

Oliveira, BF, Nascimento, CP, Dantas, CEA, Lima, IVS, Sarmento, DA, Silva, MS. & Farias, VL. (2020). Effect of enzymatic treatment on CCN-51 clone cacao pulping: physicochemical characteristics, polyphenols content and antioxidant activity. *Research, Society and Development*. 9(7):1-21. e142973999.

**Efeito do tratamento enzimático no despulpamento de cacaos do clone CCN-51:
características físico-químicas, teor de polifenóis e atividade antioxidante**

**Effect of enzymatic treatment on CCN-51 clone cacao pulping: physicochemical
characteristics, polyphenols content and antioxidant activity**

**Efecto del tratamiento enzimático en la pulpa de cacao del clon CCN-51: características
físicoquímicas, contenido de polifenoles y actividad antioxidante**

Recebido: 27/04/2020 | Revisado: 27/04/2020 | Aceito: 28/04/2020 | Publicado: 05/05/2020

Bruno Felipe de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0518-9768>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: brunofoliveira014@gmail.com

Candido Pereira do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0565-556X>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: nascimento.cpe@gmail.com

Carlos Eduardo Alves Dantas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2113-2152>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: carlos.dantas@ufcg.edu.br

Ingrid Vitória Sousa Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7405-8975>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: diivitoria@gmail.com

Diogenes Abrantes Sarmento

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3157-8951>

Empresa D. H. Abrantes ME

E-mail: dabrantess01@yahoo.com.br

Mayara Salgado Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8739-836X>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: silvams@ifce.edu.br

Virna Luiza de Farias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1459-7525>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Brasil

E-mail: virna@ifce.edu.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da maceração enzimática com pectinases na polpa de cacau do clone CCN-51, por meio do rendimento, dos aspectos físico-químicos, do teor de polifenóis e da atividade antioxidante da polpa de cacau diluída (PCD) resultante. Foram conduzidos três tratamentos. No tratamento T1, à polpa foi acrescida água na proporção de 1:3 (m/v) e o complexo enzimático Pectinex ULTRA SP-L, sendo a mistura mantida a 45 °C por 15 minutos sob agitação; no T2 não houve adição de enzimas e no T3 a polpa foi extraída manualmente. As PCD foram submetidas às análises físico-químicas de pH, acidez, cor, umidade, cinzas, lipídios, proteínas e açúcares redutores; além do teor de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante pelos métodos dos radicais ABTS⁺ e DPPH. T3 apresentou o maior rendimento (32,04%), entretanto a presença da enzima aumentou em mais de 100% o valor (T1 = 22,45%) quando comparado ao controle (T2 = 11,18%). T1 apresentou o menor pH (3,39) e a maior acidez (0,10%). O tratamento enzimático não alterou os parâmetros de cor da PCD quando comparado ao processo manual. Os métodos de extração não influenciaram significativamente a composição centesimal dos PCD. O teor de polifenóis foi maior em T1 (7,47 mg/100 g), que também apresentou a melhor atividade antioxidante pelos dois métodos avaliados. Pode-se concluir que o tratamento enzimático teve influência positiva no rendimento, na extração de polifenóis e na atividade antioxidante da polpa diluída de cacau.

Palavras-chaves: *Theobroma cacao* L.; Maceração enzimática; Composição centesimal; ABTS; DPPH.

Abstract

The objective of the present work was to evaluate the influence of enzymatic maceration with pectinases on CCN-51 clone cocoa pulp, by means of yield, physicochemical aspects,

polyphenol content, and antioxidant activity of diluted cocoa pulp (PCD). Three treatments were conducted. In the T1 treatment, the pulp was added water in the proportion of 1: 3 (m / v) and the Pectinex ULTRA SP-L enzyme complex, the mixture being kept at 45 °C for 15 minutes under agitation; in T2 there was no enzymes addition and in T3 the pulp was extracted manually. The PCD were subjected to physicochemical analyzes of pH, acidity, color, moisture, ash, lipids, proteins and reducing sugars; in addition to the content of total extractable polyphenols and antioxidant activity by the radicals ABTS^{•+} and DPPH methods. T3 showed the highest yield (32.04%), however the presence of the enzyme increased the value by more than 100% (T1 = 22.45%) when compared to the control (T2 = 11.18%). T1 showed the lowest pH (3.39) and the highest acidity (0.10%). The enzymatic treatment did not change the color parameters of the PCD when compared to the manual process. The extraction methods did not significantly influence the chemical composition of the PCD. The content of polyphenols was higher for T1 (7.47 mg / 100 g), which also showed the best antioxidant activity by the two methods evaluated. It can be concluded that the enzymatic treatment had a positive influence on the yield, on the extraction of polyphenols and on the antioxidant activity of the diluted cocoa pulp.

