



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ENZIMAS PRODUZIDAS DURANTE OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE
FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann)**

IZABELLA PINTO GARCIA

**MANAUS
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

IZABELLA PINTO GARCIA

**ENZIMAS PRODUZIDAS DURANTE OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE
FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ila Maria de Aguiar Oliveira

**MANAUS
2006**



BELLA PINTO GARCIA

**ENZIMAS PRODUZIDAS DURANTE OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE
FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 26 de Setembro de 2006

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Ila Maria de Aguiar Oliveira
Universidade Federal do Amazonas

Profº Drª Aparecida das Graças Claret de Souza
Embrapa Amazônia Ocidental

Profº Drª Maria Francisca Simas Texeira
Universidade Federal do Amazonas



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Aos meus pais, irmã, familiares, amigos e professores que me deram apoio emocional e que por muitas vezes dispuseram de seu tempo para me ajudar a realizar este trabalho.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio Garcia e Nadyanara Pinto, pelo suporte financeiro, pela paciência e pelo apoio emocional.

A Profa. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira pela orientação, atenção constante e conhecimentos transmitidos.

As minhas amigas, Alcinira Farias, Luciana Contim e Jovana Benoliel, a minha irmã, Nadja Garcia, e as minhas professoras, Marlene Donadio e Chynthia Tereza, pelo companheirismo e pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação pelo aprendizado.

A Universidade Federal do Amazonas pelos recursos fornecidos.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela doação dos frutos.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Amazonas pela concessão de bolsa de estudo.

RESUMO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann) se encontra disseminado, em estado silvestre ou cultivado, por toda a região Norte. O fruto contém em média 32 sementes por fruto e estas correspondem de 20 a 30% do fruto, porém são geralmente descartadas, apesar de poderem ser usadas na fabricação de um tipo de chocolate, denominado *õcupulateö*, seguindo-se o mesmo processo do cacau (*Theobroma cacao* L.), pois pertencem ao mesmo gênero, excetuando-se a etapa de despulpamento, até obtenção das sementes fermentadas e secas. A fermentação das sementes de cacau e cupuaçu envolve processos microbianos e ação de enzimas que atuam nas reações físico-químicas e bioquímicas responsáveis pelo desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma do chocolate. Dentre estas modificações pode-se ressaltar a hidrólise de proteínas formando peptídeos e aminoácidos e a hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Os produtos destas reações durante a torrefação, por meio da reação de Maillard, contribuem para a formação do *õflavorö* do chocolate. Devido à ausência de informações sobre a ação de enzimas em sementes de cupuaçu fermentadas, este estudo teve como objetivo determinar as enzimas presentes durante as diferentes fases de fermentação das sementes do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann) e, também, analisar as variações de temperatura, pH e acidez durante o processo, estabelecendo uma relação com a produção dessas enzimas durante a fermentação. A fermentação das sementes de cupuaçu foi realizada em caixas de madeira com capacidade de 25kg por um período de 7 dias, de acordo com as recomendações propostas por Venturieri (1988). As sementes, a cada 24h, foram retiradas da superfície, meio e fundo das caixas, para a determinação de pH e acidez e produção do pó cetônico que foi utilizado como fonte de enzimas, tendo sido detectadas a presença de amilases, celulases, invertases, pectinesterases, poligalacturonases, peroxidases, polifenoxidases, proteases e lipases. Durante a fermentação, a temperatura máxima foi registrada nas 72 h de fermentação, os comportamentos do pH e da acidez foram inversamente proporcionais, tendo o pH aumentado de 3,92 no tempo zero para 6,32 nas 168 h de processo fermentativo, e a acidez baixou de 17,29 para 4,89 meq de NaOH/100 g de semente seca. A celulase e a poligalacturonase tiveram atividade máxima nas 48 h de fermentação com aumento de 57 % e 13 % da atividade inicial. A pectinesterase não teve variações significativas da atividade. A ação da invertase variou conforme a temperatura, apresentando média de maior atividade nas 72 h de processo fermentativo. Com relação às amilases, obteve-se perfis diferentes, sendo que a α -amilase mostrou-se inativa a partir de 96 h de fermentação enquanto que a β -amilase foi ativa durante todo o processo. As proteases revelaram dois picos de atividade, nas 24 e 120 h, podendo significar a presença de dois tipos de enzimas proteolíticas. As polifenoxidases e as peroxidases tiveram maior atividade com 24 h de fermentação e apresentaram atividades médias inferiores às encontradas em fermentações com sementes de cacau. A lipase apresentou maior média de atividade com 72 h de fermentação.

Palavras-chave: fermentação semi-sólida, biocatalizadores, *õcupulateö*, frutas da Amazônia.

ABSTRACT

The cupuassu plant (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann) is widespread in the wild or cultivated form throughout the north of Brazil. The fruit contains an average of 32 seeds per fruit, corresponding 20% to 30% of the fruit, but they are usually discarded, although they can be used to produce a kind of chocolate called "cupulate", using the same process of cocoa (*Theobroma cacao* L.), except the step to remove the pulp until obtain the fermented and dried seeds, because they belong to the same genus. Fermentation of cocoa and cupuaçu beans involves microbial processes and the action of enzymes that act on the physical, chemical and biochemical reactions responsible for developing the precursors of the flavor and taste of chocolate. Among these changes can be noted the hydrolysis of proteins to form peptides and amino acids and the hydrolysis of sucrose on glucose and fructose. The products of these reactions during roasting, by means of the Maillard reaction, contribute to the formation of the flavor of chocolate. Due to lack of information about the action of enzymes in fermented cupuassu seeds, the objective of this study was to determine the enzymes present during the different stages of fermentation of cupuassu seeds (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann) and also analyze variations in temperature, pH and acidity during the process and establish the relationship with the production of these enzymes during fermentation. The fermentation of cupuassu beans was carried in wooden boxes with a capacity of 25 kg for a period of 7 days, according to the recommendations proposed by Venturieri (1988). The seeds, every 24 hours, were removed from the surface, middle and bottom of the boxes for the determination of pH and acidity and to make acetone powder which was used as a source of enzymes. It was detected the presence of amylase, cellulase, invertase, pectinesterases, polygalacturonase, peroxidase, polyphenol oxidases, proteases and lipases. The maximum temperature of cupuassu seeds was 46.7 °C after 72 h of fermentation. The mean pH and acidity were inversely proportional with the pH ranged from 3.92, on zero time, to 6.32 after 168 h of fermentation and the average acidity ranged from 17.29 to 4.89 meq NaOH / 100 g of dry seed. All the enzymes, except protease, showed maximum enzyme activity in the first 72 hours of fermentation, coinciding with the anaerobic phase of fermentation, where temperatures ranged from 35 to 47 °C and pH varied from 4.2 to 4.6. There was a correlation between the enzymatic activity of alpha-amylase, beta-amylase, peroxidase and polygalacturonase with the fermentation time and also with the pH and acidity measured during the 7 days of fermentation cupuassu beans. The temperature did not exert any influence on the activity of these enzymes. The Invertase and pectniesterase were influenced only by the fermentation temperature. The other parameters had no effect on enzyme activity of these enzymes. The incubation time, pH, temperature and acidity measured during the 168 hours of cupuassu seeds fermentation had no significative influence on the enzymatic activity of cellulase, lipase, protease and polyphenoloxidase.

Key words: solid-state fermentation, biocatalysts, "cupulate" Amazonian fruits.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Perfil da temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	60
Gráfico 2: Perfil de pH durante a fermentação de sementes de cupuaçu	62
Gráfico 3: Perfil da acidez titulável durante a fermentação das sementes de cupuaçu	64
Gráfico 4: Correlação entre atividade da celulase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	65
Gráfico 5: Correlação entre atividade da celulase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	66
Gráfico 6: Correlação entre atividade da celulase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.	66
Gráfico 7: Correlação entre atividade de celulase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	67
Gráfico 8: Correlação entre atividade de poligalacturonase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.	69
Gráfico 9: Correlação entre atividade da poligalacturonase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.	69
Gráfico 10: Correlação entre atividade da poligalacturonase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	70
Gráfico 11: Correlação entre atividade poligalacturonase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.	70
Gráfico 12: Correlação entre atividade de pectinesterase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.	71
Gráfico 13: Correlação entre atividade da pectinesterase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.	72
Gráfico 14: Correlação entre atividade da pectinesterase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	73
Gráfico 15: Correlação entre atividade da pectinesterase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	73
Gráfico 16: Correlação entre atividade da invertase e o tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	75
Gráfico 17: correlação entre atividade da invertase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	76
Gráfico 18: Correlação entre atividade de invertase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	77
Gráfico 19: Correlação entre atividade de invertase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	77
Gráfico 20: Correlação entre atividade de α -amilase e o tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	78
Gráfico 21: Correlação entre atividade de α -amilase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	79
Gráfico 22: Correlação entre atividade de α -amilase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	80
Gráfico 23: Correlação entre atividade de α -amilase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	80

de β -amilase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	81
Gráfico 25: Correlação entre atividade de β -amilase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	82
Gráfico 26: Correlação entre atividade de β -amilase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	82
Gráfico 27: Correlação entre atividade de β -amilase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	83
Gráfico 28: Correlação entre atividade de protease e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	84
Gráfico 29: Correlação entre atividade de protease e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	85
Gráfico 30: Correlação entre atividade de protease e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	86
Gráfico 31: Correlação entre atividade de protease e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	86
Gráfico 32: correlação entre atividade de polifenoloxidase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	88
Gráfico 33: Correlação entre atividade de polifenoloxidase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	89
Gráfico 34: Correlação entre atividade de polifenoloxidase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	89
Gráfico 35: Correlação entre atividade de polifenoloxidase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	90
Gráfico 36: Correlação entre atividade de peroxidase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	91
Gráfico 37: correlação entre atividade de peroxidase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	92
Gráfico 38: correlação entre atividade de peroxidase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.	93
Gráfico 39: correlação entre atividade de peroxidase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	93
Gráfico 40: Correlação entre atividade de lipase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu	94
Gráfico 41: Correlação entre a atividade de lipase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu	96
Gráfico 42: Correlação entre atividade de lipase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu	96
Gráfico 43: Correlação entre atividade de lipase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu	97



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do processamento das sementes de cupuaçu e cacau até obtenção das sementes fermentadas e secas	23
Figura 2: Estrutura e Composição das sementes de cacau	24
Figura 3: Caixa de fermentação com furos no fundo	38
Figura 4: Caixa de fermentação construída de acordo com Grimaldi (1978)	39
Figura 5: Mudanças na coloração das sementes durante a fermentação das sementes de cupuaçu	58

BREVEATURAS E SIGLAS

A.O.A.C	Association of Official Analytical Chemistry
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et al.	E outros
IDAM	Instituto de Desenvolvimento da Amazônia
x g	Força equivalente à da gravidade
g	Gramma
h	Hora
Kg	Kilograma
Km	Kilômetro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µL	Micro litro
µmol	Micromol
µM	Micromolar
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro (s)
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às micro e pequenas Empresas
SINI	Site Informações de Negócios Internacionais
SUFRAMA	Superintendência da Zona Franca de Manaus
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Descrição botânica e variedades do cupuaçu	17
3.2 Cultura do cupuaçu e ciclo vegetativo	18
3.3 Comercialização e usos do cupuaçu	19
3.4 Características físico-químicas das sementes e manteiga de cupuaçu e cacau	20
3.5 Beneficiamento das sementes de cupuaçu e cacau	22
3.5.1 Fermentação das Sementes de Cacau	24
3.5.2 Fermentação das sementes de cupuaçu	37
3.6 Ações enzimáticas e seus produtos	43
3.6.1 Celulases	43
3.6.2 Pectinesterase	44
3.6.3 Poligalacturonase	44
3.6.4 Invertases	45
3.6.5 Amilases	45
3.6.6 Proteases	46
3.6.7 Polifenoloxidasas	46
3.6.8 Peroxidasas	47
3.6.9 Lipases	47
4. METODOLOGIA	49
4.1 Modelo de Estudo	49
4.2 Frutos	49
4.3 Obtenção das Sementes	49
4.4 Fermentação das Sementes	50
4.5 Determinação da Temperatura	50
4.6 Determinação do pH	51
4.7 Determinação da Acidez	51
4.8 Preparação do Pó Desidratado e Desengordurado das Sementes de Cupuaçu ..	51
4.9 Determinações Quantitativas das Atividades Enzimáticas do Pó desidratado e desengordurado	52
4.9.1 Determinação da Atividade de Celulases	52
4.9.2 Determinação da Atividade de Poligalacturonases	53
4.9.3 Determinação da Atividade de Pectinesterases	53
4.9.4 Determinação da Atividade de Invertases	54
4.9.5 Determinação da Atividade de Amilases	54
4.9.6 Determinação da Atividade de Proteases	55
4.9.7 Determinação da Atividade de Polifenoloxidasas	56
4.9.8 Determinação da Atividade de Peroxidasas	56
4.9.9 Determinação da Atividade de Lipases	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Variação da Temperatura Durante a Fermentação das Sementes de Cupuaçu	59

5.3 variação da ACIDEZ TITULAVEL durante a Fermentação das Sementes de Cupuaçu ..	63
5.4 Atividade das Enzimas Durante a Fermentação das Sementes de Cupuaçu	65
5.4.1 Atividade de Celulasas	65
5.4.2 Atividade de Poligalacturonases	68
5.4.3 Atividade de Pectinesterases	71
5.4.4 Atividade de Invertases	74
5.4.5 Atividade de Amilases	78
5.4.6 Atividade de Proteases	83
5.4.7 Atividade de Polifenoloxidasas	87
5.4.8 Atividade de Peroxidase	91
5.4.9 Atividade de Lipase	94
6. CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	99



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

. INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro, uma planta típica da Amazônia se encontra disseminado por toda a região Norte (SEBRAE, 1998). O fruto pesa em média 1,5 kg, constitui-se de uma baga elipsóide e em seu interior há sementes dispostas em fileiras e envolvidas por abundante polpa de coloração, branca, creme, ou amarela que é a principal fonte econômica (VENTURIERI; ALVES, 1986; VENTURIERI, 1992; SEBRAE, 1998; SUFRAMA, 2004).

Embora grande parte da exploração seja semi-extrativista, está ocorrendo um aumento no número de plantios de pequeno e médio porte. Hoje, o cupuaçu está sendo cultivado em escala comercial para o consumo interno e exportação (VENTURIERI, 1993; REVISTA AMAZON VIEW, 2005). O Estado do Pará é o maior produtor, seguido pelo Amazonas, Rondônia e Acre. As microrregiões produtoras de maior importância no Pará são: Marabá, Tomé-Açu, Castanhal, Cametá, Belém e Parauapebas (SEBRAE, 1998). No Amazonas, as áreas de maior concentração de produção estão localizadas nos municípios de Itacoatiara, Manaus, Careiro, Presidente Figueiredo, Humaitá e Manacapuru (SUFRAMA, 2004).

Segundo o Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Amazonas - IDAM, no ano de 2004, o Estado do Amazonas produziu 17.061,50 frutos de cupuaçu o que rendeu à comercialização de 3.975,50 toneladas de polpa (não publicado).

As sementes da fruta do cupuaçuzeiro correspondem de 20 a 30 % do fruto e são geralmente descartadas, apesar de poderem ser usados na fabricação de um tipo de chocolate, denominado ôcupulateö, seguindo-se o mesmo processo do cacau (*Theobroma cacao* Linn), pois pertencem ao mesmo gênero (NAZARÉ *et al*, 1990; COHEN; JACKIX, 2004).

ra a fermentação das sementes de cacau são caixas de madeira, cestas, empilhamentos e bandejas (PINHO *et al.*, 1992; LOPES *et al.*, 2003; COHEN; JACKIX, 2004).

O líquido do cupuaçu, extraído das sementes fermentadas, secas e torradas, possui aroma característico e semelhante ao líquido do cacau, contendo 18 % a mais de gordura, 24 % a menos de proteínas e 35% a menos de carboidratos (COHEN; JACKIX, 2004). Este líquido tem a mesma aplicação tecnológica do líquido de cacau, sendo que das sementes de cupuaçu já foram produzidos chocolates ao leite, branco e meio-amargo, tanto em barra como em pó (CALZAVARA, 1970; NAZARÉ *et al.*, 1990).

De acordo com Schwan (1996) o chocolate feito das sementes de cupuaçu possui sabor levemente diferente do cacau, enquanto que em estudo realizado por Cohen *et al.* (2005), verificou que os produtos elaborados com líquido de cupuaçu são um pouco adstringentes.

No processo de fermentação das sementes são parâmetros importantes, a temperatura ambiente, pH e acidez da polpa e do cotilédone, tempo e temperatura do processo e periodicidade do revolvimento da massa (SCHWAM, 1990).

Durante o processo fermentativo que se inicia na polpa que envolve as sementes, a atividade dos microorganismos causa remoção da mucilagem das sementes e reações bioquímicas no interior do cotilédone acarretando o desenvolvimento dos precursores do sabor do chocolate (COHEN; JACKIX, 2004).

A fermentação das sementes de cacau envolve processos microbianos e ação de enzimas promovendo o desenvolvimento do ôflavorö (SCHWAN, 1996). Constatou-se que importantes precursores do ôflavorö são formados enzimaticamente e a atividade dessas enzimas depende fortemente do pH, acidez, temperatura e tempo de incubação durante a

(BIEHL; PASSERN, 1982; BIEHL *et al*, 1985; BIEHL; MEYER, 1990; AMIN *et al*, 1998).

Já foi descrito que durante a fermentação das sementes de cacau há ação de enzimas celulolíticas, pectinolíticas, amilolíticas, glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, sendo originárias da própria sementes ou polpa do fruto como de microrganismos que surgem durante a fermentação (HOLDEN, 1959, LOPEZ; BIEHL; PASSERN, 1982; BIEHL *et al*, 1985; BIEHL; MEYER, 1990; DIMICK, 1991; HANSEN *et al.*, 1998; AMIN *et al*, 1998; GUILLOTEAU *et al.*, 2005).

Um estudo sobre proteases presentes em sementes de cupuaçu não-fermentadas foi desenvolvido por Reisorff (2004) tendo constatado a presença de endoprotease aspártica e carboxipeptidase.

Devido à ausência de informações sobre a ação de enzimas durante a fermentação de sementes de cupuaçu, propôs-se determinar as enzimas presentes em amêndoas de cupuaçu durante o processo fermentativo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Determinar as enzimas presentes nas sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann) durante as diferentes fases de fermentação.

2.2 Específicos:

2.2.1 Avaliar a atividade de celulase, pectinesterase, poligalacturonase, amilase, invertase, proteases, peroxidase, polifenoloxidase e lipase presentes nas sementes durante o processo fermentativo;

2.2.2 Verificar pH, acidez e temperatura nos diferentes estágios de fermentação;

2.2.3 Estabelecer a relação entre pH, acidez, temperatura, tempo de incubação e as enzimas produzidas durante a fermentação.

SÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Descrição botânica e variedades do cupuaçu

O cupuaçuzeiro pertence à divisão Anthopyta, subdivisão Angiospermae, classe das dicotiledôneas, ordem Malvales, família Sterculiaceae, gênero *Theobroma* e espécie *Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann (EMBRAPA, 1999).

O cupuaçuzeiro encontra-se disseminado, em estado silvestre ou cultivado, por toda a região Norte (SEBRAE, 1998). Planta típica da Amazônia que em seu estado silvestre ultrapassa 20 metros, porém quando cultivada racionalmente varia de 6 a 8 metros (VENTURIERI *et al.*, 1985; SEBRAE, 1998). É uma árvore de porte ereto com folhas que possuem 25 a 35 cm de largura, com ápice abrupto-acuminado, nervuras laterais com 9 a 10 pares, com nervura central; e origina inflorescências axilares ou extra-axilares, de 1 a 5 flores (VENTURIERI; ALVES, 1986).

Com relação ao fruto, o cupuaçu, o maior entre os do gênero, possui baga elipsóide de 12 a 25 cm de comprimento e 10 a 12 cm de diâmetro, pesando entre 0,5 a 4 kg, tendo em média 1,5 kg (VENTURIERI; ALVES, 1986; SEBRAE, 1998). O fruto contém 20 a 50 sementes (média de 32 sementes) que possuem aproximadamente 2,5 cm de largura por 0,9 cm de espessura, distribuem-se no fruto superpostas em fileiras em torno do eixo central, vulgarmente chamado de talo, e envolvidas pela abundante polpa (VENTURIERI, 1992). A polpa é ácida de coloração branca, creme ou amarela de odor ativo e sabor agradável (SUFRAMA, 2004).

A cultura do cupuaçuzeiro é de ciclo perene, sendo conhecidas plantas com mais de 80 anos ainda em produtividade. Em plantas jovens a produção inicia-se entre 2,5 a 3 anos após o plantio. A produção dos frutos por árvore é bastante variável, havendo casos de mais de 40 frutos, porém a produção média é de 12 frutos por planta (SEBRAE, 1998).

O cultivo deve ser feito em regiões de clima úmido ou superúmido com chuva anuais superiores a 1800 mm, temperatura média anual superior a 22 °C. O cupuaçuzeiro prefere solos de terra firme, profundo com boa constituição física e capacidade de retenção de água (CALZAVARA, 1987; SEBRAE, 1998). Embora produza bem em solos de várzea alta, desde que não sujeitas a cheias prolongadas (CALZAVARA, 1987).

O período de floração do cupuaçuzeiro apresenta variação entre plantas, porém no clímax da floração, aproximadamente 74 % das plantas florescem simultaneamente. O cupuaçu está pronto para a colheita 4 a 4,5 meses após a floração e é caracterizado pelo aroma agradável e forte (SEBRAE, 1998). Os dados fenológicos tomados em Belém-PA e Manaus-AM mostram que o período de floração coincide com o de menor precipitação, e o de amadurecimento dos frutos, com o de maior pluviosidade (CALZAVARA *et al.*, 1984).

Estimativas do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Amazonas ó IDAM - apontam para o Amazonas, em 1998, uma área plantada de 9.240 ha, área colhida de 4.218 ha com produção de 6.060.000 frutos e de 1006 ton de polpa (SUFRAMA, 2004).

O maior valor do cupuaçuzeiro está no fruto que possui endocarpo carnoso espesso com sabor ácido agradável cheiro intenso e característico, que o torna apreciadíssimo (CALZAVARA *et al.*, 1984).

A demanda do cupuaçu é cada vez maior, em função da sua rentabilidade como cultura perene e pelo sabor agradável da polpa do fruto. Projeções estatísticas indicam que a aceitação do cupuaçu e derivados atinge um índice médio de até 70 % da população (SEBRAE, 1998). Sendo um dos frutos mais populares da Amazônia, o cupuaçu atinge preços excelentes, e sua polpa é o componente de uso mais importante (CLAY, 1999).

O preço médio da fruta é de R\$ 0,68 e a polpa custa entre R\$ 2,00 a R\$ 3,50 por quilo. Já o preço da semente é em média de R\$ 1,00 por quilo (SINI, 2004). A SUFRAMA (2004) estimou o preço médio da polpa de cupuaçu no mercado local em R\$ 2,68 por quilo, e no mercado nacional, em R\$ 3,50.

Além de ser consumido na forma de sucos, o cupuaçu é também utilizado como matéria-prima de inúmeros gêneros alimentícios como sorvetes, picolé, doce em pasta, recheio de balas e chocolates, tortas, licores, geléias, néctar, etc. (VENTURIERI, 1993, CLAY, 1999).

O consumo da polpa significa a utilização de 35 % da fruta, sendo os 65 % restantes (45 % de casca e 20 % de sementes) resíduos geralmente descartados (NAZARÉ *et al.*, 1990). A casca pode ser usada como ração para gado e adubo, e as sementes podem ser usadas na fabricação de chocolate, tendo sido produzidos cupulate ao leite, branco e meio-amargo, tanto em barra como em pó (CALZAVARA, 1970; NAZARÉ *et al.*, 1990; COHEN; JACKIX, 2004).

), uma tonelada de sementes frescas de cupuaçu fornece

cerca de 160 kg de cupulate em pó e 135 kg de manteiga de cupuaçu; ou 348 kg de cupulate meio amargo e 65 kg em pó; ou 389 kg de cupulate com leite e 90 kg em pó; ou 320 kg de cupulate branco e 160 kg em pó. Num estudo realizado por Venturieri e Aguiar (1988) obteve-se para cada quilo de amêndoas de cupuaçu 350 kg de chocolate bruto (chocolate amargo) em bastão.

3.4 Características físico-químicas das sementes e manteiga de cupuaçu e cacau

As sementes não-fermentadas de cupuaçu têm por composição, em base seca, 9,43 % de proteínas, 64,85 % de lipídeos, 3,28 % de fibras, 2,94 % de cinzas e 19,50 % de outros compostos, como carboidratos, ácidos e alcalóides. Após fermentação os teores de proteínas, lipídeos e cinzas decrescem, 8,89 %, 53,60 % e 2,02 %, respectivamente (CARVALHO et al., 2005).

Lopes *et al.* (2003) caracterizaram físico-quimicamente as sementes de cacau e cupuaçu fermentadas e secas, encontrando para cupuaçu, em média, 5,35 % de umidade, 63,13 % de lipídeos, 9,80 % de proteínas, 3,31 % de fibras e 2,32 % de cinzas e para cacau 6,07 % de umidade, 53,59 % de lipídios, 11,49 % de proteínas, 4,77 % de fibras e 2,05 % de cinzas.

As sementes de cupuaçu fermentadas e tostadas apresentam as seguintes características: 2,43 % de umidade, 56,42 % de gordura, 4,22 % de fibra, 2,18 % de cinza, 10,56 % de proteína, 24,19 % de carboidrato e 640,73 kcal de energia (ARAGÃO, 1992).

Segundo Vasconcelos *et al.* (1975), as gorduras, das amêndoas de cacau e cupuaçu diferem na composição quantitativa da fração ácida dela liberada, apresentando as de cupuaçu maior teor de ácidos esterárico, oléico, araquidônico e linoléico e menor de ácido palmítico.

axos de maior teor no líquor de cupuaçu foram o oléico (43,9 %), e o esteárico (30,8 %). Essa composição difere das encontradas na manteiga de cacau, que apresenta maiores teores de ácido esteárico (33,0 - 37,0 %) seguido pelo oléico (31,0 ó 35,0 %).

Berbert (1981), ao estudar manteiga de cacau e de cupuaçu verificou que, no cupuaçu há menor concentração de ácidos palmítico e esteárico e maior de ácidos oléico, linoléico, araquídico e linolênico. Cohen e Jackix (2004) constataram que no líquor de cupuaçu os ácidos graxos em maior concentração foram os ácidos esteárico com 38,15 %, oléico com 37,83 %, e palmítico com 11,22 %, sendo estes os de maior concentração. No cacau, o ácido graxo palmítico foi o de maior teor com 38,32 %, seguido do esteárico e oléico com 33,54 % e 24,67 %, respectivamente.

Berbert (1981) observou que a manteiga de cupuaçu possui ponto de fusão em 32 °C e teor de gordura de 60,5 %, enquanto que a manteiga de cacau comum possui 56,0 % de teor de gordura, mas o mesmo ponto de fusão. Segundo Silva (1988), a manteiga de cupuaçu apresentou ponto de fusão menor que a de cacau, sendo a de cupuaçu 29-30 °C e a de cacau (34-36 °C).

A semente de cupuaçu apresenta teor de gordura saturada de 57,78%, inferior a encontrada na manteiga de cacau, 72,66 %, enquanto que as gorduras monoinsaturadas do cupuaçu estão em maior quantidade, 38,15 % sendo 25,39 % na manteiga de cacau, e as polinsaturadas representam para o cupuaçu 2,63 % e para o cacau 1,94 % (COHEN; JACKIX, 2004).

Segundo Vasconcelos *et al.* (1975), as sementes de cupuaçu apresentam 1,3,7,9-tetrametilúrico em substituição à cafeína, teobromina e teofilina do cacau. Vasconcelos (1999) detectou a presença de cafeína (28 mg/100 mL) e teobromina (120 mg/100 mL) em sementes fermentadas de cupuaçu, utilizando metodologia indicada para produtos do cacau, porém este

estudos, sugerindo que a metodologia empregada possa não ser indicada para cupuaçu ou que alguns grupos populacionais do cupuaçu apresentam esses compostos e outros não.

Reisdorff *et al.* (2004) separaram as proteínas presentes nas sementes de cacau e cupuaçu por eletroforese e constataram que tanto o cacau quanto o cupuaçu apresentam predominância de polipeptídeos na fração globulina e pelo menos uma albumina predominante de mais ou menos 20 kDa, porém estas duas espécies diferem na quantidade de globulina na faixa 47 kDa, sendo que o cupuaçu apresenta uma leve banda enquanto que no cacau esta é predominante. Polipeptídeos 2 kDa correspondem a pequenas quantidades em cacau, porém é constitui a maior parte da fração globulina no cupuaçu. Apesar destas diferenças, a quantidade de cadeias de globulinas leves, nas duas espécies, foram ao redor de 150g/Kg do total de proteínas nas sementes.

