

AUTORES
AUTHORS

✉ **Priscilla EFRAIM**
Cereal Chocotec – ITAL
Av. Brasil, nº 2880, Jd. Chapadão
Campinas – SP. CEP 13070-178
E-mail: efrain@ital.sp.gov.br

Maria Luiza TUCCI
Instituto Agronômico – IAC
E-mail: tucci@iac.sp.gov.br

Nelson Horacio PEZO-GARCÍA
Departamento de Tecnologia de Alimentos - FEA – UNICAMP
E-mail: nelson@fea.unicamp.br

Renato HADDAD
Marcos N. EBERLIN
Laboratório Thomson de Espectrometria
de Massas – IQ – UNICAMP

RESUMO

Devido à importância conferida atualmente aos compostos fenólicos presentes em sementes de cacau por suas características benéficas à saúde, foram avaliados os teores de compostos fenólicos, proantocianidinas totais e flavanóis e procianidinas (monômeros a pentâmeros) em nove genótipos da coleção de germoplasma de cacau do Pólo Regional de Desenvolvimento Sustentável dos Agronegócios do Vale do Ribeira, em Parquera-Açu, SP. Foram analisados cotilédones de sementes não fermentadas dos genótipos SCA 12, IMC 67, UF 29, ICS 95, P7, IAC 1, UF 667, UF 668 e UF 613, por meio de espectrometria (espectrofotômetro Beckmann DU 70 e espectrômetro de massas Q-Trap com ionização por *electrospray*). Em geral, observou-se que o genótipo IMC 67 apresentou teores mais elevados de proantocianidinas totais e flavan-3-óis em relação aos demais genótipos avaliados. Os teores de compostos fenólicos totais de IMC 67 não diferiram significativamente de UF 29 e UF 667. Em relação a ICS 95, o genótipo IMC 67 apresentou teores 70% mais elevados de compostos fenólicos totais e entre 5 e 15% mais elevados que os demais genótipos. Para proantocianidinas totais, IMC 67 apresentou teor 65% mais elevado que ICS 95 e, entre 9 e 27% mais elevados que os demais genótipos. Observou-se que o teor de monômeros de flavanóis para todos os genótipos foi 78,6 a 99,8% maior em relação às procianidinas (flavanóis condensados). Constatou-se grande diferença entre os teores observados de dímeros e trímeros, sendo que os últimos foram 65 a 75% menores que os primeiros.

SUMMARY

Due to the importance currently conferred on the phenolic compounds present in cocoa seeds due to their characteristics of benefit to the health, the amounts of phenolic compounds, total proanthocyanidins and flavanols and procyanidins (monomers to pentamers) were evaluated in nine genotypes from the cocoa germoplasm collection of the *Pólo Regional de Desenvolvimento Sustentável dos Agronegócios do Vale do Ribeira*, in Parquera-Açu, SP, Brazil. The cotyledons of genotypes SCA 12, IMC 67, UF 29, ICS 95, P7, IAC 1, UF 667, UF 668 and UF 613 were analysed by spectrometry (spectrophotometer Beckman DU 70 and Q-Trap electrospray ionisation mass spectrometer). It was observed that the genotype IMC 67 presented higher amounts of total proanthocyanidins and flavanols and procyanidins than the other genotypes studied. The amount of total phenolic compounds in IMC 67 did not differ significantly from that in UF 29 or in UF 667. As compared to ICS 95, the IMC 67 genotype presented 70% more total phenolic compounds, and from 5 to 15% more when compared to the other genotypes. IMC 67 also presented 65% more total proanthocyanidins than ICS 95 and from 9 to 27% more than the other genotypes. It was observed that the amounts of flavan-3-ol monomers in the genotypes were 78.6 to 99.8% higher than the amounts of procyanidins (condensed flavan-3-ols). A large difference was also observed between the dimer and trimer contents, the latter being from 65 to 75% less than the former.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

Theobroma cacao; Genótipos de Cacau; Compostos Fenólicos; Flavonóides; Procianidinas.

Theobroma cacao; Cocoa Genotypes; Phenolic Compounds; Flavonoids, Procyanidins.

1. INTRODUÇÃO

A importância de compostos naturais com capacidade antioxidante para a medicina preventiva vem sendo amplamente reconhecida nos últimos anos. Acredita-se que alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, bem como diabetes e doenças reumáticas sejam causados ou acelerados por estresse oxidativo (WEISBURGER & WILLIAMS, 2000). Pesquisas têm demonstrado que a ingestão de certos compostos presentes nos alimentos tem grande importância na prevenção ou na diminuição do risco de se contrair essas doenças (ZUMBÉ, 1998; WOLLGAST & ANKLAM, 2000). Assim, o interesse por compostos naturais com propriedades antioxidantes, como os polifenóis, considerados por muito tempo como não nutritivos, vem aumentando.

