



XXI ENCONTRO NACIONAL E  
VII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS  
CADEIA PRODUTIVA E SEGURANÇA ALIMENTAR: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS  
26 A 30 DE MAIO DE 2019  
CENTRO DE CONVENÇÕES CENTRO SUL | FLORIANÓPOLIS | SC | BRASIL



## INFLUENCIA DA FERMENTAÇÃO NO PERFIL E TEORES DE AMINOÁCIDOS DO CACAU

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

### Introdução

O cacau é a matéria-prima básica para a produção de chocolate e, para tal, deve passar por processos tecnológicos, incluindo uma etapa de fermentação, que influencia na qualidade e sabor do chocolate (Schwan & Wheals, 2004). Durante a fermentação ocorrem diversos fenômenos advindos da ação de microrganismos e de enzimas naturalmente presentes no cacau. A fermentação microbiana favorece a eliminação da polpa mucilaginosa da semente, formação do ácido acético e ativação de enzimas proteolíticas. Estas reações levam a mudanças na composição química do cacau e causam também aumento de temperatura da massa de cacau e migração do ácido acético para os grãos, interrompendo a germinação de sementes (Schwan & Wheals, 2004). Segundo Kumarin (2018), a composição das proteínas, peptídeos e aminoácidos livres no cacau são relevantes para avaliar a qualidade da fermentação.

As proteínas correspondem a 10-15% da massa seca das sementes de cacau, sendo o segundo constituinte mais abundante, depois da gordura. Durante a fermentação, as proteínas são hidrolisadas com liberação de peptídeos e aminoácidos, os quais são precursores do sabor (Voigt et al., 1994). Por esse motivo, cacau não fermentado ou sub-fermentado não desenvolvem o sabor característico de chocolate quando torrado (D'Souza et al., 2017). De fato, os peptídeos e aminoácidos livres reagem com açúcares e polifenóis em reações de escurecimento (Maillard) durante a torrefação, contribuindo para o desenvolvimento do sabor de chocolate (John et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi investigar as alterações no perfil e teores de aminoácidos livres durante a fermentação natural comercial do cacau em fazenda na Bahia.

### Material e Métodos

Sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.) foram obtidas em fazenda (14°41'96 "S e 39°12'109" W) na Bahia, Brasil. A fermentação foi conduzida na própria fazenda em três caixas (70x70x70 cm), com 500 kg de sementes cada. As caixas foram cobertas com folhas de bananeira e estopa para permitir a fermentação natural e mantê-las aquecidas. Após 48 h de fermentação, as sementes foram misturadas todos os dias para permitir a aeração da massa. A temperatura da massa de fermentação foi medida a cada 12 h (termômetro digital MT-450, MINIPA, Joinville, SC, Brasil).

Antes da fermentação e em intervalos de 12 h, sementes de cacau de diferentes áreas de cada caixa, foram retiradas, homogeneizadas e analisadas

imediatamente quanto a acidez total titulável e pH (IAL, 2008). As amostras foram congeladas, liofilizadas (L108, Liotop, São Carlos, SP, Brasil) e armazenadas para análise de aminoácidos.

Vinte aminoácidos livres (ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cistina, fenilalanina glicina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, valina) foram determinados por UPLC (Moreira et al., 2017). As amostras foram extraídas com ácido tricloroacético (TCA) 5%, centrifugadas, filtradas, e adicionadas de padrão interno (L-norvalina) antes de se completar o volume do balão. O extrato foi neutralizado. Para derivação dos aminoácidos, foram combinados 5  $\mu$ L de extrato neutralizado, 35  $\mu$ L de tampão borato AccQ.Fluor<sup>®</sup> e 10  $\mu$ L de reagente AQC. Após descanso, o extrato foi aquecido a 55 °C/10 min para completar a reação. Antes da análise, o extrato foi filtrado (0,22  $\mu$ m, Whatman<sup>®</sup>, GE Healthcare, Reino Unido). Foi usado um sistema Waters Acquity<sup>™</sup> Ultra Performance LC (UPLC<sup>™</sup>) (Waters, Milford, MA, EUA), com detector UV Acquity<sup>™</sup> a 249 nm, coluna de fase reversa BEH C18 (50x2,1; 1,7  $\mu$ m, Acquity UPLC<sup>™</sup>), e gradiente de eluição de A – tampão acetato de sódio, 0,1 mol/L (pH 4,80), e B - acetonitrila, à uma vazão de 1 mL/min. O volume de injeção foi 2  $\mu$ L. O software Waters Empower 2 foi usado para controle do cromatógrafo e aquisição dos dados. A concentração dos aminoácidos (mg/kg) foi calculada por interpolação nas respectivas curvas analíticas ( $R^2 \geq 0,971$ ).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p=5\%$ ). Análise multivariada foi realizada para caracterização das sementes durante a fermentação: análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). Todas as análises foram realizadas com software Minitab<sup>®</sup> (versão 2017; State College, EUA).