3.5 Beneficiamento das sementes de cupuaçu e cacau

O beneficiamento das sementes inclui desde a colheita do fruto até o armazenamento das sementes fermentadas e secas (PINHO *et al.*, 1992). As sementes de cupuaçu passam pelo mesmo processamento realizado para as de cacau, porém sofrem despulpamento, ficando recobertas com parte da polpa, para obtenção das sementes fermentadas e secas (figura 1).

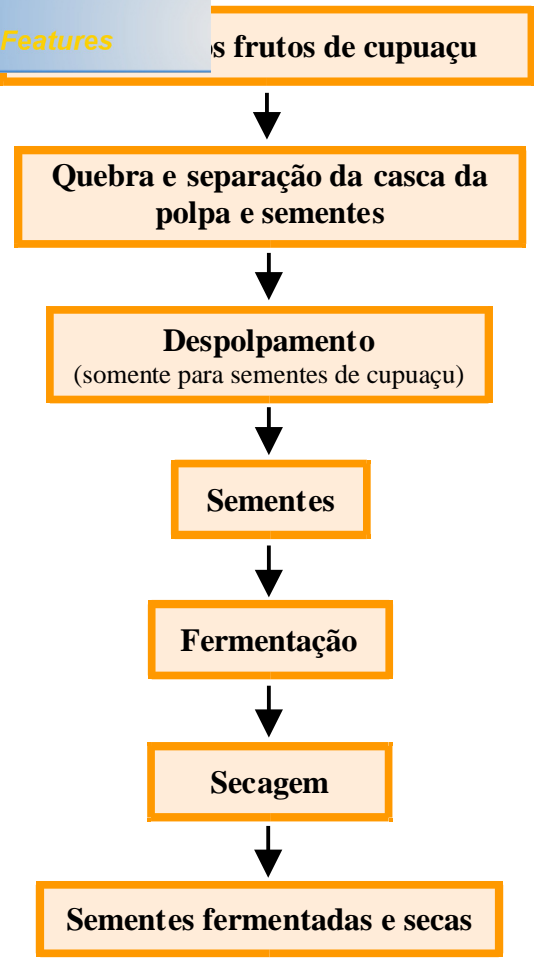


Figura 1: Fluxograma do processamento das sementes de cupuaçu e cacau até obtenção das sementes fermentadas e secas.

Fonte: Cohen; Jackix, 2004.

Das sementes fermentadas e secas obtêm-se o líquido do cupuaçu, que é semelhante ao líquido de cacau, um dos ingredientes do chocolate, a partir dos líquidos pode-se extrair as respectivas manteigas por prensagem (COHEN; JACKIX, 2004).

A polpa e as sementes de cacau possuem diversos compostos que tornam o meio passível a fermentação (figura 2) (LOPEZ; DIMICK, 1991).

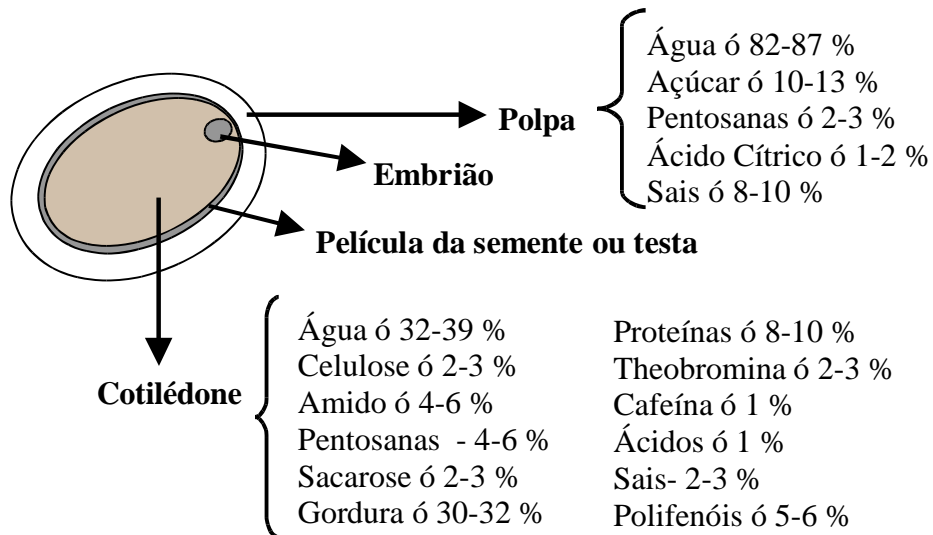


Figura 2: Estrutura e Composição das sementes de cacau.

Fonte: Lopes; Dimick, 1991.

O sabor amargo do cacau é atribuído principalmente a teobromina e cafeína, que durante a fermentação têm o seu teor reduzido em aproximadamente 30 %, devido, principalmente, aos exsudatos formados durante a fermentação (BRITO, 1996). O cacau ao atingir o grau de fermentação desejado, apresenta coloração externa marrom intensa, aroma de vinagre e internamente apresenta um líquido que exuda facilmente quando as sementes são comprimidas (PINHO *et al.*, 1992).

Os sistemas mais usados para a fermentação das sementes de cacau são caixas de madeira, cestas, empilhamentos e bandejas (PINHO *et al.*, 1992; LOPES *et al.*, 2003). Segundo Aquarone *et al.* (2001) o processamento em caixas é o melhor, pois permite certas trocas físico-químicas (oxidação, ativação de enzimas, etc) na polpa.

91) a fermentação do cacau ocorre num período de 4 a 7

dias. A fermentação do cacau não deve ultrapassar 8 dias devido a decomposição protéica e conseqüente liberação de amônia obtendo-se um chocolate com odores e sabores estranhos (OETTERER, 2004).

A fermentação das sementes de cacau envolve processos microbianos e ação de enzimas promovendo o melhoramento do ôflavorö (SCHWAN, 1996). Nesta etapa do processamento há formação de substâncias químicas que contribuem para o desenvolvimento do sabor, aroma e cor de chocolate, reveladas posteriormente na fase de industrialização do cacau (PINHO *et al.*, 1992).

Durante o processo de retirada das amêndoas do fruto e sua colocação em caixas, estas entram em contato com o ar e umidade, iniciando-se a germinação. Vários autores afirmam que no início da germinação ocorrem certos processos enzimáticos que têm influência no sabor do chocolate (AQUARONE *et al.*, 2001).

A fermentação do cacau é um processo onde os microorganismos estão presentes de maneira acentuada. Estes microorganismos são provenientes do ar e do solo, mãos dos manipuladores, superfície dos recipientes usados no transporte das sementes para a fermentação, mucilagem da fermentação anterior que cobriu a parede e o chão das caixas de fermentação e por isso há variação na microbiota (RIBEIRO *et al.*, 1986; LOPEZ; DIMICK, 1991; SCHWAN, 1996; OETTERER, 2004).

Quando a fermentação é dirigida em condições pouco higiênicas podem ocorrer graves contaminações por microorganismos. Em teoria, diversos microorganismos podem contaminar as sementes de cacau nesta etapa, mas na prática somente a *Salmonella* tem causado problemas. As formas vegetativas da *Salmonella* são destruídas durante a torrefação, porém existe a possibilidade de contaminação cruzada. Portanto, a prevenção da contaminação do

Material bruto é parte essencial na organização da produção

(VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

No decorrer da fermentação, a proliferação de microorganismos altera as características físico-químicas que ocasiona a seleção dos microorganismos, prevalecendo aqueles que melhor se adaptem às condições físico-químicas oferecidas durante o processo (RIBEIRO *et al.*, 1986; LOPEZ; DIMICK, 1991). Além da variação na população dos microorganismos, durante a fermentação ocorre aumento do pH chegando ao máximo de 5,35 no quinto ou sexto dia. Há formação dos ácidos acéticos e lácticos, principalmente, atingindo ao final do sexto dia de fermentação, com concentrações de 117 mg/10 g e 42 mg/10 g de semente, respectivamente (SAMAH *et al.*, 1993).

Duas etapas principais são identificadas durante a fermentação do cacau: uma fase inicial anaeróbica, em que há predomínio das leveduras, seguida por uma fase aeróbica com presença das Acetobactérias e, entre essas duas fases, há uma ligeira fase láctica (DIAS; ÁVILA, 1994).

3.5.1.1 Ação dos microorganismos durante a fermentação do cacau

De acordo com Ribeiro *et al.* (1986) e Ribeiro (1990), na fermentação do cacau, aparentemente os fungos podem interagir com leveduras e bactérias hidrolisando os substratos da polpa e testa da semente; se essas hidrólises forem consideráveis durante a fermentação podem concorrer para a formação de sabores ácidos e estranhos no cacau fermentado.

No início da fermentação das sementes de cacau, o pH inicial baixo (3,6) juntamente com baixos teores de oxigênio favorecem o crescimento das leveduras, que se multiplicam rapidamente nas primeiras 12 h, persistindo por um período de 24 a 36 h. As leveduras se

glicose e frutose em álcool etílico e CO₂ (LOPEZ; DIMICK, 1991; SCHWAN, 1996).

Roelofsen (1958) isolou e identificou em sementes de cacau, em Java, leveduras do gênero *Candida*, *Picchia*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* e *Schizosaccharomyces*. De acordo com este mesmo autor a espécie *Saccharomyces* domina a fase inicial da fermentação (1º dia), devido a pouca oxigenação e leveduras pseudo-miceliais (como *Candida krusei*) predominam nos estágios superiores, devido a maior oxigenação, além de serem termotolerantes desenvolvendo-se na polpa de 45 a 50 °C. Ravelomanana *et al.* (1985), isolaram leveduras da polpa de cacau em fermentação, em Madagascar, identificando espécies dos gêneros: *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Brettanomyces* e *Candida*.

Sementes de cacau inoculadas com *S. cerevisiae* mostraram decréscimo rápido da glicose e sacarose nos primeiros estágios de fermentação, convertendo-os a álcool, apresentando o nível máximo de etanol, na polpa, no segundo dia de fermentação ao contrário do cotilédone que, depois do terceiro dia de fermentação, continha aproximadamente a mesma quantidade de álcool que a polpa (SAMAH *et al.*, 1992).

Durante a fermentação dos açúcares das sementes de cacau as leveduras atuam também metabolizando ácido cítrico o que causa aumento do pH e da temperatura da massa fermentativa criando meio favorável ao desenvolvimento de bactérias lácticas. Estas bactérias crescem, atingindo seu pico quando a população de leveduras está em declínio, no período de 16 à 48h do processo fermentativo (PASSOS *et al.*, 1984; VASCONCELOS, 1999; LOPEZ; DIMICK, 1991).

Ostovar e Keeney (1973) encontraram diversos microorganismos lácticos nas primeiras 24h de fermentação, foram identificadas as espécies: *Lactobacillus fermenti*, *L. misenteroides*, *L. plantarum* e *Streptococcus Lactis*. Após 24 h, apareceram espécies termotolerantes, como:

icus e *L. lactis*. Os microorganismos lácticos decresceram após 96 h de fermentação.

Quando as leveduras esgotam o açúcar, começam a usar o álcool produzido como fonte de carbono. As leveduras oxidam o álcool produzindo ácido acético e CO₂, sendo que o ácido acético aparece também devido à presença de Acetobactérias (LOPEZ; DIMICK, 1991).

Normalmente, a partir do segundo dia de fermentação até o final do processo, faz-se o revolvimento da massa que está fermentando para promover aeração e uniformização das sementes (PINHO *et al.*, 1992; OETTERER, 2004). Na etapa de aeração a temperatura sobe acima de 37°C, tornando as bactérias acéticas os organismos dominantes. As sementes morrem entre o segundo e terceiro dia devido à ação do etanol e do ácido acético absorvidos pelos cotilédones e pela elevação da temperatura da massa (LOPEZ; DIMICK, 1991).

As bactérias acéticas formam ácido acético, diminuem a concentração de etanol e ácido láctico, induzem a acidez ou, ainda, oxidam o ácido acético à CO₂ e água (SAMAH *et al.*, 1992). O ácido acético produzido se difunde pelo tegumento das amêndoas de cacau tornando-as permeáveis e passíveis de sofrer ação enzimática (OETTERER, 2004) e diminui o pH do cotilédone (SCHWAN, 1990). Após o terceiro ou quarto dia de fermentação, a massa que possuía cheiro de álcool, passa a exalar odor de vinagre (PINHO *et al.*, 1992).

Foram isoladas, por Ostovar e Keeney (1973), três espécies de microorganismos acéticos: *Acetobacter roseus*, *A. aceti* e *A. sugoxydans*, que se apresentaram em maior quantidade nas 72 h de fermentação. A partir de 72 h de fermentação, a temperatura sobe para 50 °C ou mais provocando a diminuição das bactérias acéticas (LOPEZ; DIMICK, 1991). Passos *et al.* (1984) verificaram que as diferenças de temperatura ocorrem devido ao grau e tempo de aeração das sementes que estimulam reações exotérmicas de microorganismos aeróbicos, tendo sido detectada temperatura máxima de 53°C após 48h de fermentação.

ias acéticas, aumento da temperatura, da aeração e do pH de 3,5 para 5,0, desenvolvem-se bactérias termotolerantes do gênero *Bacillus* e outros gêneros. As espécies do gênero *Bacillus* contribuem para a formação de vários compostos como 2,3 butanediol, pirazinas, ácido acético e ácido lático (SCHWAN, 1996). Segundo Ostovar e Keeney (1973), devido às altas temperaturas nos últimos estágios de fermentação (após 120h), aparecem *Streptococcus thermophilus* e *Bacillus steorothermophilus*.

3.5.1.2 Ação das enzimas durante a fermentação do cacau

Constatou-se que importantes precursores do ôflavor são formados enzimaticamente e a atividade dessas enzimas depende fortemente do pH, acidez, temperatura e tempo de incubação durante a fermentação das sementes de cacau (BIEHL; PASSERN, 1982; BIEHL *et al.*, 1985; BIEHL; MEYER, 1990; AMIN *et al.*, 1998).

Algumas espécies de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*, são predominantes no início da fermentação, produzem enzimas pectinolíticas que atuam macerando as células da polpa causando colapso e liberação de novos substratos (LOPEZ; DIMICK, 1991; SCHWAN, 1996). Há três tipos de enzimas que atuam nas substâncias pécicas: pectinesterase (EC 3.1.1.11), poligalacturonase (EC 3.2.1.15) e a pectato liase (EC 4.2.2.2) (WHITAKER, 1972; ENZYMES COMMITTEE, 2005). As pectinases produzidas pelas leveduras atuam sobre pectina e ácido péctico sendo hidrolisados em heteropolissacarídeos, tornando o material viscoso. Também são responsáveis pela quebra da parede das células da polpa resultando no exsudato que escoar (SCHWAN, 1996). 1

Num estudo realizado por Souza *et al.* (2003) 46 fungos isolados de amostras de cacau foram capazes de produzir pectinases; os gêneros com atividade pectinolítica foram identificados como *Arpergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Paecilomyces*.

peças importantes para a produção dos precursores do flavor (aminoácidos, peptídeos e açúcares redutores) e degradação de pigmentos durante a fermentação. Uma grande quantidade de enzimas como proteases, glicosidases e polifenoloxidasas foram determinadas nas sementes de cacau (HANSEN *et al.*, 1998). As proteínas são hidrolisadas para peptídeos e aminoácidos; glicosídeos fenólicos para cianidinas e açúcares; açúcares para monossacarídeos; e polifenóis sofrem polimerização e oxidação. Os produtos destas reações interagem entre eles provendo os precursores do flavor do chocolate que, na torrefação, desenvolvem o aroma típico do chocolate (LOPEZ; DIMICK, 1991).

Segundo Holden (1959) citado por Aragão (1992) constatou-se a presença de amilase, celulase, poligalacturonase e pectinesterase em sementes de cacau frescas, germinadas e em processo fermentativo.

As glicosidases são enzimas que hidrolisam compostos O- e S-glicosil e fazem parte deste grupo α -amilase (EC 3.2.1.1), β -amilase (EC 3.2.1.2), celulase (EC 3.2.1.4), poligalacturonase (EC 3.2.1.15), α -glicosidase (EC 3.2.1.20), β -glicosidase (EC 3.2.1.21), α -galactosinase (EC 3.2.1.22), β -galactosidase (EC 3.2.1.23), α -manosidase (EC 3.2.1.24), β -manosidase (EC 3.2.1.25), invertase (EC 3.2.1.26), α -arabinosidase (EC 3.2.1.55), dentre outras (ENZYME COMMITTED, 2005).

Atividade da glicosidase parece ser encontrada apenas em fermentações contendo a película da semente, contudo, uma vez que a hidrólise da sacarose ocorre no cotilédone aceita-se que esta enzima deixe a película para atuar no cotilédone (LOPEZ; DIMICK, 1991). A amilase tem sido encontrada em diversos estudos, porém não há evidência de sua atividade, pois esta é incapaz de degradar amido insolúvel e a temperatura da fermentação é insuficiente para sua solubilização (LOPEZ; DIMICK, 1991).

Num trabalho realizado por Hansen *et al.* (1998) não foram inativadas, durante a fermentação, as glicosidases: β -galactosidase, α -arabinosidase e α -manosidase. A invertase,

H ótimo de 4,5, a relação linear da inversão da sacarose

para glicose e frutose foi verificada entre zero e 5 dias de fermentação. Este mesmo autor também constatou que as endoproteases permaneceram estáveis durante a fermentação.

As proteases estão presentes nas sementes de cacau e são ativadas depois da ruptura da célula e acidificação durante a fermentação, sendo que os oligopeptídeos e os aminoácidos formados estão relacionados com o aroma do cacau. Para que ocorra a proteólise é necessário um período mínimo de 24 a 36 h com temperaturas abaixo de 45 °C (BIEHL; PASSERN, 1982).

As sementes do cacau possuem duas proteínas de armazenamento: albumina e globulina (BIEHL *et al.*, 1982). A albumina pode não ser significativamente degradada durante a fermentação quando comparada à globulina (AMIN *et al.*, 1998; AMIN *et al.*, 2003).

Duas enzimas proteolíticas, endoprotease aspártica e carboxipeptidase, estão presentes nas sementes de cacau (BIEHL; VOIGT, 1996). A ação de ambas depende da acidez do cotilédone (BIEHL *et al.*, 1985). A endoprotease aspártica (pH ótimo 3,5) atua quebrando cadeias da globulina formando oligopeptídeos hidrofóbicos e a carboxipeptidase (pH ótimo 5,8) age sobre esses oligopeptídeos hidrofóbicos formando oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos livres que são considerados precursores do flavor específico do cacau (VOIGT *et al.*, 1994; BIEHL; VOIGT, 1996).

A formação dos aminoácidos livres, via reação proteolítica, ocorre rapidamente atingindo valor máximo em 4 dias (BRITO, 1996). Além destas proteases, também estão presentes nas sementes de cacau a aminopeptidase e a endoprotease cisteína, porém a atividade da endoprotease cisteína é significativamente menor que da endoprotease aspártica (BIEHL *et al.*, 1996), e a aminopeptidase é muito sensível à fermentação (HANSEN *et al.*, 1998).

amente com aminoácidos e peptídeos, resultantes da hidrólise enzimática dos carboidratos e proteínas, respectivamente, são responsáveis pela produção de compostos básicos para o aroma do chocolate. As proteólises são pH dependentes, sendo que um alto potencial de flavor resulta quando o pH final da nibe é igual ou maior que 5,0 (BIEHL *et al.*, 1985).

Durante a fermentação do cacau, os compostos fenólicos, originalmente compactados dentro de vacúolos de células específicas, difundem-se dentro do cotilédone (LOPEZ; DIMICK, 1991). Os polifenóis são oxidados e os compostos resultantes associam-se com proteínas por pontes de hidrogênio ou, irreversivelmente, por condensação com grupos reativos de aminoácidos, proteínas e polissacarídios, sendo estas reações importantes na formação do õflavorö do cacau (MOTODA, 1979 apud BRITO *et al.*, 2002). Segundo Hansen *et al.* (1998), a polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) é fortemente inativada durante a fase aeróbica da fermentação, porém, mesmo em baixos níveis sua atividade é suficiente para realizar as reações oxidativas.

A mudança mais óbvia que ocorre nas sementes do cacau é a descoloração do cotilédone devido à hidrólise dos pigmentos (LOPEZ; DIMICK, 1991). Esses pigmentos são, usualmente, hidrolisados completamente pelo quarto ou quinto dia de fermentação (FORSYTH; QUESNEL, 1957).

No cacau pode ser encontrada uma série de polifenóis sendo uma parte na forma glicolisada (BRITO, 1996). Sementes frescas de cacau contêm pigmentos roxos (antocianidinas, 3- β -D-galactosil e 3- α -arabinosil-cianidinas) que durante a fermentação são hidrolisados pelas glicosidases (pH entre 3,8 e 4,5) descolorindo as sementes (FORSYTH; QUESNEL, 1957). Mais tarde, durante a fase de secagem, as antocianidinas livres são transformadas pelas polifenoloxidases (pH acima de 5,5) em quinonas, que podem,

reações de polimerização e complexação não-enzimáticas

resultando em pigmentos marrons (BIEHL; VOIGT, 1996; HANSEN *et al.*, 1998).

A atividade da glicosidase começa após o segundo dia, quando ocorre a morte da semente, devido à alta temperatura e produção de ácido acético, porém estes mesmos fatores, junto com o etanol formado e os polifenóis presentes nas sementes contribuem para a inativação da enzima (FORSYTH *et al.*, 1958).

Sementes de cacau também contém peroxidases (EC 1.11.1.7), que oxidam eficientemente moléculas fenólicas usando peróxido de hidrogênio como um cosubstrato, porém foi demonstrada uma variação na atividade desta enzima e composição de suas isoenzimas que aparecem durante o amadurecimento, fermentação e secagem (SAKHAROV; ARDILA, 1999).

Broadbent *et al.* (1997) verificaram o comportamento das sementes de cacau durante a fermentação, com relação as antocianinas, peroxidases e polifenoloxidasas e detectaram um decréscimo destes componentes, chegando a polifenoloxidase a zero no último dia de fermentação. As antocianinas foram reduzidas clareando os cotilédones, porém a coloração das sementes torna-se escura devido às reações de oxidação.

Segundo Lopez e Dimick (1991) as evidências da presença de lipases (EC 3.1.1.3) nas sementes de cacau é insatisfatória, porém declararam ser improvável sua ausência devido a grande concentração de lipídios nestas sementes (30%).

Num trabalho realizado por Ribeiro *et al.* (1990), onde foi verificada a presença de enzimas em 16 espécies de fungos isoladas de sementes fermentadas de cacau, constatou-se resultado positivo com nível de lipólise variando entre as espécies e, em relação à atividade amilolítica, duas espécies foram incapazes de hidrolisar o amido; somente três espécies não possuíam atividade proteolítica e algumas espécies revelaram ainda propriedade pectinolítica (56 %) e celulolítica (37%).

ara o õflavorö do chocolate

O processo fermentativo inicia-se na polpa que envolve as sementes. A atividade dos microorganismos causa remoção da mucilagem das sementes, morte do embrião e reações bioquímicas no interior do cotilédone acarretando o desenvolvimento dos precursores do sabor do chocolate (COHEN; JACKIX, 2004).

Os açúcares redutores com aminoácidos e peptídeos estão envolvidos na formação do õflavorö pela reação de Maillard, sendo responsáveis por compostos básicos do aroma do chocolate. Uma correlação pode ser esperada entre a intensidade do õflavorö e as proteólises (BIEHL *et al.*, 1982). A acidificação das sementes durante a fermentação deveria ter um efeito favorável no õflavorö, pois o pH ótimo das proteólises é 3,5 a 4,5 (BIEHL *et al.*, 1982), porém sabe-se que acidez excessiva é usualmente acompanhada por baixo õflavorö de chocolate. É necessária a acidificação e proteólise, em seqüência, para obter o típico flavor de cacau (BIEHL *et al.*, 1985).

O nível de pH, teor de ácido acético, produtos proteolíticos e õflavorö não estão simplesmente correlacionados, vários efeitos influenciam na relação da acidificação, proteólise e desenvolvimento do õflavorö. Um flavor potencialmente alto não depende da liberação máxima de aminoácidos ou peptídeos; é provável que aminoácidos específicos sejam mais importantes que a quantidade total de peptídeos e aminoácidos para a formação do õflavorö e estes peptídeos seriam formados a partir da vicilina (proteína globular). Uma acidificação lenta pode assegurar a formação de peptídeos que favoreçam o flavor devido a atividade da endoproteinase em pH 5,5 (BIEHL *et al.*, 1985).

Além da acidificação e formação de certos aminoácidos, a temperatura também influencia no flavor, pois de acordo com Biehl *et al.* (1982) o aumento lento da temperatura é importante para a degradação das proteínas e para o flavor potencial. A decomposição

as de reserva é estimulada pelo processo germinativo da semente, particularmente nos vacúolos de proteínas. Este estímulo pode ser responsável pelo aumento do *õflavorö* potencial na fermentação convencional quando o aumento de temperatura é lento (BIEHL *et al.*, 1985).

O aroma, produzido por oligopeptídeos e aminoácidos livres, é formado durante a fermentação das sementes por proteólises induzidas pela acidez e por proteases endógenas das sementes de cacau (BIEHL; PASSERN, 1982). Os precursores do aroma do cacau são obtidos quando as proteínas globulares de estocagem das sementes são sucessivamente degradadas por endoprotease aspartica e carboxipeptidase (VOIGT *et al.*, 1994).

Brito *et al.* (2004) promoveram hidrólise das proteínas dos nibes de cacau usando uma protease (L-aminopeptidase) para verificar a formação de precursores e o efeito do sabor do cacau e constataram que o uso da enzima foi útil em melhorar os precursores do *õflavorö* do cacau, bem como afetou a percepção do *õflavorö* nos produtos derivados. Os compostos formados durante a hidrólise enzimática foram consumidos durante a torrefação, provavelmente, devido sua participação na reação de Maillard.

O *õflavorö* do cacau é grandemente influenciado por polifenóis. Estes compostos sofrem uma série de transformações durante o processamento do cacau conduzindo à formação do *õflavorö* do cacau. O uso de polifenoloxidasas exógenas mostrou-se útil para diminuir o conteúdo de polifenóis nas sementes de cacau e, assim, reduzir adstringência e amargor (Brito *et al.*, 2002). A quantidade de polifenóis, flavonóides, taninos, flavan-3-ol e antocianinas são responsáveis pela adstringência do cacau (BATE-SMITH, 1973; HASLAM; LILLEY, 1988; HASLAM *et al.* 1992; apud BONVEHI; COLL, 1997).

Os polifenóis são oxidados e os compostos resultantes associados reversivelmente com proteínas, ou irreversivelmente com grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e polissacarídeos, formam compostos importantes na formação do *õflavorö* (BARTOLOMÉ *et*

reduzindo a adstringência (BONVEHI; COLL, 1997). As células coloridas dos cotilédones contêm a maior parte dos polifenóis e, durante a secagem, estes compostos são oxidados pela polifenoloxidase e peroxidase, reduzindo o amargor e a adstringência (BROADBENT *et al.*, 1997). Bonvehi e Coll (1997) verificaram que os polifenóis e taninos decrescem durante a fermentação, estabilizando depois do 5º ou 6º dia.

Os ácidos orgânicos são compostos que têm grande influência na qualidade do chocolate e podem ser considerados como fatores importantes que contribuem para a diferença no *õflavorõ* do chocolate. Os ácidos orgânicos que aparecem em maior concentração na polpa e no cotilédone são o ácido acético, láctico, oxálico e cítrico (SAMAH *et al.*, 1992). Com exceção do ácido láctico, ao final da fermentação estes ácidos possuem concentração não alterada ou diminuída. Altas concentrações de ácido acético nas amêndoas enfraquecem o *õflavorõ* típico do cacau tostado (BIEHL *et al.*, 1985). Segundo Samah *et al.* (1992) os ácidos e, conseqüentemente, o *õflavorõ* produzidos durante a fermentação determinam a qualidade total nas sementes de cacau.

A teobromina e a cafeína durante a fermentação do cacau sofrem redução de 30 % do teor inicial, principalmente, devido à exsudação diminuindo o amargor contribuindo para melhorar o *õflavorõ* do chocolate (NEY, 1992; CROS; JEANJEAN, 1996 apud BRITO, 1996), além dos compostos voláteis formados como a tetrametilpirazina e os ácidos graxos propriônico, butírico, valérico e isovalérico, que em quantidades pequenas são consideradas parte do aroma, mas em maiores concentrações são considerados desagradáveis (LOPEZ; QUESNEL, 1973).