Os polifenóis ou compostos fenólicos que ocorrem em frutas, hortaliças, nozes, sementes e flores, constituem um dos mais numerosos e largamente distribuídos grupos de compostos do reino vegetal (BRAVO, 1998). Podem ser divididos em pelo menos 10 diferentes classes, dependendo de sua estrutura básica, sendo os flavonóides uma das mais importantes. Essa classe pode ser dividida em 13 sub-classes com mais de 5000 compostos descritos. A Figura 1 apresenta a estrutura básica dos flavonóides, enquanto a Figura 2 mostra a estrutura de um flavanol, uma sub-classe dos flavonóides, na forma monomérica (flavan-3-ol) e a condensação de duas moléculas de flavan-3-óis, que resulta na formação de proantocianidinas. As proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros de alto peso molecular que têm como precursores unidades monoméricas de flavan-3-óis (catequinas e epicatequinas) em união com flavan-3,4-dióis ou leucoantocianidinas (EFRAIM, 2004). Quando as moléculas que se condensam são catequinas ou epicatequinas, as proantocianidinas são denominadas procianidinas (WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

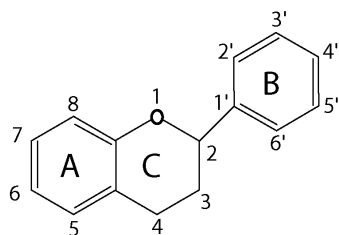
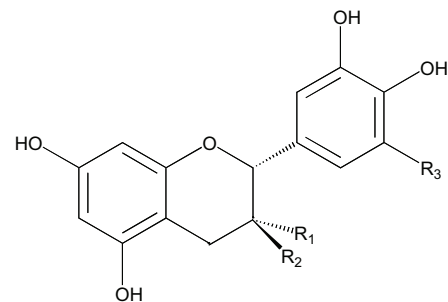


FIGURA 1. Estrutura básica de sistema numérico dos flavonóides (WOLLGAST *et al.*, 2001; PORTER, 1991).

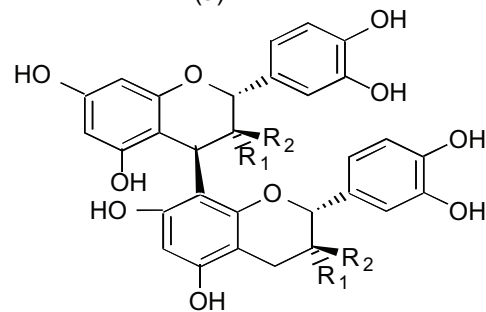
É conhecida importância dos compostos fenólicos para a sanidade dos vegetais. Com efeito, CAPRILES DE REYES *et al.* (1964) citados por NOJOSA *et al.* (2003), MEIFREIN & TANGUY (1967), DAGUENET & PARVAIS (1981) e mais recentemente OMOKOLO NDOUMOU *et al.* (1996) relacionaram teores altos de fenólicos à alta resistência dos vegetais a pragas e doenças.

A partir dos anos 90 do século passado, os flavonóides começaram a se tornar foco de múltiplas pesquisas pelos seus comprovados efeitos benéficos à saúde, devido à ação anticarcinogênica, anti-úlceras, anti-trombótica, anti-inflamatória, anti-alérgica, moduladora do sistema imunológico, anti-

microbiana, vasodilatadora e analgésica (WOLLGAST & ANKLAM, 2000).



(a)



(b)

FIGURA 2. Estrutura de um flavan-3-óis na forma monomérica (a) e a condensação de duas moléculas de flavan-3-óis originando uma proantocianidina (b) (WOLLGAST *et al.*, 2001).

Há várias décadas sabe-se que as sementes do cacauero (*Theobroma cacao* L.), apresentam elevado teor de polifenóis, entre 12 e 20% de seu peso seco e desengordurado, considerado bastante elevado em comparação a outros vegetais (SANCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003; BRITO, 2000; SANBONGI *et al.*, 1998; KIM & KEENEY, 1984). Segundo BRITO (2000), 60% desses compostos são procianidinas, na forma de flavan-3-óis condensados, contendo entre 2 e 18 moléculas de (+)-catequina ou (-)-epicatequina (HAMMERSTONE *et al.*, 1999). Segundo LANGE & FINCKE (1970) citados por WOLLGAST & ANKLAM (2000), cotilédones de sementes despigmentadas do cacauero (cotilédones brancos ou violáceo-claros) apresentam teor 33% mais baixo de compostos fenólicos em relação às sementes pigmentadas (coloração violácea intensa).

As procianidinas das sementes do cacauero têm sido bastante estudadas quanto aos efeitos benéficos que proporcionam à saúde, com destaque para a elevada atividade antioxidante, e por promoverem a diminuição da concentração das lipoproteínas de baixa densidade. Cabe ressaltar que as lipoproteínas de baixa e de muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente) estão relacionadas com a incidência de doenças cardiovasculares (STEINBERG *et al.*, 2003; KRIS-ETHERTON & MUSTAD, 1994). Estudos feitos *in vitro* e *in vivo* vêm comprovando que os flavonóides do cacauero são capazes de modular ou diminuir a ativação de plaquetas, auxiliando na manutenção da saúde cardiovascular. As procianidinas também são importantes ao sistema imunológico (STEINBERG *et al.*,

2003; WOLLGAST & ANKLAM, 2000; MAO *et al.*, 2000; REIN *et al.*, 2000 SANBONGI *et al.*, 1998).

