

EFEITO DA FERMENTAÇÃO NO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CHOCOLATE ARTESANAL

Autores: Ruth Vieira de Aguiar, Brenda Stefani Rodrigues, Larissa Zago Barbosa, Sarah Arruda Fiorido, Maria Emília Rodrigues Valente, Pollyana Ibrahim Silva.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N, Guararema- 29500-000, Alegre-ES, Brasil, ruthhaguiar@gmail.com, brenda.rodrigues21@hotmail.com, larissa.zago.barbosa@gmail.com, sara.arruda.fiorido@gmail.com, maria.valente@ufes.edu.br, pollyanna.silva@ufes.br.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes tempos de fermentação no teor de compostos fenólicos durante o processo de elaboração do chocolate artesanal. Foram determinados o conteúdo fenólico total e capacidade antioxidante de amêndoas de cacau secas, torradas, massa de cacau (liquor) e chocolates produzidos a partir de amêndoas fermentadas por 48, 72, 96, 120, 144, 168, 196, 216 e 240 horas. A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada por meio de metodologia com uso de Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante avaliada por redução do radical DPPH. Como resultados, para todas as etapas de processamento consideradas, com exceção do liquor, observou-se uma tendência de queda inicial da quantidade de fenólicos, seguida de estabilização. A capacidade antioxidante não foi afetada pelo tempo de fermentação. Em relação ao efeito das etapas de fabricação, observou-se que tanto o teor de compostos fenólicos quanto a atividade antioxidante foram significativamente inferiores para o chocolate.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Flavonoides. Qualidade do cacau.

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

Introdução

O cacau, fruto do *Theobroma cacao* L., é a principal matéria-prima do chocolate, alimento consumido mundialmente, apresentando grande importância econômica. Além de nutrientes (carboidratos, gorduras, proteínas, peptídeos e aminoácidos), as amêndoas deste fruto contêm também compostos bioativos, como os compostos fenólicos (Żyzelewicz *et al.*, 2018).

O teor de polifenóis no cacau e produtos derivados depende de vários fatores, incluindo a qualidade da matéria prima (cultivar, origem, práticas agrícolas e pós-colheita), a formulação do produto bem como os parâmetros tecnológicos adotados durante o processamento (Jalil; Ismail, 2008). Para a produção de chocolates, a perda dos compostos fenólicos auxilia na formação da coloração, aroma e sabor (perda da adstringência), dessa forma beneficiando o produto (Montoya *et al.*, 2021). Todavia, limita os benefícios de quem consome o chocolate, pois, o consumo destes compostos bioativos pode favorecer a promoção da saúde, pois são agentes potenciais para auxiliar na redução dos efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (ROS) e auxilia no aumento dos antioxidantes celulares (Bhuyan *et al.*, 2022).

Do ponto de vista tecnológico, a transformação do cacau em chocolate consiste em um processo de várias etapas que compreendem a fermentação das sementes, seguida da secagem, torrefação, moagem e refino do nibs, conchagem e temperagem (Di Mattita *et al.*, 2014). Durante esse processo são observadas mudanças sensoriais e nutricionais, às quais incluem alterações do teor compostos fenólicos, sendo o objetivo deste trabalho avaliar a influência de diferentes tempos de fermentação no teor de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante do cacau durante o processo de elaboração de chocolate artesanal.

Metodologia

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

Após colhidos, os frutos foram lavados em água corrente e abertos para remoção das sementes revestidas pela polpa, que foram, então, encaminhadas para a fermentação em caixas de isopor com furos no fundo para drenagem do líquido resultante do processo fermentativo. Os tempos de fermentação utilizados foram 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas. A massa de cacau foi mantida em condições de anaerobiose por 48 horas, seguida de revolvimento a cada 24h até o final da fermentação de cada unidade experimental, seguindo metodologia recomendada pela CEPLAC. Após a fermentação as amêndoas foram encaminhadas para secagem em secador de bandejas a 40°C por 24 horas.

Após a secagem, as amêndoas foram torradas em um torrador de cilindro rotativo a 125 °C. As amêndoas torradas foram manualmente descascadas para a obtenção do nibs. Para produzir a massa de cacau (liquor), os nibs foram pré-triturados e moídos em um moinho de pedras por 6 horas, até que a granulometria fosse inferior a 25 µm.

