

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CACAU P16 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Kamille Abreu Inacio, Bárbara Nicchio Casotti, Ruth Vieira de Aguiar, Sarah Arruda Fiorido, Maria Emília Rodrigues Valente, Raquel Vieira de Carvalho

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000, Alegre – ES, Brasil, kamilleabreuinacio@gmail.com, bnicchio@gmail.com, ruthhaguiar@gmail.com, sara.arruda.fiorido@gmail.com, maria.valente@ufes.br, raquelvcarvalho@hotmail.com

Resumo

O cacau possui grande participação na economia nacional e estadual. Em 2024, a previsão de recebimento para as indústrias nacionais brasileiras é de mais de 289 mil toneladas de amêndoas de cacau. Em 2023, o estado do Espírito Santo recebeu o título de terceiro maior produtor nacional de cacau. As sementes de cacau, conhecidas por serem matéria prima do chocolate, vêm sendo valorizadas pela sua alta capacidade antioxidante e está atrelada à presença de compostos bioativos, como os polifenóis e aminas bioativas, os quais desempenham funções benéficas à saúde. Dessa forma, tal pesquisa avaliou a capacidade antioxidante, pelo ensaio radical ABTS e DPPH, assim como a estimativa de fenólicos totais, pelo reagente Folin-Ciocalteu em duas fermentações: espontânea (FE) e com controle de temperatura (FC). Foi utilizado clone de cacau PH16, provindos do estado do Espírito Santo. Os valores finais de capacidade antioxidante em $\mu\text{mol Trolox/g}$ de amostra pelo ensaio ABTS e DPPH e fenólicos totais (FT) (mg de ácido gálico/g de amostra) em FE foram $0,216 \pm 0,16$ (ABTS), $1,045 \pm 0,16$ (DPPH) e $38,51 \pm 3,13$ (FT), já para FC $0,25 \pm 0,06$ (ABTS), $1,28 \pm 0,39$ (DPPH) e $28,44 \pm 3,25$ (FT), respectivamente. Não foi visto perfil consonante da capacidade antioxidante e estimativa de fenólicos totais.

Palavras-chave: Bioativos. Polifenóis. Saúde. Valorização. Capixaba.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde – Tecnologia de Alimentos.

Introdução

O cacau é amplamente reconhecido por ser matéria-prima do chocolate, um produto muito apreciado por pessoas em todo o mundo. Este fruto teve origem na América Central e do Sul. O cacau é extraído do cacauieiro, sua espécie *Theobroma cacao* L faz parte da família Sterculiaceae e do gênero *Theobroma* (BECKETT et al. 2017). É encontrado, em geral, em regiões tropicais de clima quente e úmido. Diferentes variedades de cacau são encontradas, Forastero, Criollo e Trinitário estão entre as principais (MINIFIE, 1989).

As amêndoas de cacau são exportadas por países como a Costa do Marfim, Camarões, Gana e Nigéria, já a comercialização de seus derivados, como a manteiga, é realizada por países Europeus, com ênfase na Holanda (DA CONCEIÇÃO et al. 2022). Em relação ao Brasil, segundo dados divulgados pela Associação Nacional das Indústrias Produtoras de Cacau (AIPC, 2024), as indústrias nacionais brasileiras receberam mais de 220 mil toneladas de amêndoas de cacau no ano de 2023 e a previsão para 2024, segundo o IBGE (2024), é que essa produção ultrapasse 289 mil toneladas. Adentrando-se ao Espírito Santo, têm-se que o estado possui grande destaque na produção do fruto, a SEAG - Secretaria do Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (2023), mostrou que o estado capixaba ocupou a terceira posição de maior produtor nacional de cacau em 2023.

As sementes de cacau possuem uma diversidade de compostos bioativos. Dentre eles estão os compostos fenólicos e as aminas bioativas, as quais podem ser formadas durante a fermentação a partir da ativação de enzimas endógenas do cacau, as quais são favorecidas pela atividade de microrganismos fermentativos, como leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético (DOMÍNGUEZ-PÉREZ et al., 2020). O grande apelo nutricional atrelado a estes compostos acabam trazendo uma valorização dos frutos de cacau (CORTEZ et al., 2023). Żyzelewicz et al. (2016) verificaram que grãos de cacau tiveram papel na modulação da insulina em camundongos, reduzindo o risco de diabetes e complicações metabólicas associadas. Ainda, a existência de flavonoides no

cacau mostra se relacionar com a redução do risco de doenças cardiovasculares e controle da pressão arterial pela melhora na função endotelial (GRASSI; DESIDERI; FERRI, 2010).