Pesquisas relacionadas aos compostos fenólicos do cacau associando-os ao sabor amargo e à adstringência de chocolates produzidos com sementes pouco fermentadas têm sido realizadas desde a década de 30 do século passado até o presente (HALLAS & WIGHT, 1939 e DUTHIE, 1938 citado por ROHAN & CONNELL, 1964; FORSYTH *et al.*, 1958; ROAHN & CONNELL, 1964; CROSS *et al.*, 1982; VILLENEUVE, *et al.*, 1985; SHAUGHNESSY, 1992; BRITO, 2000; SOARES, 2001). Com efeito, estudos recentes buscando o aprimoramento do sabor do chocolate mediante a diminuição do amargor e adstringência tomaram como base a redução dos compostos fenólicos presentes nas sementes utilizando a enzima polifenoloxidase (PFO) ou o efeito térmico promovido por uma operação de autoclavagem (SOARES, 2001; BRITO *et al.*, 2002; YOSHIYAMA & ITO, 1996). Foi verificada diminuição de 15% e 24% do teor de fenóis totais em *nibs* de cacau (amêndoas de cacau fermentadas e secas submetidas ao processo de quebra e subsequente remoção da testa e gérmen) por meio de tratamento enzimático com a PFO em estudos feitos respectivamente por LIMA *et al.* (2001) citados por SOARES (2001) e YOSHIYAMA & ITO (1996). Com respeito à autoclavagem LIMA *et al.* (2001) citados por SOARES (2001) relataram diminuição de 24% do teor de fenóis totais em *nibs*.

Entretanto, a partir do fim dos anos noventa, com a descoberta das propriedades funcionais dos compostos fenólicos do cacau, o rumo das pesquisas está sendo direcionado também para a manutenção desses compostos no chocolate e produtos de cacau, sem que, no entanto, o sabor seja consideravelmente alterado (KEALEY *et al.*, 2004; KEALEY *et al.*, 1998; EFRAIM, 2004).

Devido às comprovadas implicações benéficas para a saúde humana, o interesse científico e comercial na determinação e quantificação, não apenas dos compostos fenólicos totais e dos flavanóis simples (epicatequina e catequina) como também das procianidinas encontradas em produtos de cacau e em outros alimentos vem aumentando (WOLLGAST & ANKLAM, 2001). Os flavanóis simples (catequina e epicatequina) de chocolates e outros produtos de cacau têm sido identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando colunas de Fase Reversa (CLAE - FR) e detectores UV ou de fluorescência (KIM & KEENEY, 1984; ARTS *et al.*, 1999). As procianidinas (dímeros a pentâmeros) foram identificadas por tiólise, também utilizando como ferramenta CLAE e Ressonância Magnética, através de técnicas bastante complexas e trabalhosas (PORTER *et al.*, 1991). Com os recentes avanços nas tecnologias de interface de ionização e ionização por *electrospray* (ESI), a utilização de espectrômetro de massa acoplado se tornou uma importante ferramenta na identificação de procianidinas (WOLLGAST & ANKLAM, 2001). A ionização por *electrospray* é feita de forma branda, produzindo apenas íons pseudomoleculares com praticamente nenhuma fragmentação que promova substancial modificação das moléculas. HAMMERSTONE *et al.* (1999) utilizaram com sucesso um espectrômetro de massas com analisador de quadrupolo e ionização por *electrospray* para detectar procianidinas em amêndoas de cacau e chocolate. Com essa técnica, os monômeros (catequinas e epicatequinas) e os oligômeros (procianidinas) foram identificados usando

a relação massa/carga (m/z) de seus íons pseudomoleculares carregados de forma simples ou múltipla em modo negativo (HAMMERSTONE *et al.*, 1999; WOLLGAST & ANKLAM, 2001).

O presente estudo objetivou a avaliação e a comparação dos teores de compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais, flavan-3-óis (unidades monoméricas) e procianidinas (unidades oligoméricas e poliméricas) de sementes de cacau de diferentes genótipos, usando a espectrometria.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As sementes estudadas foram provenientes de frutos de polinização aberta coletados na coleção de germoplasma de cacau do Pólo Regional de Desenvolvimento Sustentável dos Agronegócios do Vale do Ribeira, em Pariqueira-Açu, SP, a 24°43'S; 47°53'O; 25m de altitude, plantada em 1975, em espaçamento de 3,5 x 3m. Os genótipos estudados foram: IAC1 (seleção do Instituto Agrônomo (IAC) de uma progênie de polinização aberta de UF 667 (CORAL *et al.*, 1985); ICS 95 (Imperial College Selection, Trinidad); IMC 67 (coletado originalmente por F.J. Pound em 1938, em Iquitos, Peru); P7 (coletado originalmente por F.J. Pound in 1943, no rio Nanay, Peru); SCA 12 (coletado por Pound em 1937); UF 29, UF 613, UF 667 e UF 668 (seleções da United Fruit Co., Costa Rica).

2.2 Colheita dos frutos e preparo das amostras

Em novembro de 2002, foram colhidos aleatoriamente 3 frutos de cada genótipo, que foram quebrados após 48 horas. As sementes com a polpa mucilaginosas foram congeladas a -40°C logo em seguida e secas em liofilizador Boc Edwards modelo Super Modulayo RV12 até umidade próxima a 6,0%. Posteriormente foram removidos a polpa, a testa e o germe, e os cotilédones (material de interesse para as análises) foram moídos em moedor de laboratório com adição de nitrogênio gasoso de forma a evitar a oxidação dos compostos de interesse.

