

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE AMÊNDOS DE CACAU

Sarah Arruda Fiorido, Larissa Zago Barbosa, Brenda Stefani Rodrigues Silva, Ruth Vieira de Aguiar, Maria Emília Rodrigues Valente, Sérgio Henriques Saraiva.

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

Resumo

Este estudo teve como objetivo otimizar a combinação de solventes (água, metanol e acetona) que maximize a extração de compostos fenólicos totais, além de determinar o teor compostos fenólicos e a capacidade antioxidante em amêndos de cacau submetidas a distintos tempos de fermentação. A extração foi conduzida seguindo as proporções de cada solvente definido por delineamento de misturas, enquanto o teor fenólico total foi determinado pelo reagente Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH. O delineamento apontou como condição ótima para extração de fenólicos a mistura de 49% de água destilada, 45% de acetona e 6% de metanol. A análise de regressão revelou efeito significativo ($p \leq 0,05$) do tempo de fermentação sobre o teor de fenólicos total, com redução inicial seguida de estabilização. Em contrapartida, a capacidade antiodante não foi afetada pelo tempo de fermentação ($p > 0,05$).

Palavras-chave: Cacau. Fermentação. Delineamento de misturas.

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

Introdução

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é a principal matéria-prima do chocolate, alimento popular, amplamente consumido no mundo. Suas sementes são ricas em compostos bioativos, como polifenóis, incluindo flavanóis (epicatequina, catequina, procianidinas), flavonóis (quercetina e seus glicosídeos) e ácidos fenólicos (como ácido gálico), que correspondem a aproximadamente 10% do peso seco da amêndoa (Żyżelewicz *et al.*, 2018). Esses compostos apresentam propriedades fisiológicas relevantes, como ação antioxidante, anticarcinogênica e cardioprotetora, conferindo proteção contra doenças cardíacas, câncer e distúrbios neurodegenerativos (Żyżelewicz *et al.*, 2018). Entretanto, o teor de compostos fenólicos totais sofre redução durante as etapas de fermentação e secagem, processos essenciais para o desenvolvimento do sabor característico do chocolate (Hansen; Del Olmo; Burri, 1998; Efraim, 2004).

Para quantificação bruta de fenólicos, métodos colorimétricos, como o de Folin-Ciocalteu, são amplamente utilizados devido à simplicidade e alta sensibilidade (Wollgast; Anklam, 2000). Esses métodos baseiam-se na reação dos fenóis com o reagente colorimétrico (Ramirez-Sanchez *et al.*, 2010). No entanto, a quantificação precisa depende da extração prévia dos compostos, sendo os resultados sensíveis ao tipo de solvente e ao método empregado (Wollgast; Anklam, 2000).

A natureza do solvente, especialmente sua polaridade, influencia significativamente a extração de compostos fenólicos, tornando desafiadora a padronização de um método único (Martínez-Ramos *et al.*, 2020). Compostos bioativos presentes em plantas são comumente extraídos com solventes orgânicos, como etanol, metanol, acetona, éter dietílico e acetato de etila, frequentemente combinados com água. O metanol é mais eficiente para fenóis de baixo peso molecular, enquanto a acetona aquosa favorece a extração de flavanóis de maior peso molecular (Brglez Mojzer *et al.*, 2016). No caso do cacau e seus derivados, solventes como metanol, água, acetona, 2-propanol e ácido acético têm sido relatados para extração de compostos fenólicos visando quantificação.

Nesse contexto, o presente estudo objetivou determinar a combinação de água, metanol e acetona que maximize a extração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em amêndoas secas de cacau, utilizando delineamento de misturas do tipo centroide simplex com três pontos interiores. Esses solventes foram selecionados por serem os mais comumente aplicados na extração de fenólicos do cacau e derivados. Com base nos resultados obtidos pelo delineamento, foram determinados o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante em amêndoas submetidas a diferentes tempos de fermentação, avaliando-se a influência dessa etapa sobre os parâmetros analisados.

Metodologia

Para a determinação da combinação ótima de solventes foram removidas a testa e o gérmen de amêndoas de cacau secas, obtidas no município de Alegre-ES, sendo os cotilédones triturados em almofariz e desengordurados com n-hexano (1:10 m/v) conforme Gültekin-Özgüven et al. (2016).

A extração dos compostos fenólicos seguiu a metodologia de Efraim et al. (2006, 2010), com modificações. Para tanto, 0,5 g da amostra desengordurada foi homogeneizada com 25 mL da solução extratora, cuja composição foi definida por delineamento de misturas (Tabela 1). As amostras foram agitadas em vórtex, submetidas a banho ultrassônico por 30 min e centrifugadas a 4200 g por 20 min.

Tabela 1 – Proporções dos solventes na solução extratora para os diferentes tratamentos.