O processo fermentativo, etapa necessária no beneficiamento das sementes, é responsável pela maior influência na capacidade antioxidante no cacau. Nessa etapa há uma redução gradativa dos polifenóis à medida que se passam os dias (PALLARES et al. 2016). Durante a fermentação, há uma complexidade de reações bioquímicas responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos (EFRAM, et al., 2010). Do Carmo Brito et al. (2017) verificaram alto teor de polifenóis no início da fermentação atribuindo essa influência ao pH inicial do meio, visto que foi altamente ácido neste período. Contudo, durante este período também há formação das aminas bioativas, o que atribui à fermentação a obtenção de um alimento com características funcionais (DOMÍNGUEZ-PÉREZ et al., 2020).

A fermentação, além de influenciar nas características nutricionais, também é responsável por afetar características sensoriais do produto final. Alterações do metabolismo de microrganismos, como as bactérias do ácido acético, causam mudanças no pH, as quais afetam a estabilidade dos compostos bioativos (JONH et al., 2019). Enzimas como a polifenoloxidase oxidam os polifenóis durante processo fermentativo, estes compostos estão ligados a adstringência e amargor dos grãos de cacau (KONGOR et al., 2016).

Assim, tal pesquisa avaliou a capacidade antioxidante, pelo ensaio radical ABTS e DPPH e estimativa de fenólicos totais, pelo reagente Folin-Ciocalteu em duas fermentações: espontânea (FE) e com controle de temperatura (FC).

Metodologia

A pesquisa realizada foi do tipo experimental, observacional e transversal. Os cacaus maduros da variedade Forastero do clone PH16, foram oriundos do município de Linhares-ES (19°27'29"S 39°52'14"W), do distrito de Povoação, nº 248, Fazenda São Luís, localizada a 26 Km da cidade. A pesquisa foi conduzida nas dependências do CCAE da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre-ES. Os frutos, após recebimento, foram lavados em água corrente e cortados. Suas sementes foram retiradas manualmente e seguiram para fermentação, que ocorreu em reatores (caixas de isopores) em duplicata. Dois tratamentos de fermentação foram usados: (1) fermentação espontânea (FE), onde os reatores ficaram armazenados à temperatura ambiente (em uma sala); (2) fermentação controlada (FC), com controle de temperatura, onde os reatores ficaram armazenados dentro de uma câmara de fermentação (marca Shel Lab modelo HC9R-2) à 40 °C com umidade de 80%. Levando-se em conta os dados provindos da literatura usada, o processo fermentativo foi monitorado nos tempos de 0 a 168h (7 dias).

Para as análises de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, foram retiradas amostras diárias das sementes e congeladas a -18 °C até sua utilização (DEUS et al., 2020; DO CARMO BRITO et al., 2017). Para que houvesse a separação do conjunto polpa, testa e gérmen dos cotilédones, foi feito o descascamento manual da semente. Os cotilédones foram liofilizados, secos até umidade próxima a 6% e moídos em moedor de laboratório tipo mixer. Após, seguiram para o desengorduramento com n-hexano (GİLTEKIN-ÖZGİVEN; BERKTAŞ; ÖZÇELİK, 2016). A solução desengordurada necessitou passar pela etapa de preparação, de modo a torná-la apta às análises. Assim, seguindo metodologia proposta por Efraim et al., (2006 e 2010) com adaptações, a obtenção dos extratos foi realizada, utilizando o solvente metanol:acetona:água.