As amostras moídas foram desengorduradas com hexano na proporção de 1:5 (amostra:solvente) por cinco vezes.

2.3 Métodos

2.3.1 Determinação de fenóis totais

As determinações foram feitas de acordo com AMERINE & OUGH (s.d.) e EFRAIM (2004). Para a extração, foram pesados 100,0 mg de amostra desengordurada, em tubos de centrífuga aos quais acrescentaram-se 5 mL de solução de acetona 70%. Os tubos vedados foram agitados por 20 minutos a 4°C e centrifugados a 4200 g. Em balões volumétricos de 100 mL foram adicionados os seguintes reagentes na ordem indicada: 60 mL de água destilada; 0,5 mL do sobrenadante obtido

na extração da amostra; 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu marca Dinâmica e 15 mL de uma solução contendo 200 mL de carbonato de sódio, 1,2% de tartarato de sódio e 800 mL de água. O tartarato de sódio foi utilizado como catalisador da reação colorimétrica. Controlou-se o tempo para que a última solução (carbonato de sódio) fosse adicionada entre 30 segundos e 8 minutos desde a adição do reagente de Folin-Ciocalteu. Os balões foram deixados durante 30 minutos em temperatura ambiente antes da leitura, que foi feita em espectrofotômetro Beckmann, modelo DU70 a 765 nm. A curva padrão foi feita com ácido tânico da marca Sigma.

2.3.2 Proantocianidinas totais

As determinações foram feitas de acordo com PORTER (1989). Para a extração, 200,0 mg de amostra desengordurada foram misturados a 4 mL de solução de acetona 50% em tubos de centrífuga que foram vedados e agitados por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 4200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em balões volumétricos de 25 mL. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes, quando se adicionou metanol até completar o volume para 25 mL. A 1 mL do extrato, adicionaram-se 6 mL do reagente butanol (95 n-butanol: 5 HCl concentrado – v/v) e 0,2 mL do reagente FAS (solução 2% de sulfato férrico de amônio dodecahidratado em HCl 2M). A curva padrão foi feita utilizando-se taninos de uva.

2.3.3 Identificação e quantificação relativa dos flavan-3-óis (monômeros) e procianidinas (dímeros, trímeros, quadrâmeros e pentâmeros)

Para essa determinação, as amostras foram extraídas de acordo com o método empregado por HAMMERSTONE *et al.*, (1999) para sementes do cacaueiro. A extração do material foi feita com solução 70:30 de acetona:água por três vezes e depois com solução 70:30 de metanol:água por duas vezes, na proporção de 1:5 (amostra:solvente). Em cada aplicação de solvente, a amostra foi agitada por 5 minutos e o sobrenadante, filtrado em papel Whatman nº 1, foi recolhido em balões próprios para evaporador rotativo. Todo sobrenadante recolhido foi submetido à concentração em evaporador rotativo a vácuo a 60°C para retirada dos solventes orgânicos (acetona e metanol), evitando-se a degradação dos flavonóides.

Utilizou-se espectrômetro de massas Q-Trap com interface de ionização por *electrospray*, modo negativo, nas seguintes condições: 4,2 kV; pressão de nebulização 25 psig e temperatura do gás da cortina (nitrogênio) de 150°C. O solvente utilizado foi metanol:água (v/v, 1:1) e foram injetados 50 µL do extrato contendo os compostos de interesse em 1,0 mL de solvente. O tempo de aquisição dos espectros foi de 2 minutos (EFRAIM, 2004).

2.4 Análises Estatísticas

As determinações de polifenóis totais e proantocianidinas totais foram feitas em triplicata. As médias foram comparadas

pelo teste de Tukey a 5% de significância SAS® (1993). Foi feita a análise de correlação de Pearson entre os resultados obtidos (STEEL & TORRIE, 1980; STATGRAPHICS, 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos Fenólicos Totais e Proantocianidinas Totais

Foram observadas diferenças significativas entre genótipos tanto para fenólicos totais como para proantocianidinas totais (Tabela 1). O teor de compostos fenólicos totais variou de 6 a 21,5% do peso seco e desengordurado das sementes. As concentrações observadas variaram entre 60,0 mg/g para o genótipo ICS 95 e 215,5 mg/g para o genótipo IMC 67 (Tabela 1).

Os teores de compostos fenólicos totais encontrados para o genótipo IMC 67 foram semelhantes aos reportados por BRITO (2000) (231,00 mg/g), que trabalhou com uma mistura de genótipos também provenientes do Pólo Regional de Desenvolvimento Sustentável dos Agronegócios do Vale do Ribeira e por EFRAIM (2004) (238,45 mg/g), que trabalhou com uma mistura de genótipos do grupo *Forastero* colhidos em novembro de 2002 no município de Teixeira de Freitas (BA), além de terem sido bem mais altos que os teores de 121,08 mg/g verificados por MATTIETTO (2001), em sementes não fermentadas e liofilizadas de cacau provenientes de Tomé-Açu (PA). SOARES (2001) trabalhando com sementes de cacaueiro liofilizadas provenientes de vários genótipos da mesma coleção de Pariqueira-Açu (SP), reportou teor de 330 mg/g de fenóis totais, consideravelmente mais elevado que o maior valor encontrado nos genótipos estudados no presente trabalho. As diferenças encontradas nos valores reportados nos diversos estudos podem estar relacionadas a diversos fatores, entre os quais se destacam, além do material genético, as condições climáticas do local de cultivo, especialmente temperatura do ar e precipitação pluviométrica.

