



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

LUCIANE SANTOS SOUSA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS PROTEASES E SUAS ISOENZIMAS NO
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE CACAU
(*Theobroma cacao* L.) PRODUZIDOS NO SUL DA BAHIA, BRASIL.**

SALVADOR

2015

LUCIANE SANTOS SOUSA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS PROTEASES E SUAS ISOENZIMAS NO
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE CACAU
(*Theobroma cacao* L.) PRODUZIDOS NO SUL DA BAHIA, BRASIL.**

Dissertação apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Sérgio Eduardo Soares.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Eliete da Silva Bispo

SALVADOR

2015

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Sousa, Luciane Santos.

Atividade enzimática das proteases e suas isoenzimas no processo de fermentação de dois cultivares de cacau (*Theobroma cacao L.*) produzidos no Sul da Bahia, Brasil / Luciane Santos Sousa, - 2016, 85 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Eliete da Silva Bispo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2015.

Enzimas. 2. Isoenzimas. 3. Cacau. 4. Cacau - Microbiologia. I. Soares, Sérgio Eduardo. II. Bispo, Eliete da Silva. III. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD - 572.7

CDU - 577.15



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANE SANTOS SOUSA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEASE NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO
EM DOIS CULTIVARES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) PRODUZIDOS NO
SUL DA BAHIA, BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 30 de setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sérgio Eduardo Soares
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Dr. Marcelo Andrés Umsza-Guez
Universidade Federal da Bahia

Dr. Astria Dias Ferrão Gonzales
Universidade do Estado da Bahia

DEDICO,

Aos meus pais,

Lourdes e Genal (in memoriam), pela prática do amor.

Ao meu filho e esposo,

Rafael e Flávio, tão amados.

Aos meus irmãos,

Lucinéia, Lucimary, Lucinara e Genal Júnior, pelo suporte e orações.

Que Deus os abençoe sempre.

*“A essência do saber não está em somar verdades
ou subtrair incertezas,
mas sim em compartilhar o conhecimento compreendido!”*

Diego Góes

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita misericórdia e por iluminar meus caminhos, colocando em minha vida, anjos providos da capacidade de me guiar e ajudar.

Aos meus pais Genal (*in memoriam*) e Lourdes, responsáveis pela minha educação, agradeço pelos incentivos, pelo amor incondicional e confiança. Aos meus irmãos, pelo carinho e apoio. Obrigada família! Sempre prontos a ajudar, da melhor maneira possível principalmente nos momentos difíceis, acalentando meu coração e não me deixando desanimar nunca.

Ao meu filho por existir de forma tão doce e amorosa em minha vida! Tudo que há de melhor em mim é por ele e para ele. Ao meu esposo pelo companheirismo, cumplicidade, amor e compreensão em todos os momentos.

Aos demais familiares pelo carinho, pelos encorajamentos e torcida em todas as etapas do meu mestrado, sempre acreditando que o impossível pode se tornar possível.

Ao meu orientador Prof^o. Sérgio Eduardo Soares que acreditou em meu trabalho, obrigada pela orientação, amizade e apoio dedicados para a realização deste trabalho.

A minha coorientadora Prof^a. Eliete da Silva Bispo pela confiança e apoio irrestrito, sou imensamente grata.

A Prof^a. Mara Spínola, pela força e auxílio nos momentos difíceis, com a qual tenho eterna gratidão.

Às Professoras Alaíse Guimarães e Clícia Leite pelo apoio, paciência, carinho e palavras confortantes.

Aos professores Celso Carvalho, Astria Gonzales e Marcelo Andrez por aceitarem participar do Exame de Qualificação e da Banca de Defesa desta Dissertação, contribuindo com sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Aos Professores Rosemary Duarte, Lidércia Cavalcanti, Eugênia Mamede, Itaciara Nunes e Ederlan Ferreira pelo apoio e conhecimentos adquiridos.

As professoras Josileide Borges e Jania Betania pelas considerações feitas nesse trabalho, pelo carinho e incentivos dispensados.