Segundo Hashim e Chaveron (1994), as alquilpirazinas são um dos mais importantes grupos envolvidos na formação do aroma do cacau. Verificaram a formação das metilpirazinas a partir do primeiro dia de fermentação, quando foi identificada a presença de 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina e tetrametilpirazina e, também, constataram a formação

a de processo fermentativo. A principal metilpirazina formada foi a tetrametilpirazina, que teve sua concentração aumentada até o sexto dia de fermentação quando, então, decresceu.

3.5.2 Fermentação das sementes de cupuaçu

A polpa do cupuaçu possui compostos não-voláteis, como açúcares redutores e não-redutores, proteínas e compostos lipídicos e pH baixo (3,6) (CHAAR, 1980), portanto, assim como o cacau, é propício à fermentação. A polpa do cupuaçu possui componentes voláteis, sendo, que três, também, podem ser encontrados nas sementes (ácido 9-octadecanóide, ácido hexadecanóide e piperazina). Foi detectado nas sementes acetaldeído benzeno que mostrou-se ausente na polpa (VELHO *et al.*, 1991).

Segundo Oliveira *et al.* (2004), a fração volátil do liquor do cupuaçu é similar ao que tem sido reportado para cacau e seus derivados, sendo que os principais compostos encontrados, tri- e tetra-etilpirazina, 3-metilbutanal, dimetil sulfito e β -linalol, são tidos como os componentes-chave do aroma do cacau. O que diferiu na composição foi a concentração de compostos alquilpirazinas que são encontrados em altas concentrações no cacau e favorecem o flavor.

A fermentação das sementes de cupuaçu poderá ser feita em caixas de madeira (VENTURIERI; AGUIAR, 1988; NAZARÉ *et al.*, 1990; ARAGÃO, 1992; VASCONCELOS, 1999; OLIVEIRA, 2001; LOPES *et al.*, 2003; COHEN; JACKIX, 2004). As caixas de madeira não devem possuir odores para não transferi-los para o produto e devem ser dotados de drenos para escoar o exsudato e facilitar a aeração (PINHO *et al.*, 1992).

de cupuaçu termina entre o 5º e 7º dia (NAZARÉ *et al.*, 1990). A fermentação não deve ultrapassar 8 dias para evitar decomposição das proteínas (COUTINHO, 1969). Após a fermentação, a semente é chamada de amêndoa (BRITO, 1996).

Venturieri e Aguiar (1988) realizaram fermentação das sementes de cupuaçu em caixas de madeira com furos de 3/8 polegadas no fundo (figura 3), cobertas com saco de aniagem, durante 5 dias. Foram realizados três revolvimentos, o primeiro após 24 h de fermentação e os outros 24 e 72 h depois do primeiro revolvimento. Obtiveram chocolate de cupuaçu com 58,5 % de gordura, 7,8 % de proteínas e 672,1 cal de energia.

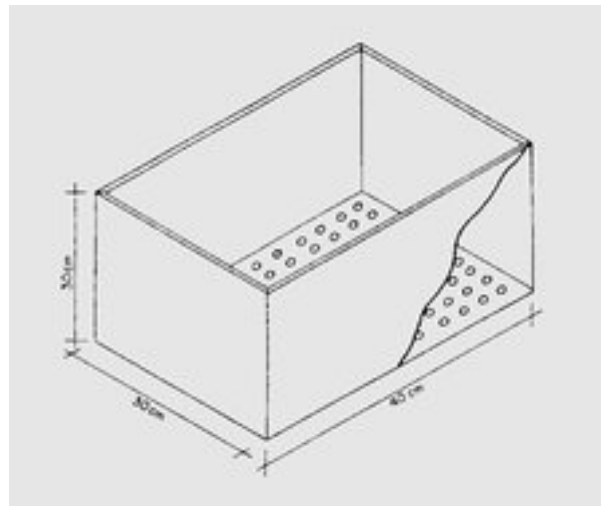


Figura 3: Caixa de fermentação com furos no fundo.
Fonte: Venturieri; Aguiar (1988).

Nazaré *et al.* (1990) procederam a fermentação das sementes de cupuaçu em caixas de madeira com capacidade de 80 kg. Depois de 24 e 48 h do início da incubação, foi acrescentada à massa fermentativa solução de açúcar a 30 %, na proporção de 1 % de solução em relação ao peso do material. As sementes foram revolvidas duas vezes ao dia, sendo o término da fermentação entre o 5º e 7º dia. Após a fermentação, as sementes foram lavadas, secas ao sol, torradas (150 °C), descascadas e utilizadas como matéria-prima para preparo do

luto em tablete meio amargo, com leite e branco, organolepticamente semelhante ao obtido a partir de amêndoas de cacau.

Aragão (1992) estudou o processo fermentativo de sementes de cupuaçu em caixa de madeira com frestas no fundo de 0,5 cm de largura para escoar o exsudato, revolvendo a cada 24 h com auxílio de pás de madeira. Depois de 7 dias de fermentação, o material foi seco, tostado e descascado, sendo utilizado para a produção de um creme.

Vasconcelos (1999) realizou fermentação de sementes de cupuaçu em caixas de madeira com capacidade de 153 Kg, contendo três compartimentos (figura 4), em que o fundo da caixa possuía espaçamento de 0,2 cm entre as tábuas para escoar o exsudato. Inicialmente, no compartimento nº 1 foram colocadas as sementes junto com fragmentos de folhas de bananeiras e, então, foram cobertas com folhas de bananeira e saco de aniagem para reter o calor gerado. Após 48 h, com o auxílio de pá de madeira, o material foi revolvido e transferido para o compartimento nº 2. Depois de 48 h o material foi novamente revolvido e transferido para o compartimento nº 3, onde permaneceu por mais 72 h. Vinte e quatro horas antes do final da fermentação as amêndoas foram submetidas ao último revolvimento. A metodologia neste tipo de caixa foi considerada adequada.

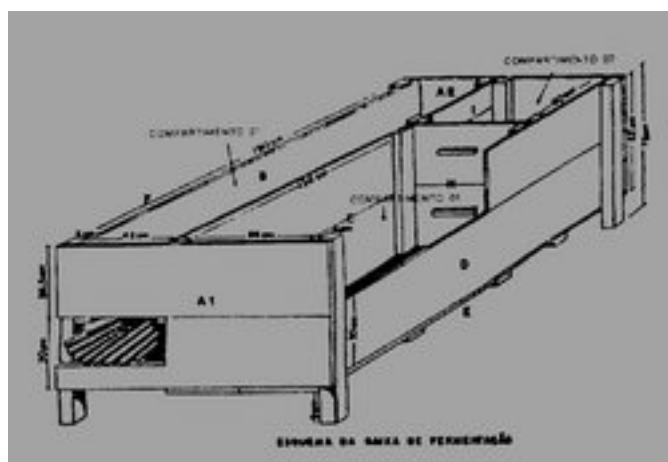


Figura 4: Caixa de fermentação construída de acordo com Grimaldi (1978).
Fonte: Vasconcelos (1999)

fermentação sementes recém despulpadas de cupuaçu em caixa de madeira com capacidade de 25 Kg, contendo furos de 3/8 polegadas no fundo, fechada com tampa de mesmo material, durante 7 dias. As sementes foram revolvidas a cada 24 h, após as primeiras 48 h de fermentação, obtendo-se amêndoas de cupuaçu fermentadas de coloração púrpura marrom semelhante às de cacau.

Cohen e Jackix (2004) obtiveram bons resultados ao submeterem as sementes de cupuaçu à fermentação em caixas de madeira com capacidade de 600 kg contendo três compartimentos e sem adição de solução de açúcar. O tempo total do processo foi de 7 dias e o revolvimento das sementes foi realizado com 48 h (do 1º para o 2º compartimento) e 72 h (do 2º para o 3º compartimento) após o início do processo fermentativo.

Lopes *et al.* (2003), também realizaram a fermentação das sementes de cupuaçu em caixas de três compartimentos com capacidade de 160 kg durante um período de 7 dias. O revolvimento foi feito após 48, 96 e 144 h após o início da fermentação. Junto com as sementes foram colocadas folhas de bananeira para inocular os microorganismos da superfície da folha.

A temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu eleva-se a partir do segundo até o terceiro ou quarto dia, decrescendo depois, possivelmente devido à atividade dos microorganismos (COHEN; JACKIX, 2004; LOPES *et al.*, 2003).

Nazaré *et al.* (1990) encontraram o maior índice de temperatura de 48 °C com 48 h de fermentação, este mesmo valor foi observado por Vasconcelos (1999), porém com 72 h de processo fermentativo. Aragão (1990) obteve temperatura média máxima de 40 °C, nas 48h de fermentação, diminuindo para 31°C nas 72 h, enquanto que Oliveira (2001) observou temperatura média máxima de 41 °C, em processo fermentativo aeróbio em caixas de madeira, com 48 e 72 h do processo.

mento do pH e acidez titulável durante a fermentação de sementes frescas, Aragão (1991) constatou que o pH aumentou linearmente até o 4º dia (de 3,5 para 6,9) com subsequente estabilização, enquanto a acidez titulável decresceu linear e acentuadamente até o 5º dia e de forma mais lenta nos dois últimos dias de fermentação. Isso ocorreu, porque o ácido cítrico disseminado na polpa foi fermentado pelas leveduras e bactérias lácticas produzindo ácido lático e acético que são menos dissociados (ROHAN, 1964). Vasconcelos (1999) observou variação de pH iniciando com 6,30 chegando a 4,71 com 168 h de processo, e depois da secagem atingiu pH 5,34. Oliveira (2001) constatou que o pH aumentou em relação ao tempo de fermentação, elevando-se do tempo zero até 48 h de fermentação, diminuindo às 72 h e aumentando até o final do processo fermentativo (168h), atingindo pH acima de 5,0.

Vasconcelos (1999) observou que as transformações que ocorrem com os açúcares, ácidos e álcool, durante a fermentação do cupuaçu, assemelham-se àquelas descritas na literatura para o cacau. Verificou que a sacarose foi o açúcar predominante no cotilédone, e após 48 h de fermentação, o principal sacarídeo foi hidrolisado à frutose, que atingiu seu maior valor com 72 h de fermentação, e manteve-se como açúcar predominante até o término da secagem. A glicose começou a aparecer com 48 h de fermentação, atingindo maior concentração em 72 h, mantendo-se quase que constante até o final do processo fermentativo. Com relação à fração dos aminoácidos, houve discreto aumento de serina, glicina, metionina, fenilalanina e arginina e decréscimo ácido aspártico, treonina, ácido glutâmico, prolina, alanina, cistina, valina, isoleucina, tirosina e arginina.

Oliveira (2001) isolou diversas espécies de levedura, fungos e bactérias de sementes de cupuaçu, em fermentação aeróbica em caixa de madeira. Das 130 culturas isoladas houve predomínio de leveduras do gênero *Candida*, sendo isoladas em todas as etapas de fermentação. A diversidade da microbiota encontrada nas sementes de cupuaçu durante a

de à microbiota descrita na literatura para sementes de cacau. Além de *Candida* sp. foram identificadas as linhagens no tempo zero: *Kloeckera lindneri*; *Leuconostoc*; *Streptococcus lactis*, que permaneceram até 24 h após início da fermentação, e levedura negra. Foram identificados ainda: *Brettanomyces* a partir de 48 até 72 h do início da fermentação; *Aspergillus* sp. que surgiu com 48 h; *Geotrichum* com 96 h; *Pichia fermentans* com 96 até 144 h; *Trichosporum adeninovorans* com 120 h; *Arxiozyma telluris* com 144 h e *Acinetobacter* após 144 até 168 h de fermentação. Também observou o comportamento da fermentação das sementes de cupuaçu em aerobiose em caixas de isopor e em anaerobiose em caixas de madeira e de isopor, e constatou que as sementes não desenvolveram a coloração púrpura-marrom, característica das amêndoas de cacau fermentadas, demonstrando que o oxigênio é essencial no processo fermentativo das sementes de cupuaçu.

Espécies do gênero *Candida* são capazes de produzir lipases, poligalacturonases e proteases, assim como outras leveduras e fungos podem produzir estas ou outras enzimas, como algumas espécies de *Aspergillus* que possuem atividade lipolítica, celulolítica e proteolítica (RIBEIRO, 1990; OYEWOLE, 2001; D'ANNIBALE *et al.* 2006; ZOUMPANIOTI *et al.*, 2006).

Neves (2004) analisou a atividade proteolítica de leveduras de diversas procedências, dentre as quais oriundas de fermentações de sementes de cupuaçu, dentre as quais estavam espécies do gênero *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*. Depois de 18 h de incubação em meio sólido em ágar gelatina-leite a 37 °C, a espécie *Candida tropicalis* mostrou maior atividade proteolítica que *Candida albicans*, *Candida rugopelliculosa*, *Rhodotorula minuta* e *Trichosporon adeninovorans*, que por sua vez tiveram maior atividade que *Candida salmonticensis* e *Candida vartiovaarai*.

cotilédone da microflora durante a fermentação, e não há evidências que enzimas microbianas sejam transportadas para dentro do cotilédone, porém alguns metabólitos aparecem dentro das sementes (REINECCIUS *et al.*, 1972; LOPEZ 1986; LOPEZ *et al.*, 1987).

Reisdorff (2004) constatou a presença de endopeptidase aspártica e carboxipeptidase em sementes de cupuaçu não fermentadas e verificou que a atividade ótima desta enzima foram de 3,45 a 3,55 para endopeptidase e ao redor de 5,4 para carboxipeptidase.

3.6 Ações enzimáticas e seus produtos

3.6.1 Celulases

As celulases são glicoproteínas capazes de romper ligações 1,4- β -D-glicosídicas em celulose. A celulose é o principal polímero presente na parede de células vegetais e é constituído de cadeias lineares de unidades de glicose. As celulases são complexo enzimático formado por três enzimas: endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4) que hidrolizam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose; as exo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades redutoras e não redutora de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; e as β -1,4-glicosídeos (EC 3.2.1.21) que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose a glicose. Esses três componentes atuam de forma sinérgica na hidrólise da celulose. (SAID; PIETRO, 2004; ENZYME NOMENCLATURE, 2005). Holden (1959) determinou a presença de celulase em sementes de cacau não fermentadas e germinadas, porém não há estudo em sementes de cupuaçu.

As pectinesterases (EC 3.1.1.11) atuam desesterificando a pectina, em meio aquoso, originando metanol e pectato (ENZYME NOMENCLATURE, 2005). As pectinas são polissacarídeos ácidos que apresentam uma cadeia principal de ácido D-galacturônico unidos por ligações do tipo α -1,4 e possuem ramificações de resíduos de ramnose, arabinose, galactose e xilose (SAID; PIETRO, 2004). As pectinesterases têm sido encontradas em todas as espécies de plantas superiores, sendo que a diminuição do grau de esterificação é relevante para o processo de maturação dos frutos, pois retiram grupos metil éster dos constituintes pectínicos da parede celular diminuindo a adesividade intracelular e rigidez do tecido (FOGARTY; KELLY, 1983; ALONSO *et al.*, 1995; JLANG *et al.*, 2003). Holden (1959) determinou a presença de pectinesterases em sementes de cacau não fermentadas e germinadas, porém não há estudos em sementes de cupuaçu.

3.6.3 Poligalacturonases

As poligalacturonases (EC 3.2.1.15) hidrolisam aleatoriamente ligações 1,4- α -D-galacturônicas em pectato e outros compostos galacturônicos (ENZYME NOMENCLATURE, 2005). Assim como as pectinesterases, as poligalacturonases são encontradas em plantas superiores e tem importância para a maturação de frutos e vegetais. Essas enzimas atuam despolimerizando a pectina diminuindo a adesividade intracelular e a rigidez do tecido. (ALONSO *et al.*, 1995; PIRES; FINARDI-FILHO, 2005). Holden (1959) determinou a presença de poligalacturonases em sementes de cacau não fermentadas e após 24 h de fermentação, porém não há estudos em sementes de cupuaçu.

A invertase ou α -D-Frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) é uma enzima que hidrolisa sacarose na porção α -D-Frutofuranosídeo terminal não-redutor, originando uma mistura em quantidades iguais de glicose ou frutose (ENZYME NOMENCLATURE, 2005). É encontrada em fungos e leveduras, animais, algas verdes, bactérias e vegetais. Nos vegetais, geralmente se relaciona com o grau de amadurecimento do fruto, aumentando a medida que o fruto amadurece (SAID; PIETRO, 2004). Foi constada a presença de invertase em sementes de cacau fermentadas (HANSEN *et al*, 1998), porém não há estudos em sementes de cupuaçu.

3.6.5 Amilases

Atuam no amido, glicogênio, polissacarídeos e oligossacarídeos, sendo que a ação da α -amilase resulta em uma mistura de grupos redutores em α -configuração e a β -amilase produz α -maltose por inversão (ENZYME NOMENCLATURE, 2005). O mais importante polissacarídeo de reserva no reino vegetal é o amido, polímeros de cadeias de glicose unidas por ligações 1,4- α -D-glicosídicas (SAID; PIETRO, 2004). A α -amilase (EC 3.2.1.1) é uma endohidrolase que cliva ligações 1,4- α -D-glicosídica em polímeros de polissacarídeos contendo três ou mais ligações 1,4- α - de unidades de D-glicose. As β -amilases (EC 3.2.1.2) hidrolisam ligações 1,4- α -D-glicosídica em polissacarídeos removendo sucessivamente unidades de maltose a partir do final das cadeias não redutoras. Holden (1949) demonstrou a presença dessas enzimas em sementes frescas, germinadas e fermentadas de cacau, porém não há estudos em sementes de cupuaçu.

As proteases (EC 3.4) são hidrolases que degradam proteínas a peptídeos e aminoácidos. O crescimento e desenvolvimento dos organismos resultam de um balanço entre síntese de proteínas e biogênese de organelas, proteólise e reciclagem de componentes de organelas. Nas plantas, a degradação de proteínas está relacionada a vários processos de desenvolvimento tais como germinação, diferenciação e morfogênese, senescência, morte celular programada, ritmo circadiano, resposta de defesa das plantas e ôstress oxidativo. Em consequência as plantas são excelentes fontes de proteases (SAID; PIETRO, 2004). Reisdorff *et al.* (2004) verificou a presença de dois tipos de proteases, endopeptidase aspártica e carboxipeptidases, em sementes não fermentadas de cupuaçu.

3.6.7 Polifenoloxidasas

As polifenoloxidasas (EC 1.10.3.1) são encontradas em fungos e, provavelmente, em todas as plantas superiores. São enzimas que participam em dois tipos de reações: (1) a hidroxilação de monofenóis originando *o*-difenois e (2) a oxidação de *o*-difenois formando *o*-quinonas (WHITAKER, 1972). Estas enzimas foram determinadas em diversas etapas de fermentação das sementes de cacau, sendo que as quinonas são importantes para a formação da coloração marrom típica do cacau (HOLDEN, 1959; HASLAN, 1982; BROADBENT *et al.*, 1997; HANSEN *et al.*, 1998). Além da participação na formação da cor, as polifenoloxidasas contribuem para o flavor, pois reduzem a adstringência devido a oxidação de taninos. Não há estudos sobre essa em sementes de cupuaçu, porém sabe-se eu nestas sementes encontra-se uma grande variedade de compostos fenólicos como catequinas e epicatequinas (YANG *et al.*, 2003).

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são hemiproteínas amplamente distribuídas em plantas superiores, sendo também encontradas em animais e microrganismos. Nas plantas estão relacionadas com diversos processos metabólicos, tais como defesa contra patógenos, oxidação de compostos fenólicos, ligação de proteínas e polissacarídeos à parede celular e particularmente polimerização de ligninas (WHITAKER, 1972; SAID; PIETRO, 2004). Atuam oxidando moléculas fenólicas usando peróxido de hidrogênio como co-substrato, formando substâncias coloridas, causando o chamado escurecimento enzimático (SAKHAROV; ARDILA, 1999). Peroxidases têm sido encontradas em sementes de cacau (HOLDEN, 1959; BROADBENT *et al.*, 1997; SAKHAROV; ARDILA, 1999), porém não há estudos dessas enzimas em sementes de cupuaçu.

3.6.9 Lipases

Lipases ou triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (BEISSON *et al.*, 2000). São enzimas solúveis em água, mas catalisam reações envolvendo substrato lipofílicos ó a estrutura molecular das lipases, muitas vezes compostas por um ãtampaõ que protege o sítio ativo predominantemente hidrofóbico da enzima (SCHMIDT; VERGER, 1998).

Gorduras ocorrem em pequena quantidade em raízes, caules e frutos, mas são encontrados com abundância em sementes, sendo a maioria dos lipídeos de estoque está na forma de triglicerídeos (AKHTAR *et al.* 1975; ACHAKZAI *et al.*, 2003).



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

mente são encontradas nos frutos e sementes devido ao conteúdo de triglicerídeos, que durante a germinação serão degradados a glicerol e ácidos graxos que serão convertidos em açúcar para suportar o crescimento da planta jovem (HILL; BEEVERS, 1987; SAID; PIETRO, 2004).

METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um experimento para determinação da atividade das enzimas produzidas espontaneamente, a cada 24 horas, nos sete dias de fermentação das sementes de cupuaçu e monitoramento do pH, acidez e temperatura nesse intervalo de tempo.

4.2 Frutos

Os frutos de cupuaçu da safra 2005 foram doados pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada no município de Manaus/AM, Km 24 da estrada AM010.

4.3 Processamento das Sementes

Antes da quebra da casca, o cupuaçu foi lavado com água corrente para eliminação de sujidades e, então, se seguiu o despolpamento, por despolpadeira mecânica, no laboratório de beneficiamento de frutos da EMBRAPA. As sementes recém despolpadas, com aproximadamente 3% de polpa residual, foram embaladas em sacos plásticos de 50kg e transportadas até a planta piloto do Departamento de Medicamentos e Alimentos do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas, localizado na Rua Alexandre Amorim, 330, Aparecida, onde foram submetidas à fermentação.

O processo fermentativo seguiu as recomendações da CEPLAC, Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira (1982), e os trabalhos realizados por Ostovar e Keeney (1973), Passos *et al.* (1984), Ribeiro *et al.* (1986) e Oliveira (2001).

As sementes de cupuaçu foram submetidas à fermentação, por sete dias, em caixas de madeira de dimensões 30x30x40cm, com capacidade de 25kg, com tampa do mesmo material e com furos no fundo de 3/8 polegadas para escoar possíveis líquidos exsudados. Após as primeiras 48 horas as amêndoas foram revolvidas e depois a cada 24 horas até o sétimo dia de fermentação, com o objetivo de incorporar oxigênio à massa.

Para obter resultados estatísticos as fermentações foram realizadas em triplicata, sendo então determinada a atividade de enzimas nas sementes e a verificação do pH, acidez e temperatura, na superfície, meio e fundo de cada caixa.

4.5 Determinação da Temperatura

As mudanças de temperatura durante o processo fermentativo das sementes de cupuaçu foram acompanhadas durante sete dias, a partir do início do processo (tempo zero) e a cada 24 horas. A medição da temperatura, nas caixas, foi realizada com a introdução de um termômetro digital calibrado em °C.

A variação de pH foi monitorada medindo-se o pH em intervalos regulares de 24 horas, a partir do tempo zero durante os sete dias de fermentação das sementes de cupuaçu. A determinação do pH foi realizada de acordo com o método da A.O.A.C. (1997) para produtos de cacau. O pH foi medido retirando-se uma alíquota das sementes, que depois de trituradas em multiprocessador, foram pesadas (10 g) e diluídas com água destilada fervida. O pH do filtrado foi medido, em pHmetro digital previamente calibrado, em temperatura ambiente.

4.7 Determinação da Acidez

A acidez das sementes em fermentação foi determinada no filtrado obtido de acordo com o item 4.6 e titulado com solução de NaOH 0,1 N, de acordo com o método da A.O.A.C. (1997) para produtos de cacau, a cada 24 horas, a partir do tempo zero, durante os sete dias do processo fermentativo.

4.8 Preparação do Pó Desidratado e Desengordurado das Sementes de Cupuaçu

A cada 24 horas, a partir do tempo zero, durante os sete dias de fermentação foram retiradas sementes de cupuaçu para o preparo do pó desidratado e desengordurado, utilizado nas análises das enzimas. A película e o embrião foram removidos antes da trituração e extração. Os cotilédones foram então triturados em multiprocessador (15 segundos) e depois foram extraídos gorduras, alcalóides e polifenóis de acordo com método de Amin *et al.* (1998) utilizando-se éter, clorofórmio e acetona 80 % (três vezes) e 100 %, respectivamente. O pó

o ao final desse processo foi estocado a -20°C até sua utilização nas análises das enzimas (AMIN *et al.*, 1998).

4.9 Determinações Quantitativas das Atividades Enzimáticas do Pó Desidratado e Desengordurado das Sementes de Cupuaçu

Foram determinadas quantitativamente, a cada 24 horas, a atividade enzimática da celulase, pectinesterase, poligalacturonase, amilase, invertase, proteases, peroxidase, polifenoloxidase e lipase dos extratos das sementes em pó desidratado e desengordurado durante os sete dias de fermentação das sementes de cupuaçu. A atividade das enzimas foi expressa em unidade de atividade enzimática (U). Para todas as análises foram realizadas reações dos extratos enzimáticos inativados, em banho-maria por 5 minutos a 100°C , mais o meio reacional para descartar a presença de compostos interferentes ou pré-formados.

3.9.1 Determinação da Atividade da Celulase

A atividade da celulase foi determinada de acordo com o método descrito por Sadashivam e Manickam (1992) modificado por Agrawal *et al.* (2002). A solução enzimática foi obtida usando-se 100 mg do pó desidratado e desengordurado das sementes em 5 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 5,0). A mistura reativa foi preparada com 0,5 mL de tampão citrato, 0,5 mL de carboximetilcelulose a 1 % e 0,5 mL de solução enzimática que foi incubada a 55°C por 15 minutos em banho-maria. Depois foram determinados os grupos reduzidos de açúcar, de acordo com o método descrito por Nelson (1944) modificado por Somogyi (1952). A atividade enzimática foi determinada a 540 nm. Usou-se D-glicose como

definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1

μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

3.9.2 Determinação da Atividade da Poligalacturonase

A enzima foi extraída a partir de 100 mg de pó desidratado e desengordurado das sementes, usando-se tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, (AGRAWAL *et al.*, 2002). A atividade da poligalacturonase foi determinada pela mensuração dos grupos reduzidos do ácido poligalacturônico, de acordo com o método descrito por Nelson (1944) modificado por Somogyi (1952). A mistura reacional constituída de 0,25 mL de enzima, 0,25 mL de tampão acetato de sódio, pH 4,5, e 0,5 mL de solução de ácido poligalacturônico a 1 % foi incubada por 30 minutos, a 37 °C. Ao final do período de incubação a quantidade de grupos reduzidos foi determinada utilizando-se ácido D-galacturônico como padrão (ABU-GOUKH; BASHIR, 2003). A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar de 1 μmol de ácido monogalacturônico por minuto de reação nas condições de ensaio.

3.9.3 Determinação da Atividade da Pectinesterase

A enzima foi extraída do pó desidratado e desengordurado das sementes usando-se solução de NaCl 8,8 %, a 4 °C, e os homogeneizados centrifugados a 20000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 7,5 com NaOH (HAGERMAN; AUSTIN, 1986). Um volume de solução de verde de bromocresol 0,017 g/100 mL, em água destilada, foi adicionado a 10 volumes de solução de pectina cítrica 0,5 g/100 mL, em água destilada, e então, sendo o pH ajustado para 5,1 com solução de NaOH 1 mol/L. A absorbância foi mensurada a 617 nm. Em seguida a reação foi iniciada adicionando-se 50 μL

foi determinada a 617 nm depois de 30s. Usou-se ácido galacturônico como padrão (VILARIÑO *et al.*, 1993). Uma unidade de pectinesterase é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos carboxílicos por minuto de reação nas condições de ensaio.

3.9.4 Determinação da Atividade da Invertase

A análise foi desenvolvida com suspensões de pó desidratado e desengordurado das sementes. A mistura reacional foi preparada adicionando-se 920 μL de citrato/fosfato 50/100 mM (pH 4,5), 80 mg de pó e 80 μL de solução de sacarose 300 mM. Os tubos foram incubados por 3 h a 50°C com suave agitação, e depois aquecido por 5 minutos à 100 °C e centrifugado duas vezes à 20000 x g por 5 minutos para interromper a reação (HANSEN *et al.*, 1998). Foi usado D-glicose como padrão. A quantidade de grupos reduzidos de açúcar foi determinada de acordo com o método descrito por Nelson (1944) modificado por Somogyi (1952). A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

3.9.5 Determinação de Amilases

Para extração da α -amilase, o pó desidratado e desengordurado das sementes foi suspenso em tampão fosfato 0,1 M e nitrato de potássio 0,2 M a pH 7,5 e centrifugado a 2000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e usado como fonte da enzima (HAYAT; AHMAD, 2003).

