

EFEITO DA FERMENTAÇÃO, TRATAMENTO TÉRMICO E ÁCIDO NOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E FENÓLICOS DE AMÊNDOSAS DE CACAU

Autores: Ruth Vieira de Aguiar, Sarah Arruda Fiorido, Maria Emília Rodrigues Valente, Bárbara Nicchio Casotti, Pollyanna Ibrahim Silva, Sérgio Henriques Saraiva.

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

Resumo

Este estudo investigou o impacto da fermentação, branqueamento e tratamento ácido nas características físico-químicas, no teor de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante de amêndoas de cacau. Foram analisados o pH e cor (sistema CIELab* e CIELch*) das amêndoas, o teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteu e a capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS. Os resultados mostraram que o branqueamento e a fermentação afetaram significativamente a coloração das amêndoas, indicando uma tonalidade mais avermelhada nas amostras não fermentadas e branqueadas. O pH foi influenciado pela fermentação, branqueamento e tratamento ácido, enquanto a capacidade antioxidante não foi significativamente afetada por nenhum deles. A análise do teor de fenólicos revelou que a amostra não fermentada, branqueada e tratada com ácido apresentou quantidade superior destes compostos em relação à amostra apenas fermentada. De uma forma geral, a ausência de fermentação, combinada com branqueamento e tratamento ácido influenciaram positivamente a preservação da coloração avermelhada e dos fenólicos das amêndoas.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*. Compostos bioativos. Chocolate Ruby.

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

Introdução

O cacau é o fruto da árvore nativa da bacia Amazônica, *Theobroma cacao*, cujas amêndoas são matéria-prima do chocolate, alimento popularmente consumido em diversas partes do mundo.

Recentemente, o elevado teor de compostos fenólicos nas amêndoas de cacau tem atraído consumidores preocupados com a saúde (Febrianto & Zhu, 2019). Entretanto, a destes compostos sofre uma queda considerável durante o processamento do cacau. Durante a fermentação, por exemplo, polifenóis sofrem reações de polimerização e formam complexos com proteínas dando origem a derivados menos solúveis em água, enquanto as antocianinas são hidrolisadas a antocianidinas, que sofrem polimerização com catequinas simples produzindo taninos. Assim, a fermentação leva ao desaparecimento quase completo das antocianinas (Zyzlewicz *et al.*, 2014), flavonoide responsável pela coloração vermelho-violeta de sementes de cacau.

Apesar da perda de antocianinas ser necessária para as características físico-químicas e sensoriais clássicas do chocolate, recentemente, há um interesse pela coloração vermelho-púrpura deste produto desde que a indústria belgo-suíça Barry Callebaut, inseriu, em 2017, no mercado o chocolate Ruby (Montoya *et al.*, 2021; Tuenter *et al.*, 2021). Seu processamento ainda é desconhecido, porém é sabido que em 2012 esta empresa registrou uma patente que utiliza, para a produção de chocolate, sementes de Cacau subfermentadas com até 3 dias de fermentação, ou não fermentadas e posteriormente tratadas com solução ácida (Tuenter *et al.*, 2021). Assim, de acordo com estes autores, a combinação de amêndoas não fermentadas/subfermentadas e tratamento ácido são, provavelmente, as etapas-chave na produção do chocolate Ruby.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar o efeito dos fatores fermentação, branqueamento e tratamento com ácido, por meio de um esquema fatorial completo, na coloração, no teor de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante de amêndoas de cacau.

Metodologia

A pesquisa foi realizada por meio de um delineamento fatorial completo, com 2 repetições, avaliando 3 fatores – fermentação, branqueamento e tratamento com ácido – e dois níveis (presença e ausência) totalizando 8 tratamentos, descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Delineamento fatorial completo.

Tratamento	Fermentação	Branqueamento	Tratamento Ácido
SF/SB/STA	Sem fermentação	Sem branqueamento	Sem tratamento ácido
SF/CB/STA	Sem fermentação	Com branqueamento	Sem tratamento ácido
SF/SB/CTA	Sem fermentação	Sem branqueamento	Com tratamento ácido
SF/CB/CTA	Sem fermentação	Com branqueamento	Com tratamento ácido
CF/SB/STA	Com fermentação	Sem branqueamento	Sem tratamento ácido
CF/CB/STA	Com fermentação	Com branqueamento	Sem tratamento ácido
CF/SB/CTA	Com fermentação	Sem branqueamento	Com tratamento ácido
CF/CB/CTA	Com fermentação	Com branqueamento	Com tratamento ácido

Fonte: O autor(a).

Os frutos utilizados na pesquisa foram obtidos no Instituto Federal do Espírito Santo, *campus* de Alegre, e a pesquisa desenvolvida nas dependências da Universidade Federal do Espírito Santo, *campus* de Alegre.