Keywords: *Theobroma cacao* L.; Enzymatic maceration; Centesimal composition; ABTS; DPPH.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la maceración enzimática con pectinasas en la pulpa de cacao del clon CCN-51, a través del rendimiento, aspectos fisicoquímicos, contenido de polifenoles y actividad antioxidante de la pulpa de cacao diluida. (PCD) resultante. Se realizaron tres tratamientos. En el tratamiento T1, a la pulpa se le añadió agua en una proporción de 1: 3 (m / v) y el complejo enzimático Pectinex ULTRA SP-L, la mezcla se mantuvo a 45 °C durante 15 minutos bajo agitación; en T2 no hubo adición de enzimas y en T3 la pulpa se extrajo manualmente. Las PCD se sometieron a análisis físico-químicos de pH, acidez, color, humedad, cenizas, lípidos, proteínas y azúcares reductores; además del contenido de polifenoles extraíbles totales y actividad antioxidante por los métodos de los radicales ABTS^{•+} y DPPH. T3 mostró el mayor rendimiento (32.04%), sin embargo, la presencia de la enzima aumentó el valor en más del 100% (T1 = 22.45%) en comparación con el control (T2 = 11.18%). T1 mostró el pH más bajo (3.39) y la acidez más alta (0,10%). El tratamiento enzimático no cambió los parámetros de color de la PCD en comparación con el proceso manual. Los métodos de extracción no influyeron

significativamente en la composición química de la PCD. El contenido de polifenoles fue mayor en T1 (7.47 mg / 100 g), que también mostró la mejor actividad antioxidante por los dos métodos evaluados. Se puede concluir que el tratamiento enzimático tuvo una influencia positiva en el rendimiento, en la extracción de polifenoles y en la actividad antioxidante de la pulpa de cacao diluida.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L.; Maceración enzimática; Composición aproximada; ABTS; DPPH.

1. Introdução

O cacau, que tem como nome científico *Theobroma cacao* L., é uma espécie originária da Bacia Amazônica e é encontrada com facilidade em diversas regiões tropicais, sendo produzida em mais de 20 países. Pertencente à família Malvaceae, esta planta é um potencial gerador de renda, visto que maior parte da produção dos frutos é destinada à elaboração do chocolate (Gardea et al., 2017).

O processamento do cacau para a produção de chocolate gera uma quantidade significativa de resíduos pós-colheita, dentre os quais destaca-se a polpa, também chamada de mucilagem (Santos, Bispo, Santana, & Carvalho, 2014), que apesar de servir de substrato para o processo fermentativo, pode ser extraída da semente na proporção de até 20%, tornando o processo fermentativo mais eficiente (Schwan & López, 1988). A polpa de cacau possui um grande potencial e pode ser utilizada para a obtenção de produtos de alto valor agregado (Vásquez et al., 2019), entretanto, a fim de viabilizar a exploração da polpa, é necessário que sua extração seja aprimorada.

O uso de enzimas para auxiliar a extração de polpas de fruta é um exemplo de técnica adotada pela indústria, especialmente pelo fato delas melhorarem a eficiência do processo (Sharma, Patel, & Sharma, 2014). Pectinases é um conjunto de enzimas importantes para a indústria alimentícia, que vêm sendo utilizadas desde os anos 1930. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de substâncias pécicas encontradas na parede das células vegetais (Uenojo, & Pastore, 2007).

No Brasil, apesar do comércio de cacau ter destaque para produção de chocolate (Alexandre, Chagas, Marques, Costa, & Cardoso, 2015), a produção também pode ser destinada à extração de polpa. A partir da polpa é possível elaborar sucos, bebidas destiladas, geleias, entre outros produtos comestíveis (Gardea et al., 2017, Gonçalves, 2014).

Assim, as pectinases, que são muito utilizadas pela indústria de sucos e vinhos, na

maceração de tecidos vegetais, na melhoria da eficiência de filtração e clarificação dos sucos e até para a remoção do amargor em cascas de frutas cítricas (Uenojo, & Pastore, 2007) podem ser utilizadas para aumentar o rendimento em polpa de cacau, por facilitar a separação da mucilagem aderida às sementes.

Dentre os clones de cacau utilizados, o CCN-51 (*Colección Castro Naranjal*), que possui origem equatoriana e alta produtividade, se destaca por produzir duas vezes por ano após o plantio no campo e ser mais resistente a pragas e doenças.

Essas características se devem ao fato de ter sido desenvolvido durante no combate à vassoura-de-bruxa, doença causada por um fungo basidiomiceto, que atingiu o Brasil inicialmente nas décadas de 80 e 90, causando muitas perdas de produção do plantio de cacau (Gonçalves, 2014, Oliveira, & Luz, 2005).

Visando obter condições práticas de separação da polpa das amêndoas do cacau, este trabalho consiste na avaliação do efeito da Pectinex Ultra SP-L no despulpamento de cacau da variedade CCN-51, caracterizando e comparando a polpa diluída obtida quanto aos aspectos físico-químicos e características bioativas.

2. Metodologia

O trabalho se trata de uma pesquisa aplicada de natureza experimental e abordagem quantitativa. Quanto aos objetivos, a pesquisa é explicativa, pois busca verificar relações de causa e efeito a partir de dados coletados em laboratório com o propósito de avaliar o impacto da aplicação de enzimas nas características físico-químicas, no conteúdo de compostos bioativos e na atividade antioxidante de polpa cacau, mediante a obtenção de dados numéricos e avaliação estatística (Cervo, Bervian, & Silva, 2007, Pereira, Shitsuka, Parreira, & Shitsuka, 2018).

2.1 Reagentes e solventes

Foram utilizados padrões e reagentes de grau analítico. As soluções também foram preparadas utilizando-se reagentes de grau analítico.