Para extração da β -amilase, o pó desidratado e desengordurado das sementes foi suspenso em tampão TRIS-HCl, 50 Mm, contendo EDTA 1 mM e, então, centrifugado a

enadante usado como extrato enzimático (SAIKA *et al.*, 2005).

Para reação enzimática foram usados 60 μL de extrato enzimático, 40 μL de tampão acetato de sódio 0,5 M, pH 6,0 e 100 μL de solução de amido solúvel 0,5 %, incubando-se a 37 °C por 30 minutos (CARVALHO, 1998). Usou-se como padrão D-glicose para α -amilase e D-maltose para β -amilase. Depois, foram determinados os grupos reduzidos de açúcar de acordo com o método descrito por Nelson (1944) modificado por Somogyi (1952). A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

3.9.6 Determinação da Atividade de Proteases

A enzima foi extraída pela homogeneização do pó desidratado e desengordurado das sementes com tampão fosfato de sódio pH 7,6 conforme Ainouz *et al.* (1994). A atividade proteolítica foi determinada usando-se como substrato solução de caseína a 1 % (pH 7,6). Em 1000 μL de substrato foi acrescentado 1000 μL de solução enzimática e incubados a 40°C por 30 minutos. Esta reação foi interrompida pela adição de 2 mL de ácido tricloroacético 0,4 M e depois filtrada em papel de filtro Whatman nº 40 (MACEDO *et al.*, 2005). Do filtrado foi determinada a produção de aminoácidos conforme método de Lowry (1951). Usou-se tirosina como padrão. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de aminoácidos por minuto nas condições de ensaio.

Polifenoloxidase

A enzima foi extraída do pó desidratado e desengordurado das sementes utilizando-se tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, homogeneizando-se em multiprocessador. Depois, o extrato foi centrifugado a 10000 rpm e o sobrenadante foi usado para determinar a atividade de polifenoloxidase. O meio reacional para determinar a atividade de polifenoloxidase foi constituído de: 1,2 mL de catecol 0,4% em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; 1,7 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; e 0,1 mL de extrato enzimático. A atividade foi medida a 420 nm contra branco contendo 2,9 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 0,1 mL de extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causar um aumento de 0,001 de absorbância por minuto por grama de amostra nas condições de ensaio (OKTAY *et al.*, 1995).

3.9.8 Determinação da Atividade da Peroxidase

A enzima foi extraída do pó desidratado e desengordurado das sementes das sementes utilizando-se tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, homogeneizando-se em liquidificador. Depois, o extrato foi centrifugado a 10000 rpm e o sobrenadante foi usado como fonte de enzima. O meio reacional para determinar a atividade de peroxidase foi constituída de: 1,5 mL de solução guaiacol 1 % em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; 1,2 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; 0,4 mL de H₂O₂ 0,33% em tampão fosfato 0,005 M, pH 6,0; e 0,1 mL de extrato enzimático. A atividade foi determinada a 470 nm contra branco contendo 1,5 mL de guaiacol 1 %; 1,6 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; e 0,1 mL de extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causar um aumento de 0,001 de absorbância por minuto por grama de amostra nas condições de ensaio (KHAN; ROBINSON, 1994).

3.9.9 Determinação da Atividade de Lipase

O pó desidratado e desengordurado das sementes (0,3g) foi suspenso em 50 mL de tampão fosfato (0,05 M, pH 8,0), misturando por 45 minutos, e o material insolúvel foi removido por centrifugação a 11000 rpm por 30 minutos. A proteína foi precipitada com sulfato de amônio 48 % a 4 °C com agitação por 30 minutos e centrifugado a 5000 rpm, sendo o precipitado foi dissolvido em um 5,0 mL de tampão fosfato. Para a reação foi utilizado como substrato 1000 mg de azeite de oliva, 5,0 mL de tampão acetato de sódio, pH 5,6 e 1,0 mL do extrato enzimático. Incubou-se a 40 °C sob agitação por 1 hora. A reação foi interrompida adicionando-se 20 mL de solução 1:1 de etanol/acetona. Os ácidos graxos formados foram determinados por titulação com KOH 0,1 M. Usou-se como padrão ácido

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições de ensaio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

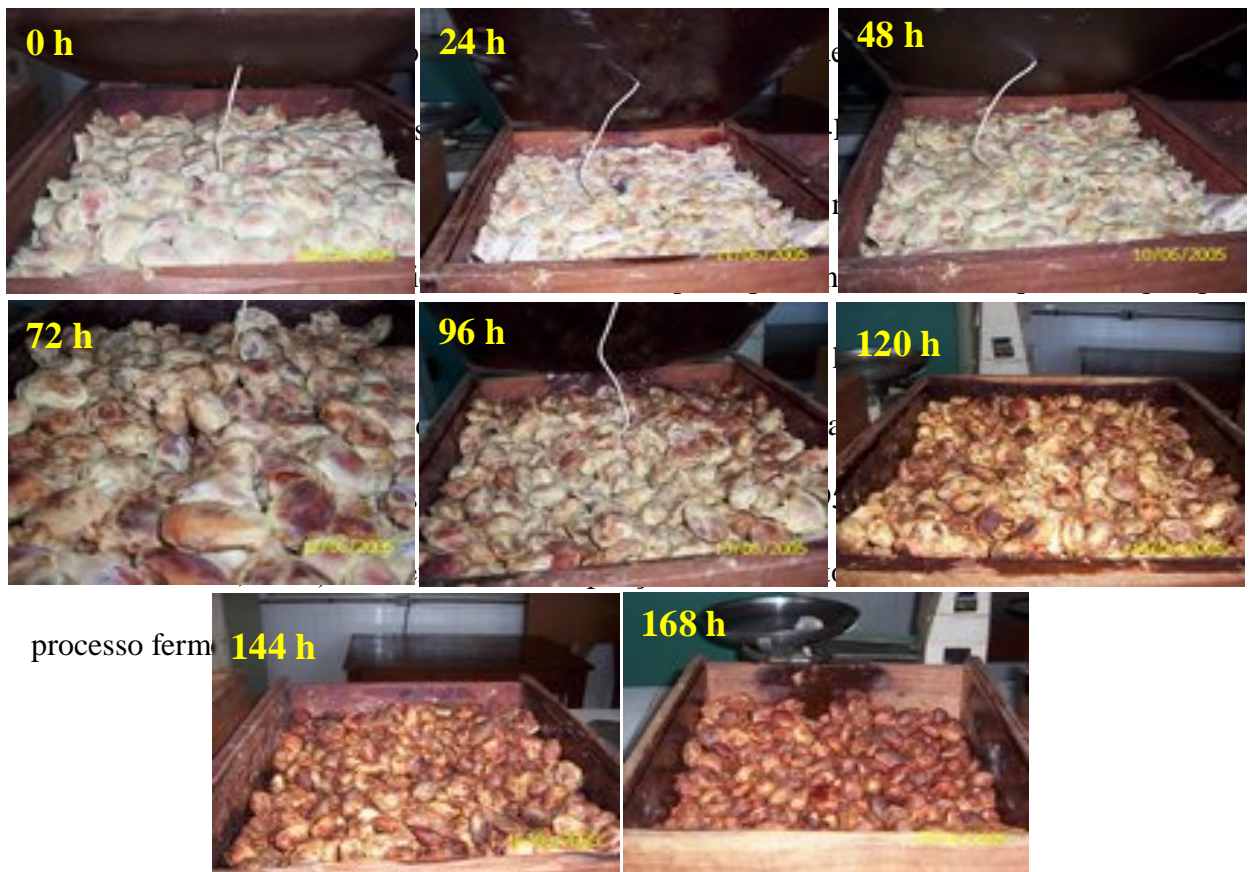


Figura 5: mudanças na coloração das sementes de cupuaçu durante a fermentação.

Não há relatos de que o processo que ocorre no cacau resultando em seu escurecimento seja o mesmo para as sementes de cupuaçu. Segundo Kuskoski *et al.* (2006) a polpa de cupuaçu não contém antocianidinas. Aragão (1991) verificou uma redução das formas monoméricas dos compostos fenólicos na testa durante a fermentação das sementes de cupuaçu, indicando reações de hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e subsequente oxidação destes a quinonas. Foram determinadas as presenças de (+)-catequinas e (+)-epicatequinas em sementes de cupuaçu, além de outros compostos flavonóides, dentre estes compostos flavonóides glicosídeos (YANG *et al.*, 2003). Portanto, a reação de escurecimento das sementes de cupuaçu pode ser similar a de cacau.

5.1 Variação da temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Durante o processo fermentativo das sementes, há elevação da temperatura devido ao trabalho metabólico da microbiota presente no meio fermentativo sobre os açúcares e ácidos

olve as sementes a serem fermentadas, bem como nos presentes na própria semente (NAZARÉ *et al.*, 1990). O calor despreendido deve-se a oxidação do etanol a ácido acético e a conversão desse ácido a dióxido de carbono e água (PASSOS *et al.*, 1984; LOPEZ, 1991; SAMAH *et al.*, 1993).

Segundo Varnam; Sutherland (1997), a elevação da temperatura exerce efeitos diferenciais na atividade das enzimas de cacau. O gráfico 1 apresenta o perfil das médias das temperaturas das sementes de cupuaçu durante o processo fermentativo. A fermentação iniciou-se com a temperatura de 33,6 °C, atingindo, após 72 h, a temperatura máxima de 46,7 °C e finalizando com 34,7°C em 168 h. O grau e o tempo de aeração das sementes estimulam as reações exotérmicas devido ao aumento da microbiota aeróbica (PASSOS *et al.*, 1984; SAMAH *et al.*, 1993), isso explica o aumento acentuado da temperatura com 72 h de fermentação, já que o primeiro revolvimento das sementes em fermentação foi realizado com 48 h.

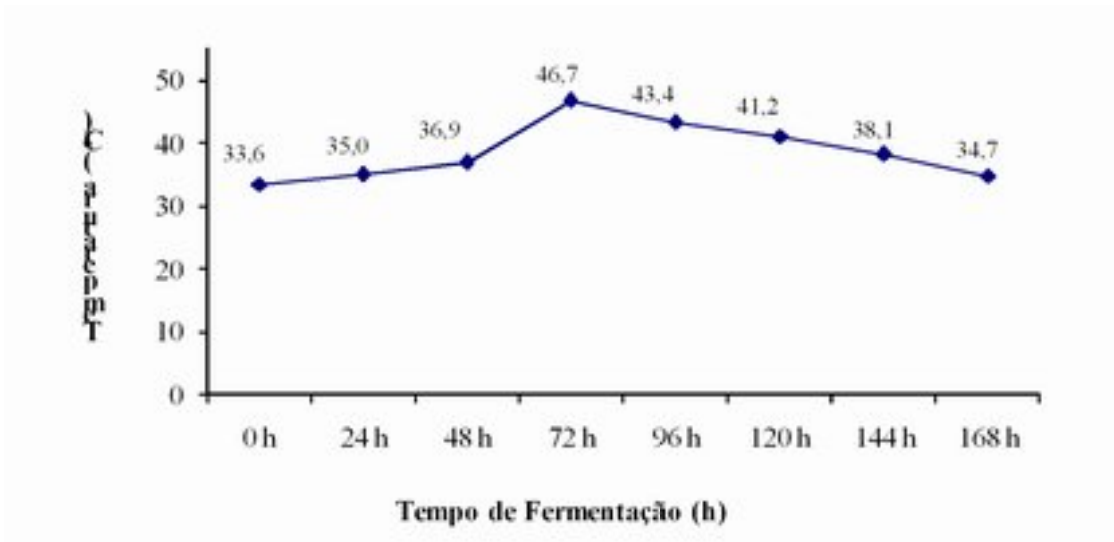


Gráfico 1: Perfil da temperatura durante os diferentes estágios de fermentação das sementes de cupuaçu.

Nazaré *et al.* (1990) observaram aumento de temperatura, que ficaram próximas à 48 °C, até o quarto dia de fermentação, com posterior diminuição até atingir a temperatura

processo, sendo este um bom parâmetro para constatar o final da fermentação.

Aragão (1992) realizou a fermentação de sementes de cupuaçu em caixas de madeira medindo 40 x 40 x 60 cm, com frestas de 0,5cm de largura, por 7 dias. O processo, com sementes frescas, iniciou-se a 29°C, atingindo o pico de temperatura de 40°C, em média, após 48h.

Vasconcelos (1999) fermentou sementes de cupuaçu durante 7 dias, em caixas de madeira com três compartimentos construída de acordo com Grimaldi (1978) e com capacidade de 153 Kg. O processo começou a 32 °C e a temperatura máxima foi de 48 °C, após 72 h, havendo redução da temperatura para 43 a 45 °C nos dias posteriores. Usando esse mesmo tipo de caixa de fermentação, Lopes *et al.* (2003) e Cohen; Jackix (2004) observaram a temperatura máxima de 49 °C após 72 h do início do processo fermentativo e temperatura final em torno de 35 °C em ambos, nas 168 h de fermentação.

Oliveira (2001) realizou o processo fermentativo de sementes de cupuaçu em caixa da madeira 40 x 40 x 60 cm, iguais às utilizadas neste experimento, usando a mesma metodologia, porém a temperatura máxima de 41°C foi alcançada após 96 h do início do processo, diferindo do resultado encontrado neste estudo.

5.2 Variação do pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Durante a fermentação de sementes de cacau, a testa torna-se permeável a muitas substâncias de baixo peso molecular e o álcool, ácido acético, bem como outros metabólitos são absorvidos pelas sementes, junto com a água, durante a fermentação (LOPEZ, 1981). As leveduras e as bactérias lácticas metabolizam o ácido cítrico da polpa, resultando na sua

ático o que causa aumento do pH, pois estes últimos se dissociam menos (OSTOVAR; KEENEY, 1973; SAMAH *et al.*, 1993).

Dentre as diversas reações que ocorrem na fermentação do cacau é a acidificação que tem maior efeito sobre a qualidade. Os cotilédones absorvem o ácido acético e se o fazem em excesso o produto final adquirirá um caráter ácido não desejado. Concentrações moderadas do ácido acético e também do láctico têm um papel positivo para determinar a qualidade, porque em condições que favorecem a redução da acidez levará a obter um produto de baixa qualidade (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

Na polpa do cupuaçu os teores de ácido cítrico, acético e láctico variam no decorrer da fermentação. Segundo Vasconcelos (1999), a concentração de ácido cítrico diminuiu linearmente, passando de 0,43 % para 0,11 %, em base seca, ao final do processo fermentativo. O conteúdo de ácido acético sofreu variações aumentando 1,2% do tempo zero até 144 h, mas, ao final da fermentação, 168 h, não apresentou valores muito superiores ao do início e término do processo, 0,1 % e 0,17 %, respectivamente. O teor de ácido láctico aumentou de 0,2% para 0,46 % do tempo zero até 168 h. Essas mudanças nas concentrações dos ácidos contidos na massa fermentativa, obviamente, resultam em variações de pH e acidez.

Os valores médios do pH em cada intervalo de tempo estão apresentados no gráfico 2. Verificou-se aumento crescente de pH até o final do processo fermentativo,

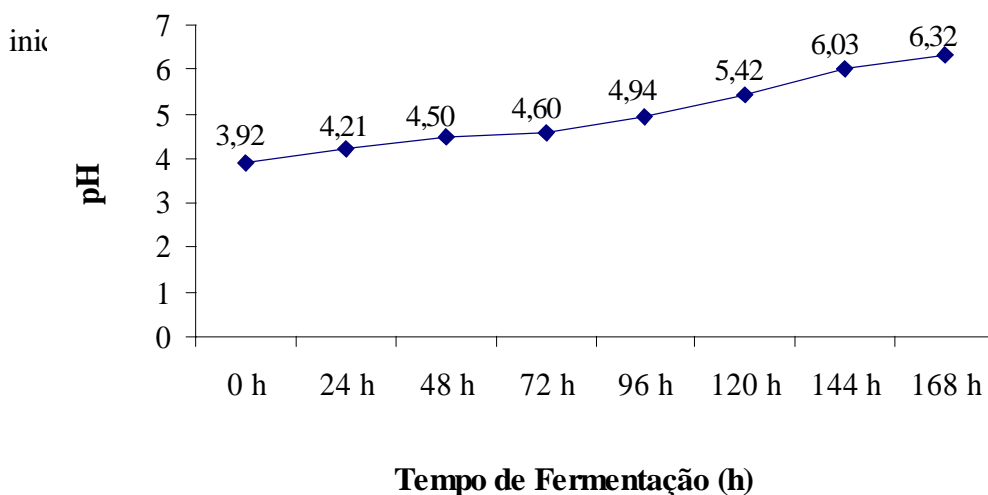


Gráfico 2: Perfil de pH durante os diferentes estágios de fermentação de sementes de cupuaçu.

Aragão (1992) observou aumento linear de pH até o quarto dia de fermentação das sementes de cupuaçu, variando de 3,5 para 6,9, com estabilização nos dias posteriores. Oliveira (2001) também constatou aumento do pH em função do tempo de fermentação, atingindo pH máximo de 6,02.

Para fermentação do cacau, valores de pH superiores a 5,0 ao final do processo são indicativos de boa fermentação (ROHAN, 1964; OSTOVAR; KEENEY, 1973; SAMAH *et al.*, 1993). Portanto, comparando-se com a fermentação do cacau, o pH final das sementes de cupuaçu atingiu essa faixa adequada. A atividade proteolítica das enzimas se reduz se o pH das sementes cair abaixo de 5,0. Tudo isso ocasiona o não desenvolvimento do sabor e aroma peculiar do cacau (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

Reisdorff *et al.*, 2004, relataram que o cotilédone do cacau deve ser acidificado a valores de pH entre 5 e 5,5, durante a fermentação, para garantir a formação satisfatória de precursores do aroma de chocolate. Observando experimentos *in vitro* com fermentação de sementes de cupuaçu, concluíram que o pH do cotilédone deverá estar na faixa de 4,5 a 5,0 para desencadear a ação de enzimas proteolíticas.

O pH intracelular das sementes de cacau desce de 6,5 até 4,2, o que obviamente tem grandes efeitos sobre os componentes intracelulares. Quando o ácido acético entra na célula há perda de compartimentação intracelular com conseqüente interação entre enzimas, substratos, inibidores e moléculas reativas. A ruptura das células e a perda da integridade das

atividade de algumas vias metabólicas. A variação do pH exerce um efeito diferente sobre a atividade enzimática, ativando algumas enzimas e inibindo outras (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

5.3 Variação da acidez titulável durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

O comportamento da acidez durante o processo fermentativo é apresentado no gráfico 3. Observou-se diminuição da acidez inicial de 17,29 para 4,89 meq de NaOH/100g da amostra seca das sementes de cupuaçu ao término da fermentação. A partir dos gráficos 2 e 3 pode-se verificar que o perfil do pH e o da acidez apresentaram comportamento inverso.

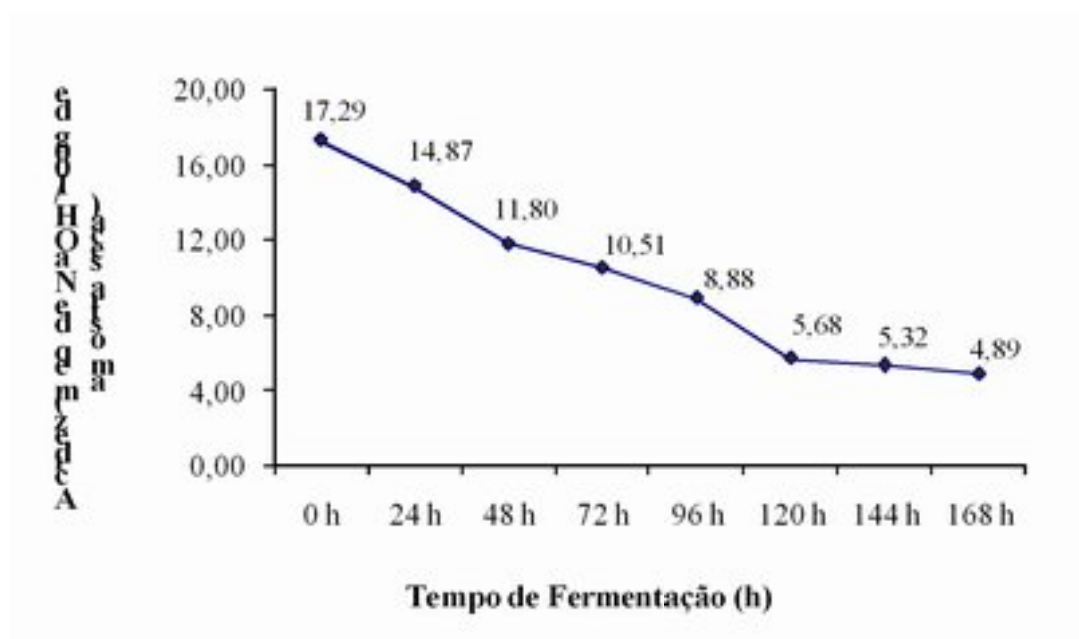


Gráfico 3: Perfil da acidez titulável durante os diferentes estágios de fermentação das sementes de cupuaçu.

De acordo com Vasconcelos, 1999, na polpa residual de cupuaçu aderida à semente, os teores de ácido cítrico, acético e láctico variam no decorrer da fermentação. A concentração de ácido cítrico diminuiu linearmente, passando de 0,43 % para 0,11 % em base seca, durante a

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

cupuaçu. Os conteúdos de ácido lático e acético também variaram durante processo fermentativo, passando o primeiro de 0,2 % no tempo zero para 0,46 %, em base seca, nas 168 h de fermentação, e o segundo de 0,1 % para 0,17 % no mesmo período. O ácido acético atingiu concentração máxima nas 72 h de fermentação (1,57 % em base seca). O ácido cítrico é predominante na polpa e mais dissociável que os ácidos acético e lático, portanto, o declínio linear deste ácido ocasiona decréscimo da acidez e conseqüente aumento do pH.

Aragão (1992) constatou redução linear e acentuada da acidez até o quinto dia de fermentação das sementes de cupuaçu e, de forma mais lenta, nos dias subseqüentes, enquanto que neste estudo o decréscimo da acidez foi mais sutil a partir de 120 h de fermentação. Oliveira (2001) também observou diminuição da acidez ao final do processo fermentativo, variando de 13,57, no tempo zero, para 6,79 meq de NaOH/100g de amostra seca nas 168h de fermentação, alcançando acidez menor do que o encontrado neste experimento.

5.4 Atividade das Enzimas Durante a Fermentação das Sementes de cupuaçu

5.4.1 Atividade de Celulase

A celulase apresentou atividade durante todo o processo fermentativo. A atividade

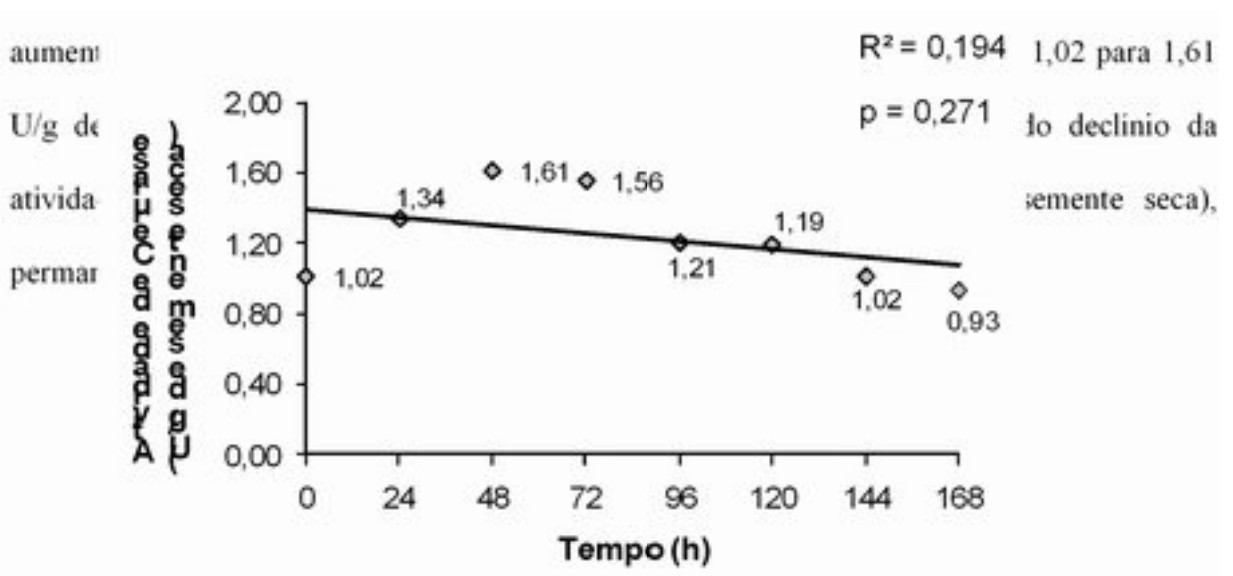


Gráfico 4: Correlação entre atividade da celulase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

Não há diminuição significativa de atividade nas 72 h de fermentação, quando ocorre a temperatura máxima no processo fermentativo. O gráfico 5 mostra que não houve correlação entre as variações de atividade de celulase com a temperatura ($p = 0,255$).

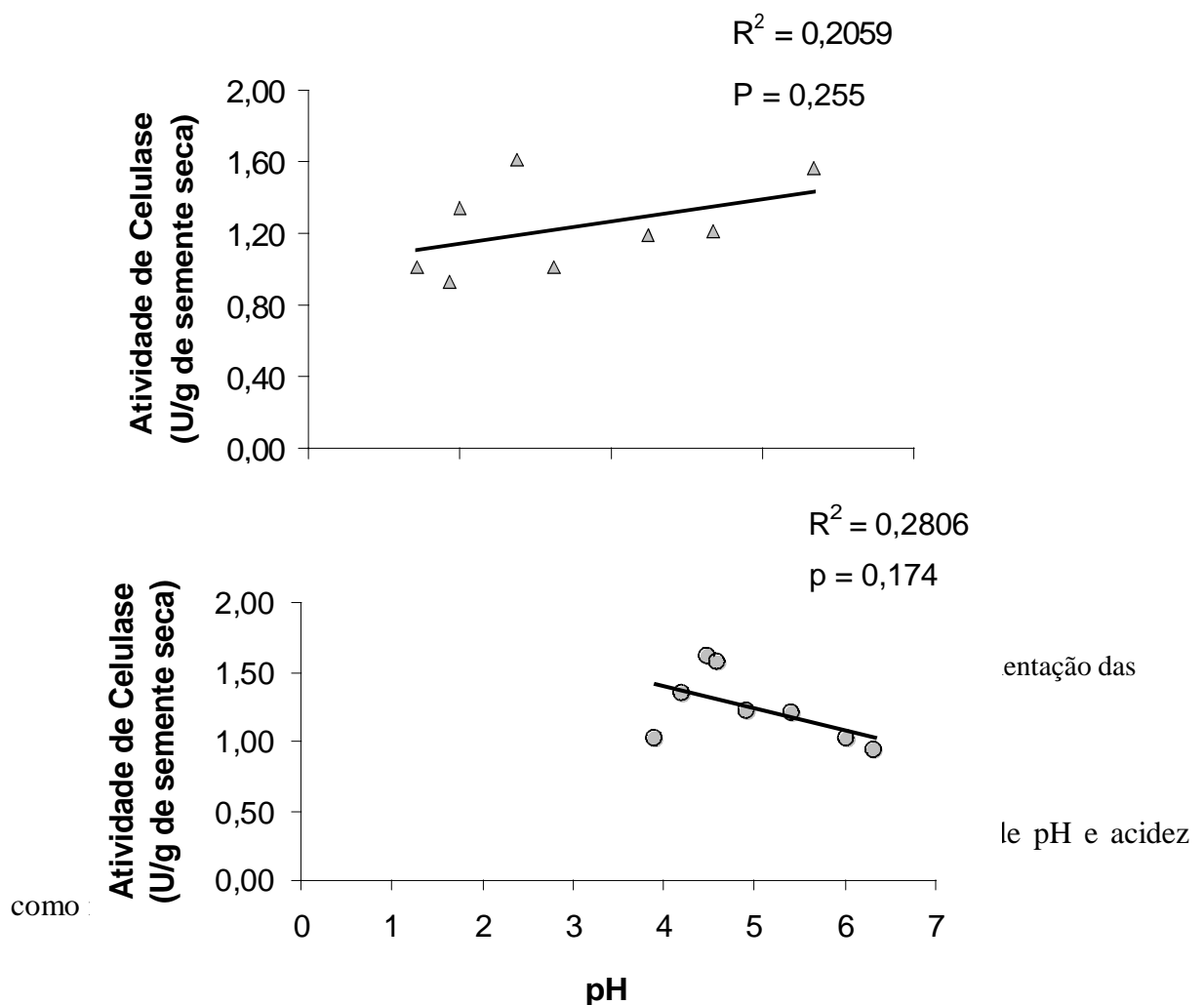


Gráfico 6: Correlação entre atividade da celulase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

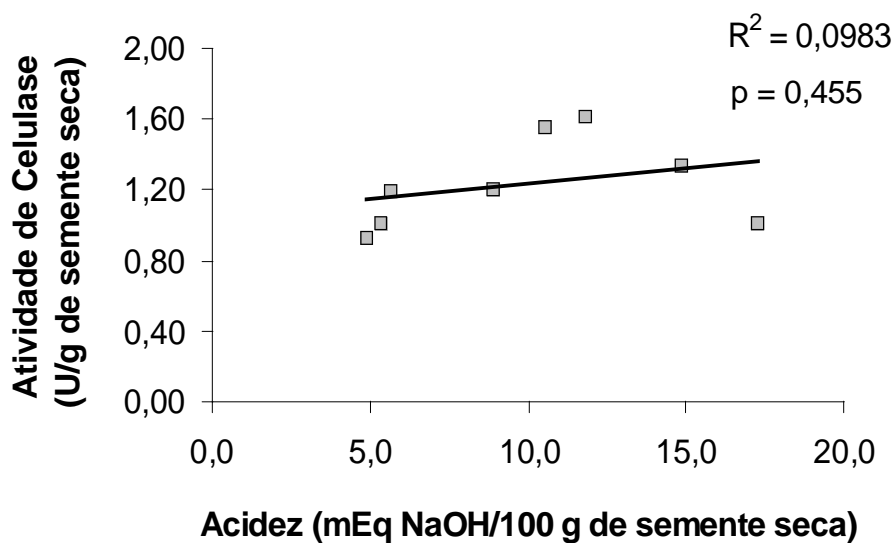


Gráfico 7: Correlação entre atividade de celulase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Aragão (1992) constatou redução significativa na concentração de fibras na testa das sementes indicando a ação enzimática na testa, porém não evidenciou diferenças significativas no teor de fibras nas sementes. A testa protege o cotilédone de microrganismos durante a fermentação, e não há evidências que enzimas microbianas sejam transportadas para dentro do cotilédone, porém alguns metabólitos como sorbose, manitol e inositol aparecem

mentação o que pode ser devido sua difusão depois da hidrólise dos polissacarídeos da polpa (REINECCIUS *et al.*, 1972; LOPEZ 1986; LOPEZ *et al.*, 1987).