## Resultados e Discussão

A temperatura da massa aumentou ( $p < 0,05$ ) durante a fermentação (Figura 1A) atingindo 47,4 °C em 72 h. A fermentação foi interrompida as 144 h. Houve também aumento da acidez e diminuição do pH (Figura 1B), provavelmente devido à formação de ácido acético pelas bactérias ácido acéticas em processo altamente exotérmico, levando ao aumento da temperatura (Schwan et al., 2014). Baseado nestes resultados, a fermentação do cacau prosseguiu como esperado em processos típicos de fermentação (John et al., 2016).

A

B

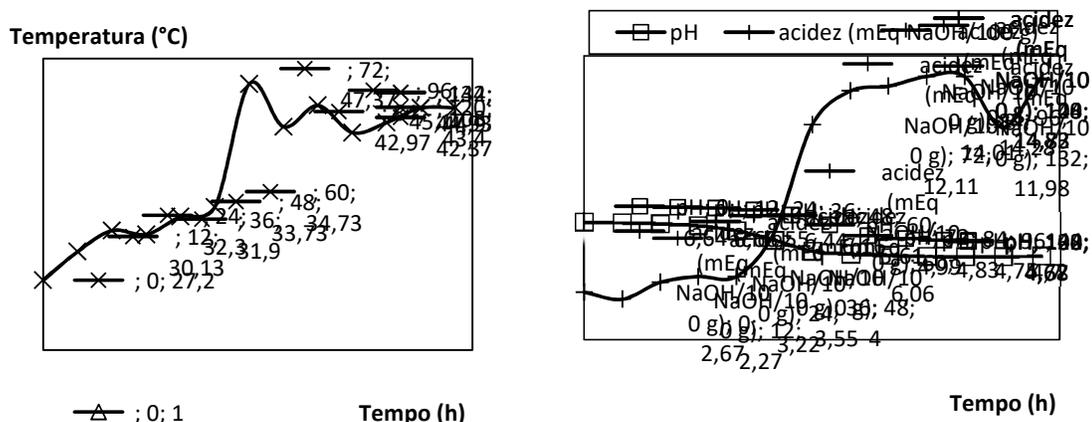


Figura 1. Alterações na temperatura (1A), no pH e na acidez total titulável (1B) durante a fermentação natural de cacau.

Dentre os 20 aminoácidos livres investigados, 14 foram detectados durante a fermentação do cacau (Figura 2A): asparagina, serina, glicina, ácido glutâmico, histidina, treonina, arginina, alanina, prolina, tirosina, valina, lisina, leucina e fenilalanina. O ácido glutâmico estava presente durante toda fermentação, sendo o aminoácido predominante (exceto as 144 h). A ocorrência dos demais aminoácidos variou, com aumento da contribuição de fenilalanina, leucina, tirosina e lisina e diminuição da contribuição de serina e asparagina, ao teor total, durante a fermentação.