Folin Ciocalteu, padrão Ácido gálico monohidratado, Carbonato de sódio anidro, Álcool metílico, Álcool etílico, Acetona e Persulfato de potássio foram adquiridos da Dinâmica. Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), DPPH (2,2-

Difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foram obtidos da Sigma. Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi obtido da Vetec.

Utilizou-se a preparação enzimática Pectinex[®] Ultra SP-L, da Novozymes, com atividade declarada de poligalacturonase (Novozymes, 2015).

2.2 Obtenção dos frutos

Os frutos de cacau do CCN-51 foram obtidos por doação pela empresa Agrícola Formosa, localizada no Perímetro Irrigado Tabuleiro de Russas, Limoeiro do Norte – CE, e encaminhados à Planta de Processamento de Frutos e Hortaliças do Instituto Federal do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte.

2.3 Processamento dos frutos e obtenção das polpas de cacau diluídas

Os frutos completamente maduros foram selecionados, higienizados e sanitizados com solução clorada a 100 mg/L por 15 minutos. Após enxágue, procedeu-se a quebra da casca para obtenção manual da polpa juntamente com as sementes de cacau, que foram acondicionadas em sacos selados de polietileno e congeladas a -18 °C até o momento dos experimentos.

Foram realizados três tratamentos, em triplicata real, de despulpamento. Para isso, 50 g de sementes com a mucilagem foram pesadas em béquer de 600 mL e acrescidas de água destilada na proporção de 1:3 (sementes com mucilagem : água).

Em seguida, procedeu-se a mistura a 45 °C por 15 minutos sob agitação a 100 rpm em um agitador mecânico IKA[®], modelo RW 20 digital, de modo que três tratamentos foram aplicados: o tratamento T1 foi adicionado de 500 µL de Pectinex Ultra SP-L[®]; no tratamento T2 não foram adicionadas enzimas, sendo considerado um controle; e o tratamento T3, por sua vez, não foi submetido à agitação mecânica e ao aquecimento.

Faz-se o despulpamento manual das sementes em presença de água, com auxílio de uma peneira de nylon, simulando um processamento convencional, obtendo-se a polpa diluída. Em T2 e T3, a polpa diluída consistiu no líquido que permaneceu no béquer após remoção das sementes com auxílio de uma espátula, ao final do tempo de agitação.

A polpa de cacau diluída (PCD) obtida de cada tratamento foi pesada para cálculo do rendimento.

2.4 Rendimento em polpa de cacau diluída

O rendimento consistiu na polpa que foi liberada das sementes para a água adicionada inicialmente, e foi calculado utilizando as massas obtidas, conforme Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = [(\text{Polpa de cacau diluída} - \text{Água}) / \text{Água}] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

2.5 Caracterização da polpa de cacau diluída

Para a caracterização físico-química das PCD realizou-se, em triplicata, as análises de umidade em estufa a 105 °C até peso constante, cinzas por incineração a 600 °C, lipídeos totais por Bligh-Dyer, acidez total titulável (g/100 g de ácido cítrico) e pH com auxílio de um pHmetro portátil (Kasvi, modelo K39-0014pa), seguindo as metodologias do Instituto Adolfo Lutz (2008). Determinou-se também o nitrogênio total convertido em proteína bruta pelo método Kjeldhal, segundo AOAC (2005) e açúcares redutores pela técnica espectrofotométrica do DNS, segundo metodologia descrita por Miller (1959).

A análise instrumental da cor foi realizada em colorímetro portátil (Hunter Lab, modelo MINISCAN EZ-MSEZ0506), mensurando-se as coordenadas L*, a* e b*, onde L* consiste na luminosidade, que varia, em uma escala de 0 a 100, de preto a branco; a* varia de -60 a +60, sendo os valores negativos mais próximos do verde, enquanto os positivos tendem ao vermelho; e b* varia de -60 a +60, sendo os valores negativos mais próximos do azul, enquanto os positivos tendem ao amarelo. A partir dessas coordenadas foram calculados os valores de cromaticidade (C*) e o ângulo hue (°H), de acordo com McGuire (1992). C* é a saturação da cor e varia de zero e aumenta à medida em que se distancia do centro do espaço CIELAB; enquanto o ângulo hue (°H) é a tonalidade, iniciando no eixo +a*.

2.6 Preparo do extrato para as análises de compostos bioativos e atividade antioxidante

Foram avaliadas a concentração de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante das polpas de cacau diluídas (PCD) a partir da elaboração de extratos metanólicos/acetônicos, conforme as metodologias de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997) e Obanda e Owuor (1977). Foram pesados 50 g da PCD e adicionados 25 mL de

metanol 50%, aguardou-se 60 minutos em repouso e seguiu-se com a centrifugação (5000 rpm / 15 minutos) (Eppendorf 5804), onde o sobrenadante foi transferido para balão âmbar de 100 mL. Ao resíduo da centrifugação foram adicionados 25 mL de acetona 70% e seguiram-se os procedimentos anteriores, transferindo o novo sobrenadante para o mesmo balão volumétrico âmbar de 100 mL que continha o sobrenadante anterior. O volume do balão foi aferido com água destilada.