Vasconcelos (1999) constatou um teor de fibra de 7,43 % nas sementes de cupuaçu não-fermentadas e de 5,46 % em sementes após fermentação, mostrando que o processo fermentativo reduziu o teor de fibras totais. A alteração do conteúdo de fibra no cotilédone ocorre, portanto, devido à presença de enzimas celulolíticas nas sementes de cupuaçu aqui evidenciados. Também foi verificada a presença de celulasas em sementes de cacau não-fermentadas quanto nas germinadas e sob fermentação em baixas concentrações (HOLDEN, 1959).

5.4.2 Atividade de Poligalacturonase

A presença de ácido D-galacturônico nas sementes de cupuaçu foi confirmada por Yang *et al.* (2003). Holden (1959) constatou a presença de poligalacturonase em fermentações com sementes de cacau, detectando baixos níveis nas sementes frescas e nas 24 h de fermentação e nenhuma atividade após esse período. Neste estudo com sementes de cupuaçu a poligalacturonase mostrou-se ativa durante todo o processo fermentativo.

Observando-se o gráfico 8 verifica-se que há correlação entre a atividade de poligalacturonase e o tempo de fermentação ($p = 0,001$). A poligalacturonase atingiu atividade máxima nas 48 h de fermentação com 1,72 U/g de semente seca, sendo 10,25 % a mais da atividade inicial (1,56 U/g de semente seca). A partir das 72 h de fermentação iniciou-se o declínio da atividade atingindo 0,55 U/g de semente seca ao final do processo fermentativo, correspondendo 35,25% da atividade no tempo zero (Gráfico 8).

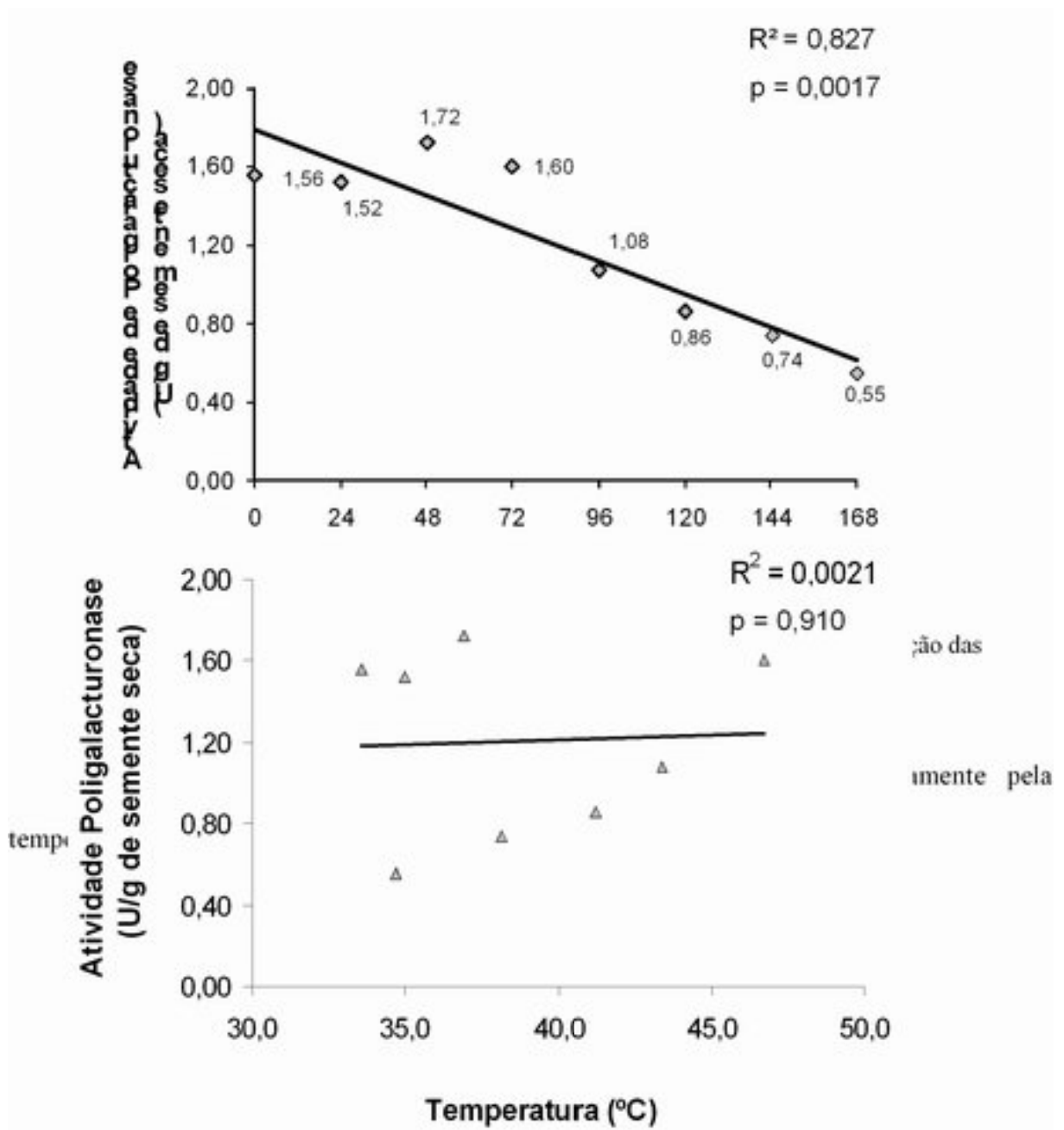


Gráfico 9: Correlação entre atividade da poligalacturonase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Conforme observa-se nos gráficos 10 e 11 houve correlação entre a atividade de poligalacturonase com o pH ($p = 0,0008$) e a acidez ($p = 0,007$).

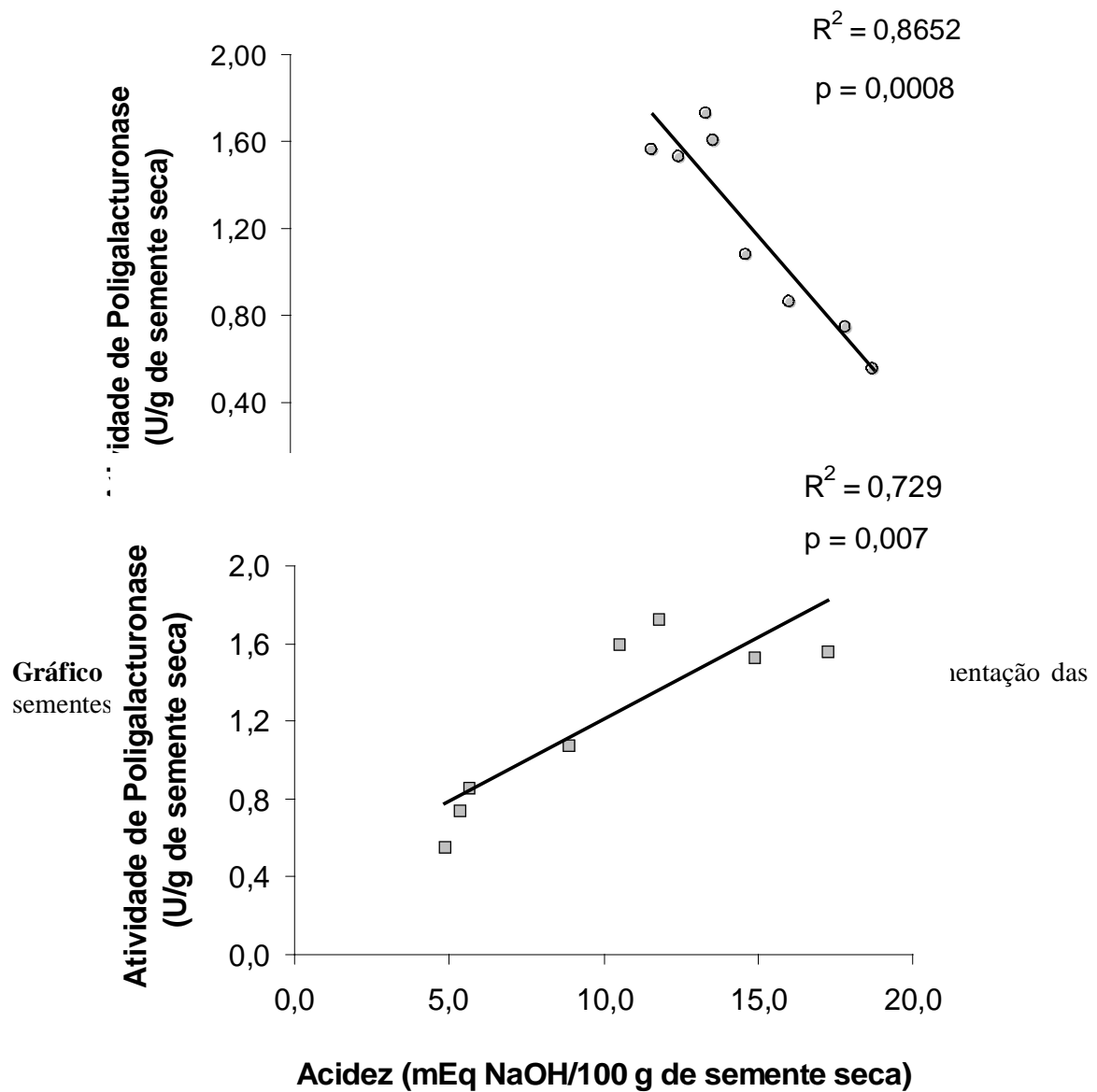


Gráfico 11: Correlação entre atividade poligalacturonase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

5.4.3 Atividade de Pectinesterase

As sementes de cupuaçu apresentaram atividade da pectinesterase, porém houve pouca variação da atividade durante todas as etapas do processo fermentativo, ficando em torno de 62 U/g de semente seca (Gráfico 12).

A maior atividade da pectinesterase foi constatada nas 72 h de fermentação (62,49 U/g de semente seca). Observando-se o gráfico 12 verifica-se que não há correlação entre o tempo de fermentação e a atividade enzimática ($p = 0,516$).

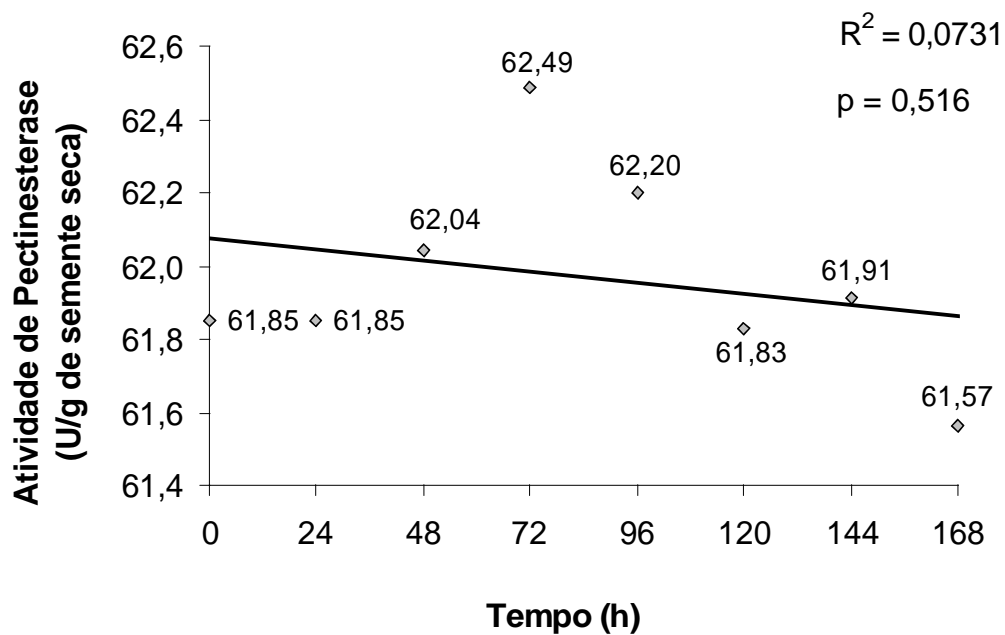


Gráfico 12: Correlação entre atividade de pectinesterase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

O comportamento da pectinesterase com relação ao tempo de fermentação foi diferente do encontrado por Holden (1959) ao pesquisar pectinesterases em sementes de cacau, que constatou atividade desta enzima até o terceiro dia de fermentação.

Conforme observa-se no gráfico 13 que houve correlação entre a atividade de pectinesterase com a temperatura ($p = 0,0119$), verificando-se que a atividade máxima de pectinesterase ocorreu as 72 h, período em que o processo fermentativo atingiu a máxima de temperatura.

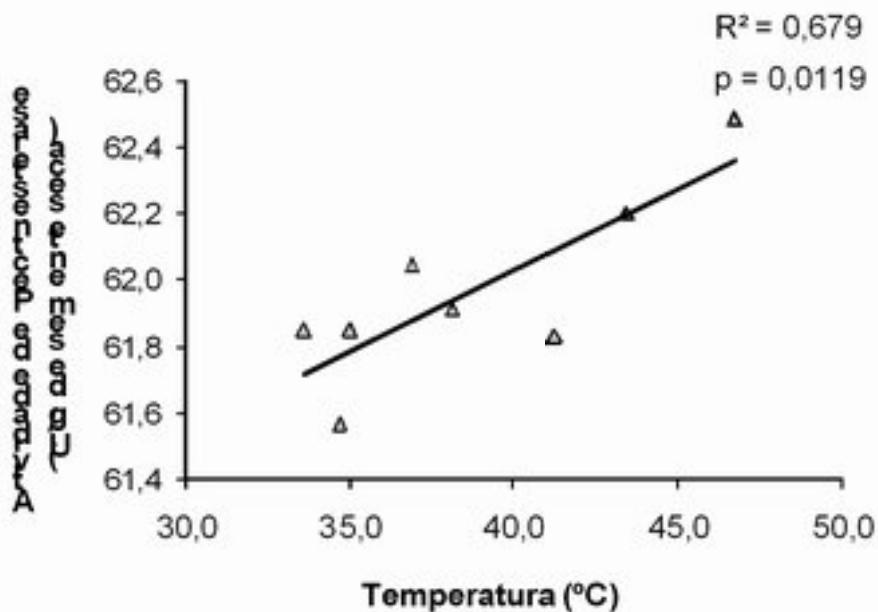


Gráfico 13: Correlação entre atividade da pectinesterase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Observando-se os gráficos 14 e 15 constata-se que não houve correlação entre atividade de pectinesterase com pH e acidez ($p = 0,317$ e $p = 0,671$, respectivamente).

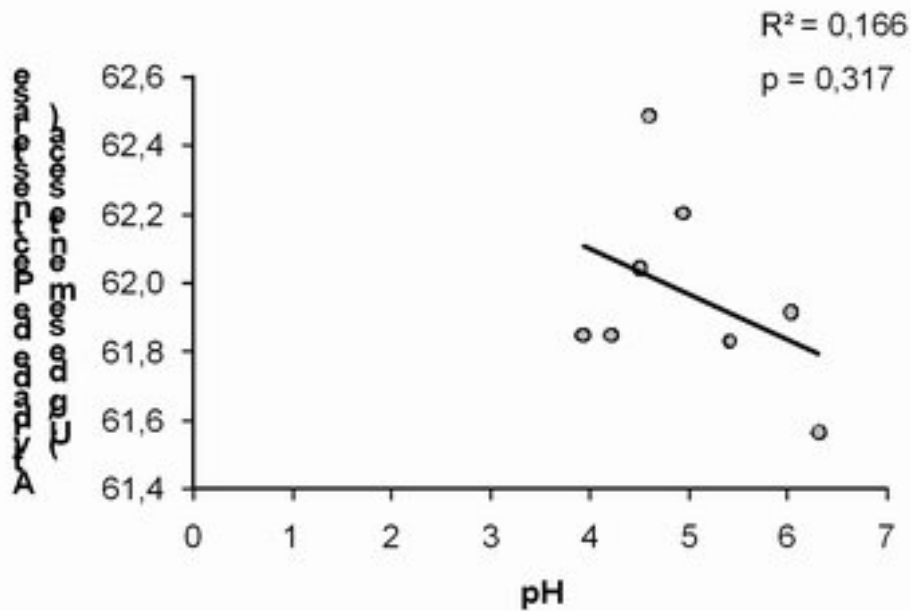


Gráfico 14: Correlação entre atividade da pectinesterase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

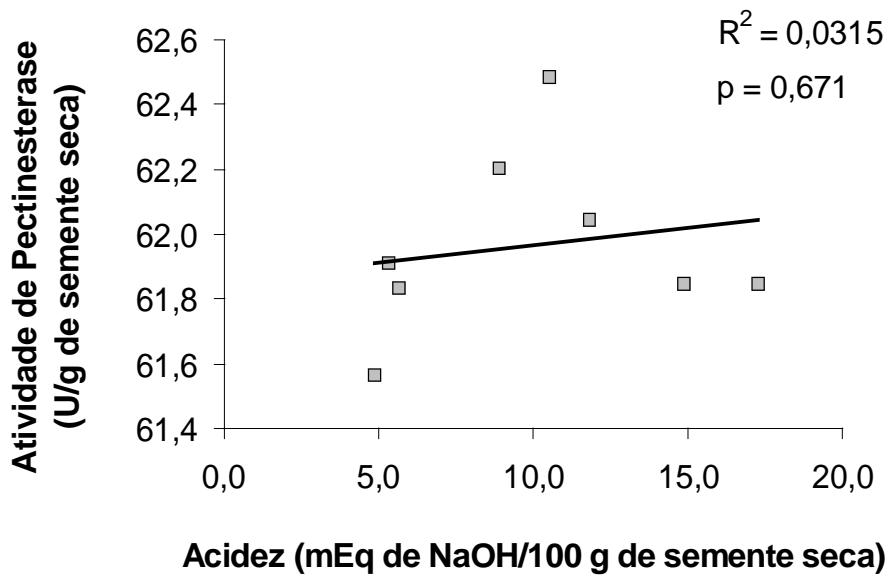


Gráfico 15: Correlação entre atividade da pectinesterase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

5.4.4 Atividade de Invertase

Durante a fermentação das sementes de cupuaçu, Vasconcelos (1999) constatou a diminuição no teor de sacarose no cotilédone durante a fermentação com simultâneo aumento de glicose e frutose, sugerindo a presença de invertase. A sacarose foi o açúcar predominante no tempo zero até 24 h de fermentação, sendo que a frutose foi o açúcar predominante a partir das 48 h até o final da fermentação e secagem. A maior concentração de glicose foi com 72 h de fermentação.

A glicose e frutose formadas juntamente com aminoácidos e peptídeos formam compostos característicos do chocolate durante a torrefação devido à reação de Maillard (HANSEN *et al.* 1998; REISDORFF *et al.*, 2004). Vasconcelos (1999) observou que após as sementes de cupuaçu serem torradas houve diminuição dos açúcares redutores e também dos açúcares totais. Portanto, a ação da invertase é importante para a formação do flavor e sua presença durante todas as etapas de fermentação é fundamental.

A invertase apresentou atividade durante todo o processo de fermentativo, sendo que a atividade enzimática no tempo zero foi de 2,47 e finalizando as 168 h de fermentação com 2,75 U/g de semente seca. Observando-se o gráfico 16 verifica-se que houve maior atividade às 72 h de fermentação, atingindo 3,76 U/g de semente seca, sendo 52,22 % a mais da atividade inicial, porém pode-se constatar que não houve correlação entre o tempo e a atividade da invertase ($p = 0,874$).

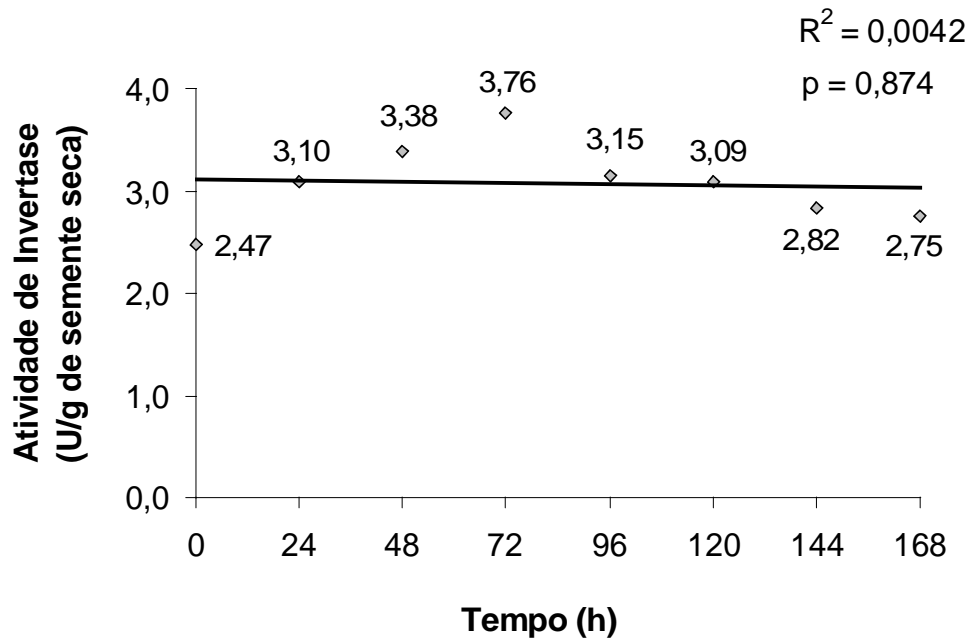


Gráfico 16: Correlação entre atividade da invertase e o tempo de fermentação das sementes de cupuaçu

A atividade total de invertase no cotilédone de cacau no experimento de Hansen *et al.* (1998) foi baixa, 0,037 U/g de semente de seca, no tempo zero, não sendo mais detectada a partir do segundo dia de fermentação. Portanto, esta enzima demonstrou maior atividade nas sementes de cupuaçu.

A maior atividade desta enzima ocorreu quando a temperatura atingiu a máxima de 46,7 °C às 72 h de fermentação. O gráfico 17 demonstra a atividade da invertase com relação à temperatura, pode-se ver que houve correlação entre ambas ($p = 0,0305$).

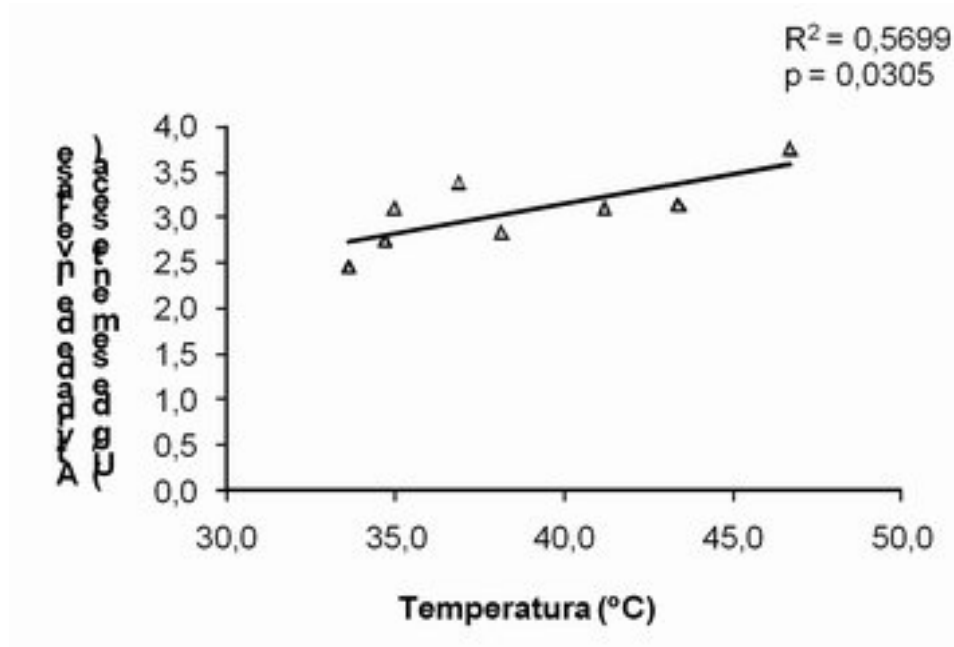


Gráfico 17: correlação entre atividade da invertase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Observando-se os gráficos 18 e 19 verifica-se que não houve correlação entre atividade de invertase, pH e acidez, ($p = 0,631$ e $p = 0,899$, respectivamente), durante os diversos estágios de fermentação. Porém, a maior atividade desta enzima foi observada em pH de 4,6, similar ao que foi encontrado no estudo das enzimas de fermentação de sementes de cacau por Hansen *et al.* (1998) que verificaram que o pH ótimo de atividade da invertase em cotilédono de cacau é em pH 4,5.

