

AMINAS BIOATIVAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU

Maria Beatriz de Abreu Gloria, Valterney Deus, Adriana França - UFMG [Belo Horizonte, Mg - MG - Brasil]

Introdução

O cacau tem composição química única e complexa, sendo a matéria-prima básica para a produção de chocolate. As sementes passam por vários processos tecnológicos, incluindo a fermentação, que é uma das etapas mais importante do processamento do cacau, determinando a qualidade dos produtos à base de chocolate e cacau. Esta envolve fenômenos distintos, interdependentes: a fermentação microbiana que contribui para a eliminação da polpa mucilagínosa da semente, e as reações enzimáticas nos cotilédones, que alteram a composição química dos grãos e, em particular, promovem a formação de precursores do aroma. Estas reações são favorecidas pelo aumento da temperatura da massa e pela migração de ácido acético para a polpa do grão, interrompendo a germinação da semente (Schwan & Wheals, 2004). Dentre as atividades enzimáticas, a descarboxilase é favorecida por baixos valores de pH, como mecanismo de proteção de bactérias contra o meio ácido (Gloria, 2006; Oracz & Nebesny, 2014). Entretanto, as bactérias contaminantes também podem descarboxilar aminoácidos e formar aminas. Portanto, a fermentação e as condições sanitárias prevalentes durante o processamento do cacau podem afetar o perfil e os teores de aminas bioativas (Brito et al., 2017).

Aminas bioativas são compostos orgânicos nitrogenados de baixa massa molecular, envolvidas em diversas atividades benéficas à saúde humana. Dentre estas, as poliaminas atuam no crescimento e metabolismo celular, pela síntese de DNA, RNA e proteínas, e são importantes na maturação e recuperação da mucosa intestinal. Outras aminas apresentam atividade antioxidante, sendo benéficas à saúde e à estabilidade oxidativa do cacau e chocolate. Outras aminas são vaso ou neuroativas, sendo benéficas ao homem pela modulação do humor (Bandeira et al., 2012). Entretanto, algumas aminas, em concentrações elevadas, podem gerar sabores indesejáveis ou causar efeitos adversos à saúde humana, como prurido e reações tipo alérgicas, e enxaqueca, relacionados a histamina e tiramina, respectivamente (EFSA, 2011).

O objetivo deste estudo foi investigar as alterações no perfil e teores de aminas bioativas durante a fermentação do cacau em condições reais, em fazenda de cacau do sul da Bahia.

Material e Métodos

Sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.) foram obtidas de fazenda (14°41'96 "S e 39°12'109" W) no sul da Bahia, Brasil. A fermentação ocorreu na própria fazenda em três caixas (70x70x70 cm), com ~500 kg de sementes cada, nas mesmas condições. As caixas foram cobertas com folhas de

bananeira e estopa para permitir a fermentação natural e mantê-la aquecida. As sementes foram misturadas todos os dias para promover a aeração da massa a partir de 48 h de fermentação.

Antes da fermentação e em intervalos de 12 h a temperatura da massa foi medida e sementes de diferentes áreas da caixa foram retiradas e reunidas em amostra representativa. No laboratório, as amostras foram analisadas quanto a acidez e pH, e congeladas, liofilizadas e armazenadas para análise de aminas bioativas. A temperatura da massa de fermentação foi tomada em intervalos de 12 h (termômetro digital MT-450, MINIPA, Joinville, SC, Brasil). O pH foi analisado (pHmetro digital portátil, PHtek, Cariacica, ES, Brasil) e a acidez total titulável foi determinada (IAL, 2008).

Nove aminas bioativas livres (espermidina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina) foram determinadas por UPLC (Moreira et al., 2017). Para tal, as amostras foram extraídas com tricloroacético (TCA) 5%, agitadas e centrifugadas a 11180xg, 4 °C. Este processo foi repetido (3x), os sobrenadantes combinados e foi adicionado o padrão interno L-norvalina antes de completar o volume do balão. Para derivação, o extrato foi neutralizado com NaOH 1 mol/L e centrifugado (16.000xg, 4 °C). A 5 µL de extrato neutralizado foram adicionados 35 µL de tampão borato AccQ.Fluor® e 10 µL de reagente AQC. Após descanso, o extrato foi aquecido a 55 °C/10 min em banho-maria para completar a derivação. As amostras derivadas foram filtradas em filtros de 0,22 µm de poro (Whatman®, GE Healthcare, Reino Unido) e, analisadas. Foi usado um sistema Waters Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC™) (Waters, Milford, MA, EUA), com detector UV Acquity™ a 249 nm, coluna de fase reversa BEH C18 (50x2,1 mm, 1,7 µm, Acquity UPLC™), e gradiente de eluição de A – tampão acetato de sódio a 0,1 mol/L (pH 4,80), e B - acetonitrila, à uma vazão de 1 mL/min. O volume de injeção de amostra foi 2 µL. O software Waters Empower 2 foi utilizado para controle do UPLC e aquisição dos dados. Os teores de aminas foram calculados por interpolação nas respectivas curvas analíticas ($R^2 \geq 0,971$) e expressos em mg/kg.