Ao grande amigo Túlio, obrigada por sua amizade e por me ajudar nas dificuldades encontradas durante a elaboração desse trabalho; pelas infindáveis horas de convivência que me rendeu além da concretização deste trabalho, bons momentos;

Aos alunos do LAPAAC, no qual sempre trabalhamos juntos, e dividimos momentos bons e momentos difíceis, como Camila Pinheiro, Mariana Barros, Gabriel, Gustavo, Gabriela, Mariana Novaes, pelos momentos de descontração e aprendizado.

Aos anjos Fátima Rocha, Lorena e Cezar Miguel que contribuíram em partes fundamentais deste trabalho obrigada pela ajuda e carinho dispensado.

A Priscila Assunção, Carolina Portela e Jeane Menezes pelo apoio, amizade e carinho dispensados.

A Universidade Federal da Bahia pelo suporte.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos e seus professores, pelos ensinamentos, que serviram para elevar meus conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos laboratórios LAPAAC, MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS (EXTENSÃO E PESQUISA), BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA e ANÁLISE INSTRUMENTAL, assim como seus colaboradores, pela parceria e ajuda.

A Cintia Matos, Lene Nascimento, Adriana Barros e Ingrid pela colaboração e convívio enriquecedor.

A Fátima Bomfin, grande amiga, pelo carinho e apoio principalmente nos momentos de stress científico, sempre aguentou meus desabafos e sempre acalentava meu coração. A Jaqueline, pela amizade e colaboração sempre.

Aos meus amigos e colegas de trabalho parte integrante na minha vida pessoal e profissional, pelo carinho, torceram e me estimularam sempre nessa jornada.

Agradeço a Fazenda Lajedo do Ouro, nas pessoas do Srº. Pedro, Srº. Pedro Neto e Srª. Ângela, pelo carinho, fornecimento integral do material de estudo, pela parceria firmada. Sem a disponibilidade de vocês tudo seria muito mais difícil. Muito obrigada!

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigado!!!!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
REFERÊNCIAS.....	19
OBJETIVOS.....	21
CAPITULO I – Revisão Bibliográfica.....	22
1. Aspectos Históricos do Cacau.....	23
2. Cacau.....	25
2.1. Aspectos gerais	25
2.2. Aspectos agrícolas.....	27
3. Produção mundial de cacau.....	28
4. Variedades do cacau.....	31
5. Composição química do cacau.....	31
6. Pré-processamento do cacau.....	33
6.1. Colheita e pós-colheita dos frutos	33
6.2. Fermentação.....	35
6.3. Secagem.....	38
6.4. Armazenamento.....	41
7. Enzimas.....	41
8. Enzimas e suas atividades no cacau	43
9. Microbiota do cacau.....	46
10. Proteases	47
REFERÊNCIAS.....	49

CAPÍTULO II – Artigo.....	60
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAIS E METODOS.....	65
2.1. Material.....	65
2.2. Métodos.....	65
2.2.1. Fermentação dos cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188).....	65
2.2.2. Coleta das amostras.....	66
2.2.3. Determinação da atividade das proteases e suas isoenzimas	66
2.2.3.1. Extração das proteases das polpas.....	66
2.2.3.2. Purificação parcial das proteases das polpas.....	67
2.2.3.3. Extração das proteases das sementes.....	67
2.2.3.4. Purificação parcial das proteases das sementes.....	67
2.2.3.5. Determinação da atividade das proteases (polpa e sementes)	67
2.2.3.6. Determinação da atividade da endoprotease (polpa e sementes)	68
2.2.3.7. Determinação da atividade da carboxipeptidase (polpa e sementes).	68
2.2.3.8. Determinação da atividade da aminopeptidase (polpa e sementes)...	69
2.2.4. Determinação do teor de proteína nos extratos (polpa e sementes)....	69
2.2.5. Determinação da contagem de bolores e leveduras e mesófilos aeróbios.....	69
2.3. Análise dos dados.....	70