O conteúdo fenólico total dos cotilédones foi medido utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, conforme o método de Singleton e Rossi (1965). Nessa etapa foram usados o extrato diluído + reagente Folin-Ciocalteu + solução saturada de Na₂CO₃, com posterior leitura em espectrofotômetro (Global Analyzer, GTA-96) a 760 nm O ácido gálico foi utilizado como padrão, e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por grama de amostra. Já nas análises de capacidade antioxidante, o método de ensaio do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina6-sulfônico)) foi conduzido de acordo com Re et al. (1999). Foi utilizada a solução radical ABTS⁺, (absorbância corrigida para 0,700 (± 0,05) com adição de etanol) adicionada ao extrato, usando o espectrofotômetro (Global Analyzer, GTA-96) a 734 nm. Enquanto que para o ensaio DPPH se seguiu o método proposto por Brand-Williams et al. (1995) com adaptações. A solução de DPPH (absorbância corrigida para 0,700 (± 0,05) com adição de metanol 80%) foi adicionada ao extrato diluído. A leitura foi feita a 515 nm após 30 minutos de reação. O Trolox foi utilizado como padrão (0-150 µmol/L) e os resultados foram expressos em equivalente de Trolox (µmol Trolox/g), em base seca.

As fermentações espontânea e controlada foram realizadas em recipientes de isopor, em duplicata. As amostras foram coletadas de cada recipiente ao longo do processo fermentativo e as análises foram feitas em triplicata. Os dados obtidos foram apresentados como médias \pm desvios padrão. Os resultados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA por meio do software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 20.0 for Windows. As diferenças entre as médias (variável tempo e tipo de tratamento) foram testadas com o teste de Tukey e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

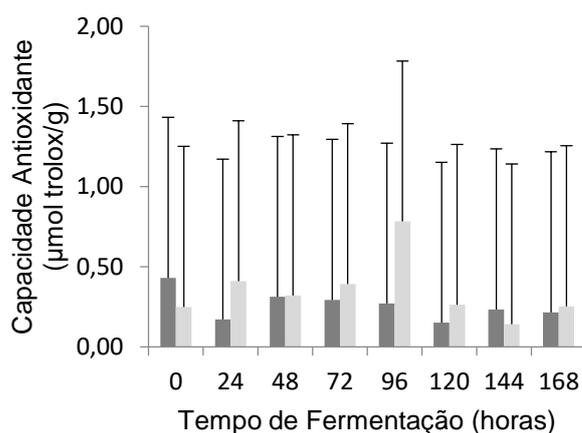
Resultados

Tabela 1- Valores de fenólicos totais (mg de ácido gálico/g de amostra) e seus respectivos desvios padrões em amostras de cotilédones do cacau nos 2 tipos de fermentação: fermentação espontânea (FE) e fermentação controlada (FC) durante os tempos 0 a 168h.

| Tempo de fermentação (horas) | Fenólicos totais FE ^{ns} | Fenólicos totais FC |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 34,90 \pm 0,00 | 46,28 \pm 0,00 ^{ab} |
| 24 | 41,03 \pm 1,90 | 49,18 \pm 2,85 ^a |
| 48 | 40,33 \pm 1,41 | 48,87 \pm 8,80 ^a |
| 72 | 42,72 \pm 3,76 | 48,41 \pm 2,13 ^a |
| 96 | 37,12 \pm 5,57 | 38,70 \pm 2,27 ^{abc} |
| 120 | 41,50 \pm 2,51 | 33,96 \pm 2,42 ^{bc} |
| 144 | 44,00 \pm 3,15 | 32,55 \pm 3,45 ^c |
| 168 | 38,51 \pm 3,13 | 28,44 \pm 3,25 ^c |

Fonte: o autor.

Figura 1 - Valores de capacidade antioxidante encontrados por meio do ensaio radical ABTS⁺ (a) e DPPH (b) em amostras de cotilédones do cacau nos 2 tipos de fermentação (■FE – Fermentação Espontânea; ■FC – Fermentação Controlada) durante os tempos 0 a 168h.



(a)

(b)

Fonte: o autor.