Parte das amêndoas foi encaminhada para a fermentação e parte seguiu diretamente para a etapa de despulpamento, segundo os tratamentos descritos no Quadro 1.

A fermentação aplicada aos tratamentos CF/SB/STA, CF/CB/STA, CF/SB/CTA, CF/CB/CTA foi realizada em caixas de isopor com furos no fundo para drenagem do líquido resultante do processo fermentativo. Após 48 horas, ocorreu o único revolvimento da massa, que permaneceu em repouso até completar 72 horas. Após esse tempo, as sementes foram encaminhadas para a etapa de despulpamento.

As sementes, fermentadas ou não, foram despulpadas por fricção em tela de náilon. O branqueamento foi realizado com imersão das sementes em água a 95 °C por 5 minutos, seguido de um choque térmico em água com temperatura variando de 18°C a 20 °C por 20 minutos. O tratamento ácido consistiu na imersão das sementes em uma solução de ácido cítrico 1,5 M por 5 minutos, conforme a metodologia descrita por Montoya *et al.*, (2021). Após os tratamentos, as amêndoas foram lavadas em água corrente e encaminhadas para a secagem em secador de bandejas a 50 °C até o peso constante.

Para as análises, as amêndoas foram aleatoriamente coletadas, a testa foi removida e os cotilédones foram finamente triturados em um moedor de grãos (Black+Deccker MG200-B2). Para as análises físico-químicas foi realizada a determinação de pH, em triplicata, a partir da diluição de 10 g de amostra em 100 mL de água destilada (IAL, 2008). A cor foi avaliada em triplicata utilizando um colorímetro (Konica Minolta CM-5), fornecendo os dados nos sistemas CIE Lab* e CIE Lch*.

Para análise em espectrofotômetro (Thermo Ficher Scientific, EVO 300 PC, EUA) as amostras foram primeiramente desengorduradas com n-hexano, conforme Gültekin-Ozgüven *et al.* (2016). Os extratos foram então obtidos a partir de uma mistura de água (49%), acetona (45%) e metanol (6%) e preparados conforme Efraim *et al.* (2011) e Efraim; Tucci; Pezoa-Garcia (2006), com modificações. Para a análise de compostos fenólicos foi utilizada a metodologia descrita por Sigleton & Rossi (1965) e para capacidade antioxidante foi utilizada a metodologia descrita por Silveira *et al.* (2018) para análise de ABTS e de Brito *et al.* (2017) para DPPH.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre os tratamentos, com um nível de confiança de 5%, utilizando o *software* Statistica.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Resultados

Os resultados da análise colorimétrica estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1- Resultados de cor das coordenadas L*, a*, b*, c* e h*.

Tratamento	L*	a*	b*	c*	h*
SF/SB/STA	50,84±2,36 ^b	4,01±0,33 ^a	2,82±1,08 ^{abc}	4,93±0,89 ^a	34,30±7,95 ^{bc}
SF/CB/STA	43,87±0,01 ^a	5,72±0,24 ^b	1,56±1,44 ^{ab}	6,01±0,61 ^{ab}	14,84±13,08 ^{ab}
SF/SB/CTA	47,98±0,21 ^{ab}	3,92±0,37 ^a	5,21±0,83 ^c	6,51±0,86 ^{ab}	53,90±2,31 ^c
SF/CB/CTA	44,94±2,38 ^a	6,91±0,61 ^c	2,06±0,66 ^{abc}	7,21±0,69 ^{ab}	16,92±1,49 ^{ab}
CF/SB/STA	45,87±0,33 ^{ab}	6,51±0,08 ^{bc}	4,64±0,98 ^{bc}	8,01±0,64 ^b	35,32±5,30 ^{bc}
CF/CB/STA	42,64±0,88 ^a	6,35±0,05 ^{bc}	0,01±0,06 ^a	6,36±0,05 ^{ab}	0,13±0,57 ^a
CF/SB/CTA	46,05±0,33 ^{ab}	6,79±0,004 ^{bc}	3,72±0,24 ^{bc}	7,74±0,11 ^b	29,29±0,95 ^b
CF/CB/CTA	42,88±0,73 ^a	6,98±0,09 ^c	0,20±0,66 ^a	7,00±0,11 ^{ab}	1,61±5,44 ^a

Nota: Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si por meio de teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota: SF=sem fermentação; CF= com fermentação; SB=sem branqueamento; CB=com branqueamento; STA=sem tratamento ácido; CTA=com tratamento ácido.

Fonte: O autor(a).

Figura 1. Amostras utilizadas para análise de cor.