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.1. Determinação das Proteases dos extratos (polpa e sementes).....	70
3.2. Determinação de bolores e leveduras e mesófilos aeróbios.....	74
3.3. Determinação das Isoenzimas dos extratos.....	76
4. CONCLUSÕES.....	78
5. PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1** – Cronologia do Cacau (*Theobroma cacao* L.)..... 25
- Figura 2** – (A) Cacaueiro; (B) Flor do cacaueiro 26
- Figura 3** - (A) Cacau; (B) Corte longitudinal de um fruto de cacau - 1: Placenta; 2: Polpa Mucilaginosa; 3: Casca; (C) Corte longitudinal de uma semente de cacau - 4: Testa; 5: Cotilédone; 6: Gérmen ou embrião..... 27
- Figura 4** - Zona de cultivo do cacau na cor laranja..... 28
- Figura 5** - Fluxograma do processamento das sementes de cacau até obtenção das sementes fermentadas e secas..... 34
- Figura 6** - (A) Massa de cacau coberta com folha de bananeira; (B) Revolvimento da massa de cacau..... 36
- Figura 7** – Fases da fermentação do cacau 37
- Figura 8** - Vista superior de uma barcaça para secagem de cacau (A); Vista frontal de uma barcaça para secagem de cacau (B)..... 39

CAPITULO II

- Figura 1** - Atividade enzimática das proteases na polpa e na semente de cacau. (A) Polpa cultivar PH-16 e TSH-1188; (B) Semente cultivar PH-16 e TSH-1188..... 70
- Figura 2** - Percentual de redução da atividade enzimática das proteases na polpa e na semente de cacau. (A) cultivar PH-16; (B) cultivar TSH-1188. 74
- Figura 4** - Atividade das isoenzimas na polpa e na semente de dois cultivares de cacau. (A) Aminopeptidase; (B) Carboxipeptidase; (C) Endoprotease.... 77

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Produção de amêndoas de cacau (mil Toneladas).....	29
Tabela 2 - Composição centesimal média das amêndoas de cacau fermentadas e secas.....	32
Tabela 3 - Principais enzimas ativas durante a fermentação de sementes de cacau.....	44

CAPITULO II

Tabela 1 – Contagem de bolores e leveduras em sementes de dois cultivares de cacau durante o processo de fermentação.....	75
Tabela 2 – Contagem de mesófilos aeróbios em sementes de dois cultivares de cacau durante o processo de fermentação.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% – Porcentagem

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sulfato de Amônia

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μM - Micromolar

A. O. A. C. - Association of Official Analytical Chemistry

APHA – American Public Health

CEPEC - Centro de Pesquisa do Cacau

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

DRBC – Dicloran rosa de bengala cloranfenicol

EEG - Estação Experimental de Goitacazes

et al. - E outros

g – Grama

h – Hora

HCl – Ácido Clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB - Instituto do Cacau da Bahia

ICCO - International Cocoa Organization (Organização Internacional do Cacau)

M – Molar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mMol – Micromol

N – Normal

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanômetro

°C – Grau Celsius

PCA – Ágar padrão para contagem

pH - Potencial hidrogeniônico

PSD – Peso Seco e Desengordurado

SIAL - Estação Instituto Agrônômico do Leste

TCA – Ácido Tricloroacético

Ton - Toneladas

UE – Unidade Enzimática

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UFC – Unidades formadoras de colônias