A formulação do chocolate incluiu 35% de massa de cacau, 30% de açúcar refinado, 19,6% de leite em pó, 15% de manteiga de cacau e 0,4% de lecitina de soja. As etapas de refino e conchagem foram realizadas em melanger, com duração de 21 horas. As amostras foram primeiramente desengorduradas com n-hexano, conforme Giltekin-Ozgiven *et al.* (2016), com adaptações. Os extratos foram então obtidos a partir de uma mistura de água (49%), acetona (45%) e metanol (6%), preparados conforme Efraim *et al.* (2011) e Efraim; Tucci; Pezoa-Garcia (2006), com modificações.

Foram analisadas amêndoas de cacau secas e torradas, liquor e os chocolates produzidos a partir de amêndoas fermentadas por 48, 72, 96, 120, 144, 168, 196, 216 e 240 horas.

Para determinação do teor de compostos fenólicos totais, foi utilizada a metodologia descrita por Sigleton & Rossi (1995). Para análise pelo radical DPPH foi adotado o método descrito por Alam *et al.* (2013), com modificações. Retirou-se uma alíquota de 0,3 mL de extrato diluído com 3,0 mL de solução contendo o radical DPPH (0,5 mM), a mistura ficou em repouso no escuro por 20 minutos e sua absorbância foi lida em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, EVO 300 PC, EUA) a 517 nm.

O efeito das etapas de elaboração do chocolate no teor de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante de cacau submetidos a diferentes tempos de fermentação foi analisada por análise de variância (ANOVA) utilizando o software Statistica e análise de regressão utilizando o software SigmaPlot.

Resultados

A análise estatística realizada mostrou que houve efeito significativo do tempo de fermentação e etapa de processamento sobre o teor de compostos fenólicos a 5% de significância pelo teste F (ANOVA). Como a interação entre esses fatores foi significativa, foi necessário o desdobramento para analisar o efeito da etapa de processamento dentro dos diferentes tempos de fermentação. Os valores médios de compostos fenólicos, expressos em mgAGE/g, para cada etapa e para cada tempo de fermentação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Média de compostos fenólicos (mgAGE/g) para os produtos obtidos nas diferentes etapas de processamento em diferentes tempos de fermentação.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

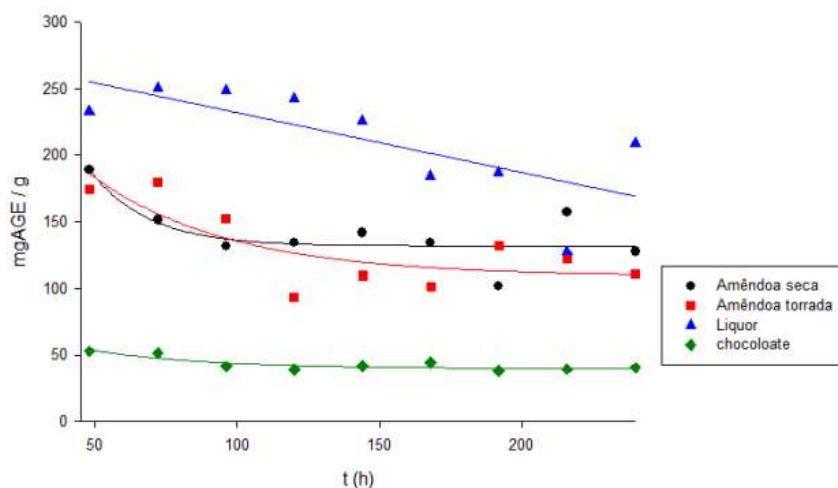
Tempo de Fermentação	Etapa de processamento			
	Amêndoas secas	Amêndoas torradas	Liquor	Chocolate
48 h	189,09 ^b	174,49 ^b	232,93 ^b	52,78 ^a
72 h	151,35 ^b	179,96 ^{b,c}	250,58 ^c	51,55 ^a
96 h	131,87 ^b	152,36 ^{b,c}	248,72 ^c	41,34 ^a
120 h	134,20 ^b	93,55 ^{a,b}	242,59 ^c	38,95 ^a
144 h	141,69 ^{b,c}	109,54 ^{a,b}	225,97 ^c	41,78 ^a
168 h	133,90 ^b	100,86 ^{a,b}	184,50 ^b	44,09 ^a
192 h	101,54 ^{a,b}	131,70 ^{a,b}	187,02 ^b	38,30 ^a
216 h	157,39 ^b	122,84 ^{a,b}	127,52 ^{a,b}	39,37 ^a
240 h	127,64 ^{a,b}	110,92 ^a	209,17 ^a	40,35 ^a

Nota: Os valores dentro de uma linha seguidos pelas mesmas letras sobrescritas não são significativamente diferentes no nível 0,05 de acordo com a ANOVA (Pb 0,05).