Os resultados obtidos foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas (teste de Tukey, $p=0,05$). Foi realizada análise multivariada - análise de componentes principais (PCA) para caracterização das sementes durante a fermentação: Foi utilizado o software Minitab® (versão 2017.17.3.1).

Resultados e Discussão

A temperatura alcançou valor máximo a ~72 h de fermentação, característico de fermentações comerciais, e o tempo final da fermentação foi de 144 h (Tabela 1). As alterações da temperatura são oriundas das reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação do cacau. Há formação de ácido acético pelas bactérias ácido-acéticas que metabolizam etanol em processo altamente exotérmico, levando a aumento da temperatura (Schwan et al., 2014).

O pH inicial da massa foi de 6,6 e, no final do processo da fermentação, era de 4,7. Houve um aumento significativo ($p<0,05$) da acidez titulável durante o processo fermentativo, similar aos encontrados por Brito et al. (2017). De

acordo com esses resultados, a fermentação do cacau prosseguiu como esperado em um processo típico de fermentação natural.

Das nove aminas investigadas seis foram detectadas, a poliamina espermidina e as aminas biogênicas putrescina, serotonina, triptamina, tiramina e feniletilamina. Este perfil diferenciou daquele obtido na fermentação natural de cacau do Pará (Brito et al., 2017), quando apenas espermidina, espermina, triptamina, e tiramina estavam presentes.

A espermidina foi a amina predominante durante todo o processo fermentativo (Figura 1), representando cerca de 50% do teor total de aminas. A predominância de espermidina no cacau é relevante, pelo seu potencial antioxidante como agente sequestrador de radical hidroxila, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio (Kalac, 2014). A serotonina, que representava 20% do total na semente original, não foi detectada a partir de 72 h de fermentação. Por outro lado, a feniletilamina foi detectada a partir de 60 h de fermentação atingindo, no final, 20% do teor total de aminas. O aumento nos teores de feniletilamina é relevante, pois esta amina é moduladora do humor (Afoakwa, 2008). Houve também um aumento na contribuição de tiramina ao teor total. Esta amina é vaso constritora e seu acúmulo deve ser minimizado pois, em concentrações elevadas, pode causar crise hipertensiva em indivíduos em tratamento com medicamentos inibidores de monoaminaoxidase (EFSA, 2011).

Tabela 1. Temperatura, pH e acidez total titulável durante a fermentação natural de cacau

Tempo (h)	Valores médios $\pm$ desvios padrão		
	Temperatura (°C)	pH	Acidez titulável (mEq NaOH/100 g)
0	27,20 $\pm$ 0,00 ^h	6,66 $\pm$ 0,01 ^a	2,67 $\pm$ 0,20 ^{e,f}
12	30,13 $\pm$ 0,12 ^g	6,61 $\pm$ 0,02 ^a	2,27 $\pm$ 0,21 ^f
24	32,30 $\pm$ 0,20 ^f	6,66 $\pm$ 0,03 ^{a,b}	3,22 $\pm$ 0,18 ^{e,f}
36	31,90 $\pm$ 0,30 ^{f,g}	6,44 $\pm$ 0,02 ^{b,c}	3,55 $\pm$ 0,46 ^e
48	33,73 $\pm$ 1,01 ^{e,f}	6,33 $\pm$ 0,13 ^c	3,46 $\pm$ 0,18 ^{e,f}
60	34,73 $\pm$ 1,40 ^e	5,59 $\pm$ 0,02 ^d	6,40 $\pm$ 0,55 ^d
72	47,37 $\pm$ 0,25 ^a	4,98 $\pm$ 0,01 ^e	12,11 $\pm$ 0,14 ^c
84	42,97 $\pm$ 0,60 ^{c,d}	4,84 $\pm$ 0,02 ^f	14,00 $\pm$ 0,47 ^b
96	45,17 $\pm$ 0,21 ^b	4,75 $\pm$ 0,01 ^{f,g}	14,28 $\pm$ 1,12 ^{a,b}
108	42,37 $\pm$ 0,21 ^d	4,70 $\pm$ 0,02 ^g	14,83 $\pm$ 0,23 ^{a,b}
120	43,40 $\pm$ 0,44 ^{b,c,d}	4,69 $\pm$ 0,02 ^g	15,28 $\pm$ 0,19 ^a
132	44,90 $\pm$ 0,85 ^{b,c}	4,69 $\pm$ 0,02 ^g	14,50 $\pm$ 0,16 ^{a,b}
144	44,93 $\pm$ 1,19 ^{b,c}	4,73 $\pm$ 0,02 ^{f,g}	14,72 $\pm$ 0,25 ^{a,b}