xg - Força equivalente à da gravidade

α - Alfa

β – Beta

RESUMO

O interesse no cultivo do cacau (*Theobroma cacao* L.) está relacionado no aproveitamento de suas sementes para a produção de derivados, principalmente para a produção de chocolate, sendo, portanto, um componente importante na economia de muitos países incluindo o Brasil. Basicamente após a colheita do cacau, os frutos são amontoados no chão da plantação cacauzeira e abertos com facões. A casca e a placenta são separadas e o material interno (formado de sementes e polpa) é levado à etapa de fermentação, um fenômeno espontâneo realizado pela ação sucessiva de micro-organismos (leveduras, bactérias ácido-lácticas e bactérias ácido-acéticas) naturais do ambiente e como consequência das ações microbianas, a polpa envoltória das sementes de cacau é degradada, produzindo metabólitos como produtos finais, entre eles álcoois e ácidos orgânicos, que se difundem pela membrana e em combinação com o aumento da temperatura, promovem a morte do gérmen (embrião). Este fenômeno leva a perda da permeabilidade seletiva das membranas, possibilitando assim o contato entre enzimas e substratos. Essas alterações induzem por sua vez uma série de reações bioquímicas complexas dentro e fora das amêndoas, gerando os precursores (aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores) de sabor e aroma do chocolate, que são produtos das reações de proteólise e desmontagem de polissacarídeos. Em seguida as amêndoas de cacau são conduzidas à etapa de secagem que além de auxiliar a eliminação da água, possibilita a continuidade das mudanças bioquímicas, iniciadas na fermentação. Visando identificar as possíveis diferenças no processo de fermentação, principalmente no que se refere à proteólise, é que se optou por determinar a atividade das proteases e suas isoenzimas em dois cultivares de cacau, PH-16 e TSH-1188 na polpa e na semente, sob condições previamente determinadas de temperatura, pH e concentração de substrato em diferentes tempos de fermentação do cacau. Determinou-se também a carga microbiana (bolores e leveduras e mesófilos aeróbios). O referido grupo de enzima e suas isoenzimas foram extraídas da polpa e da semente, purificadas e as atividades enzimáticas determinadas por espectrofotometria. Os resultados evidenciaram que a atividade das proteases é maior no cultivar PH-16 que no cultivar TSH-1188 tanto na polpa quanto na semente, sendo encontrado a maior atividade em 66 h de fermentação, para ambos os cultivares, portanto, o aumento da atividade nos primeiros dias coincide com o período de crescimento de micro-organismos especialmente de fungos e leveduras (fase anaeróbica) que são bons secretores de enzimas entre elas as proteases. Esses resultados estão em consonância com os resultados das análises microbiológicas, onde foram evidenciadas que a contagem de bolores e leveduras aumentou em 12 e 36 h de fermentação para o cultivar PH-16 e para o cultivar TSH-1188 aumentou em 12 e 24 h, em oposição a contagem para mesófilos aeróbios aumentou a partir de 48 h (PH-16) e 36 h (TSH-1188), portanto o período seguinte a redução da contagem dos bolores e leveduras condiz com o período de aumento da atividade das proteases, mostrando assim possível produção dessas enzimas por esses micro-organismos. Em relação às isoenzimas os resultados mantiveram-se próximos na polpa e na semente entre os dois cultivares.

Palavras-chave: Cacau. Proteólise. Aminopeptidase. Carboxipeptidase. Endoprotease.

ABSTRACT

The interest in cocoa cultivation (*Theobroma cacao* L.) is listed on the use of its seeds for the production of oil products, mainly for the production of chocolate, is therefore an important component in the economy of many countries including Brazil. Basically after the cocoa harvest, the fruits are piled on the floor of the cocoa plantation and open with machetes. The shell and the placenta are separated and the inner material (formed from seeds and pulp) is brought to the fermentation step, a spontaneous phenomenon carried out by the successive action of micro-organisms (yeasts, lactic acid bacteria and acid-acetic bacteria) natural the environment and as a result of microbial action, the envelope pulp of cocoa beans is degraded, yielding metabolites such as final products, including alcohols and organic acids, which diffuse through the membrane and in combination with increasing temperature, promoting the death of germ (embryo), leading to selective loss of membrane permeability, thus allowing contact between the enzymes and substrates. These changes induce in turn a series of complex biochemical reactions inside and outside of almonds, generating precursors (free amino acids, peptides and reducing sugars) flavor, aroma and color of chocolate, which are products of proteolysis reactions and disassembly of polysaccharides . Then the cocoa beans are conducted to the drying step that besides helping the elimination of water, enables the continuity of biochemical changes, initiated in fermentation. To identify the possible differences in the fermentation process, especially with respect to proteolysis, it is that chosen for determining the activity of the protease and its isoenzymes in two cocoa cultivars, PH-16 and HRT-1188 in the pulp and seed, under predetermined conditions of temperature, pH and substrate concentration on different cocoa fermentation times, besides determination of microbial load (molds, yeasts and mesophilic aerobic). Said enzyme group and its isoenzymes were extracted from the pulp and seed, purified and enzyme activities determined by spectrophotometry. The results showed that protease activity is higher in growing PH-16 in the cultivating TSH-1188 in both the pulp and the seed being found the highest activity at 66 h of fermentation for both cultivars, therefore, increased activity in the early days coincides with the period of growth of microorganisms especially fungus and yeast (anaerobic stage) which are good secretors of enzymes including proteases. These results are consistent with the results of the microbiological analyzes, which were shown that the mold count and yeast increased in 12 and 36 h of fermentation for PH-16 farming and TSH-1188 farming increased at 12 and 24 h, as opposed to count for mesophilic aerobic increased from 48 h (PH-16) and 36 h (TSH-1188), so the next time reducing the count of molds and yeasts fits with the period of increased activity of proteases, thus showing possible production of these enzymes by micro-organisms. Regarding the results isoenzymes remained close in the pulp and seed between the two cultivars.