2.6.1 Polifenóis Extraíveis Totais (PET)

Os polifenóis extraíveis totais foram determinados segundo a metodologia de Larrauri et al. (1997). Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de extrato diluído, 1 mL do reativo Fenol Folin Ciocalteau (1:3), 2 mL de carbonato de sódio anidro 20% e 2 mL de água destilada. Para o branco, adicionou-se água destilada ao invés da amostra, acrescentando todos os reagentes citados. Os tubos foram agitados em vortex (EEQ9033, Edultec), deixados em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (600 Plus, Femto) a 700 nm. A curva padrão foi construída com solução padrão de ácido gálico (0; 10; 20; 30; 40; 50 mg/L). Os resultados foram expressos em µg/g.

2.6.2 Atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre ABTS^{•+}

O método de captura do radical livre 2,2-azinobis (3-etilbenzolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) conforme descrito por Rufino et al. (2010) foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante das amostras.

Preparou-se o radical ABTS por meio da reação de 5 ml da solução estoque de ABTS (3,84 mg/ml) com 88 µl de uma solução de persulfato de potássio (37,84 mg/ml), que foi mantida em ambiente escuro por 16 horas. Após esse tempo, a solução do radical foi diluída em álcool etílico até à absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Foram preparadas três diluições dos extratos, e alíquotas de 30 µL dessas diluições foram transferidas para tubos de ensaio, acrescidas de 3 ml do radical preparado anteriormente. Os tubos de ensaio foram homogeneizados em vortex (EEQ9033, Edultec) e aguardou-se 6 minutos até a leitura em espectrofotômetro (600 Plus, Femto) a 734 nm para obtenção da absorbância. Álcool etílico foi utilizado como branco. Utilizou-se uma curva padrão com concentrações de 100 a 1.500 µM a partir de uma solução padrão de Trolox para determinar o potencial antioxidante das amostras, pela capacidade de reduzir o radical ABTS.

2.6.3 Atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH

A atividade antioxidante das amostras pelo método de sequestro de radical livre DPPH foi determinada segundo a metodologia de Rufino et al. (2010).

A tubos de ensaio contendo 3,9 mL de radical DPPH (0,06 mM) foi adicionado 0,1 mL dos extratos obtidos das amostras em três concentrações diferentes e em seguida os tubos foram homogeneizados em vortex (EEQ9033, Edultec). Para o controle utilizou-se o mesmo volume de radical DPPH com 0,1 mL de solução controle (solução controle de álcool metílico, acetona e água). As leituras foram monitoradas a cada minuto, observando-se o decréscimo da absorbância do radical DPPH a 517 nm até sua estabilização. Metanol foi utilizado como branco. A atividade antioxidante foi expressa em g PCD/g DPPH, chamada de EC₅₀, que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH.

2.7 Análise dos dados

Os valores obtidos nas análises de caracterização foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* STATISTICA, versão 7.0 (STATSOFT, 2007).

3. Resultados e Discussão

3.1 Rendimento e características físico-químicas das polpas diluídas

A polpa diluída pode ser utilizada como base para a elaboração de néctar de cacau, por isso o rendimento é um parâmetro importante na avaliação dos tratamentos, indicando a obtenção de um néctar com mais polpa quanto maior for o rendimento em PCD. A partir da Tabela 1 é possível observar que o tratamento T3, que consistiu no despulpamento manual, apresentou rendimento significativamente maior ($p < 0,05$), que se justifica pela força mecânica empregada no processo.

Com relação aos tratamentos sem a força mecânica, o uso do complexo enzimático aumentou o rendimento em 100,8% comparado com o controle, e proporcionou menor quantidade de resíduos aderidos às sementes, comprovando a eficiência da enzima. Isso se

deve à composição da preparação enzimática utilizada, que por ser constituída principalmente por pectinase, atua na pectina presente na parede celular vegetal (Uenojo, & Pastore, 2007).

Tabela 1. Rendimento, pH, acidez e cor instrumental das polpas de cacau diluídas obtidas por diferentes métodos de extração.

Parâmetros	Tratamentos		
	T1	T2	T3
Rendimento (%)	22,45 ± 1,89 ^{ab}	11,18 ± 7,35 ^b	32,04 ± 3,11 ^a
pH	3,29 ± 0,11 ^c	3,93 ± 0,02 ^a	3,74 ± 0,01 ^b
Acidez (g/100 g ác. cítrico)	0,10 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,00 ^b	0,07 ± 0,00 ^b
L*	53,64 ± 1,76 ^b	59,00 ± 2,61 ^a	52,34 ± 2,19 ^b
C*	2,08 ± 1,02 ^a	2,16 ± 1,02 ^a	2,38 ± 1,50 ^a
°H	101,37 ± 9,99 ^a	67,42 ± 9,46 ^b	103,83 ± 15,26 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey

T1= sementes + água + Pectinex ULTRA SP-L; T2= sementes + água; T3= sementes + água + despulpamento manual

L* = Luminosidade; C* = Cromaticidade; °H = Tonalidade.

Fonte: autores.

Ainda assim o despulpamento manual apresentou rendimento 42,7% maior do que quando as enzimas foram adicionadas, entretanto este método envolve maior manipulação, aumentando assim o risco de contaminação na indústria (Kamala & Kumar, 2018). Paralelamente, a aplicação de enzimas mostrou-se promissora e esse processo pode ser aprimorado a fim de ser obter maior rendimento.