n = 3.

Médias com letras diferentes na mesma coluna são diferentes (Teste de Tukey $p < 0,05$).

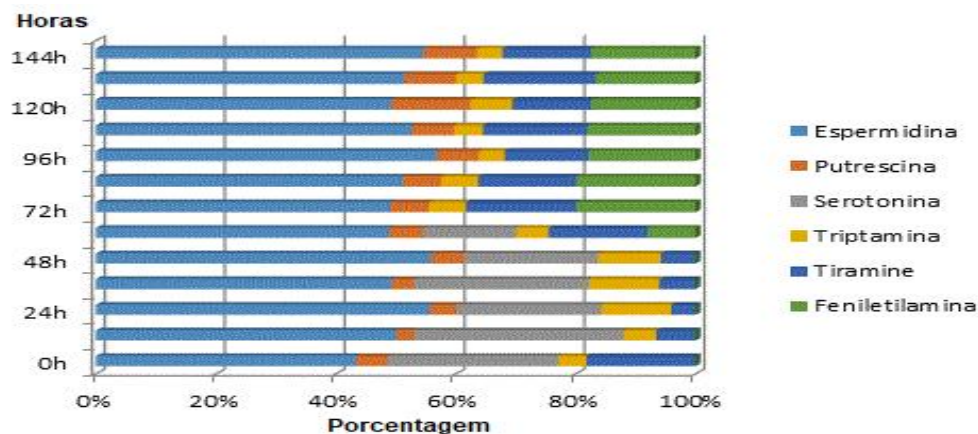
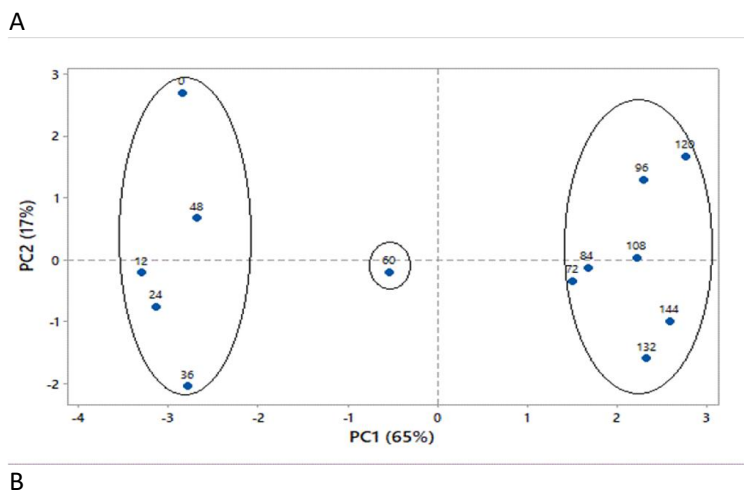


Figura 1. Contribuição dos teores de cada amina ao teor total durante a fermentação de cacau.

Na análise de componentes principais (Figura 2), os dois principais componentes representaram 82% da variância explicada. As sementes de cacau puderam ser diferenciadas em três grupos durante a fermentação. O primeiro, formado por cacau do tempo 0 a 36 h de fermentação (início), caracterizou-se pelo maior conteúdo de serotonina, triptamina e os valores de pH mais elevados. O segundo grupo, foi formado por cacau no final da fermentação, de 72 a 144 h. Este foi caracterizado pelos maiores valores de acidez, e teores de tiramina, putrescina, feniletilamina e temperatura durante a fermentação. Finalmente, o último grupo (60 h), no meio da fermentação, ficou caracterizado como atípico, podendo este tempo ser considerado como um ponto crucial de transformações físico-químicas e bioquímicas durante a fermentação do cacau.