Fonte: O autor(a).

A Figura 1 mostra o efeito do tempo sobre o teor de compostos fenólicos para cada etapa de processamento. Os modelos ajustados, bem como o coeficiente de determinação são apresentados na Tabela 2.

Figura 1 - Comportamento de compostos fenólicos em função do tempo de fermentação para os produtos de cada etapa de elaboração de chocolates.



Fonte: O autor(a).

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Tabela 2- Modelos ajustados e coeficientes de determinação (R^2) para os produtos de cada etapa de processamento.

Etapa	Modelo ajustado	R^2
Amêndoas secas	$y = 131,79 + 627,46e^{-0,050x}$	0,628
Amêndoas torradas	$y = 109,23 + 208,08e^{0,021x}$	0,649
Liquor	$y = 276,69 - 0,448x$	0,537
Chocolate	$y = 39,66 + 46,86e^{0,025x}$	0,775

Fonte: O autor(a).

Para capacidade antioxidante, a análise estatística revelou que houve efeito significativo apenas da etapa de processamento, a 5% de significância pelo teste F (ANOVA). Assim, a capacidade antioxidante pode ser considerada constante nos diferentes tempos de fermentação. A Tabela 3 mostra as médias obtidas para atividade antioxidante (método do DPPH) para cada etapa do processamento.

Tabela 3 - Média de capacidade antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$) para os produtos obtidos nas diferentes etapas de processamento.

	Amêndoas secas	Amêndoas torradas	Liquor	Chocolate
Capacidade antioxidante	29,4 ^b	24,7 ^b	63,1 ^c	4,97 ^a

Nota: Os valores dentro de uma linha seguidos pelas mesmas letras sobrescritas não são significativamente diferentes no nível 0,05 de acordo com a ANOVA (Pb 0,05).

Fonte: O autor(a).

Discussão

Os resultados mostram que, para todos os tempos de fermentação, as médias de compostos fenólicos para o chocolate, são significativamente menores que nas amêndoas secas, amêndoas torradas e liquor, embora a partir de 120h de fermentação as médias obtidas para o chocolate, são estatisticamente iguais às médias obtidas para amêndoas torradas. Em geral, o liquor apresentou as maiores médias para compostos fenólicos; para os tempos de 48, 168, 192 e 216 horas não houve diferença estatística entre o liquor, amêndoas secas e amêndoas torradas.

Ortega *et al.* (2008) avaliaram o efeito de algumas etapas de processamento de amêndoas de cacau sobre os teores e o perfil dos compostos fenólicos. Foram avaliadas amêndoas fermentadas e secas, nibs torrados, liquor e pó de cacau do grupo Forastero, oriundos de Gana, África. Foram encontrados teores mais altos de compostos fenólicos nos nibs torrados em relação aos demais produtos avaliados pelos autores. Essa ocorrência é justificada em função das operações de quebra das amêndoas e torração dos nibs de cacau, as quais permitiriam, por meio da ruptura de membranas celulares, maior solubilidade e difusão dos compostos fenólicos.

Durante o processo de moagem, necessária para obtenção do liquor a partir das amêndoas torradas, há rompimento de células e liberação de compostos. Portanto, os valores superiores de compostos fenólicos encontrados para o liquor não implicam, necessariamente, em formação de compostos durante essa etapa, mas sim uma liberação desses compostos das células facilitando sua extração e, conseqüentemente, sua quantificação.

Em nenhum dos tempos de fermentação houve diferença estatística entre amêndoas secas e torradas. Esse resultado demonstra que, provavelmente, o método de torração utilizado não implicou numa destruição significativa de compostos fenólicos presentes nas amêndoas, por conta de ter sido feita uma torra branda (temperatura de 125°C).

Conforme observado pela Figura 3, para todas as etapas de processamento consideradas, com exceção do liquor, há uma tendência de queda inicial da quantidade de fenólicos com o tempo de

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

fermentação, seguida de estabilização. Isso pode ser explicado pelos processos que ocorrem no interior da semente durante a fermentação.