Segundo Alexandre, Chagas, Marques, Costa & Cardoso (2015), a quantidade de resíduos gerados, principalmente bagaços e outras perdas, estão diretamente relacionados às concentrações de preparados enzimáticos utilizados, isto é, quanto maior a concentração, menor a quantidade de resíduos. Assim, o processo pode ser melhorado, em termos de rendimento, adequando-se a quantidade de enzima adicionada. É importante ressaltar que tanto o despulpamento manual quanto o enzimático envolve custos de diferentes naturezas, sendo o primeiro com mão-de-obra e o segundo com enzimas, por isso o custo-benefício deve ser avaliado.

A amostra T1 apresentou o menor valor de pH, seguida de T3 e T2, sendo observadas diferenças significativas entre todos os tratamentos, conforme a Tabela 1. O complexo enzimático aplicado contém pectinases do tipo pectinametilesterase, que desmetoxilam ácidos galacturônicos da pectina, aumentando a acidez, e consequentemente, reduzindo o pH, o que justifica o menor pH e maior acidez no tratamento submetido à maceração enzimática.

Resultados próximos de pH (3,19 e 3,31) foram encontrados por Alexandre et al. (2015) em clones de cacau PS 1319 e TSH 1188, respectivamente.

Para Franco & Landgraf (2008), cada microrganismo tem um pH mínimo, ótimo e máximo de crescimento, de tal maneira que as células microbianas são substancialmente afetadas pelo pH dos alimentos. A maioria dos microrganismos cresce bem em pH próximos a neutralidade (6,6 – 7,5) e poucos têm capacidade de desenvolver-se em valores de pH inferiores a 4,0. As amostras apresentaram valores de pH abaixo de 4,0, sendo consideradas ácidas, o que dificulta o crescimento microbiano. A acidez total titulável expressa em ácido cítrico dos PCD obtidos pode ser considerada baixa, em que T1 destacou-se com 0,10 g/100 g \pm 0,01, enquanto T2 e T3 obtiveram 0,07 g/100 g \pm 0,00. Os resultados obtidos mostram que não há diferença entre T2 e T3, aos quais não foi adicionado o complexo enzimático.

Gardea et al. (2017) cita que a acidez total está relacionada ao grau de maturação da fruta e, geralmente, no início da colheita, quando as frutas não atingiram ainda um grau de maturação desejável, os frutos apresentam teor elevado de acidez e com o aumento do grau de maturação, vários ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico e ácido acético são consumidos, fazendo com que a acidez diminua. Ao estudar sobre cacau, esse autor encontrou valores de 3,75 para o pH, e observou alto valor para a acidez, relacionando o baixo pH e a alta acidez total. Os ácidos preservam a cor, o sabor e as características sensoriais da polpa, além de auxiliarem na preservação de contaminação bacteriana.

Como a luminosidade (L^*) varia de 0 a 100, sendo mais clara a amostra quanto mais próxima de 100, os tratamentos apresentaram luminosidade mediana, variando de 52,34 \pm 2,19 (T3) a 59,00 \pm 2,61 (T2). A cromaticidade ($*C$), com valores de próximos a 2 em todos os tratamentos, indicou baixa pureza cor, pois segundo Ferreira e Spricigo (2017) o valor desse parâmetro está diretamente relacionado à saturação das cores perceptíveis aos humanos, e cores neutras possuem baixa saturação e são menos brilhantes na percepção humana, enquanto as de maior cromaticidade são mais puras.

A matiz ou ângulo hue é o atributo pelo qual as cores geralmente são definidas como esverdeadas e avermelhadas (Fernández-Vázquez, Stinco, Hernanz, Heredia, & Vicario, 2013). Ângulos de 0° e 90°, por exemplo, indicam vermelho e amarelo puros (Alizadeh, Mortezapour, Akhavan, & Balvardi, 2019), sendo assim, as amostras apresentaram tonalidades amareladas em T1 (101,37 \pm 9,99) e T3 (103,83 \pm 15,26), e alaranjadas em T2 (67,42 \pm 9,46). Essa diferença do T2 para os demais tratamentos foi notada visualmente, onde se observou uma coloração amarronzada, provavelmente resultante de reações de

escurecimento enzimático, especialmente por ação de peroxidases, cuja atividade é maior do que a de polifenoloxidasas na polpa de cacau (Paz, 2010).

Avaliando amostras comerciais de polpa de cupuaçu de três marcas comercializadas em São Paulo, Freire et al. (2009) encontraram diferença entre os valores de L*, a* e b* das amostras, sendo as de polpa pasteurizada as que apresentaram maiores valores para b* (coloração amarelada). Por conta disso, os autores sugeriram uma relação da mudança de cor com os diferentes tipos de extração e tratamentos térmicos utilizados pelas indústrias fornecedoras das polpas. Assim, a distinção de cor observada entre as PCD pode ser decorrente dos também distintos métodos de extração de polpa empregados neste estudo. A cor, apesar de não ter influência direta nas condições sanitárias do produto, é um fator que pode implicar em sua rejeição pelo mercado consumidor. Por isso é importante destacar que a maceração enzimática não promoveu alterações negativas nos parâmetros de cor da polpa.

Os resultados referentes à composição centesimal PCD podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Composição centesimal das polpas de cacau diluídas obtidas por diferentes métodos de extração.