Tratamento	Metanol	Acetona	Água
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,3333	0,3333	0,3333
8	0,6667	0,1667	0,1667
9	0,1667	0,6667	0,1667
10	0,1667	0,1667	0,6667

Fonte: elaborado pelos autores.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado segundo Singleton e Rossi (1965), utilizando 0,6 mL de extrato, 3 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) e, após 3 min, 2,4 mL de Na₂CO₃ saturado. As amostras permaneceram 1 hora em repouso no escuro e a leitura foi realizada em 760 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por g de amostra seca.

A combinação ótima de solventes foi determinada pela metodologia de superfícies de respostas sendo validada por Análise de Regressão (ANOVA), utilizando-se o software Statística.

Esta solução foi então utilizada na preparação dos extratos para quantificação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de amêndoas submetidas a diferentes tempos de fermentação.

Para obtenção das amostras, os frutos de cacau foram colhidos no ponto de maturação adequado no setor de Fruticultura do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), campus de Alegre. Após pré-seleção e lavagem em água corrente, foram armazenados por 48 h, quebrados e as sementes, juntamente com a polpa, destinadas à fermentação. A fermentação foi conduzida em caixas de isopor perfuradas para drenagem, em condições de anaerobiose por 48 h, seguidas de revolvimento da massa a cada 24 h, de acordo com a metodologia da CEPLAC (Ferreira et al., 2013). Os tempos avaliados foram 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 h. Concluída cada fermentação, as amêndoas foram secas em estufa de bandejas a 40 °C sob fluxo de ar contínuo por 24 h, ao final da secagem foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -18 °C até as análises.

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método DPPH (Alam et al., 2013), com modificações, utilizando 0,3 mL de extrato diluído e 3,0 mL de solução DPPH (0,5 mM), em repouso por 20 min no escuro, seguida de leitura a 517 nm. Os resultados foram expressos em µmol de equivalente Trolox por g de amostra seca.

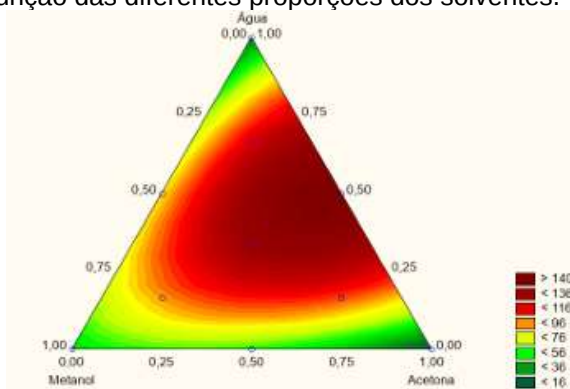
A relação entre teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante e o tempo de fermentação foi analisada por análise de regressão utilizando o software Statistica.

Resultados

O modelo cúbico especial ajustado para a variável resposta teor de compostos fenólicos, cuja equação e gráfico (Figura 1) são apresentados abaixo – onde x_1 , x_2 e x_3 são as proporções de metanol, acetona e água, respectivamente – apresentou coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9678, indicando um excelente ajuste.

$$y = 48,19x_1 + 13,85^{ns}x_2 + 25,94^{ns}x_3 + 103,27^{ns}x_1x_2 + 188,27^{ns}x_1x_3 + 519,56^*x_2x_3 + 451,28^{ns}x_1x_2x_3$$

Figura 1 – Gráfico de superfície de respostas para teor de compostos fenólicos (mg AGE/g) em função das diferentes proporções dos solventes.

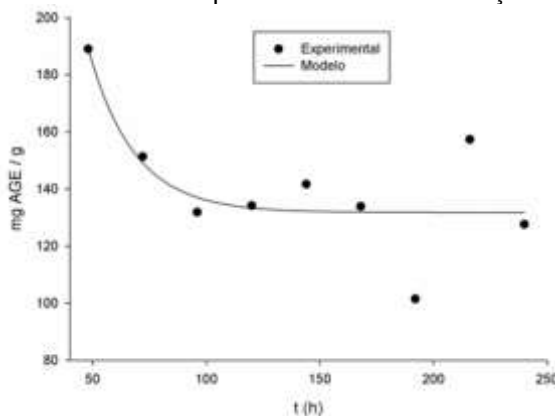


Fonte: elaborado pelos autores.

Houve efeito significativo do tempo de fermentação sobre o teor de compostos fenólicos a 5% de significância pelo teste F (ANOVA). O modelo ajustado pela análise de regressão (Figura 2), cuja equação é dada abaixo, apresentou coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,6277.

$$y = 131,7904 + 627,4559e^{-0,04977t}$$

Figura 2 – Comportamento do teor de compostos fenólicos em função do tempo de fermentação.



Fonte: elaborado pelos autores.

Não foi observado efeito significativo do tempo de fermentação sobre a capacidade antioxidante, pelo método do DPPH, a 5% de significância pelo teste F (ANOVA). Logo, a capacidade antioxidante, cuja média obtida foi de 29,4 µg TE/g, pode ser considerada constante ao longo do tempo de fermentação.