Os teores de aminoácidos livres totais variou, durante o processo fermentativo, de 423,08 para 848,66 mg/kg, ou seja, houve uma duplicação dos teores. Resultados similares foram obtidos por Ho et al. (2014). Entretanto ao longo o processo fermentativo, três picos de teores totais de aminoácidos livres foram observados às 60, 108 e 132 h de fermentação (Figura 2B). Estes picos aparecem posteriormente à revolvimento da massa, sugerindo a importância deste procedimento na liberação de aminoácidos. Por outro lado, as diminuições ocorridas nos teores totais de aminoácidos durante a fermentação, podem estar relacionadas à condensação covalente destes com compostos fenólicos, ou a descarboxilação de aminoácidos e formação de aminas por bactérias, na tentativa de neutralizar o meio ácido gerado (Glória, 2006; Oracz & Nebesny, 2014).

A

B

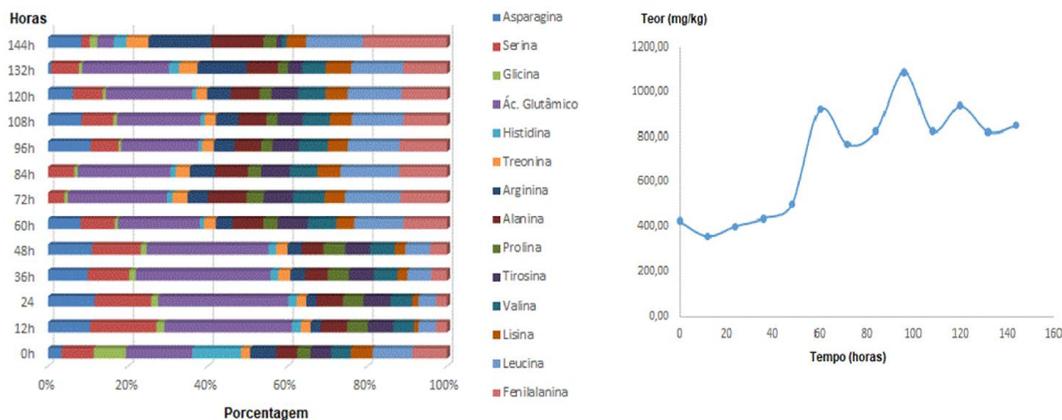
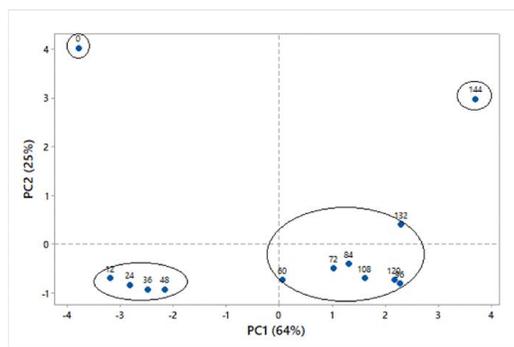


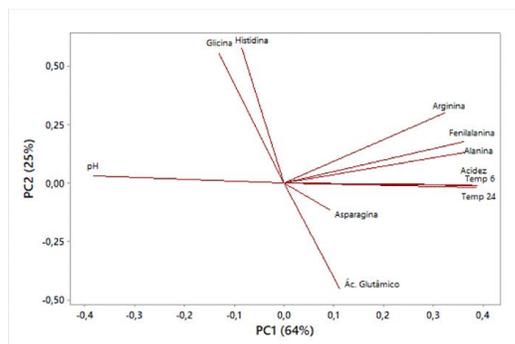
Figura 2. Contribuição dos teores de cada aminoácido ao teor total (A) e teor total de aminoácidos (B) durante a fermentação natural do cacau.

Na análise de componentes principais - PCA, dois componentes explicaram 89% da variância, e as amostras foram agrupadas em quatro grupos (Figuras 3A e 3B), o que foi confirmado pelo HCA (Figura 3 C). O cacau, antes da fermentação, ficou no canto esquerdo da PCA, caracterizada por pH mais elevado e maiores teores de glicina e histidina. O segundo grupo, formado por cacau com 12 a 48 h de fermentação, caracterizou-se pelo pH elevado e menores teores de aminoácidos. Um terceiro grupo, com 60 a 132 h de fermentação, se destacou por maiores temperatura, acidez e teores de ácido glutâmico e asparagina. Finalmente, a última amostra, 144 h de fermentação ficou destacou pela elevada acidez, e maiores teores de arginina, fenilalanina e alanina. O cacau com 60 a 132 h de fermentação teria um sabor umami, amargo e ácido; por outro lado, com 144h passaria a predominar o sabor amargo e doce.