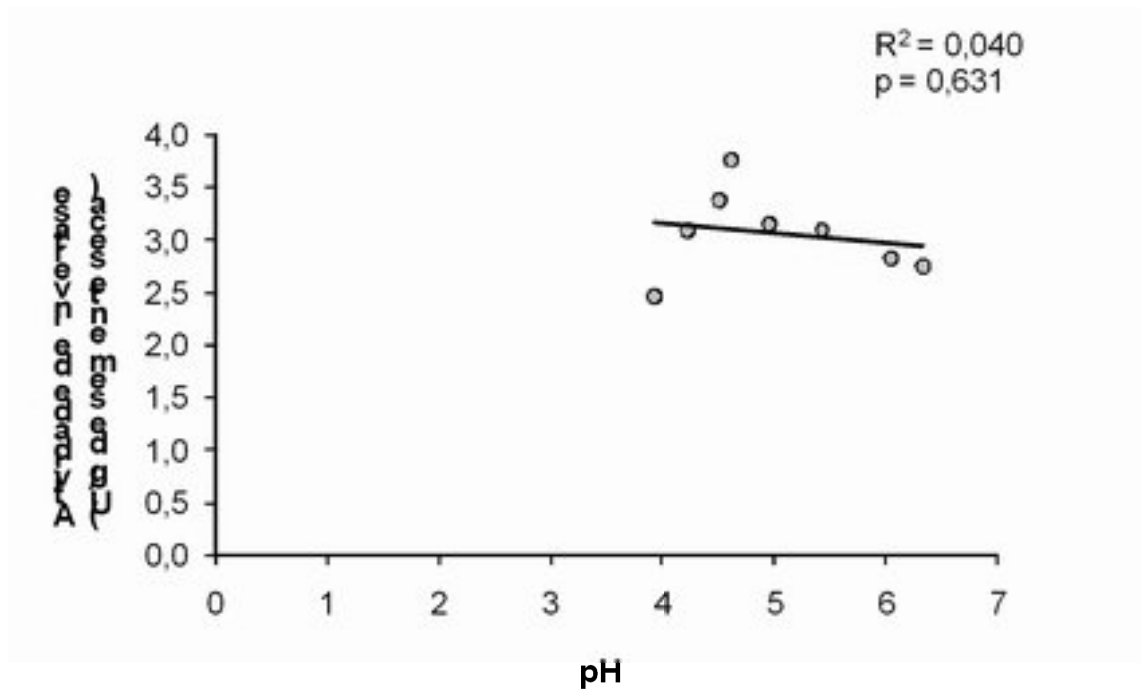


Gráfico 18: Correlação entre atividade de invertase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

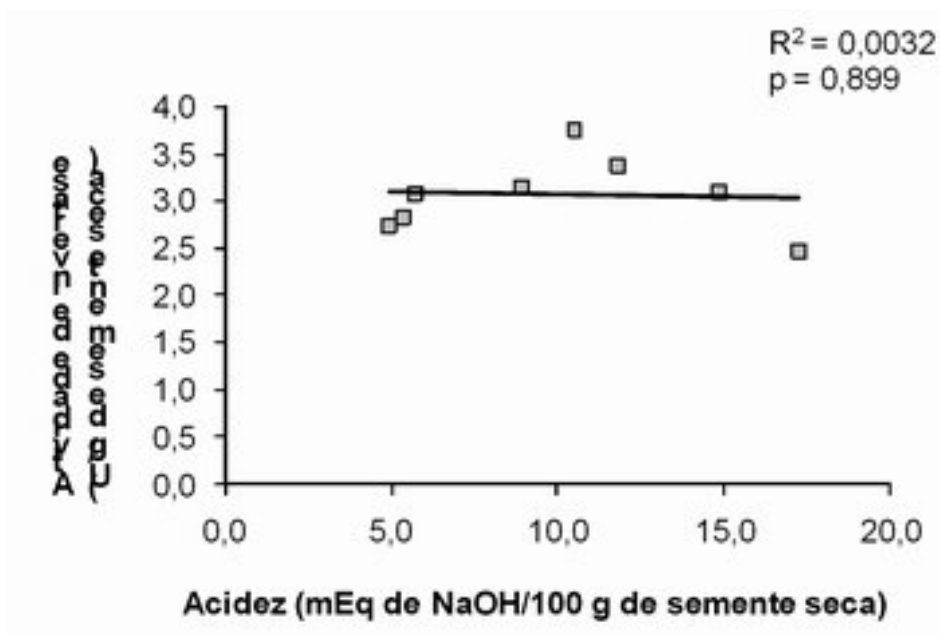


Gráfico 19: Correlação entre atividade de invertase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

5.9.5 Atividade de Amilases

A α -amilase apresentou atividade até as 72 h de fermentação, sendo mais ativas após 24 h de fermentação, com atividade de 2,97 U/g de semente seca (gráfico 20), sendo 24,78 % a mais da atividade no tempo zero. Observando-se o gráfico 20 pode-se verificar que houve correlação entre a atividade de α -amilase e o tempo de fermentação ($p = 0,002$).

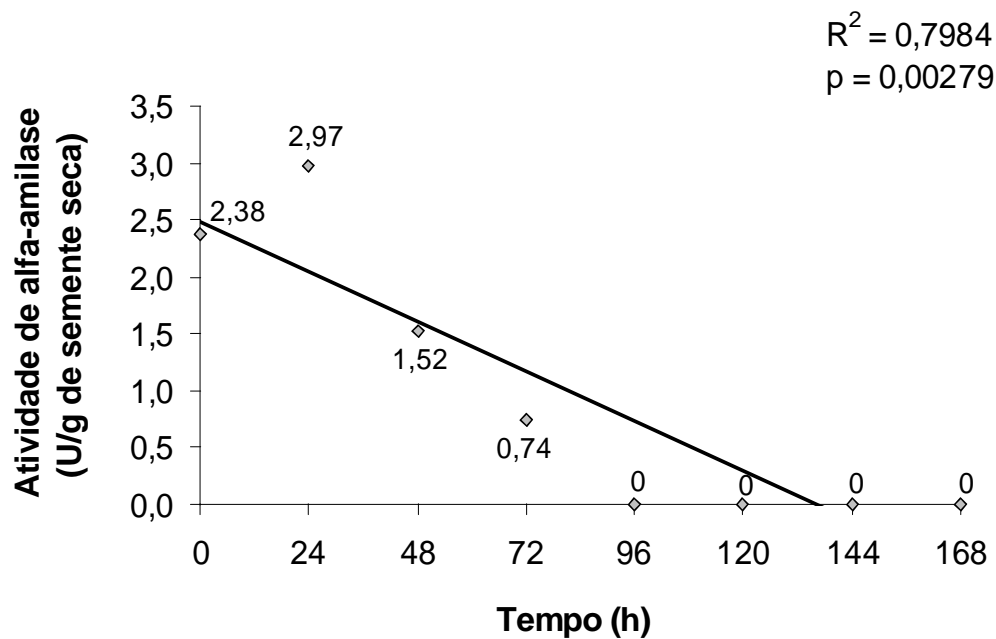


Gráfico 20: Correlação entre atividade de α -amilase e o tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

Nas 72 h de fermentação foi o período em que ocorreu a máxima de temperatura (46,7 °C), havendo grande diminuição da atividade enzimática. Porém, observando-se o gráfico 21 verifica-se que não houve correlação entre atividade de α -amilase e temperatura ($p = 0,197$).

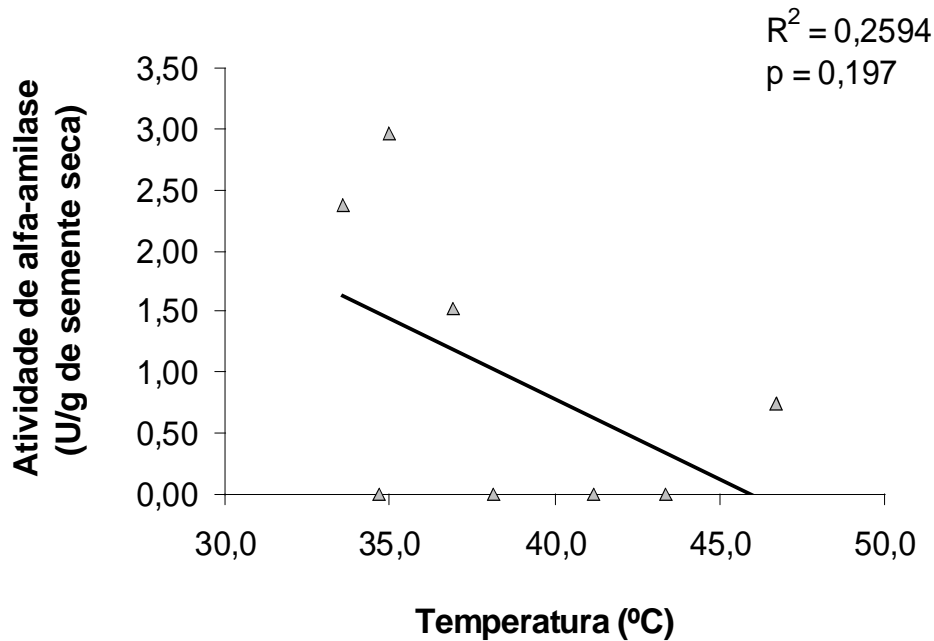


Gráfico 21: Correlação entre atividade de α -amilase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Holden (1959) constatou a presença de amilases em fermentações com sementes de cacau ao realizar fermentações em caixas e em montões por quatro dias, observando decréscimo constante durante este período nos dois tipos de fermentação. Nas fermentações realizadas por este autor a temperatura das sementes durante o processo fermentativo em montões está sempre acima de 40 °C alcançando algumas vezes ± 50 °C, nestas fermentações houve maior perda de amilases do que nas fermentações em caixa que iniciou a 36 °C e terminou com 48 °C sendo este o máximo de temperatura, portanto as amilases em sementes de cacau parecem reduzir devido ao aumento da temperatura durante o processo fermentativo.

Pode-se verificar que a atividade de α -amilase apresentou correlação com as variações de pH ($p = 0,0132$) e acidez ($p = 0,00115$) conforme se observam nos gráficos 22 e 23, respectivamente. Durante a máxima atividade de α -amilase encontrava-se o pH em 4,21 e a acidez em 14,87 mEq de NaOH/100 g de semente seca.

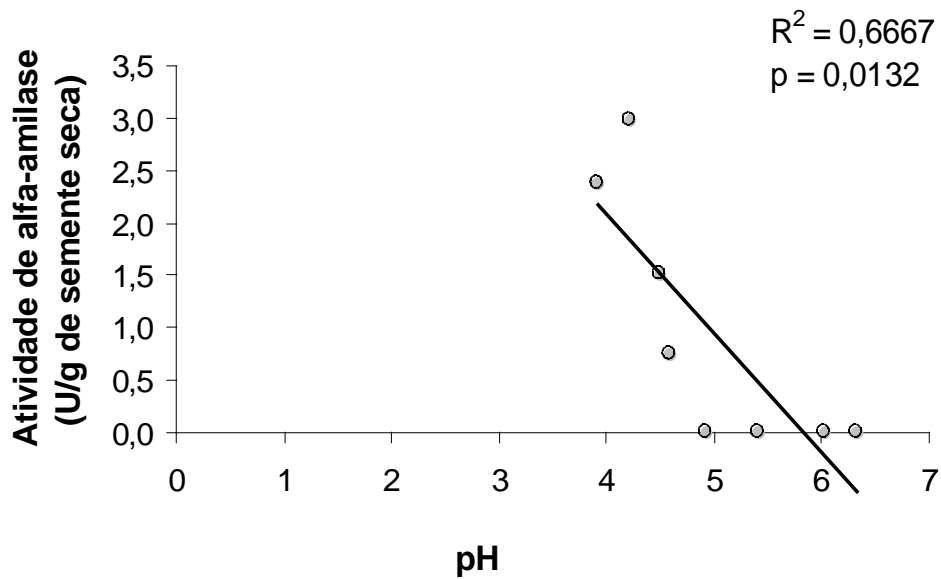


Gráfico 22: Correlação entre atividade de α -amilase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

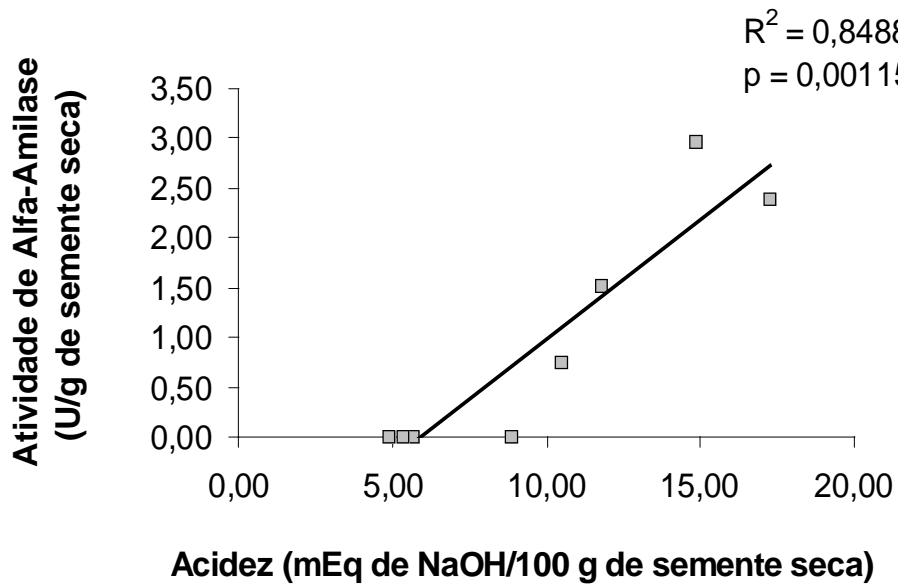


Gráfico 23: Correlação entre atividade de α -amilase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

tiva durante toda fermentação, porém sua atividade

encontrou-se bastante reduzida ao final do processo fermentativo, passando de 23,9 no tempo zero para 1,27 U/g de semente seca (Gráfico 24), representando um pouco mais que 5% da atividade inicial. O gráfico 24 demonstra que houve correlação entre atividade de β -amilase e tempo de fermentação ($p = 0,0149$).

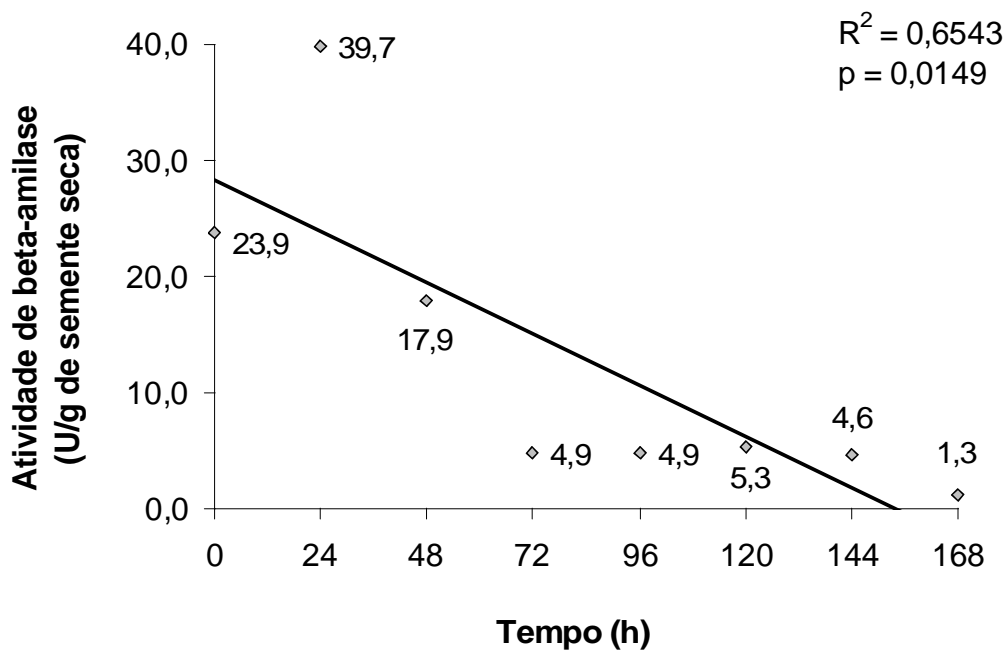


Gráfico 24: Correlação entre atividade de β -amilase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

Observando-se o gráfico 24 pode-se ver que nas 72 h de fermentação houve diminuição significativa da atividade de β -amilase, período em que se tem a maior temperatura do processo fermentativo (46,7 °C), porém, não houve correlação entre a temperatura e a atividade de β -amilase (Gráfico 25).

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

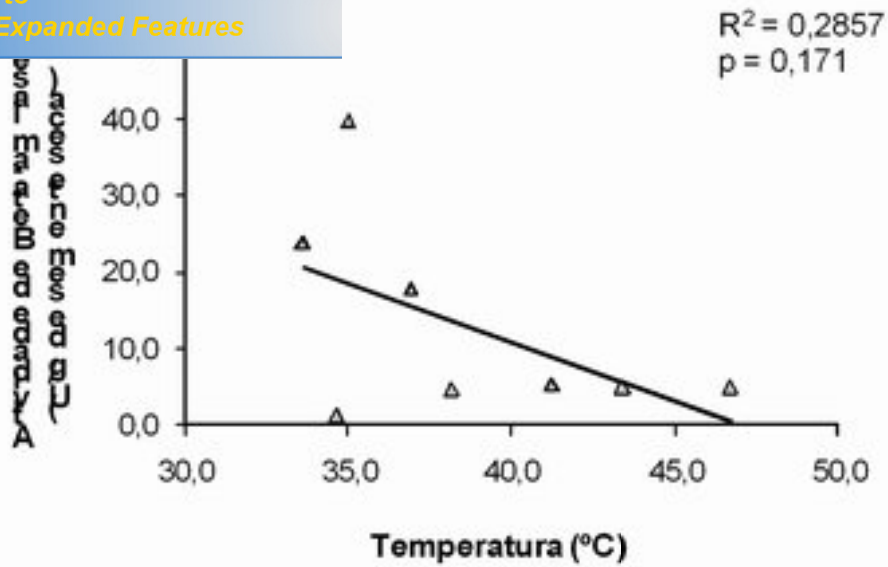


Gráfico 25: Correlação entre atividade de β-amilase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Observando-se os gráficos 26 e 27 pode-se verificar que houve correlação entre a atividade de β-amilase com pH ($p = 0,0393$) e acidez ($p = 0,0118$). Durante a máxima atividade de β-amilase encontrava-se o pH em 4,21 e a acidez em 14,87 mEq de NaOH/100 g de semente seca.

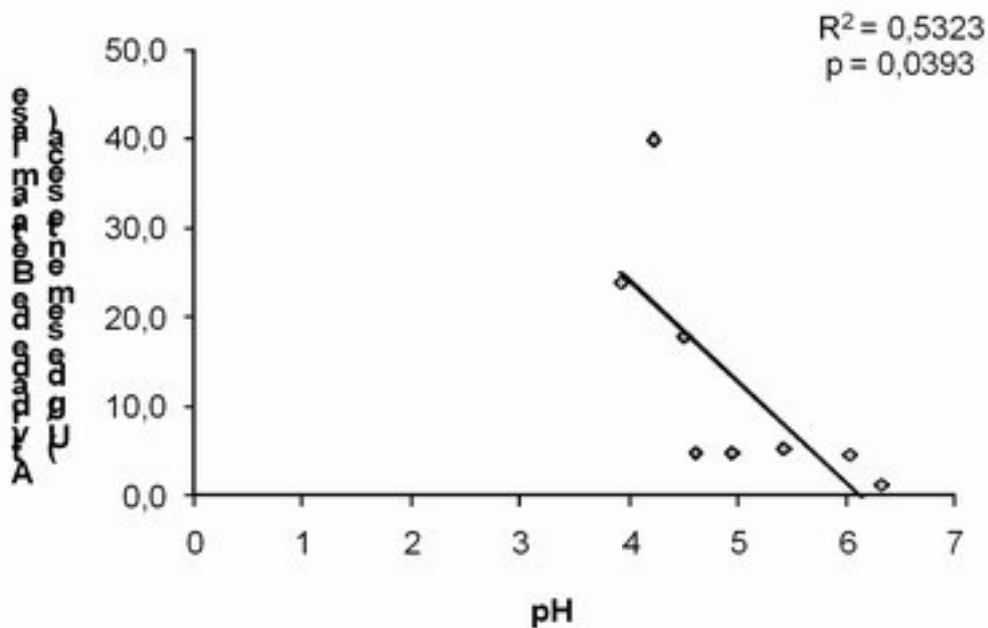


Gráfico 26: Correlação entre atividade de β-amilase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

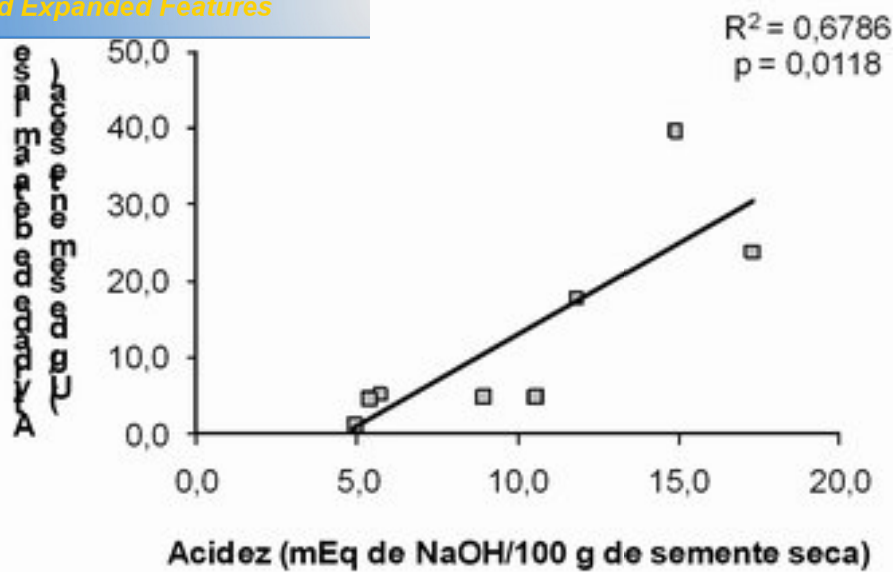


Gráfico 27: Correlação entre atividade de β -amilase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

5.9.6 Atividade de Proteases

As proteases, durante a fermentação, atuam sobre as proteínas formando peptídeos e aminoácidos que são responsáveis pelo flavor e a ação parece depender do pH e temperatura (BIELH, 1961; BIELH; PASSERN, 1982; REISDORFF *et al.*, 2004).

De acordo com Varnam; Sutherland (1997), as enzimas proteolíticas são as mais importantes na formação do aroma e sabor, sendo mais ativas na fase anaeróbica de

fermentação:

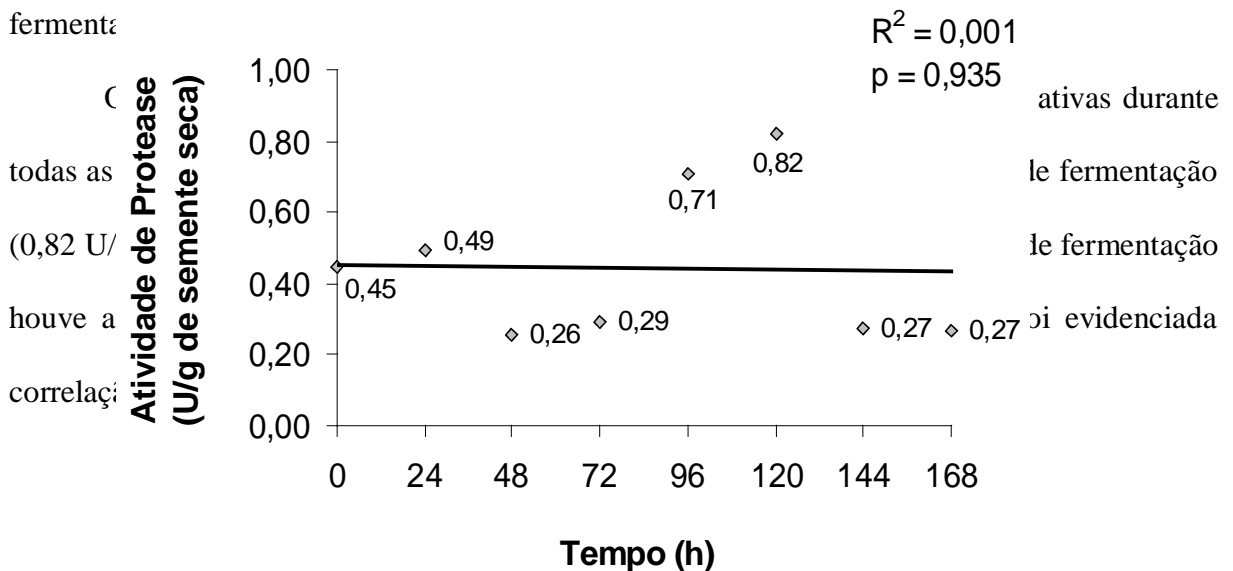


Gráfico 28: Correlação entre atividade de protease e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

Aragão (1991) constatou redução linear na concentração das proteínas das sementes de cupuaçu, durante a fermentação de sementes frescas do tempo zero até 168 h de fermentação, comprovando a atividade proteolítica durante todo o processo fermentativo.

Observando-se o gráfico 29, pode-se verificar que não houve correlação entre atividade de protease e a temperatura nos diferentes tempos de fermentação ($p = 0,524$).

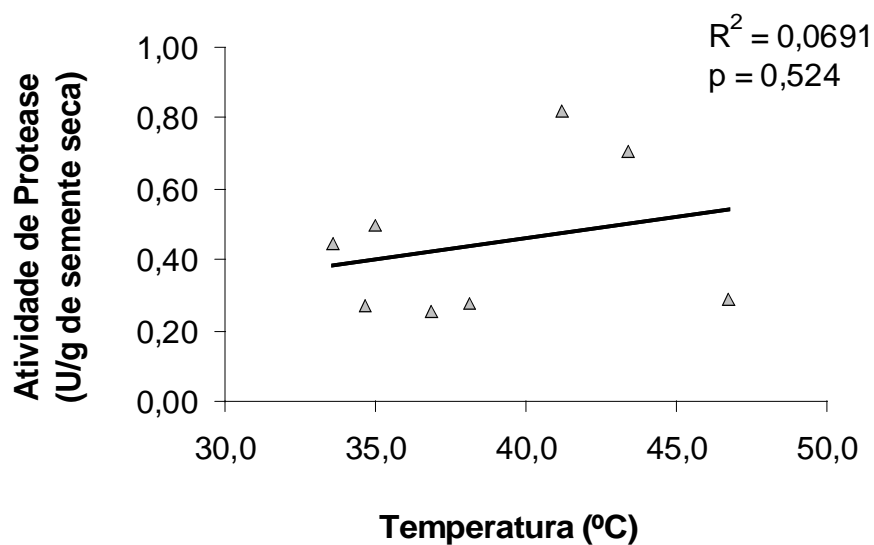


Gráfico 29: Correlação entre atividade de protease e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

a

endoprotease aspártica e a carboxipeptidase. A endoprotease tem apresentado atividade ótima

carboxipeptidase em pH um pouco mais alto, em torno de 5,8 (BYTOF *et al.*, 1995; AMIM *et al.*, 1998; HANSEN *et al.*, 1998; GUILLOTEAU *et al.*, 2005). Além destas duas proteases, também foi verificada a presença de aminopeptidase que exibe pH ótimo em torno de 7,0 (HANSEN *et al.*, 1998).

Reisdorff *et al.* (2004) detectaram presença de carboxipeptidase e endopeptidase aspártica em sementes de cupuaçu não fermentadas, congeladas e liofilizadas, constatando pequena diferença na atividade destas enzimas quando comparadas com as encontradas no cacau, estando provavelmente as duas enzimas presentes durante a fermentação de sementes de cupuaçu.

Reisdorff *et al.* (2004) determinaram que nas sementes não fermentadas de cupuaçu a atividade de endopeptidase aspártica teve atividade ótima em pH 3,45 a 3,55, e a carboxipeptidase teve atividade máxima ao redor de 5,4, sendo similar ao que tem sido reportado para sementes de cacau.