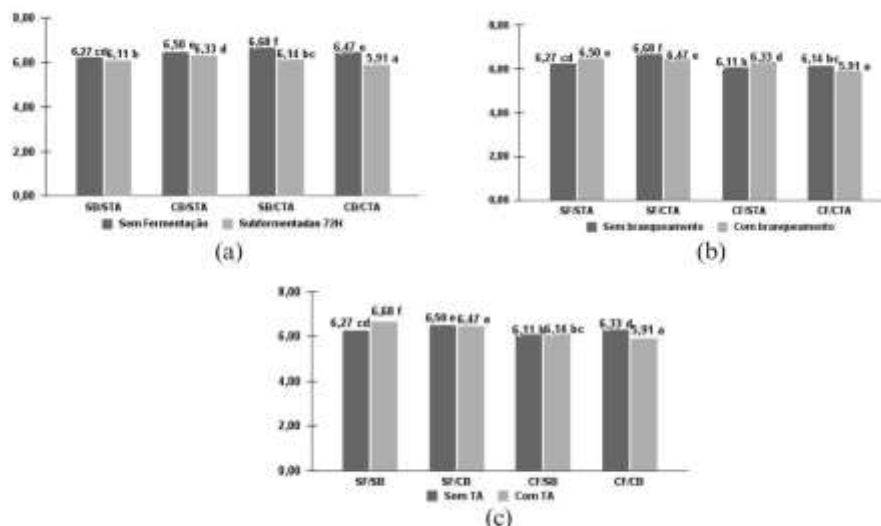
Nota: SF=sem fermentação; CF= com fermentação; SB=sem branqueamento; CB=com branqueamento; STA=sem tratamento ácido; CTA=com tratamento ácido.

Fonte: O autor(a).

Os resultados da análise de pH são apresentados na Figura 2 e os valores obtidos para o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS e DPPH são apresentados na Tabela 2.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 2. Influência a) da fermentação; b) do branqueamento e; c) do tratamento ácido nos valores do pH de amêndoas de cacau.



Nota: SF=sem fermentação; CF= com fermentação; SB=sem branqueamento; CB=com branqueamento; STA=sem tratamento ácido; CTA=com tratamento ácido.

Fonte: O autor(a).

Tabela 2. Resultados da quantificação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de amêndoas de cacau.

Tratamento	Compostos Fenólicos (mgAGE/g)	ABTS+ (umolTE/g)	DPPH+ (umolTE/g)
SF/SB/STA	70,16±11,67 ^{ab}	707,16±322,93 ^a	5587,50±9,82 ^a
SF/CB/STA	79,64±3,78 ^{ab}	761,33±133,17 ^a	5483,33±333,91 ^a
SF/SB/CTA	70,58±4,64 ^{ab}	616,33±31,81 ^a	5122,22±1178,51 ^a
SF/CB/CTA	99,25±11,51 ^b	726,33±83,67 ^a	5712,50±451,76 ^a
CF/SB/STA	63,05±0,10 ^a	782,16±124,92 ^a	5594,44±235,70 ^a
CF/CB/STA	65,8±15,02 ^{ab}	751,33±102,53 ^a	5886,11±196,41 ^a
CF/SB/CTA	77,19±0,32 ^{ab}	581,33±57,75 ^a	5469,44±196,41 ^a
CF/CB/CTA	94,47±8,21 ^{ab}	848,00±114,32 ^a	5483,33±451,76 ^a

Nota: Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si por meio de teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota: SF=sem fermentação; CF= com fermentação; SB=sem branqueamento; CB=com branqueamento; STA=sem tratamento ácido; CTA=com tratamento ácido.

Fonte: O autor(a).

Discussão

Durante a fermentação, devido à morte do gérmen da semente, que passa a ser chamada de amêndoa, há aumento da permeabilidade da membrana (Junior *et al.*, 2021). O mesmo fenômeno ocorre durante o tratamento térmico promovido pelo branqueamento. Portanto, ácidos orgânicos conseguem penetrar pela membrana, promovendo redução de pH da amêndoa, e favorecendo maior valor de a^* (coloração rosa-avermelhada). As antocianinas, que são compostos antioxidantes presentes no cacau, são estáveis na presença de pH baixo (Pham *et al.*, 2019) devido à presença do cátion flavílio que absorve luz e reflete uma tonalidade vermelho-rosada dentro do espectro de luz visível (Riaz *et al.*, 2019).

O pH foi influenciado pelo fator fermentação, pois, nas primeiras horas do processo fermentativo, há o escoamento da polpa e o revolvimento da massa de cacau que auxilia na entrada de oxigênio. Por esta razão, há o favorecimento do ambiente para a presença de bactérias do ácido lático e acético, que

liberam ácidos orgânicos. Assim, as amostras que passaram pela subfermentação tiveram seus valores de pH mais baixos provavelmente devido à presença de ácidos orgânicos formados durante a subfermentação (Junior *et al.*, 2021).