TABELA 1. Teor de compostos fenólicos totais e proantocianidinas totais e os respectivos desvios padrão nos cotilédones secos e desengordurados dos diferentes genótipos de cacaueiro estudados, ordenados alfabeticamente.

	Fenólicos Totais (mg/g)	Proantocianidinas Totais (mg/g)
IAC 1	195,40 ± 0,33 bc	12,39 ± 0,25 d
ICS 95	61,00 ± 0,83 d	5,93 ± 0,33 e
IMC 67	215,50 ± 7,66 a	17,05 ± 0,34 a
P 7	180,95 ± 1,96 c	12,49 ± 0,05 d
SCA 12	181,78 ± 6,87 c	14,05 ± 0,17 c
UF 29	204,02 ± 11,04 ab	14,88 ± 0,10 bc
UF 667	201,49 ± 7,06 ab	15,59 ± 0,14 b
UF 668	197,13 ± 2,50 bc	13,13 ± 0,47 d
UF 613	198,59 ± 1,10 bc	13,24 ± 0,22 d
MDS	17,97	0,88

M.D.S: Mínima diferença significativa

Valores de mesma coluna, com mesma letra, não diferem entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Os teores de proantocianidinas totais variaram significativamente entre os genótipos (Figura 1), estando entre 5,9 mg/g para ICS 95 e 15,6 mg/g para IMC 67. Não foram encontrados outros trabalhos com cacau na literatura consultada em que tenham sido utilizados os métodos empregados neste estudo. Os teores de proantocianidinas totais mostraram-se consideravelmente inferiores àqueles observados para os compostos fenólicos totais, mesmo considerando-se, que 60% dos compostos fenólicos presentes em sementes de cacaueiro correspondem às procianidinas. Isso pode ter sido causado pela diferença dos padrões utilizados nas duas determinações. Para proantocianidinas totais, foram utilizados como padrão taninos de uva, de acordo com PORTER (1989). Segundo WOLLGAST *et al.* (2001), as proantocianidinas encontradas na uva apresentam peso molecular inferior àquelas do cacau (menor número de monômeros condensados). Além disso, a determinação das proantocianidinas totais foi colorimétrica, utilizando despolimerização oxidativa dos taninos condensados catalisada por ácido para fornecer antocianidinas de coloração vermelha. Com isso, a forma como as moléculas provavelmente foram clivadas por ácido, pode ter variado consideravelmente (por exemplo, as ligações 4→6 são mais resistentes à clivagem que as 4→8) (WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

A diferença entre os genótipos IMC 67 e ICS 95 de 353% para fenóis totais e 287% para proantocianidinas pode estar relacionada à coloração dos cotilédones, violeta escuro (IMC 67) e violeta pálido (ICS 95). Os demais genótipos apresentaram

colorações intermediárias, embora tendendo para o violeta escuro. Segundo KEALEY *et al.* (1998), BRITO (2000) e EFRAIM (2004), as sementes de cacaueiro do grupo *Forastero* contêm entre 30 a 60 % mais compostos fenólicos que as do grupo *Criollo*. Neste aspecto, a pigmentação dos cotilédones pode ser um indicativo do teor de compostos fenólicos presentes, o que de fato foi observado, uma vez que os valores mais altos encontrados para fenóis totais e proantocianidinas totais dos demais genótipos estiveram mais próximos de IMC 67 do que de ICS 95.

3.2 Flavanóis e Procianidinas

Na Figura 3 pode-se observar um espectrograma típico obtido para a determinação dos flavanóis e procianidinas com os picos representados por 289; 577; 865; 1153,1 e 1440,3; correspondentes respectivamente à massa molecular (m) do composto químico (-)-epicatequina (290) ionizado negativamente, ou seja, adicionado de um elétron dividido pela carga elétrica (z). Dessa forma, 289, 577, 865, 1153,1 e 1440,3 representam respectivamente monômeros, dímeros, trímeros, quadrâmeros e pentâmeros dos flavonóides estudados.

Na Figura 4 são apresentados os histogramas referentes à quantificação relativa dos flavanóis dos diferentes genótipos de cacau estudados.