No presente experimento, realizado com sementes de cupuaçu, podem ser observados (gráfico 28) dois picos de ação de proteases, as 24 h e as 120 h, podendo significar a ação de dois tipos de enzimas durante a fermentação, período em que as sementes de cupuaçu encontravam-se com pH 4,21 às 24 h e pH 5,42 às 120 h. Porém, não pôde ser constatada correlação entre atividade de protease e pH ($p = 0,779$) e também com acidez ($p = 0,904$),

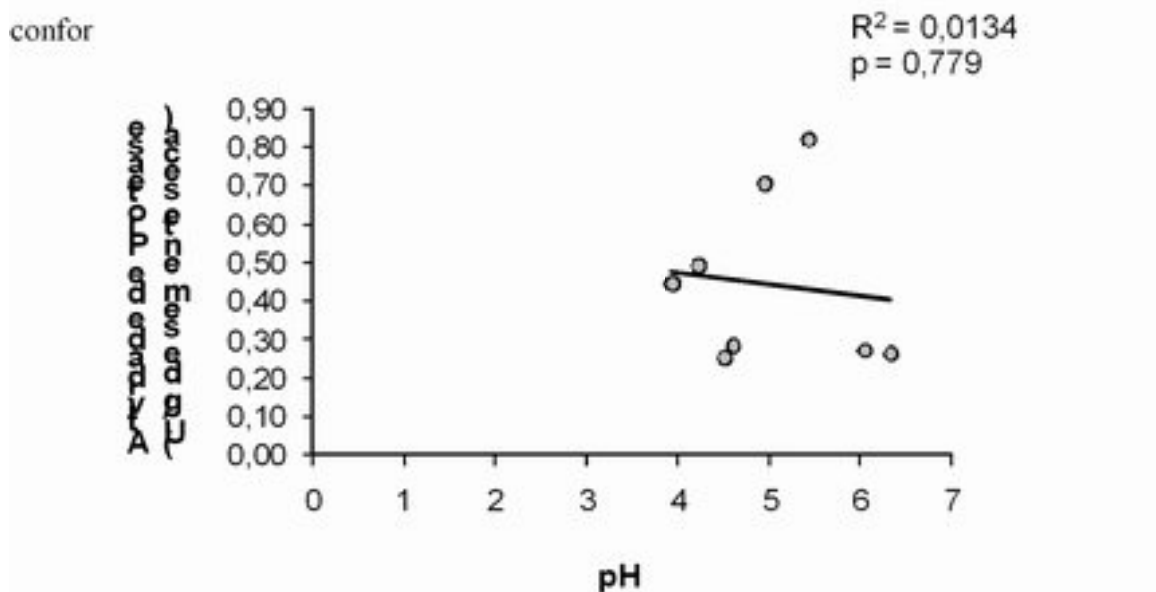


Gráfico 30: Correlação entre atividade de protease e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

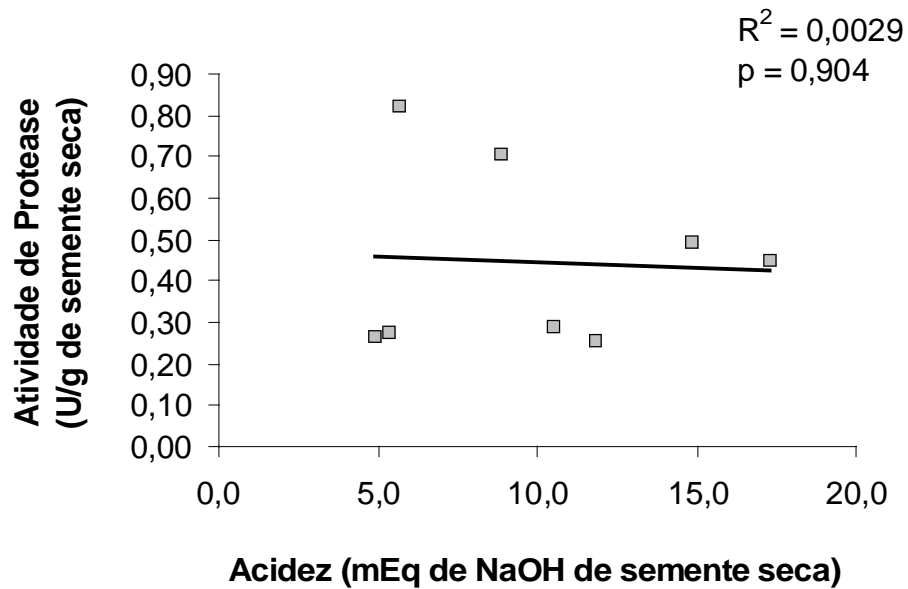


Gráfico 31: Correlação entre atividade de protease e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

Reisdorff et al. (2004) constatou também diferenças qualitativa e quantitativa entre as globulinas presentes nas sementes de cupuaçu e cacau, indicando um menor potencial para gerar precursores do aroma de chocolate para o cupuaçu em relação ao cacau. Para minimizar essa diferença, sugerem adaptações na tecnologia de fermentação das sementes, uma vez que

ões bioquímicas de produzir os aromas de chocolate, principalmente após a torrefação das amêndoas.

Vasconcelos (1999) determinou os aminoácidos presentes nas sementes de cupuaçu antes, durante e após o processo fermentativo, encontrando, em ordem decrescente, maiores valores para ácido aspártico, glutâmico, valina, leucina, treonina, alanina, serina, isoleucina e tirosina. As diferenças nos teores dos aminoácidos nas amostras, em valores absolutos, foram pequenas.

Pesquisas relatam que os aminoácidos livres contribuem para o sabor das amêndoas torradas de cacau (Vasconcelos, 1999). De acordo com Rohsius *et al.* (2006), a quantidade de aminoácidos livres nas sementes de cupuaçu processadas, quando comparada com sementes de cacau, é baixa. Portanto, há necessidade de uma pesquisa mais profunda sobre quais os tipos de proteases que atuam durante a fermentação de sementes de cupuaçu e, assim, tentar conduzir a fermentação para maior formação destes compostos de importância fundamental para o desenvolvimento do flavor.

5.9.7 Atividade de Polifenoloxidasas

Foram identificados nas sementes de cupuaçu nove compostos flavonóides antioxidantes: (+)-catequina, (+)-epicatequina, isoscutelareína 8-O-β-D-glicoronídeo, Hipolaetina 8-O-β-D-glicoronídeo, quercetin 3-O-β-D-glicoronídeo, quercetin 3-O-β-D-glicoronídeo 6-*o*-metil éster, quercetin, caempferol e isoscutelareína 8-O-β-D-glicoronídeo 6-*o*-metil éster. Foram identificados também dois compostos flavonóides glicosídeos sulfatados (theograndins I e II) (YANG *et al.*, 2003).

A polifenoloxidase mostrou-se ativa durante todas as etapas do processo fermentativo, havendo maior atividade com 24 h de fermentação, apresentando 2173 U/g (tabela 2),

atividade inicial. As 168 h de fermentação a atividade de polifenoloxidase encontrava-se superior a inicial em 6,19 % (1440 U/g).

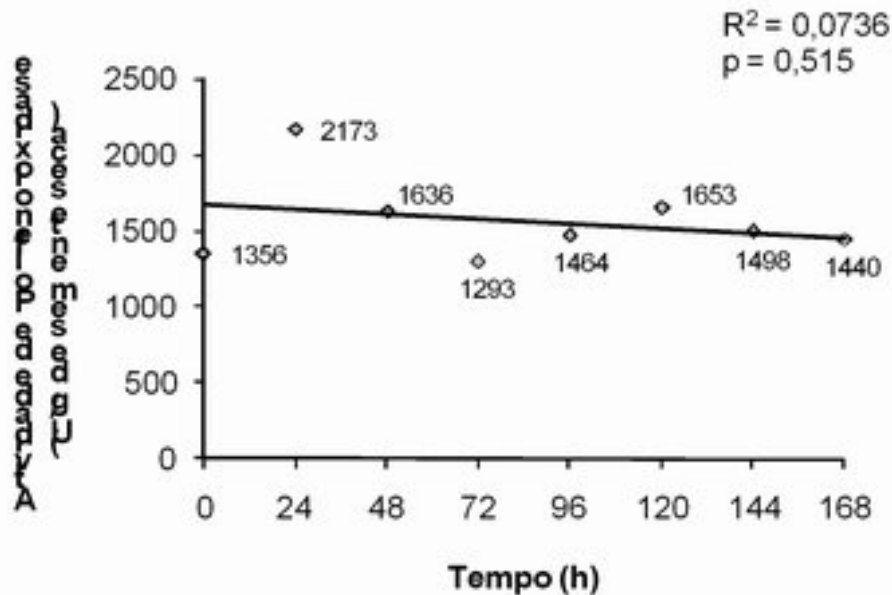


Gráfico 32: correlação entre atividade de polifenoloxidase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

O comportamento desta enzima na fermentação realizada com sementes de cupuaçu mostrou-se diferente dos encontrados por Broadbent *et al.* (1997) que realizou fermentação com sementes de cacau em caixas de madeira e em montões, obtendo nos dois tipos de fermentação atividade de polifenoloxidase reduzida a zero ao final da fermentação. Hansen *et al.* (1998), verificaram intensa inibição da polifenoloxidase durante a fermentação,

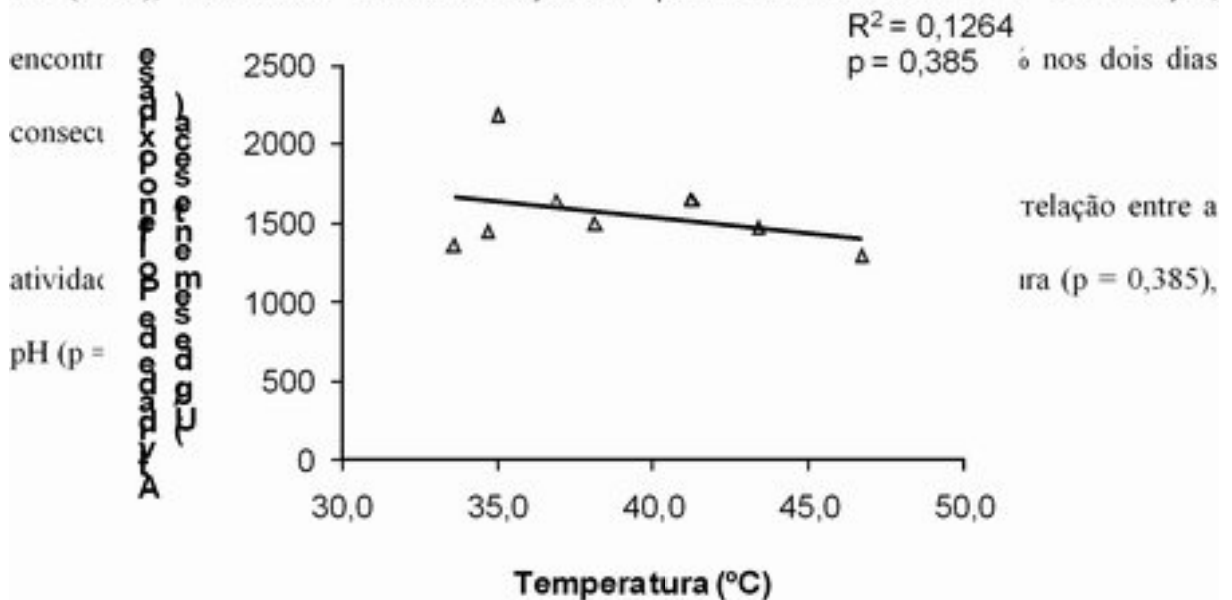


Gráfico 33: Correlação entre atividade de polifenoloxidase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

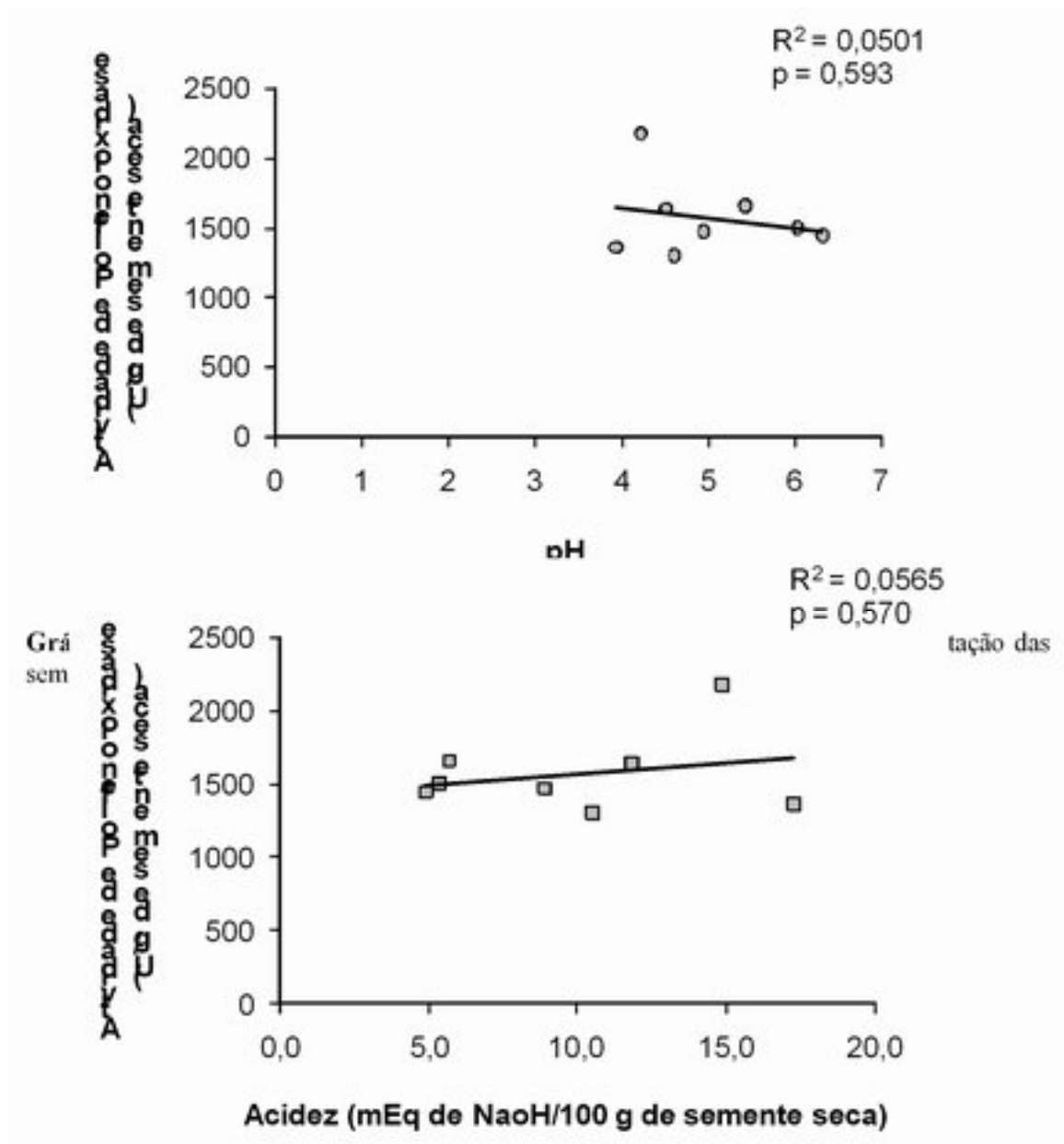


Gráfico 35: Correlação entre atividade de polifenoloxidase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

No cacau, a quantidade de compostos polifenólicos, flavonóides, taninos, grupo flavan-3-ol e antocianinas são responsáveis pelo gosto adstringente e afeta a digestibilidade do cacau. Alguns grupos de compostos solúveis são de interesse na avaliação da adstringência e amargura do cacau (BONVEHÍ; COLL, 1997). Os fenóis oxidados reagem com as proteínas ou com grupos de aminoácidos, peptídeos e polissacarídeos que são importantes para o flavor do cacau (BRITO *et al.*, 2002). Portanto, a persistência da atividade da polifenoloxidase nas sementes de cupuaçu é conveniente para a formação do flavor.

Além de estarem envolvidas na formação do flavor, as polifenoloxidases contribuem para o escurecimento das sementes, pois atuam oxidando o-difenóis a quinonas. As quinonas podem complexar-se com taninos de alto peso molecular e formar pigmentos marrons (HANSEN *et al.* 1998). Observando-se a figura 5, pode-se notar grande alteração na coloração das sementes de cupuaçu no período de 48 h para as 72 h de fermentação, coincidindo com a etapa de aeração que é iniciada com o revolvimento das sementes com 48 h após o início do processo fermentativo.

5.9.8 Atividade de Peroxidase

A peroxidase mostrou-se ativa durante todas as etapas do processo fermentativo, havendo aumento de atividade nas primeiras 24 h de fermentação (29507 U/g), e acréscimo de quase 27 % em relação à atividade inicial (21751 U/g). Nas etapas posteriores houve declínio

, reduzindo cerca de 60 % ao final da fermentação (12660

U/g). Observando-se o gráfico 36, verifica-se que houve correlação entre o tempo de fermentação e a atividade de peroxidase ($p = 0,0123$).

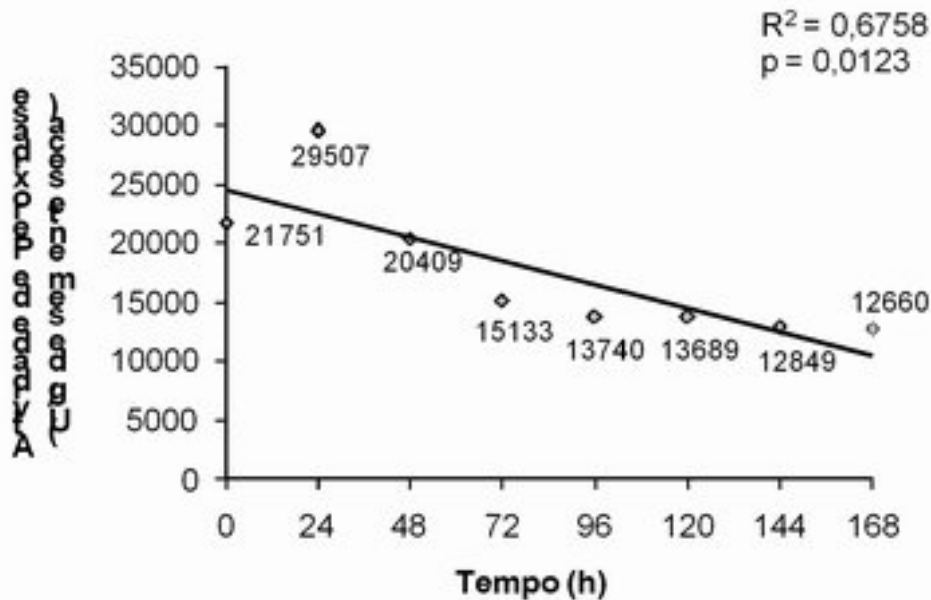


Gráfico 36: Correlação entre atividade de peroxidase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

Em experimentos com sementes de cacau, Broadbent *et al.* (1997) obtiveram redução constante da atividade desta enzima, porém a peroxidase também se mostrou ativa durante todo o processo fermentativo, tanto em fermentações realizadas em caixas de madeira quanto nas conduzidas em montões, havendo diminuição de quase 50% em relação à atividade no tempo zero.

Sakharov e Ardila (1999) fermentaram sementes de cacau por 4 dias e determinaram a atividade de peroxidase Utilizando dois substratos: guaiacol e o-fenilenediamina. Com guaiacol, observaram um aumento da atividade da peroxidase de 5.700 U/g (tempo zero) para mais de 40.000 U/g nas 72 h de fermentação, com redução após este período, atingindo cerca de 20.000 U/g nas 96 h.

os oxidantes de compostos fenólicos e usam peróxido de hidrogênio como co-substrato, portanto, a persistência da atividade desta enzima pode ser de interesse na formação do flavor do chocolate de cupuaçu.

Aragão (1991) verificou, nas sementes de cupuaçu, que o teor de compostos fenólicos poliméricos decresceu a partir do 3º dia e nos dias subseqüentes, atribuindo a provável ação da peroxidase que oxida estes polímeros dando pigmentos de coloração escura.

Durante a máxima atividade de peroxidase, nas 24 h de fermentação, a temperatura encontrava-se em 35 °C. Observando-se o gráfico 37, não houve correlação entre temperatura e atividade de peroxidase ($p = 0,218$).

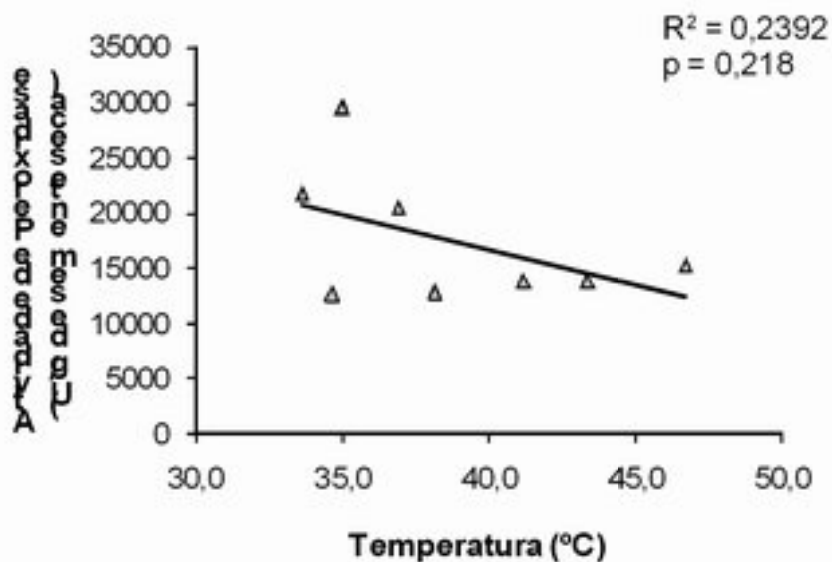


Gráfico 37: correlação entre atividade de peroxidase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

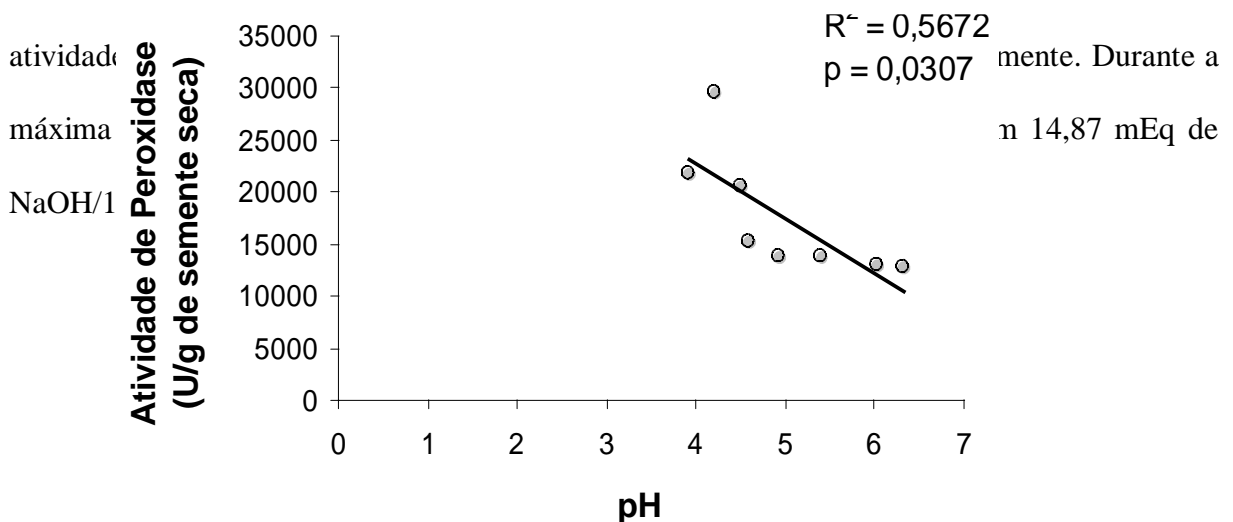


Gráfico 38: correlação entre atividade de peroxidase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

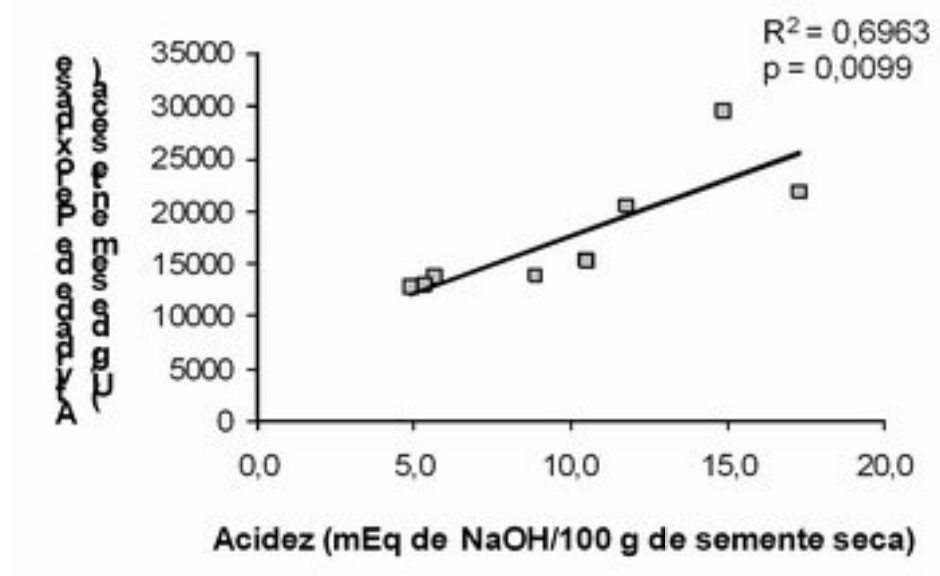


Gráfico 39: correlação entre atividade de peroxidase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

5.9.9 Atividade de Lipase

A principal substância de reserva das sementes de cupuaçu é de natureza lipídica, como nas sementes as lipases atuam sobre glicerol e ácidos graxos para formar açúcar durante a germinação é natural que esta enzima esteja presente nas sementes de cupuaçu (CUNHA *et al.*, 1987; HILL; BEEVERS, 1987; SAID; PIETRO, 2004).

A lipase apresentou atividade durante todos os estágios de fermentação, havendo maior atividade enzimática após 72 h do início do processo (0,67 U/g de amostra seca), apresentando 28,84 % mais a atividade que no tempo zero. A partir das 96 h de fermentação

as 168 h de fermentação (0,47 U/g de amostra seca).

Observando-se o gráfico 40 pode-se afirmar que não houve correlação entre a atividade enzimática e o tempo de fermentação ($p = 0,252$).

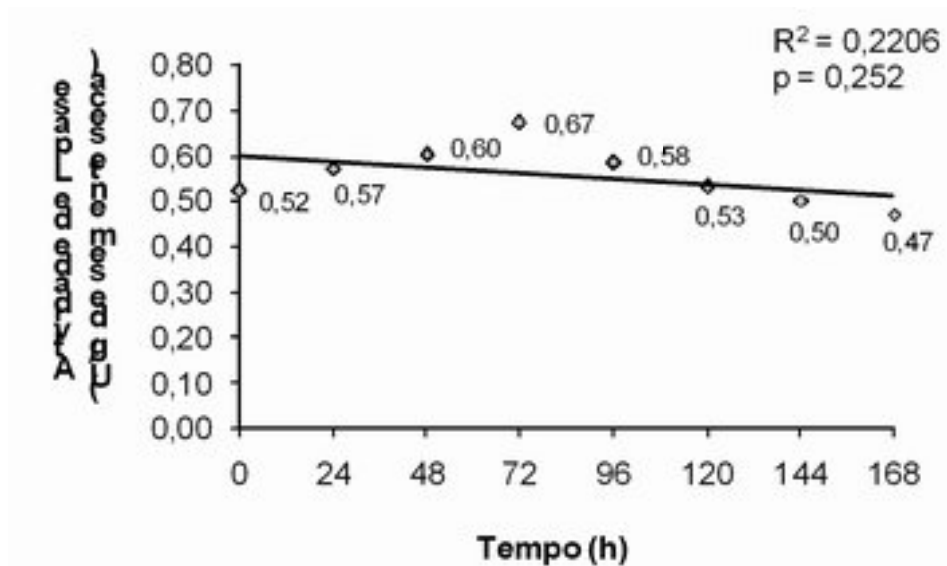


Gráfico 40: Correlação entre atividade de lipase e tempo de fermentação das sementes de cupuaçu.

Aragão (1992) verificou o efeito do tempo de fermentação no teor de gordura das sementes e testa de cupuaçu e constatou pouca diminuição da gordura do cotilédone, sendo 58,86% no tempo zero e 58,22% nas 168 h de fermentação, porém na testa a mudança foi significativa passando de 9,93% para 6,05%.

Com relação a concentração de ácidos graxos presentes em gorduras de sementes de cupuaçu não fermentadas, Venturieri et al. (1975) encontraram 42,8 % de ácido oléico, 38,3 % de ácido esteárico e 5,8 % de ácido palmítico. Silva (1988) também encontrou em gorduras de sementes de cupuaçu maiores teores de ácido oléico, 43,9 %, e esteárico, 30,8 %, seguidos dos ácidos araquídico com 11,0 % e palmítico com 7,2 %.

Cohen e Jackix (2004) constataram 57,78 % de gorduras saturadas, 38,15 % de monoinsaturadas e 2,63 % de poliinsaturadas e determinaram a composição de ácidos graxos presentes na gordura de sementes de cupuaçu fermentadas encontrando teor de ácido esteárico

), 38,15 % e 37,83 %, respectivamente, seguidos do palmítico com 11,22 %, apresentando, portanto maior concentração do que foi detectado em gordura de sementes não-fermentadas.

Segundo Carvalho et al. (2005) as sementes de cupuaçu frescas têm um teor de lipídeos de 64,85 %, reduzindo após fermentação com 53,60 %, e verificou também sementes fermentadas e torradas que tiveram o conteúdo lipídico de 53,73 %, portanto não diferiu muito das sementes fermentadas.

