). Application of near infrared spectroscopy in chocolate analysis. **Chemické Listy**, 97, 571–575.

Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R. & Engelsen, S.B. (2006). Multivariate autofluorescence of whole food systems. **Chemical Reviews**, 106, 1979–1994.

Dagnew, M.D., Crowe, T.G. & Schoenau, J.J. (2004). Measurement of nutrients in Saskatchewan hog manures using near-infrared spectroscopy. **Canadian Biosystems Engineering**, 46, 33–37.

Dhanoa, M.S., Lister, S.J, Sanderson, R. & Barnes, R.J. (1994). The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, 2 (1), 43–47.

Faber, N.M. & Rajkó, R. (2007). How to avoid over-fitting in multivariate calibration - The conventional validation approach and an alternative. **Analytica Chimica Acta**, 595, 98–106.

Fearn, T., Riccioli, C., Garrido-Varo, A. & Guerrero-Ginel, J.E. (2009). On the geometry of SNV and MSC. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 96 (1), 22–26.

Geladi, P., MacDougall, D. & Martens, H. (1985). Linearization and Scatter-Correction for near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. **Applied Spectroscopy**, 39 (3), 491–500.

IBGE (2013) – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Available in: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201309.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf) . Accessed March 15, 2014.

Isaksson, T. & Naes, T. (1988). The Effect of Multiplicative Scatter-Correction and Linearity Improvement on NIR Spectroscopy. **Journal of Applied Spectroscopy**. 42 (7), 1273–1284.

Kaffka, K.J., Norris, K.H., Kulcsar, F. & Draskovits, I. (1982). Attempts to determine fat, protein and carbohydrate content in cocoa powder by the NIR technique.

**Acta Alimentaria**, 11, 271–288.

Leite, P.B, Maciel, L.F., Opretzka, L.C.F., Soares, S.E., Bispo, E.S. (2013). Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from "witch broom disease" resistant and non resistant cocoa cultivars. *Ciência e Agrotecnologia*, 37(3), 244-250.

Luna, A.S., Da Silva, A.P., Pinho, J.S.A., Ferré, J. & Boqué, R. (2013). Rapid characterization of transgenic and non-transgenic soybean oils by chemometric methods using NIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta A**, 100, 115–119.

Martens, H. & Naes, T. (1989) *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Murray, I. & Williams, P.C. (2001). Chemical principles of near-infrared technology. In: Williams, P. & Norris, K. (Eds.), *Near-infrared technology in the agricultural and food industries (second edition)*, St. Paul, Minn, **American Association of Cereal Chemists**.

Nicolai, B.M, Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I. & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, 46 (2), 99–118

Osborne, B.G. & Fearn, T (1986). *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. New York: **John Wiley**.

Osborne, B.G, Fearn, T. & Hindle, P.H. (1993). *Practical NIR Spectroscopy: With Applications in Food and Beverage Analysis*, **Longman Scientific & Technical, Harlow**, 227 pp.

Park, B., Chen, Y.R., Hruschka, W.R., Shackelford, S.D & Koohmaraie, M. (2001). Principal component regression of near-infrared reflectance spectra for beef tenderness prediction. *Transactions of the ASAE (American Society of Agricultural Engineers)*, 43 (3), 609-615.

Pasquini, C. (2003). Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14, 198–219.

Perez-Marín, D.C., Garrido-Varo, A., Guerrero-Ginel, J.E. & Gomez-Cabrera, A. (2004). Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the mandatory labelling of compound feeding stuffs: Chemical composition and open declaration. **Animal Feed Science and Technology**, 116, 333–349.

Pizarro, C., Esteban-Diez, I., Nistal, A.J. & Gonzalez-Saiz, J.M. (2004). Influence of data pre-processing on the quantitative determination of the ash content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, 509 (2.), 217–227.

Reis, N., Franca, A.S. & Oliveira, L. S. (2013). Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. **Food Science and Technology**, 50, 715-722.

Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A. & Jent, N.

(2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 44, 683–700.

Skibsted, E.T.S., Boelens, H.F.M., Westerhuis, J.A., Witte, D.T. & Smilde, A.K. (2004). New Indicator for Optimal Preprocessing and Wavelength Selection of Near-Infrared Spectra. **Journal of Applied Spectroscopy**, 58 (3), 264–271.

Veselá, A., Barros, A.S., Synytsya, A., Delgadillo, I., Copíková, J. & Coimbra, M. A. (2007). Infrared spectroscopy and outer product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. **Analytica Chimica Acta**, 601, 77-86.

Whitacre, E., Oliver, J., Van, D.B.R., Van, E.P., Kremers, B., Van, D.H.B., Stewart, M. & Jansen-Beuvink, A. (2003). Predictive analysis of cocoa procyanidins using near-infrared spectroscopy techniques. **Journal of Food Science**, 68, 2618-2622.

Williams, P.C. (2001). Implementation of near-infrared technology. In: Williams, P.C. & Norris, K. (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries* (second ed.). Minnesota, USA: **American Association of Cereal Chemists Inc.** St. Paul, pp. 145–169.

Williams, P.C. & Sobering, D. (1996). How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In: Davies, A. M. C. & Williams, P. C. (Eds.), *Near infrared spectroscopy: the future waves*. Chichester, West Sussex, UK: **NIR Publications**, pp. 185–188.

Windig, W., Shaver, J. & Bro, R. (2008). Loopy MSC: A Simple Way to Improve Multiplicative Scatter Correction. **Journal of Applied Spectroscopy**, 62 (10), 1153–1159.

Yang, W. & Wu, H. (2014). Regularized complete linear discriminant analysis. **Neurocomputing**. 137, 185–191.

## CONCLUSÃO GERAL

Com a caracterização dos diferentes clones de cacau, verificou-se que cada clone apresenta características próprias em relação a sua composição e perfil de compostos bioativos. Não foi possível estabelecer uma relação entre a contaminação por AFs e OTA com cada clone, porém verifica-se que determinados clones apresentam contaminação menor ou não apresentam contaminação. Esses clones devem continuar sendo monitoradas para estabelecer uma relação de resistência aos fungos produtores de micotoxinas.

Existe uma variação considerável entre os clones analisados em relação ao seus teores de compostos bioativos. O clone SRN apresentou os maiores valores para compostos fenólicos, flavonoides, cafeína, catequina e epicatequina. O clone CC apresentou os menores valores de compostos fenólicos, flavonoides, catequina e epicatequina. O clone PH 16\*\*, destinado à produção de “chocolate fino” apresentou o maior valor de teobromina entre as amostras analisadas. As análises de PCA demonstraram que todas os clones apresentam características próprias referentes à sua composição em compostos bioativos, classificando cada clone de forma bem definida.

Foi proposta a aplicação da espectroscopia NIR, como um método analítico potencial para classificar diferentes clones e prever a composição química de cacau. Os resultados das análises de composição química e as medições colorimétricas apresentaram diferenças significativas entre os clones. Os espectros NIR de amostras exibiram perfis característicos para cada clone e análise de componentes principais mostrou diferentes clones de acordo com características espectrais.