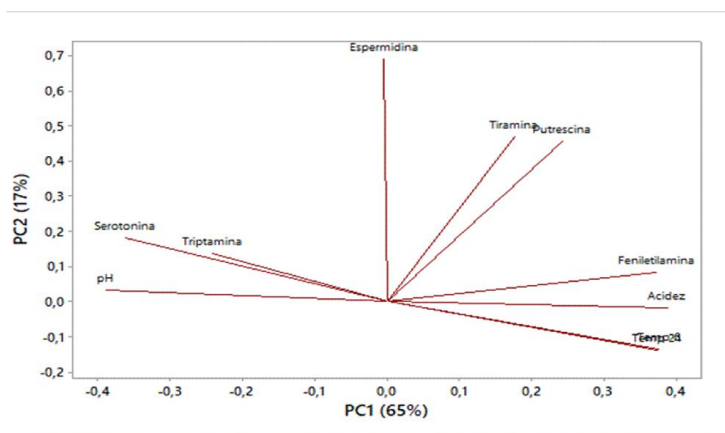


Figura 2. Análise de componentes principais – PCA para os valores médios das aminas bioativas, pH, acidez titulável e temperatura durante a fermentação do cacau.

Conclusão

Durante a fermentação natural do cacau da Bahia, houve aumento da acidez total titulável, diminuição do pH e aumento, com posterior diminuição, da temperatura. Seis aminas foram detectadas, sendo a espermidina predominante ao longo da fermentação, o que pode contribuir para a estabilidade oxidativa do cacau. O perfil e teores de aminas biogênicas alteraram durante a fermentação. Análise multivariada destes parâmetros agrupou a fermentação em três grupos. No primeiro, início da fermentação (0-48 h), o cacau teve maiores teores de triptamina, serotonina e valores de pH mais elevados. O segundo, as 60 h, há transição, com menor pH, ausência de serotonina, e surgimento da feniletilamina. Outro grupo, no final da fermentação (>72 h), o cacau fermentado exibiu maiores teores de tiramina, putrescina e feniletilamina.

Agradecimentos

A FAPEMIG, CNPq e CAPES.

Referências

- 1 - Afoakwa, E. O. Cocoa and chocolate consumption. South African Journal of Clinical Nutrition, v. 21 (3), p. 107-113, 2008.
- 2 - Bandeira, C. M.; Evangelista, W. P.; Gloria, M. B. A. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. Food Chemistry, v. 131, p. 1355-1359, 2012.



- 3 - Brito, B. N. C.; Chisté, R. C.; Pena, R. S.; Gloria, M. B. A.; Lopes, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, v. 228, p. 484-490, 2017.

- 4 - EFSA. Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. *EFSA Journal*, v. 9, n. 10, p. 2392, 2011.

- 5 - Gloria, M. B. A. Amines. In: Hui, H., Nollet, L. L. (Ed.) *Handbook of Food Science*, New York: Marcel Dekker, 2006.

- 6 - IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), p 576, 2008.

- 7 - Kalac, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*. v. 161, p. 27-39, 2014.

- 8 - Moreira, G. M. M.; Sobral, D.; Costa, R. G. B.; Paula, J. C. J.; Fernandes, C.; Gloria, M. B. A. Parâmetros de desempenho em método uhplc-uv para quantificação de aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos mussarela, prato, parmesão e gorgonzola. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 72, n. 4, p. 192-204, 2017.

- 9 - Oracz, J.; Nebesny, E. Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different Theobroma cacao cultivars. *Food Research International*, v. 55, p. 1-10, 2014.

- 10 - Schwan, R. F.; Wheals, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Food Science Nutrition*, v. 44(4), p. 205-221, 2004.

- 11 - Schwan, R. F.; Pereira, G. V. M.; Fleet, G. H. Microbial activities during cocoa fermentation. In Schwan, R. F.; Fleet, G. H. (Eds.), *Cocoa and coffee fermentations*, pp. 125–135 London: Taylor & Francis, 2014.