Essas diferenças na composição lipídica das sementes de cupuaçu frescas e após a fermentação podem ter sido ocasionadas pela ação da lipase.

A maior atividade de lipase, nas 72 h de fermentação, foi quando a temperatura de fermentação atingiu a máxima de 46,7 °C, porém, observando-se o gráfico 41 não se pode afirmar que há correlação entre atividade de lipase e temperatura ($p = 0,0678$).

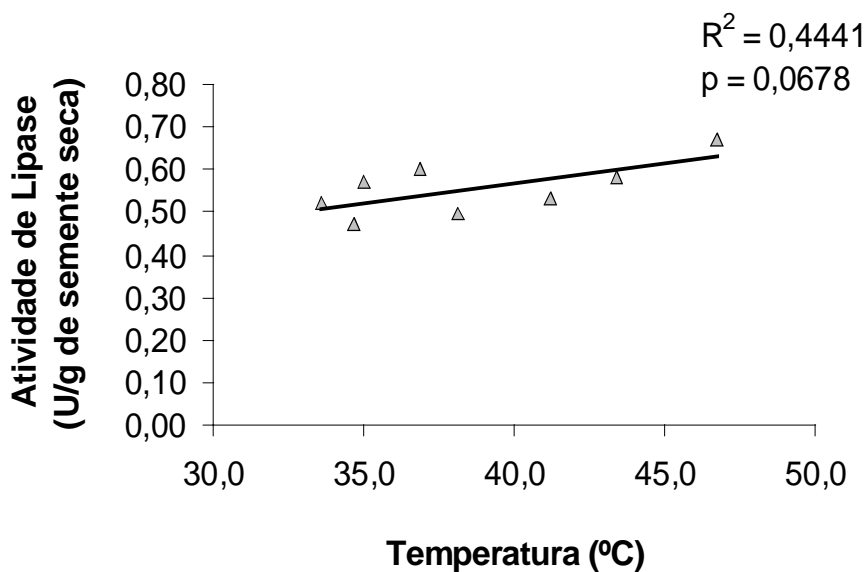


Gráfico 41: Correlação entre a atividade de lipase e temperatura durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Observando-se os gráficos 42 e 43 verifica-se que não houve correlação entre a atividade de lipase e pH ($p = 0,128$) e acidez ($p = 0,386$), respectivamente.

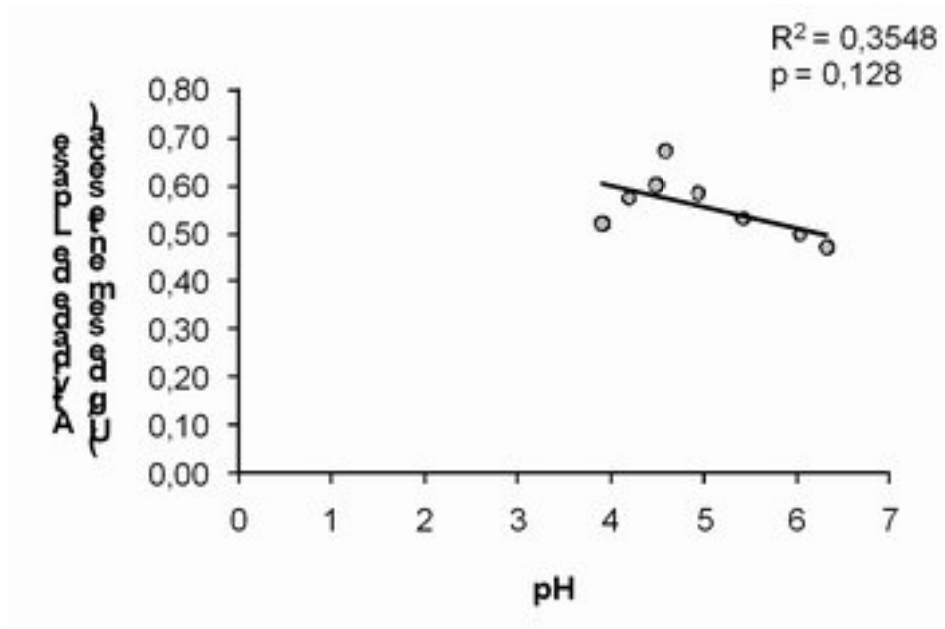


Gráfico 42: Correlação entre atividade de lipase e pH durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

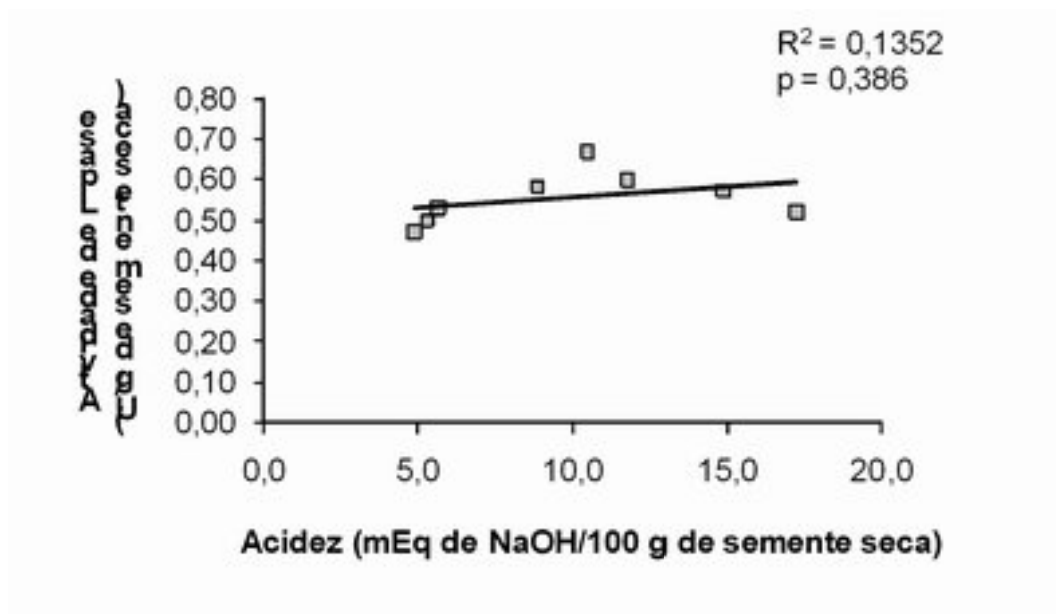


Gráfico 43: Correlação entre atividade de lipase e acidez durante a fermentação das sementes de cupuaçu.

CONCLUSÃO

- A temperatura média máxima das sementes de cupuaçu foi de 46,7 °C com 72 h de fermentação.
- As médias de pH e a acidez titulável foram inversamente proporcionais, tendo a média do pH variado de 3,92 no tempo zero para 6,32 nas 168 h de fermentação e a média da acidez variado de 17,29 para 4,89 meq de NaOH/100 g de semente seca.
- Todas as enzimas, com exceção das proteases, apresentaram máxima atividade enzimática nas primeiras 72 horas do início do processo fermentativo, coincidindo

mentação, cujas temperaturas variaram entre 35 a 47°C e

pH de 4,2 a 4,6.

- Verificou-se que há correlação entre as atividades enzimáticas da alfa-amilase, beta-amilase, peroxidase e poligalacturonase, com o tempo de fermentação, e, também com os valores de pH e acidez medidos durante os 7 dias fermentação das sementes de cupuaçu. A temperatura não exerceu nenhuma influência na atividade dessas enzimas.
- A invertase e pectniesterase sofreram influência, somente, da temperatura de fermentação; os demais parâmetros não exerceram nenhum efeito na atividade enzimática dessas enzimas.
- O tempo de incubação e os valores de pH, temperatura e acidez medidos durante as 168 horas de fermentação das sementes de cupuaçu não influenciaram estatisticamente a atividade enzimática da celulase, lipase, polifenoxidase e proteases.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: edited Ig W. Howitz 16^a ed. Washington, 1997. 850p.

ABU-GOUKH, A.A.; BASHIR, H.A. Changes in pectin enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. **Food Chemistry**. 83, p. 213-218, 2003.

ACHAKZAI, A.K.K.; KAYANI, S.A.; YAQOOB M.; NABI, A. Effect of fertilizaer and inoculation on Lipase and Urease Activity of Mature Soybean cv. Willians-82 seeds. **Asian Journal of Plant Sciences**, 2 (9): 692-695, 2003.

AGRAWAL, A. P.; BASARKAR, P. W.; SALIMATH, P. M.; PATIL, S. A. Role of cell wall-degrading enzymes in pod-shattering process of soybean, *Glycine max* (L.) Merril. **Current Science**, vol. 82, n. 1, 10 Jan., 2002.

ARINOZ, I. L.; MOTA, M. H. G.; BENEVIDES, N. M. B.; FREITAS, A. L. P. Proteolytic activities in seeds of *Clitoria ternatea* L. during germination. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 6 (1): 15-19, 1994.

AKHTAR, M.W., PARVEEN, H.; KAUSAR, S.; CHUGHTAI, M. I. D. Lipase activity in plant seeds. **Pak. J. of Biochem.**, 8: 77-82. 1975.

ALONSO, J.; RODRÍGUEZ, M.T.; CANET, W. Detection of pectinesterase in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 16, pp. 39642, 1995.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; HARIKRISMA, K. Analyseis of Cacao Cotyledons Albumin. **Asian Journal of Plant Science**. 2 (13): 958-962, 2003.

AMIN, J.; JINAP, S.; JAMILAH B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase e Carboxypeptidase) of Cacao Bean during Fermentation. **J. Sci. Food. Agric.**, 76, p. 123-128, 1998.

AQUARONE; E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotechnologia Industrial**. Vol. 4, Ed. Edgard Blücher LTDA. 2001.

ARAGÃO, C.G. **Mudanças Físicas e Químicas da Semente de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) Durante o Processo Fermentativo**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Fundação Universidade do Amazonas. Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Manaus, 1992.

BARTOLOMÉ, B.; JIMÉNEZ-RAMSEY, L. M.; BUTLER, L. G. N. Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fraction in foods. **Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 357-362, 1995.

BATE-SMITH, E. C. Haemanalysis: The concept of relative astringency. **Phytochemistry**, 11, 907-912, 1973.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for Lipase Detection and Assay: a Critical Review. **European Journal Of Lipid Science and Technology**. v. 34, p. 133-153, 2000.

BERBERT, P.R. Determinação do teor de ácidos graxos e características físicas das sementes do *Theobroma grandiflorum* S. e do *T. bicolor* L. em comparação com a gordura do *T. cacao* L. Ver. *Theobroma*. 11(2): 91-98. 1981.

BIEHL, B.; BRUNNER, E.; PASSERN, D.; QUESNEL, V.C.; ADOMAKO, D. Acidification, proteolysis and flavour potencial in fermenting cacao beans. **J. Sci. Fd. Agric.** 36: 583-598, 1985.

BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; VOIGT, J. VOIGT, G. BYTOF, G. SERRANO, P. Nature of proteases and their action on storage proteins in cacao seeds during germination as compared with fermentation. **12th Int. cacao Research Conference, Salvador, Bahia, Brasil**, 17 ó 23, Nov., 1996.

reading: A Method for Pulp Preconditioning to Impair Strong NIB Acidification During Cocoa Fermentation in Malaysia. **J. Sci. Fd. Agric.** 51: 35-45. 1990.51: 35-45. 1990.

BIEHL, B.; PASSERN, D. proteolysis during fermentation-like incubation of cacao seeds. **J. Sci. Fd. Agric.** 33: 1280-1290. 1982.

BIEHL, B.; VOIGT, J. The Biochemistry of Chocolate Flavour Precursors. **12th Int. Cacao Research Conf. Salvador**, Nov., 1996.

BIEHL, B.; WEWETZER, C.; PASSERN, D. Vacuolar (storage) proteins of cacao seeds and their degradation during germination and fermentation. **J. Sci. Fd. Agric.** 33: 1291-1304. 1982.

BONVEHI, J.S.; COLL, F.V. Evaluation of bitterness and adstringency of polyphenolic compounds in cacao power. **Food Chemistry**. Vol. 60, n^o3, p. 365-370, 1997.

BRITO, E.S. **A Fermentação do Cacao: uma revisão**. Universidade Federal de Campinas. Nov., 1996.

BRITO, E.S.; GARCÍA, N.H.P.; AMÂNCIO, A.C. Effect of polyphenol oxidase (PPO) e air treatments on total phenol and tannin content of cacao nibs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 22 (1): 45-48, jan-abr. 2002.

BRITO, E.S.; GARCÍA, N.H.P.; AMÂNCIO, A.C. Use of a proteolytic enzyme in cocoa (*Theobroma cacao* L.) processing. **Braz. Arch. Boil. Technol.**, Vol. 47, n^o4, Curitiba, Aug., 2004.

BROADBENT, J.H.; TURATTI, J.M.; TOCCHINI, R.P.; IADEROS, M. Rural Processing of Cacao Beans in Brazil. **Trop. Sci.**, 37, p. 164-168, 1997.

BYTOF, G.; BIEHL, B; HEINRICHS, H.; VOIGT, J.. Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, 54, 15-2, 1995.

CALZAVARA, B. B. G. Fruteiras: abacaxizeiro, cajueiro, maracujazeiro, muricizeiro. Belém, IPEAN. Culturas da Amazônia, 1 (2): 1-42, 1970.

CALZAVARA, B.B.G. Cupuaçuzeiro. **EMBRAPA: Recomendações básicas** 1. Maio. 1987. 5p.

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.G. Fruticultura Tropical: O cupuaçuzeiro. **EMBRAPA**. Belém. 1984. 101p.

CARVALHO, A.V.; GARCÍA, N.H.P.; WADA, J.K.A. Caracterização Físico-Química e Curvas de solubilidade Protéica de Sementes, Amêndoas Fermentadas e Torradas de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 127-134, abr/jun, 2005.

çu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e Conservação de seu nectar por meios físico e químicos. MS Thesis, UFRRJ, Rio de Janeiro, Brazil. 1980.

CLAY, J.W. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização por Jason W. Clay, Paulo de T. B. Sampaio, Charles R. Clement. Manaus. INPA/SEBRAE, 1999.

COHEN, K.O.; JACKIX, M.N.H. Obtenção e caracterização física, química e físico-química de líquido de cupuaçu e cacau. **Braz. J. Food Technol.**, vol. 7, nº1, p. 57-67., jan/jun., 2004.

COHEN, K.O.; SOUSA, M. V.; JACKIX, M.N.H. Parâmetros Físicos e Aceitabilidade Sensorial de Chocolate ao Leite e de Produtos Análogos Elaborados com Líquor e Gordura de Cupuaçu. **Braz. J. Food Technol.**, v.8, n.1, p. 17-23, jan./mar., 2005.

COUTINHO, R.B.S. Industrialização das Sementes de Cupuaçu (*Theobroma bicolor* Humboldt). **Rev. Farm. Bioquim. Amaz.** Belém. 2 (4): 7-10, 1969.

CUNHA, J. SERÓDIO, R. dos S. Tecnologia Disponível para o beneficiamento e armazenamento do cacau. **CEPLAC**. Boletim Técnico nº177. 1995.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLE, M. Olive-mill wastewater: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, 97, p. 1828-1833, 2006.

DIAS, J.C.; ÁVILA, M.G.M. Avaliação do Grau de Fermentação e da Acidez do Cacau Comercial dos Estados do Pará e Rondônia. **CEPLAC**. Boletim Técnico nº12. 1994.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A cultura do Cupuaçu**. ISSN 1517-2449, dezembro, 1999.

ENZYME COMMITTEE. IUBMB Enzyme Nomenclature. Disponível no site <www.chem.qmul.ac.uk> acessado em março de 2005.

FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. Pectic Enzymes. In- *Microbial Enzymes and Biotechnology*, ed. W. M. Fogarty. **Applied Science**, 131, 1983.

FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL, V.C. Cacao Glycosidase and Colour Changes During Fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, 8, September, 1957.

FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL, V.C.; ROBERTS, J.B. The Interaction of Polyphenols and Proteins During Cacao Curing. **J. Sci. Food Agric.**, March, 1958.

GRIMALDI, J.; Les possibilités d'anebriation des techniques d'acobossage et de fermentation dans le processus artisanal de la préparation du cacao. *Café, cacao, Thé*. Vol. 22, n. 4, p. 303-316, 1978.

GUILLOTEAU, M.; LALOI, M.; MICHAUX, S.; BUCHELI, P.; McCARTHY, J. Identification and characterisation of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. **J. Sci. Food Agric.** 85:5496562, 2005.

...]. Continuous Spectrophotometric Assay for Plant Pectin Methyl Esterase. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 34, nº 3, p. 441-444, 1986.

HANSEN, C.E.; OLMO, M. del; BURRI, C. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, 77, p. 273-281, 1998.

HASHIM, L.; CHAVERON, H. Extraction and Determination of Methylpyrazines in Cocoa Beans Using Coupled Steam Distillation ó microdistillator. **Food Research International. Canadian Institute of Food Science and Technology**. 27, p. 537-544, 1994.

HASLAM, E. Proanthocyanidins. In *The Flavonoids: Advances in Research*. Ed. J. B. Harborne & T. J. Mabry. Chapman and Hall, London, pp. 417-447, 1982.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; Natural astringency in foodstuffs. A molecular interpretation. *Critical reviews in foods. Sci. and Nutr.*, 27, p. 1-40, 1988.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; WARMINSKY, E.; LIAO, H.; CAI, Y.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P. N.; LUCK, G. Polyphenol complexation: a study in molecular recognition. In *Phenolic Compounds in Food and their Effects on health. Analysis Occurrence and Chemistry*, ed. C. T. Ho., C. Y. Lee & M. T. Huang American Chemical Society, Washington, DC, pp. 8-50, 1992.

HAYAT, S.; AHMAD, A. Homobrassinolide Induced Changes Favoured Germinability Of Wheat Grains. **Bulg. J. Plant physiol.**, 29(162), 55662, 2003.

HILL, M.J.; BEEVERS. An antibody to the castor bean glyoxysomal lipase (62 kD) also binds to a 62 Kd protein in extracts from any young oil seed plants. **Plant Physiol.**, 85: 1084-1089, 1987.

HOLDEN, M. Processing of raw cocoa. III.- Enzymic Aspects of Cocoa Fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, 10, p. 691-700, December, 1959.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Amazonas. Relatório de Acompanhamento. Produção de Cupuaçu, Jan-Dez, 2005.

JIANG, C. M.; WU, M. C.; WU, C. L.; CHANG, H.M. Pectinesterase and polygalacturonase activities and textural properties of rubbery papaya (*Carica papaya* Linn.). **Journal of Food Science**, 68: 5, pp. 159061594, 2003.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, New York, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Cienc. Rural**, vol.36 no.4 Santa Maria July/Aug. 2006.

LOPES, A.S.; GARCÍA, N.H.P.; VASCONCELOS, M.A.M. Avaliação das Condições de Torração após a Fermentação das Sementes de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e Cacao (*Theobroma cacao* L.). **Braz. J. Food Technol.**, nº6, p. 309-316, jul/dez., 2003.

es Involved in Cocoa Curing. In: *Food Enzymology* (Vol. 1), ed. FOX, P.F. Elsevier Science Publisher Ltd. London, V. 16, p. 211-236, 1991.

LOPEZ, A. S. Chemical changes occurring during the processing of cacao. In: *Proc Symposium Cacao Biotechnology*, ed. Dimick P. S. Pennsylvania State University, PA, USA, p. 19-53, 1986.

LOPEZ, A. S.; DIMICK, P. S.; WALSH, R. M. Scanning electron microscopy studies of the cellular changes in raw fermented and dried cacao beans. **Food Microstruct**, 6: 9-16, 1987

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, U.L. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275, 1951.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; PARK, Y. K.. **Bioquímica Experimental de Alimentos**. Editora Varela. São Paulo, 2005, 187 p.

NAZARÉ, R.F.R.; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R.M.F. Processamento das Sementes de Cupuaçu para a obtenção de cupulate. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA**. Boletim de Pesquisa nº108, ISSN 0100-8102, Nov., 1990.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **J.Biol.Chem.** , v. 153, p. 375-80, 1944.

NEY, K. U. Cocoa off-flavor in foods and beverages. **Ed. G. Charalambous, Elsevier**, p. 419-432, 1992.

OETTERER, M. Tecnologias de obtenção do cacau e do chocolate. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Disponível em < www.esalq.usp.br/departamento/lan/pdf/cacau%20chocolate.pdf > acessado em Agosto de 2004.

OKTAY, M.; KUFREVIOGLU; KOCACALÝSKAN, L.; SAKIROGLU, H. Polyphenol oxidase from amasya apple. **J. Food Sci.** 60, 495-500, 1995.

OLIVEIRA, A.M.; PEREIRA, N.R.; MARSAIOLI Jr., A.; AUGUSTO, F. Studies on the aroma of cupuassu liquor by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1025, p. 115-124, 2004.

OLIVEIRA, C.Y.F.B. **Isolamento e Identificação da Microbiota nos Diferentes Estágios de Fermentação das Sementes de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd. Ex spreng.) Schum)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas. Curso de Pós-graduação em ciência dos Alimentos. Agosto, 2001.

OSTOVAR, K.; KEENEY, P.G. Isolation and Characterization of Microorganisms Involved in the Fermentation of Trinidad Cacao Beans. **Div. of Food Science & Industry, The Pennsylvania State University, University Park**. Vol. 38, p. 611-617, 1973.

OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for ethanol production. **Int. J. Food. Sci.** Vol. 65, Issue 3, 10 May 2001, Pages 213-218.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

PARK, I., PASTORE, G.M. Esterificação de ácido graxo com glicerol por lipases microbianas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 9 (2): 163-171, 1989.

PASSOS, F.M.L.; LOPEZ, A.S.; SILVA D.O. Aeration and Its Influence on the Microbial Sequence in Cacao Fermentations in Bahia, with Emphasis on Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Science**, vol 49, p. 1470-1474, 1984.

PINHO, A.F. de S.; MULLER, M.W.; SANTANA, M.B.M. Sistema de Produção de Cacau no recôncavo da Bahia. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, 1992.

PIRES, T. C. R.; FINARDI-FILHO, F. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). **Food Chemistry**, vol. 89, Issue 1, p. 85-92, January 2005.

RAVELOMANANA, R.; GUIRAUD, J.P.; VINCENT, J.C.; GALZY, P. Etude de la Flore de Levedures de la Fermentation Traditionnelle du Caçao a Madagascar. **Journal of applied microbiology and biotechnology**, Vol. 1 (4), 1985.

REINECCIUS, G. A.; ANDERSON, D. A.; KAVANAGH, T. E.; KEENEY, P. G. Identification and qualification of the free sugars in coca beans. **J. Agric. Food Chem.**, 29, p. 209-219, 1972.

REISDORFF, C.; ROHSIUS, C.; CLARET DE SOUZA, A. G.; GASPAROTTO, L.; LIEBEREI, R. Comparative study on the proteolytic activities and storage globulins in seeds of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum and *Theobroma bicolor* Humb Bonpl, in relation to their potencial to generate chocolate-like aroma. **J Sci Food Agric**, 84/7:6936 700, 2004.

REVISTA AMAZON VIEW. Cupuaçu, uma fruta dos deuses. Ed. 72, p. 8, 2005.

RIBEIRO, N.C.A. Hidrólise enzimática produzida por fungos isolados do cacau em fermentação. **Agrotropica**. 2(2): 75-80, 1990.

RIBEIRO, N.C.A.; BEZERRA, J.L.; LOPEZ, A.S. Microbiota na Fermentação do Cacau no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Theobroma**. 16(1): 47-55. 1986.

ROELOFSEN, P.A. **Fermentation, During and Storage of Cacao Beans**. Advances in Food Research, 8, 1958. p. 225-296.

ROHSIUS, C.; MATISSEK, R.; LIEBERE, R. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. **Eur Food Res Technol**, 222: 4326438, 2006.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos, **ed. Legis Summa**, Ribeirão Preto, 2004.

SAIKA, H.; NAKAZONO, M.; IKEDA, A.; GUCHI, J. Y.; MASAKI, S.; TSU, M. K.; NEMOTO, K. A transposon-induced spontaneous mutation results in low α -amylase content in rice. **Plant Science**, Vol. 169, Issue 1, p. 239-244, 2005.

Variations of Peroxidase Activity in Cacao (*Theobroma cacao* L.) Beans During their Ripening, Fermentation and Drying. **Food Chemistry**, Vol. 65, Issue 1, p. 51-54, 1999.

SAMAH, O.A.; PUTH, M. F.; SELAMAT, J. Biochemical Changes During Fermentation of Cacao Beans Inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (Wild Strain). **Journal Food Science Technology**, vol. 29, nº6, p. 341-343, 1992.

SAMAH, O.S.; IBRAHIM, N.; ALIMON, H.; KARIM, M.I.A. fermentation studies of stored cacao beans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 9, 1993.

SCHMIDT, R.D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie ó International Edition**. v. 37, n. 12, p. 1609-1633, 1998.

SCHWAN, R. F.; LOPEZ, A.; SILVA, D. O.; VANETTI, M. C. D. Influência da frequência e intervalos de revolvimentos sobre a fermentação de cacau e qualidade de chocolate. **Revista Agrotrópica**. 2, 22-31, 1990.

SCHWAN, R.F. Microbiology of cacao fermentation: A study to improve quality. In: 12ª **Conferência Internacional de Pesquisa em Cacau**. Salvador-BA. Nov. 1996.

SEBRAE. Cupuaçu. Produtos Potenciais da Amazônia. Brasília, 1998.

SILVA, W.G. **Gordura de Cupuaçu: o Sucedâneo da Manteiga de Cacau**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Curso de Pós-graduação em ciência dos Alimentos, 1988.

SINI. Site de Informações sobre Negócios Internacionais. Artigos. 2001. Disponível em <www.sebraemg.com.br/sini/artigos_desc.asp/cod=6.htm> acessado em dezembro de 2004.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 195, p. 19-23, 1952.

SOUZA, J.V.B. SILVA, E.S.; MAIA, M.L.S.; TEXEIRA, M.F.S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. **Science Direct. Process Bichemistry**. Vol. 39, Issue 4, dez. 2003, p. 455-458.

SUFRAMA. Superintendência da Zona Franca de Manaus. Projeto Potencialidades Regionais e Estudo de Viabilidade Econômica. Cupuaçu. Jul/2003. Disponível no site <www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/cupuaçu> Acessado em Dezembro de 2004.

VASCONCELOS, M.A.M. **Transformações Físicas e Químicas Durante a Fermentação de Amêndoas do Cupuaçu**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Fevereiro, 1999.

VASCONCELOS, M.N.L.; SILVA, M.L.; MAIA, J.G.S.; GOTTLIEB, O.R. Estudo Químico das Sementes de Cupuaçu. **Acta Amazônica**. V. 5(3): 293-295. 1975.

VELHO, C.C.; CHARLES, D.L.; SIMON, J.E. Volatile Fruti Constituents of *Theobroma grandiflorum*. **Hort-Science**. 26(5): 608, 1991.

VENTURIERI, G.A. Cupuaçu. A espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu. 1993. 103p.

VENTURIERI, G.A. Floral Biology of Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann). Report with partial results to a PhD program at School of Plant Science/**Univ. of Reading, UK**, 73, 1992.

VENTURIERI, G.A.; AGUIAR, J.P.L. Composição do Chocolate Caseiro de Amêndoas de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum). **Acta Amazônica**. 18 (1-2): 3-8. 1988.

VENTURIERI, G.A.; ALVES, M.L.B. A Cultura do Cupuaçuzeiro. Apostila atualizada e revisada. INPA, Manaus, 1986.

VENTURIERI, G.A.; ALVES, M.L.B.; NOGUEIRA, M.D. O cultivo do cupuaçuzeiro. **Informativo Soc. Brás. Frutic**. 4(1): 15-17, 1985.

VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J. F.; HAURS, R.A.; CASCONI, O. Spectrophotometric Method for Fungal Pectinesterase Activity Determination. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, 26, 107-110, 1993.

VOIGT, J.; VOIGT, G.; HEINRICHS, D.; WRANN; BIEHL, B. *In vitro* studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cacao seeds: the significance of endoprotease specificity. **Food Chemistry**. 51: 7-14. 1994.

WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Science**. Marcel Dekker, INC, New York and Basel, 1972.

YANG, H.; PROTIVA, H.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, B.; KENNELLY, E.J. New Bioactive Polyphenol from *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu). **J. Nat. Prod.**, 66, p. 1501-1504, 2003.

ZOUMPANIOTI, M.; KARALI, M.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H. Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsion-like ternary systems and related organogels. **Enz, microb. Tech.** Vol. 39, Issue 4, P. 531-539, 2006.