Segundo Brito (2000), os polifenóis se localizam em células específicas do cotilédono, juntamente, com toda a cafeína e teobromina da semente de cacau. Durante a fermentação, reações bioquímicas ocasionam a morte do embrião e a perda da compartimentação dos cotilédones, os compostos fenólicos sofrem difusão e entram em contato com enzimas polifenoloxidase e glicosidase presentes nas sementes. Os polifenóis também podem combinar-se com proteínas por meio de pontes de hidrogênio e sofrer oxidação com formação de quinonas. Essas reações promovem uma redução do teor desses compostos (relacionado a formação do sabor desejável do chocolate), sendo que a maior parte dessa diminuição ocorre entre o primeiro e terceiro dia (Brito, 2000). Efraim (2010) verificou teor 30% menor, em média, de compostos fenólicos totais nas amêndoas fermentadas durante 7 dias e secas tanto de forma natural como artificial, em relação às fermentadas por 3 dias.

De acordo com os resultados obtidos, a capacidade antioxidante pode ser considerada constante nos diferentes tempos de fermentação. Aikpokpodion e Dongo (2010) estudaram o perfil da capacidade antioxidante do sistema do primeiro ao sexto dia de fermentação, quando os compostos fenólicos são reduzidos. O conteúdo de catequina das sementes de cacau não reduziu durante a fermentação e os resultados mostraram que, apesar da perda de compostos fenólicos totais durante a fermentação, a concentração restante nas sementes foi suficiente para produzir uma elevada capacidade antioxidante.

Observa-se que o chocolate apresentou uma menor atividade antioxidante se comparado com as amêndoas secas, torradas e liquor, o que já era esperado, pois a formulação do chocolate contém apenas 35% de liquor, ou seja, pode ter ocorrido um efeito de diluição dos compostos fenólicos.

De forma similar ao observado para compostos fenólicos, os valores médios obtidos para capacidade antioxidante no liquor foram significativamente superiores aos obtidos nas amêndoas secas e amêndoas torradas. A liberação de compostos durante a moagem pode explicar esse resultado.

Conclusão

De uma forma geral, o teor de compostos fenólicos apresentou tendência de queda com o tempo de fermentação, sendo esse comportamento mantido durante as etapas de processamento; para atividade antioxidante não houve diferença significativa com o tempo de fermentação.

Em relação ao efeito das etapas de fabricação, observou-se que tanto o teor de compostos fenólicos quanto a atividade antioxidante foram significativamente inferiores para o chocolate, sugerindo que, além do efeito de diluição, pode ter havido degradação desses compostos ou interação destes com outros componentes da formulação, que impediram uma efetiva extração e quantificação desses compostos.

O teor de compostos fenólicos, bem como a atividade antioxidante, não apresentaram diferenças significativas nas amêndoas secas e amêndoas torradas, sugerindo que as condições de torra não foram suficientes para promover grandes perdas desses compostos bioativos.

Referências

AIKPOKPODION, P. E.; DONGO, L. N. Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. **International Journal of Sustainable Crop Production**, Bangladesh, v. 5, n. 4, p. 66-70, 2010.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n.2, p. 143-152, 2013.

BHUYAN, Upasana, *et al.* Chapter 6 - Plant polyphenols as potent antioxidants: Highlighting the mechanism of antioxidant activity and synthesis/development of some polyphenol conjugates. Editor(s): Atta-ur-Rahman. **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier, Volume 75, 2022, Pages 243-266, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91250-1.00006-9>.

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. 2000. 134f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP**, Campinas, 2000.

DI MATTIA, C.; MARTUSCELLI, M.; SACCHETTI, G.; BEHEYDT, B.; MASTROCOLA, D.; PITTIA, P. Effect of different conching processes on procyanidin content and antioxidant properties of chocolate. *Food Research International*, v. 63, p. 367–372, 2014.

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.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2011, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 142–150, 2010.

GLTEKIN-OZGIVEN, 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.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JALIL, Abbe Maleyki Mhd; ISMAIL, Amin. Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health?. *Molecules*, v. 13, n. 9, p. 2190–2219, 2008.

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.

ORTEGA, N.; ROMERO, M. P.; MACIA, A.; REGUANT, J.; ANGLES, N.; MORELLO, J. R. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, Washington*, v. 56, n. 20, p. 9621-9627, 2008.

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.

ŻYŻELEWICZ, D., *et al.* The effect on bioactive components and characteristics of chocolate by functionalization with raw cocoa beans. *Food Research International*, v. 113, p. 234–244, July, 2018.