Parâmetros	Tratamentos		
	T1	T2	T3
Umidade (g/100 g)	98,10 ^a ± 0,32	98,32 ^a ± 0,14	98,41 ^a ± 0,06
Proteínas (g/100 g)	0,28 ^a ± 0,02	0,27 ^a ± 0,02	0,27 ^a ± 0,01
Lipídios (g/100 g)	0,02 ^a ± 0,00	0,03 ^a ± 0,02	0,01 ^a ± 0,00
Cinzas (g/100 g)	0,04 ^a ± 0,01	0,04 ^a ± 0,02	0,05 ^a ± 0,00
Açúcares redutores (g/100 g)	1,43 ^a ± 0,30	1,24 ^a ± 0,15	1,43 ^a ± 0,32

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey.

T1= sementes + água + Pectinex ULTRA SP-L; T2= sementes + água; T3= sementes + água + despolpamento manual

Fonte: Autores

Não foram constatadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos em nenhum dos parâmetros em questão. Os teores de umidade foram os que apresentaram maiores médias em relação aos demais parâmetros, variando de 98,10 a 98,41 g/100g. Tais resultados podem ser explicados em função da mistura inicial das sementes contendo a mucilagem com água, na proporção de 1:3, elevando o teor de umidade nas amostras.

Em um estudo sobre a caracterização da polpa de diferentes clones de cacau cultivadas na região do Vale do Jaguaribe – Ceará, Moreira (2017) encontrou um valor médio de 78,77 g/100 g para umidade do clone CCN-51, o mesmo utilizado nesta pesquisa.

Quanto ao teor de proteínas, foram constatadas baixas concentrações nas PDC, com médias variando de 0,27 a 0,28 g/100 g. Concentrações relativamente superiores foram reportadas em polpas de cacau *in natura* comercializadas na região Sudeste da Bahia, cujos resultados médios oscilaram entre 0,73 e 1,13 g/100 g (Penha, Matta, 1988).

Dentre os parâmetros avaliados na composição centesimal, os valores referentes aos lipídios são os mais baixos em relação aos demais, estando presentes em concentrações de 0,01 a 0,03 g/100 g nos PCD. Estes resultados são inferiores à concentração de 1,28 g/100 g verificada na polpa de cacau do clone CCN51 estudada por Moreira (2017).

No que diz respeito aos resultados de cinzas, os extratos apresentaram valores médios de 0,04 a 0,05 g/100 g. As cinzas correspondem ao conteúdo mineral presente nos alimentos (Gomes, & Oliveira, 2011). Os resultados apresentaram-se inferiores àqueles reportados por Moreira (2017) e pela TACO (2011) para o clone CCN51 e para o cacau *in natura*, com valores de 0,35 e 0,30 g/100 g, respectivamente.

No que compete aos açúcares redutores das PCD, suas concentrações médias variaram de 1,24 a 1,43 g/100 g, diferentemente do estudo de Dias, Schwan, Freire e Serôdio (2007) em polpa de cacau, onde detectaram em torno de 10,70 g/100 g. O maior valor de umidade e os menores teores de proteínas, lipídeos, cinzas e açúcares redutores encontrados no presente trabalho se justifica pelo fato de se tratar de polpas diluídas em água, enquanto os estudos mencionados avaliaram polpas integrais, sem nenhuma diluição prévia.

3.2 Atividade antioxidante

Os resultados das análises de Polifenóis Extraíveis Totais (PET), atividade antioxidante pela captura do radical livre ABTS^{•+} e pela captura do radical livre DPPH estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante polpas de cacau diluídas obtidas por diferentes métodos de extração.

Parâmetros	Tratamentos		
	T1	T2	T3
PET (mg/100 g)	7,47 ^a ± 0,62	6,74 ^a ± 0,53	5,36 ^b ± 0,37
ABTS (µM Trolox/ g)	6,70 ^a ± 0,01	6,47 ^{ab} ± 0,34	5,84 ^b ± 0,06
DPPH (g/g DPPH)	7277,51 ^c ± 34,33	11219,67 ^b ± 14,30	12105,59 ^a ± 37,19

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey.

T1= sementes + água + Pectinex ULTRA SP-L; T2= sementes + água; T3= sementes + água + despolpamento manual

Fonte: Autores

O T3 (despolpamento manual) apresentou menor concentração de PET, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos demais tratamentos, evidenciando que o tratamento enzimático e a agitação mecânica foram mais eficientes na extração destes compostos da polpa de cacau.

As PCD submetidas aos tratamentos T1 e T2 apresentaram conteúdo de polifenóis próximo ao encontrado na casca do cacau, em torno de 7 mg/100 g (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018). Entretanto, Dos Santos (2018), ao utilizar o mesmo método de extração de polifenóis, detectou concentração superior (40 mg/100 mL) em suco de cacau com 34% (m/v) de polpa, preparado a partir de frutos adquiridos do comércio de Imperatriz-MA, o que pode indicar influência da região de obtenção dos frutos, ou ainda uma maior diluição das polpas avaliadas no presente estudo.

Ao grupo dos polifenóis são atribuídos diversos benefícios à saúde, como diminuição do risco de câncer, efeitos antienvhecimento e anti-inflamatório, bem como a redução do risco de desenvolvimento de doenças cardíacas, por meio de sua atuação em diversos mecanismos como a expressão genética e a apoptose. Estudos mostram ainda que os polifenóis presentes no cacau possuem influência na carcinogênese, pois atuam modulando alguns genes associados ao câncer e como antioxidantes (Bagchi, Preuss, & Swaroop, 2016, Silva et al., 2014).