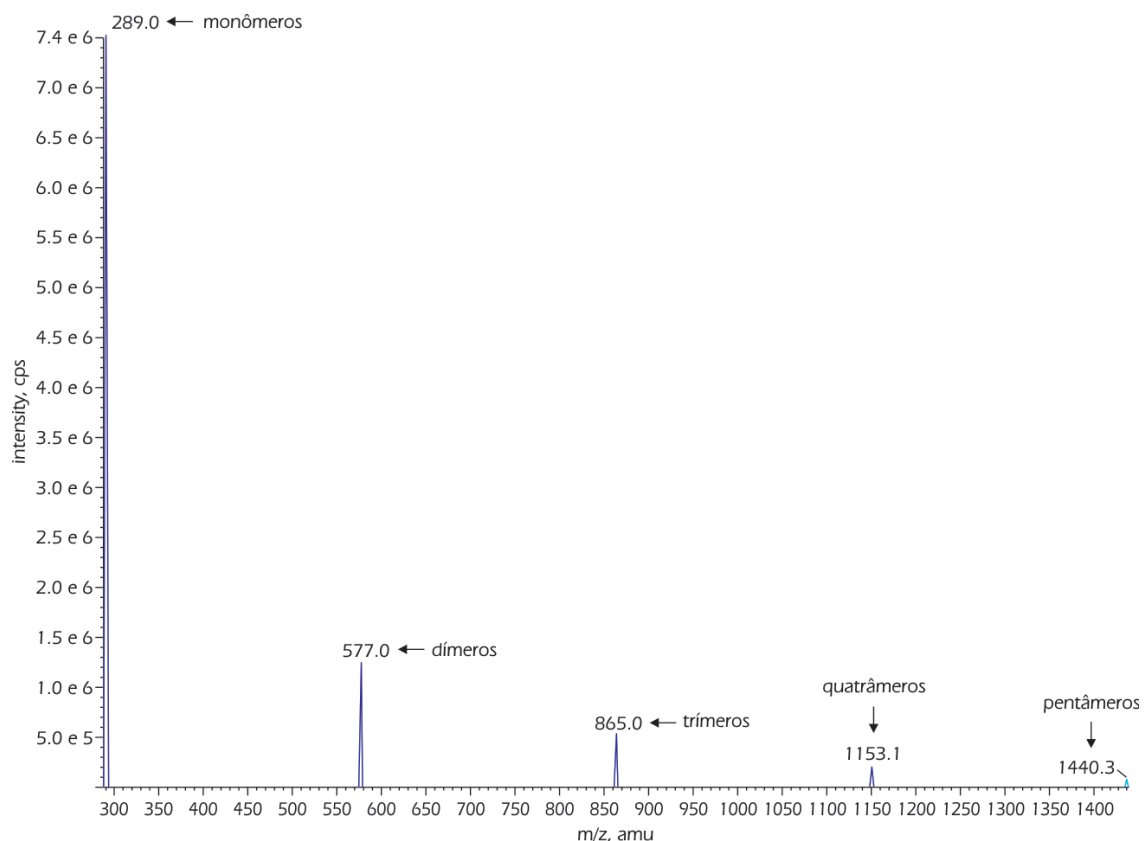


FIGURA 3. Espectrograma típico obtido no espectrômetro de massas Q-Trap com o flavan-3-ol (monômero) e procianidinas (dímeros a pentâmeros).

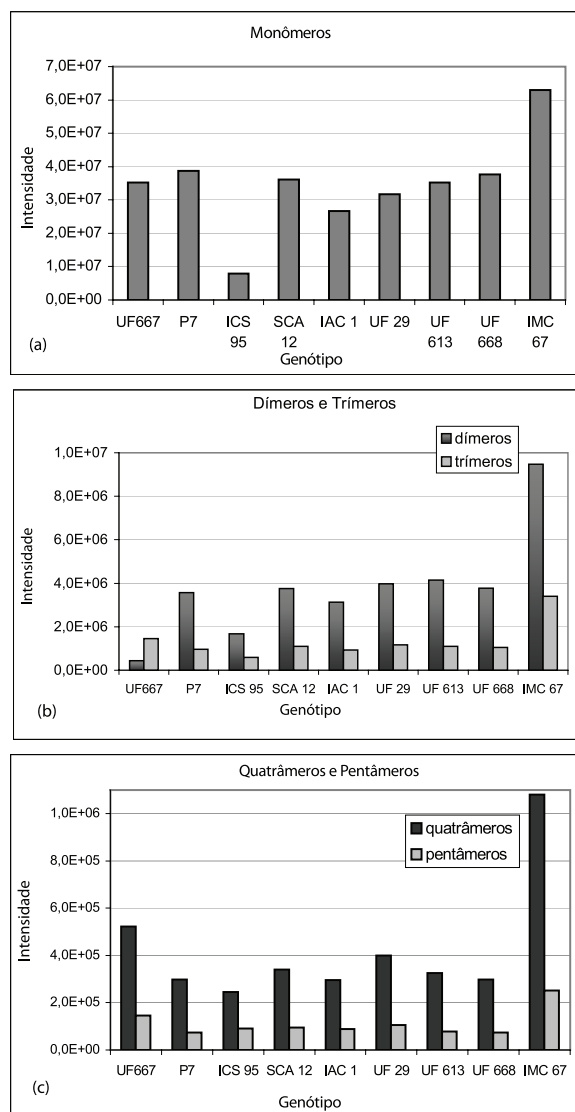


FIGURA 4. Histogramas referentes aos teores de flavan-3-óis dos diferentes genótipos de cacau estudados: a) monômeros; b) dímeros e trímeros, c) quatrâmeros e pentâmeros.