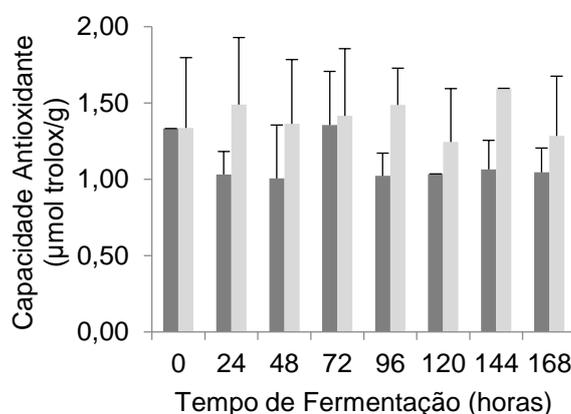
Discussão

Os valores em mg de ácido gálico/g de amostra dos compostos fenólicos totais (FT) foram de $38,51 \pm 3,13$ e $28,44 \pm 3,25$ em amostras de cotilédones após o processo fermentativo para fermentação espontânea (FE) e controlada (FC) respectivamente (Tabela 1). O teor de polifenóis é influenciado por diversos fatores, dentre eles a localidade de onde foram extraídos dos frutos. Efraim et al. (2010) encontraram no sétimo dia da fermentação $44,55$ mg/g de fenólicos totais em amostras de cacau provindos do município de Teixeira de Freitas – BA. Já Leite et al. (2013) verificaram em duas cultivares diferentes oriundas do sul da Bahia que o conteúdo fenólico das massas de cacau era de $23,95$ mg/g e $25,03$ mg/g após processo fermentativo. Diferentes variedades de cacau, colhidos e fermentadas em localizações geográficas distintas, apresentam variação a depender da localização de colheita e o processo fermentativo (GIL et al., 2019).

A temperatura é um importante fator do processo fermentativo. Ela tem papel importante nas atividades da polifenoloxidase e peroxidase, enzimas responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos (CALVO et al., 2021). Dessa forma, comparando-se a FE e FC, têm-se que o controle de temperatura a 40 °C não foi favorável à conservação de compostos fenólicos, conforme observado pela sua queda durante a fermentação controlada.

A capacidade antioxidante nas duas fermentações não apresentou diferença estatística entre os tempos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, permanecendo constante. Ao final da fermentação espontânea foram encontrados valores para capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/g}$ de amostra) pelo ensaio ABTS e DPPH de $0,216 \pm 0,16$ (ABTS) e $1,045 \pm 0,16$ (DPPH). Já na fermentação controlada foi verificado $0,25 \pm 0,06$ (ABTS) e $1,28 \pm 0,39$ (DPPH). Pallares et al. (2016), verificaram que ao decorrer da fermentação a capacidade antioxidante tende a cair. Melo et al. (2020) não encontraram mudança significativa na capacidade antioxidante até o terceiro dia da fermentação, porém a partir deste tempo notaram uma queda gradativa.

Ao comparar as fermentações (Figura 1), têm-se que de os valores de capacidade antioxidante para fermentação controlada, em geral, mostraram-se maiores que aqueles vistos na fermentação



espontânea. Tal fato não condiz integralmente com os dados de fenólicos totais encontrados, tendo em vista que a partir das 120h o teor de FT era maior na FE. Os compostos fenólicos possuem alta capacidade antioxidante (MAGRONE; RUSSO; JIRILLO, 2017). Dessa forma, sugere-se interferência de outro ou outros compostos presentes. Além dos compostos fenólicos, outras substâncias antioxidantes também fazem parte da complexa composição das sementes de cacau (DOMINGUEZ-PÉREZ et. al., 2020; DEUS et. al., 2020, 2021; SILVA, 2021), como peptídeos, aminoácidos e aminas bioativas (DO CARMO BRITO et al., 2017). Estas últimas são fundamentais para diversos processos fisiológicos, têm papel nas etapas da inflamação, alterações de humor, além de possuírem ação antioxidante e consequentemente antienvhecimento (SILVA, 2021).

Conclusão

O conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante nas amêndoas submetidas à fermentação espontânea não apresentou queda à medida que se prosseguia o processo fermentativo, sendo positivo ao se tratar de alegação de saúde. Contudo, na fermentação controlada foi vista redução nos fenólicos totais (FT) sendo este tratamento desfavorável à preservação desses compostos nas amêndoas. Os valores de FT e capacidade antioxidante não expressaram padrão consonante, apontando uma possível interferência da capacidade antioxidante por outros compostos, como aminas biogênicas.