O tratamento com enzimas (T1) apresentou a maior atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre ABTS^{•+} ($6,70 \pm 0,01 \mu\text{M Trolox/g}$), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do despolpamento manual (T3) ($5,84 \pm 0,06 \mu\text{M Trolox/g}$). A atividade antioxidante das PCD foi ligeiramente maior quando comparada àquela verificada em néctar de fisális ($3,48 \mu\text{M Trolox/mL}$) (Pereda, Nazareno, & Viturro, 2020), e bem superior à do suco de cacau avaliado por Dos Santos (2018), que detectou em torno de $0,06 \mu\text{M Trolox/g}$.

Quanto ao método de captura do radical livre DPPH, menor valor significa que menos amostra é necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH, indicando maior atividade antioxidante. Assim, T1 apresentou a maior atividade antioxidante ($7277,51 \pm 34,33$ g/g DPPH), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os demais métodos de despolpamento.

A polpa diluída resultante do tratamento enzimático apresentou a maior concentração de PET e maior atividade antioxidante, tanto pelo método de captura do radical ABTS⁺ quanto do DPPH. De acordo com o relatado por Rufino et al. (2010), tal fato indica que a atividade antioxidante das amostras avaliadas é decorrente da presença dos compostos fenólicos.

4. Considerações Finais

Este estudo é inovador por apresentar uma forma alternativa de despolpamento de cacau, obtendo-se uma polpa diluída com melhores características bioativas quando comparada à do despolpamento manual, agregando um apelo saudável. Essa polpa diluída pode servir de base para a elaboração de néctar de cacau, com maior aproveitamento desse fruto.

O rendimento em polpa diluída submetida ao tratamento enzimático superior a 100% quando comparado ao tratamento sem enzima mostrou que a aplicação do complexo enzimático Pectinex Ultra SP-L é uma boa alternativa para o despolpamento de sementes de cacau, gerando economia de mão-de-obra e dispensando utensílios/equipamentos específicos. Entretanto mais estudos são necessários a fim de otimizar esse processo de forma a se aproximar mais do rendimento do processo manual.

O tratamento enzimático influenciou no aumento da acidez e na redução do pH, mas não modificou a composição centesimal das polpas diluídas. O uso da enzima também se destacou pela permanência da cor semelhante às polpas obtidas pelo processo convencional, pelo aumento da extração de polifenóis a partir polpa de cacau e pelo aumento da atividade antioxidante.

Como forma de melhorar o processo e aumentar o rendimento em polpa, estudos envolvendo variações nas concentrações de enzima, assim como nos tipos de pectinases, são necessários. Sugerem-se ainda testes com uso combinado de pectinases e outras enzimas de maceração, como celulases e hemicelulases.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFCE – Limoeiro do Norte), à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e financiamento da pesquisa e bolsas de estudos concedidas.

Referências

- Alexandre, R. S., Chagas, K., Marques, H. I. P., Costa, P.R., & Cardoso, J, Filho. (2015). Caracterização de frutos de clones de cacauzeiros na região litorânea de São Mateus, ES. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola*, 19(8), 785-790. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v19n8/1807-1929-rbeaa-19-08-0785.pdf>. doi: 0.1590/1807-1929/agriambi.v19n8p785-790
- Alizadeh, H., Mortezapour, H., Akhavan, H., & Balvardi, M. (2019). Performance of a liquid desiccant-assisted solar juice concentration system for barberry juice. *Solar Energy*, 184, 1-10. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038092X19303135> doi: 10.1016/j.solener.2019.03.085
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (18^a ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Bagchi, D., Preuss, H. G., & Swaroop, A. (2016). *Nutraceuticals and Functional Foods in Human Health and Disease Prevention*. Nova Iorque: CRC Press.
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172-184. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417307513> doi: 10.1016/j.tifs.2018.09.022

Cervo, A. L., Bervian, P. A., & Silva, R. (2007). *Metodologia científica* (6^a ed.). São Paulo: Prentice Hall.

Dias, D. R., Schwan, R. F., Freire, E. S., & Serôdio, R. S. (2007). Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(3), 319-329. Recuperado de <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2006.01226.x> doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01226.x

Dos Santos, A. L. (2018). *Efeito das condições de fermentação e da estocagem na qualidade de suco probiótico de cacau*. (Trabalho de Conclusão de Curso). Engenharias de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, MA, Brasil.

Fernández-Vázquez, R., Stinco, C. M., Hernanz, D., Heredia, F. J., & Vicario, I. M. (2013). Colour training and colour differences thresholds in orange juice. *Food Quality and Preference*, 30(2), 320-327. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0950329313001134> doi: 10.1016/j.foodqual.2013.05.018

Ferreira, M. D., & Spricigo, P. C. (2017). Colorimetria - princípios e aplicações na agricultura. In: Ferreira, M. D. (Org.). *Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças* (pp. 209-220). São Carlos: Embrapa Instrumentação. Recuperado de <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1084379>

Franco, B. D. G. M., & Landgraf, M. (2008). *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu.