O genótipo IMC 67 apresentou os teores de flavan-3-óis (desde monômeros até pentâmeros) mais elevados, seguido de UF 667 e UF 29. P7 e UF 668 apresentaram 60% dos teores de monômeros de IMC 67, enquanto ICS 95 apresentou apenas 12,6% (o menor teor em relação aos demais genótipos). Em relação aos dímeros, IMC 67 apresentou, em média, teor 58% mais alto que UF 613 e UF 29 e 95,8% mais alto que UF 667. Para trímeros, IMC 67 apresentou teores 57,2%; 65,5% e 92,7% mais altos que UF 667; UF 29 e ICS 95, respectivamente. Quanto aos quatrâmeros, IMC 67 apresentou teores 51,6%; 63,0% e 78% mais altos que os genótipos UF 667; UF 29 e ICS 95. Para pentâmeros, IMC 67 apresentou teores 41,7%; 57,8%; 69,0% e 70,3% mais altos que os genótipos UF 667; UF 29; UF 613 e UF 668.

De uma forma geral, o teor de monômeros foi maior que os teores de polímeros, mostrando-se 75% mais alto em relação ao de pentâmeros. Houve uma grande diferença entre

o teor observado de dímeros e trímeros, sendo que os primeiros apresentaram valores entre 65 a 75% mais altos que os últimos. Observou-se ainda que o teor de monômeros mostrou-se de 78,9 a 99,86% mais alto que os teores observados para dímeros, trímeros, quatrâmeros e pentâmeros.

Os resultados observados no presente estudo estão de acordo com aqueles expressos por KIM & KEENEY (1984) que avaliaram o teor de epicatequinas (monômeros de flavanóis) de oito diferentes genótipos de cacaueiro provenientes de Itabuna, Bahia, Brasil, representantes de diferentes grupos raciais (*Forastero* Amazônicos, Híbridos Trinidad-Jamaica, Trinitários e *Forastero* Nacional). O estudo realizado por esses autores mostrou que o genótipo SIC-250 (representante do grupo *Forastero* Amazônico) apresentou o maior teor de epicatequinas em relação aos demais e que os tipos ICS (híbridos Trinidad-Jamaica) apresentaram os menores teores em relação aos demais.

Por meio da análise estatística de Pearson, foi observada correlação positiva significativa entre os teores de compostos fenólicos totais e proantocianidinas totais ($r=0,94$; $P\leq 0,001$), de compostos fenólicos totais e de monômeros ($r=0,78$; $P\leq 0,05$), bem como para proantocianidinas totais e monômeros ($r=0,84$; $P\leq 0,001$). As correlações positivas observadas envolvendo os monômeros podem ser devidas ao fato de que 60% dos compostos fenólicos presentes em sementes de cacaueiro correspondem às procianidinas. Além disso, de acordo KEALEY *et al.* (1998) e EFRAIM (2004), em média 36% dos flavanóis presentes nas sementes de cacaueiro são monômeros e seu teor é 55 a 75% mais alto em relação aos dímeros, trímeros, quatrâmeros e pentâmeros.

Tal como foi observado neste trabalho, CAPRILES DE REYES *et al.* (1964) citados por NOJOSA *et al.* (2003) verificaram para o genótipo IMC 67 um teor bastante elevado de compostos fenólicos em relação a outros genótipos. Esses autores chamam atenção para o fato de IMC 67 apresentar maior resistência a pragas e doenças que genótipos com menores teores de compostos fenólicos. Com relação ao ICS 95, OMOKOLO NDOUMOU *et al.* (1996); DAGUENET & PARVAIS (1981); MEIFREIN & TANGUY (1967) também verificaram teores mais baixos de fenólicos, relacionando esse fato à maior susceptibilidade desse genótipo à pragas e doenças.

É importante ressaltar que neste trabalho foram estudadas sementes de cacaueiros cultivados em região de marcada estacionalidade climática. Os frutos, tendo sido colhidos em novembro, se desenvolveram durante meses de temperatura mais amena.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo comprovaram que há uma grande variabilidade no teor de compostos fenólicos entre os diferentes genótipos avaliados, que pode ser justificada em função das características climáticas vigentes durante o desenvolvimento dos frutos, e permite prever que o perfil de compostos fenólicos de sementes obtidas em diferentes épocas do ano pode ser diferente. O genótipo IMC 67 apresentou