O maior teor de compostos fenólicos nas amostras branqueadas e tratadas com ácido pode ser atribuída à inativação de enzimas como a polifenoloxidase, que é inativada a temperaturas entre 70°C-90°C a depender da matriz alimentar, proporcionada pelo branqueamento (Fernández *et al.*, 2018). Por serem compostos reativos, os polifenóis são oxidados e degradados quando enzimas são liberadas a partir da quebra das células vegetais. Geralmente as enzimas glicosídes e esterases catalisam reações de degradação de polifenóis, enquanto as polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases causam reações de oxidação que catalisam a transformação de polifenóis em quinonas, que então sofrem condensação adicional com grupos amino e sulfidril livres, levando a pigmentos escuros, necessários para melhorar a qualidade do chocolate (Wallace e Giusti, 2008; Montoya *et al.*, 2021).

Segundo Hu *et al.*, (2016) os compostos antioxidantes podem ser conservados a partir de mudanças no processamento do cacau. No presente estudo, entretanto, a capacidade antioxidante não foi significativamente afetada pelos tratamentos realizados. No estudo realizado por Menon (2015), foi avaliada a capacidade antioxidante por meio dos métodos de redução dos radicais ABTS e DPPH. Em contradição aos achados do presente estudo, as amostras branqueadas conseguiram conservar maior quantidade de compostos em comparação às não branqueadas.

Conclusão

É possível concluir que a fermentação, branqueamento e tratamento com ácido cítrico impactaram a cor, o pH e o teor de compostos fenólicos das amêndoas. A amostra não fermentada, branqueada e tratada com ácido obteve um valor significativamente maior de compostos fenólicos com relação às amêndoas que apenas foram subfermentadas. Por fim, os tratamentos aplicados não impactaram significativamente na capacidade antioxidante das amêndoas. Os resultados verificados a partir desta pesquisa reiteram a importância do cacau como possível fonte de compostos fenólicos.

Referências

BRITO, Brenda de Nazaré do Carmo, et al. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, Volume 228, 2017. Pages 484-490, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>.

EFRAIM, Priscilla; TUCCI, Maria Luiza; PEZOA-GARCÍA, Nelson Horacio. Phenolic Compound Content in Cocoa Seeds from Different Genotypes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229–236, 2006.

FEBRIANTO, Noor Ariefandie; ZHU, Fan. Diversity in Composition of Bioactive Compounds Among 26 Cocoa Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2019 Aug 28;67(34):9501-9509. doi: 10.1021/acs.jafc.9b03448. Epub 2019 Aug 16. PMID: 31334642.

FERNANDÉZ, M.V., et al. Optimization of high pressure processing parameters to preserve quality attributes of a mixed fruit and vegetable smoothie. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Volume 47, 2018, Pages 170-179, ISSN 1466-8564, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.011>.

GLTEKIN-OZGUVEN, M.;BERKTAS, I.; OZÇELIK, 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.72.2016 DOI:10.1016/j.lwt.2016.04.065.

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

HU, Sujung., et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of raw, roasted and puffed cacao beans. **Food Chemistry**. 2016. 1;194:1089-94. doi: 10.1016/j.foodchem. PMID: 26471657.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos (4ª ed.)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

JUNIOR, Gilson Celso Albuquerque Chagas., et al. The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v.56, Issue 2, p. 544-552, 2021. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14740>.

MENON, Abhay Santhanam. Effects of blanching and drying on the production of polyphenols rich cocoa beans and product quality. **University of Nottingham**, 2015.

MONTOYA, Cristian Camilo et al. Enhanced pink-red hues in processed powders from unfermented cacao beans. **LWT- Food Science and Technology**. v. 138, n. July 2020, p. 110671, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110671>.

PHAM, N. T., et al. Anthocyanins extraction from Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam): The effect of pH values on natural color. IOP, 2019. **Conference Series: Materials Science and Engineering** 542(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/542/1/012031>.

RIAZ, Rafia Sarah. Anthocyanin-Functionalized Contact Lens Sensors for Ocular pH Monitoring. **American Chemical Society**, 2019. 12;4(26):21792-21798. doi: 10.1021/acsomega.9b02638. PMID: 31891056; PMCID: PMC6933553.

SILVEIRA, Ana Cláudia., et al. Método DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. **Embrapa**, Comunicado Técnico 421. Colombo, PR, 2018.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

TUENTER, Emmy., et al. Ruby chocolate: A study of its phytochemical composition and quantitative comparison with dark, milk and white chocolate. **Food Chemistry**, v. 343, n. April 2020, p. 128446, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128446>.

WALLACE, T.C., GIUSTI, M. M. Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt system cored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. **Journal of Food Science**, 2008.73(4): C241-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00706.x. PMID: 18460117.

ZYZELEWICZ, Dorota *et al.* Application of various methods for determination of the color of cocoa beans roasted under variable process parameters. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 4, p. 549–563, 2014.