Freire, M. T. A., Petrus, R. R., Freire, C. M. A., Oliveira, C. A. F., Felipe, A. M. P. F., & Gatti, J. B. (2009). Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de polpa de cupuaçu congelada (*Theobroma grandiflorum* Shum). *Brazilian Journal of Food Technology*, 12(1), 9-16. doi: 10.4260/BJFT2009060800002

Gardea, A. A., García-Bañuelos, M. L., Orozco-Avitia, J. A., Sánchez-Chávez, E., Sastré-Flores, B., & Ávila-Quezada, G. (2017). Cacao (*Theobroma cacao* L.). In E. M. Yahia

(Ed), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and human health* (2nd ed.; v. 2, pp. 921-939). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd.

Gomes, J. C., & Oliveira, G. F. *Análises físico-químicas de alimentos*. (2011). Viçosa: Editora UFV.

Gonçalves, G. C. (2014). *Identificação de marcadores SSR associados à resistência a vassoura-de-bruxa e podridão parda e componentes de produção em uma progênie entre os clones CCN-51 x SIC-864 de Theobroma cacao*. (Dissertação de Mestrado). Genética e Biologia Molecular, Faculdade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil.

Instituto Adolfo Lutz – IAL. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. (5ª ed.). São Paulo: Autor. Recuperado de http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf

Kamala, K., & Kumar, V. P. (2018). Food Products and Food Contamination. In: Grumezescu, A., & Holban, A. M. (Eds.). *Microbial Contamination and Food Degradation*. (1st ed.). International: Academic Press.

Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4),1390-1393. Recuperado de <https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/jf960282f> doi: 10.1021/jf960282f

McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255. Recuperado de <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/27/12/article-p1254.xml> doi: 10.21273/HORTSCI.27.12.1254

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3, 426-428. Recuperado de <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030#> doi: 10.1021/ac60147a030.

Moreira, L. F. (2017) *Caracterização da polpa dos frutos de genótipos de cacauero (Theobroma cacao L.) produzidos no Vale do Jaguaribe–Ceará*. (Dissertação de Mestrado). Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Limoeiro do Norte, CE, Brasil.

Novozymes. (2015). *Safety data sheet*. Recuperado de <https://www.gusmerenterprises.com/wp-content/uploads/2015/11/MSDS-Pectinex-Ultra-SP-L-01-26-2015.pdf>

Obanda, M., & Owuor, P. O. (1977). Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indication of Kenyan black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2), 209-215. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199706%2974%3A2%3C209%3A%3AAID-JSFA789%3E3.0.CO%3B2-4> doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199706)74:2<209::AID-JSFA789>3.0.CO;2-4

Oliveira, M. L., & Luz, E. D. M. N. (2005). *Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil*. [e-book]. Ilhéus. Ed. CEPLAC/CEPEC/SEFIT. Recuperado de <http://www.ceplac.gov.br/Agrotropica/avulsos/livrofito.pdf>

Paz, J. C. S. N. (2010). *Caracterização bioquímica da polifenoloxidase e da peroxidase de ameixa Rubimel, polpa de cacau e estudo do efeito de agentes anti-escurecimento*. (Tese de Doutorado). Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Penha, E. M., & Matta, M. V. (1998). Características físico-químicas e microbiológicas da polpa de cacau. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33(11), 1945-1949.

Pereda, M. S. B., Nazareno, M. A., & Viturro, C. I. (2020). Optimized formulation of a *Physalis peruviana* L. fruit nectar: physicochemical characterization, sensorial traits and antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-020-04358-w> doi: 10.1007/s13197-020-04358-w

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-PesquisaCientifica.pdf?sequence=1.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996-1002. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814610001172> doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.037

Santos, C. O., Bispo, E. S., Santana, L. R. R., & Carvalho, R. D. S. (2014). Use of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L) for diet jelly preparation: an alternative technology. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(3), 640-648. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000300015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt doi: 10.1590/0100-2945-042/13

Schwan, R. F., & López, A. (1988). Mudança no perfil da fermentação de cacau ocasionada pela retirada parcial da polpa da semente. *Revista Theobroma (Brasil)*, 18 (4), 247–257.

Sharma, H. P., Patel, H., & Sharma, S. (2014). Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits: A review. *Trends in Post Harvest Technology*, 2(1), 01-14. Recuperado de http://jakraya.com/journal/pdf/2-tphtArticle_1.pdf

Silva, L. M. R., Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W.; Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398-404. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613010698?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.001

STATSOFT. (2007). *Statistica for Windows-computer programme manual*. (versão 7.0). Tulsa: Statsoft Inc.

TACO. *Tabela brasileira de composição de alimentos*. (2011). (4ª ed., 161 pp.). Campinas: NEPA-UNICAMP.

Uenojo, M., & Pastore, G. M. (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), 388-394. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200028 doi: 10.1590/S0100-40422007000200028

Vásquez, Z. S., Carvalho, D. P., Neto, Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., Oliveira, P. Z., Tiburco, P. B., Soccol, C. R. (2019). Biothechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste management*, 90, 72-83. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X19302454> doi: 10.1016/j.wasman.2019.04.030.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Bruno Felipe de Oliveira – 16%

Candido Pereira do Nascimento – 16%

Carlos Eduardo Alves Dantas – 16%

Ingrid Vitória Sousa Lima – 16%

Diogenes Abrantes Sarmiento – 10%

Mayara Salgado Silva – 10%

Virna Luiza de Farias – 16%