teores de proantocianidinas totais, flavan-3-óis e procianidinas maiores que os outros genótipos estudados; por outro lado, ICS 95 apresentou os menores teores de compostos fenólicos totais e proantocianidinas totais em relação aos demais genótipos. Uma vez que o teor de compostos fenólicos em sementes de cacaueiro pode variar consideravelmente em função de características climáticas vigentes durante o desenvolvimento dos frutos, pode-se prever diferente perfil fenólico em sementes obtidas em outras épocas do ano, o que justificaria um estudo de variação estacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERINE, M. A. & OUGH, S. S. **Methods for Analyses of Musts and Wines**. 2ed. New York. Jywwiley E. Sons, Inc. s.d, 337p.
- ARTS, I. C. W.; *et al.* Chocolate as a source of tea flavanoids. **The Lancet**. London. V. 354, p. 488, 1999.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutritional Review**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. Campinas, 2000. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- BRITO, E. S. *et al.* Effect of Polyphenol Oxidase (PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22; n.1; p. 45-48, 2002.
- CAPRILES DE REYS, L. *et al.* El contenido de ácido clorogênico con diferentes variedades de cacao y su relación con la resistencia contra el hongo *Ceratocystis fimbriata*. **Agronomia Tropical**, v. 16; p. 273-284, 1964.
- CORAL, F. J. *et al.* Cultivares lançados em 1983 e 1984 – Cacao. **O Agrônômico**, v. 37, n. 2, p. 93, 1985.
- CROSS, E. *et al.* Recherche d'un índice de fermentation du cacao. **Café, Cacao Thé**. v. 16; n. 2; p. 109-113, 1982.
- DAGUENET G. & PARVAIS J. P. Etude comparative de la résistance a *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. emend. Bras. et Grif. de trois especes du genre *Theobroma*. Mise en évidence de substances de type phytoalexins responsable de la résistance induite. **Café Cacao Thé**, v. 25; p. 181-190, 1991.
- EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. Campinas, 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, p. 505-509, 1958.
- HAMMERSTONE, J. F.; *et al.* Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(2), 490-496, 1999.
- KEALEY, K. S. *et al.* Method for producing fat and/or solids from beans and compositions containing polyphenols. **United States Patent Application** 2004/0058022, Mars Incorporated, USA. 2004.
- KEALEY, K.S. *et al.* Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same medical uses. **Patent Corporation Treaty (PCT)** WO 98/09533, Mars Incorporated, USA. 1998.
- KIM, H. & KEENEY, P. G. (-)Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p. 1090-1092, 1984.
- KRIS-ETHERTON, P. M. & MUSTAD, V. A. Chocolate feeding studies: a novel approach for evaluating the plasma lipid effects of stearic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60; p. 1029S-1036S, 1994.
- MAO, T. K. *et al.* The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences**, v. 66; n. 15; p. 1377-1386, 2000.
- MATTIETO, R. A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Campinas, 2001. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- MEIFREIN, M. & TANGUY, J. Sur le rôle des composés phénoliques au cours de l'infection des cabosses de *Theobroma cacao* par *Phytophthora*. **Café, Cacao, Thé**. v. 11; p. 337-342, 1967.
- NOJOSA, G. B. A. *et al.* Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia brasileira**. v. 28; n. 2; p. 148-154, 2003.
- OMOKOLO NDOUMOU, O. *et al.* Changes in carbohydrate, amino acids and phenol contents after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. **And Grif. Annals of Botany**, v.77; p. 153-158, 1996.
- OSAKABE, N. *et al.* The antioxidative substances in cacao liquor. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, n. 44; p. 313-321, 1998.
- PORTER, L. J. *et al.* Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, New York, v. 5, p. 1657-1663, 1991.
- PORTER, L. J. **Methods in plant biochemistry**. Academic Press, 1989, v. 1, cap. 11, p. 389-419.
- REIN, D. *et al.* Epicatechin in human plasma: *In vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. **Journal of Nutrition**, n. 130; p. 2109-2114, 2000.
- RIGAUD, J. *et al.* Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. **Journal of Chromatography**, n. 654; p. 255-260, 1993.
- ROHAN, T. A. & CONNELL, M. The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 29, p. 460-463, 1964.
- SANBONGI, C. *et al.* Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.
- SANCHEZ-RABANEDA, O. *et al.* Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*) **Journal of Mass Spectrometry**, n. 38; p. 35-42, 2003.
- SAS Institute Inc. *Statistics analyses systems (SAS)*. Cary, USA, 1993.
- SHAUGHNESSY, W. J. Cocoa beans – planting through fermentation – its effect on flavor. **Manufacturing Confectioner**. n. 72, p. 51-58, 1992.

- SOARES, M. S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através de ação enzimática durante a fermentação.** Campinas, 2001. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- STATGRAPHICS. Statistical graphics system by statistical: version 6.0. Cambridge: Graphics Corporation. 1992.
- STEEL, R. G. & TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics. New York: MacGraw-Hill, 1980. 632 p.
- STEINBERG, F. M. *et al.* Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, n. 2; v. 103; p. 215-223, 2003.
- VILLENEUVE, F.; *et al.* Effet de la fermentation sur lès activités peroxidasiques et polyphenoloxidasiques de la fève de cacao. **Café, Cacao, Thé**, v. 33, n. 2, p. 113-120, 1985.
- WEISBURGER, J. H. & WILLIAMS, G. M. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicology Science**; v. 49, p. 231-246, 2000.
- WOLLGAST, J. & ANKLAN, E. Review in polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, n. 33, p. 423-447, 2000.
- WOLLGAST, J. *et al.* Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection, **Journal of Chromatography**, v. 926-1, p. 211-220, 2001.
- YOSHIYAMA, M & ITO, Y. Decrease of adstringency of cacao beans by na enzymatic treatment. **Nippon Shokuchin Kagaku Kogaku Kaishi**. n.43; p.124-129, 1994 .
- ZUMBÉ, A. Polyphenols in cocoa: are there health benefits? **BNF Nutrition Bulletin**, n. 23p. 94-102, 1998.