Discussão

Os resultados da otimização pelo delineamento de misturas evidenciaram que a composição do solvente exerce influência direta na eficiência de extração dos compostos fenólicos de amêndoas secas de cacau. Os compostos fenólicos são afetados pela polaridade do solvente utilizado, tornando-se um desafio quando se tenta desenvolver um método unificado de extração (MARTÍNEZ-RAMOS *et al.*, 2020).

No delineamento de misturas deste trabalho, foi encontrada a quantificação mínima de compostos fenólicos de 8,15 mgAGE/g com a combinação de solventes de 100% acetona, e a quantificação máxima de 148 mgAGE/g com a combinação de solventes de 50% acetona e 50% água destilada. A partir dos resultados obtidos, obteve-se a mistura de solventes que maximiza a extração de compostos da amostra, sendo ela composta por 49% de água destilada, 45% de acetona e 6% de metanol, sendo essa a mistura utilizada para extração dos compostos fenólicos das amêndoas de cacau submetidas a diferentes tempos de fermentação.

De acordo com os resultados do estudo realizado por Ramos-Escudero *et al.* (2021), com amêndoas de cacau comercial provenientes do Peru, o teor de polifenóis totais das amostras variou entre 19,85 e 33,39 mg GAE/g. Vale ressaltar que os autores utilizaram solução de etanol 80% como solução extratora, o que pode ter influenciado negativamente na quantidade de compostos extraídos, uma vez que os valores encontrados foram muito inferiores que os obtidos no presente estudo.

Na figura 2 é possível observar um comportamento de queda no teor de compostos fenólicos totais até as 96 horas de fermentação, seguido de um comportamento de estabilização destes compostos até o final da fermentação. No início da fermentação as sementes apresentaram teores próximos a 190 mg GAE/g e no final da fermentação, teores próximos a 130 mg GAE/g, uma redução de cerca de 32%. Este resultado é compatível com o obtido por Efraim (2010), que verificou queda de 30% de compostos fenólicos totais nas amêndoas fermentadas por 7 dias em relação às fermentadas por 3 dias.

Segundo Brito (2000), os polifenóis se localizam em células específicas do cotilédono, juntamente com as metilxantinas (cafeína e teobromina) presentes na semente de cacau. Durante a fermentação, reações bioquímicas ocasionam a morte do embrião e com isso, 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).

Ramôa Júnior (2011) observou que a capacidade antioxidante das amêndoas de cacau não apresentou variações significativas durante as primeiras 72 horas do processo fermentativo. De forma semelhante, Casotti (2024) verificou um aumento dessa capacidade nas primeiras 24 horas de fermentação, seguido por uma estabilidade relativa durante a fermentação. Comportamentos no qual se assemelham ao encontrado no presente estudo, onde verificou-se que não houve influência expressiva sobre a capacidade antioxidante das amêndoas de cacau durante o processo fermentativo.

Conclusão

Os resultados da otimização pelo delineamento de misturas evidenciaram que a composição do solvente exerce influência direta na eficiência de extração dos compostos fenólicos de amêndoas secas de cacau. A condição ótima foi obtida com a mistura de 49% de água destilada, 45% de acetona e 6% de metanol, a qual foi utilizada para a determinação do teor de fenólicos e da atividade antioxidante em amêndoas submetidas a diferentes tempos de fermentação.

Observou-se efeito significativo ($p \leq 0,05$) do tempo de fermentação sobre o teor de compostos fenólicos, caracterizado por redução inicial seguida de estabilização. Em contrapartida, não foi verificado efeito significativo sobre a capacidade antioxidante.

Referências

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.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.); e propostas de tratamentos para o melhoramento do sabor**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000. DOI: <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2000.189458>.

BRGLEZ MOJZER, E. *et al.* Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 7, 2016.

CASOTTI, B. N. **Características físico-químicas, compostos fenólicos, capacidade antioxidante e atividade da polifenoloxidase durante a fermentação de cacau (*Theobroma cacao* L.) cultivado no Espírito Santo**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2024. Disponível em: <http://repositorio.ufes.br/handle/10/17693>. Acesso em: 15 jan. 2025.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

EFRAIM, P. *et al.* 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.

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.

FERREIRA, A. C. R. *et al.* **Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade**. Ilhéus: Instituto Cabruca. 2013. 52 p.

GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M.; BERKTAŞ, I.; ÖZÇELİK, B. Change in stability of procyanidins, antioxidante capacity and *in-vitro* bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. **Food Science and Technology**, v. 72, p. 559–565, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>.

HANSEN, C. E.; DEL-OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n. 2, p. 273–281, 1998.

MARTÍNEZ-RAMOS, T. *et al.* Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 41–54, 2020.

RAMÔA JÚNIOR, A. G. A. **Comportamento cinético de compostos polifenólicos e enzimas oxidativas na fermentação de cacau da Amazônia**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2011. Disponível em: <https://ppgcta.propesp.ufpa.br/index.php/br/teses-e-dissertacoes/dissertacoes/45-2009>. Acesso em: 15 jan. 2025.

RAMOS-ESCUADERO, F. *et al.* Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidante capacity in comercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **LTW**, v. 147, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111629>.

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.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 423–447, 2000.

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