Referências

- APIC – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU. **Recebimento anual de cacau – total nacional (em tons)**. Brasil: APIC, 2024. Disponível em: <https://aipc.com.br/estatisticas/recebimento/>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- BECKETT, S. T.; FOWLER, M.; ZIEGLER, G. R. (2017). **Beckett's industrial chocolate manufacture and use** (5th ed.). New York: John Wiley & Sons.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CALVO, A.M. et al. Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 16746, 2021.
- CORTEZ, D. et al. Changes in bioactive compounds during fermentation of cocoa (Theobroma cacao) harvested in Amazonas-Peru. **Current Research in Food Science**, v. 6, p. 100494, 2023.
- DA CONCEIÇÃO, R. L. C.; SOARES, N. S.; LISBOA, G. J. Oferta brasileira de exportação de derivados de cacau, 1961-2016. **Novos Cadernos NAEA**, v. 25, n. 1, 2022.
- DEUS, Valterney L. et al. Understanding amino acids and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 97, p. 103776, 2021.
- DO CARMO BRITO, B. N. et al. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 228, p. 484-490, 2017.
- DOMÍNGUEZ-PÉREZ, L. A. et al. Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 73, p. 104134, 2020.
- EFRAIM, P. et al. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 142-150, 2010.
- EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCÍA, N. H. Phenolic Compound Content in Cocoa Seeds from Different Genotypes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229–236, 2006.

GIL, M. et al. Traceability of polyphenols in cocoa during the postharvest and industrialization processes and their biological antioxidant potential. **Heliyon**, v. 7, n. 8, 2021.

GİLTEKIN-ÖZGİVEN, M.; BERKTAŞ, I.; ÖZÇELİK, B. Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 72, p. 559–565, 2016.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; FERRI, C.. Blood pressure and cardiovascular risk: what about cocoa and chocolate?. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 501, n. 1, p. 112-115, 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2024. **IBGE prevê safra de 306,2 milhões de toneladas para 2024, com queda de 3,2% frente a 2023**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/38568-ibge-preve-safra-de-306-2-milhoes-de-toneladas-para-2024-com-queda-de-3-2-frente-a-2023>. Acesso em: 14 jun. 2024.

JOHN, W. A. et al. Forcing fermentation: Profiling proteins, peptides and polyphenols in lab-scale cocoa bean fermentation. **Food chemistry**, v. 278, p. 786-794, 2019.

KONGOR, J. E. et al. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. **Food Research International**, v. 82, p. 44-52, 2016.

LEITE, P. B. et al. Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from "witch broom disease" resistant and non resistant cocoa cultivars. **Ciência e agrotecnologia**, v. 37, n. 3, p. 244-250, 2013.

MAGRONE, T.; RUSSO, M. A.; JIRILLO, E.. Cocoa and dark chocolate polyphenols: from biology to clinical applications. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 677, 2017.

MELO, T. S. et al. Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during the fermentation process. **Journal of food science and technology**, v. 58, n. 5, p. 1947-1957, 2020.

MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa and confectionery: Science and technology** (3th ed.). West Port, AVI, 1989, 480 p.

PALLARES, A. P. et al. Impact of fermentation and drying in polyphenol content and antioxidant capacity of cocoa variety CCN-51. **ION**, v. 29, n. 2, p. 7-21, 2016.

SEAG - SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO, AQUICULTURA E PESCA. **Espírito Santo está entre os três maiores produtores de cacau do Brasil**, 08, abril, 2023. Disponível em: <https://seag.es.gov.br/Not%C3%ADcia/espírito-santo-esta-entre-os-tres-maiores-produtores-de-cacau-do-brasil#:~:text=Levantamentos%20feitos%20pela%20Secretaria%20de,caf%C3%A9%20vive%20o%20Esp%C3%ADrito%20Santo>. Acesso em: 27 out. 2023.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

SILVA, G. S. **Bioacessibilidade in vitro de aminas bioativas em chocolates produzidos a partir da mistura de amêndoas de cacau sub e completamente fermentadas**. 2021. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

ŻYŻELEWICZ, D. et al. Cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) phenolic extracts as PTP1B inhibitors, hepatic HepG2 and pancreatic β -TC3 cell cytoprotective agents and their influence on oxidative stress in rats. **Food Research International**, v. 89, p. 946-957, 2016.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Espírito Santo pela disposição oferecida à pesquisa realizada. A FAPES pelo suporte financeiro e ao SEBRAE pelo financiamento da bolsa de iniciação científica.