A



B



C

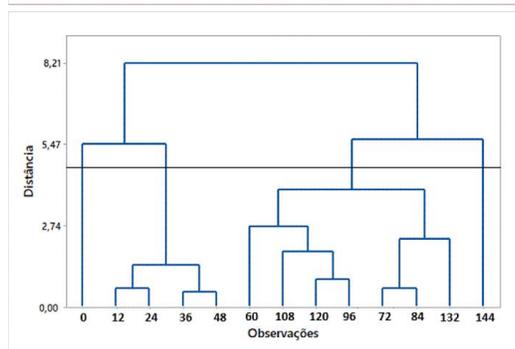


Figura 3. Análise de componentes principais – PCA (Figuras 3A e B) e análise de componentes hierárquicos – HCA (Figura 3C) para os teores médios de aminoácidos, pH, acidez titulável e temperatura durante a fermentação natural do cacau.

## Conclusão

Durante a fermentação do cacau, houve aumento da acidez, diminuição do pH, aumento de temperatura, e duplicação do teor total de aminoácidos livres. Foram 14 os aminoácidos detectados. Análise multivariada agrupou as amostras em quatro grupos distintos: (i) antes da fermentação – pH elevado e predominância de glicina e histidina; (ii) até 48 h de fermentação – pH elevado e menores teores de aminoácidos; (iii) de 60 a 132 h de fermentação – maiores temperatura, acidez e teores de ácido glutâmico e asparagina; e (iv) 144 h de fermentação – elevada acidez, e maiores teores de arginina, fenilalanina e alanina. O cacau com 60 a 132 h de fermentação teria características mais apropriadas para o produto fermentado pela menor acidez, e o sabor umami.

## Agradecimentos

A FAPEMIG, CNPq e CAPES.



XXI ENCONTRO NACIONAL E  
VII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS  
CADEIA PRODUTIVA E SEGURANÇA ALIMENTAR: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS  
26 A 30 DE MAIO DE 2019  
CENTRO DE CONVENÇÕES CENTRO SUL | FLORIANÓPOLIS | SC | BRASIL



## Referências

- 1 -D'Souza, R. N., Grimbs, S., Behrends, B., Bernaert, H., Ullrich, M. S., Kuhnert, N. Origin-based polyphenolic fingerprinting of Theobroma cacao in unfermented and fermented beans. *Food Research International*, v. 99, p. 550-559, 2017.
- 2 -Glória, M. B. A. Amines. In: Hui, H., Nollet, L. L. (Ed.) *Handbook of Food Science*, New York: Marcel Dekker, 2006.
- 3 -Ho, V. T., Zhao, J., Fleet, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 174, p. 72-87, 2014.
- 4 -IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), p 576, 2008.
- 5 -John, W. A., Kumari, N.; Böttcher, n. L., Koffi, K. J., Grimbs, S., Vrancken, G., D'Souza, R. N., Kuhnert, N., Ullrich, M. S. Aseptic artificial fermentation of cocoa beans can be fashioned to replicate the peptide profile of commercial cocoa bean fermentations. *Food Research International*, v. 89, p.764-772, 2016.
- 6 -Kumari, N., et al. Origin and varietal based proteomic and peptidomic fingerprinting of Theobroma cacao in non-fermented and fermented cocoa beans. *Food Research International*, v. 111, p. 137-147, 2018.
- 7 -Moreira, G. M. M.; Sobral, D., Costa, R. G. B.; Paula, J. C. J., Fernandes, C., Glória, 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 ILCT*, v. 72, n. 4, p. 192-204, 2017.
- 8 -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.
- 9 -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.
- 10 -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.
- 11 -Voigt, J. et al. Partial purification and characterisation of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components. **Food Chemistry**, v. 192, p. 706-713, 2016.