Keywords: Cocoa. Proteolysis. Aminopeptidase. Carboxypeptidase. Endoprotease.

INTRODUÇÃO

Cacau é o nome dado ao fruto do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) que é uma planta pertencente à família Malvaceae, originada de florestas pluviais da América Tropical e cultivada nas regiões tropicais do mundo (ALVES, 2002). Foi encontrado pela primeira vez no México entre os Astecas que o consumiam e comercializavam, usando suas sementes como objeto de troca. Os botânicos acreditam que o cacau é originário das cabeceiras do rio Amazonas, tendo-se expandido em duas direções principais, que deram origem a dois grupos genéticos importantes: o *Criollo*, que se espalhou em direção ao norte, para o rio Orinoco, penetrando na América Central e Sul do México e o *Forastero* propagou-se pela bacia amazônica abaixo e em direção as Guianas. Há um terceiro tipo denominado de *Trinitário* proveniente do cruzamento (hibridização) entre o *Criollo* e o *Forastero* (SINDONI, 2006; BECKETT, 2009; CEPLAC, 2015).

O interesse no cultivo do cacau está no aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de manteiga de cacau e chocolate (ALVES, 2002). Um dos alimentos mais apreciados do mundo, o chocolate, tem seu *flavor* (sabor e aroma) não apenas condicionado a atributos genéticos (variedade) do cacauzeiro, como também a modificações que ocorrem durante seu beneficiamento (BECKETT, 1994; LUNA et al., 2002; TAYLOR, 2002). Basicamente após a colheita do cacau, os frutos são amontoados no chão da plantação cacauzeira e abertos com facões. A casca e a placenta são separadas e o material interno (formado de sementes e polpa) é levado à etapa de fermentação, essa facilita a separação da polpa da semente, além de proporcionar a ocorrência de uma série de reações bioquímicas, incluindo o desenvolvimento dos precursores e inúmeros compostos de sabor e odor do chocolate (OETTERER, 2006).

Durante a fermentação das sementes há ação das enzimas celulolíticas, pectinolíticas, amilolíticas, glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, originárias da própria sementes e polpa do fruto, como dos micro-organismos que atuam durante a fermentação (AMIN; JINAP; JAMILAH, 1998; HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998; GUILLOTEAU et al., 2005), principalmente leveduras, bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas, que são naturais do ambiente e em decorrência do processo fermentativo elevam a temperatura para cerca de 50 °C (CRUZ et al., 2013). Esses micro-organismos atuam sobre os açúcares e ácidos orgânicos da polpa, e os transforma em etanol, ácido lático e especialmente em ácido acético (SCHWAN; WHEALS, 2004). Os ácidos orgânicos gerados penetram nas sementes, e juntamente com a elevação da temperatura causada pela fermentação, causam a morte do

embrião e acidificação no tecido armazenado. Com a morte do embrião, é perdida a permeabilidade seletiva das membranas, possibilita o contato entre enzimas e substratos, normalmente separados nos tecidos vivos (LOPEZ, 1986; CRUZ et al., 2013). A fermentação é a etapa pós-colheita que mais afeta a qualidade dos produtos obtidos a partir do cacau (LAGUNES-GALVEZ et al., 2007).

Depois de fermentadas, as amêndoas são secas e torradas a 7% de umidade, com o objetivo de estabilizar o sabor e produzir o aroma e cor característicos do chocolate, muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam na secagem e torração, como as reações de oxidação que proporcionam a redução da acidez das amêndoas, além de promover o escurecimento dos cotilédones (LOPEZ; QUESNEL, 1973; BECKETT, 1994) e redução do teor de compostos fenólicos que são responsáveis pelo amargor e adstringência (FELLOWS, 2006; DOMINGUES, 2010).

O sabor e aroma de chocolate é único e exclusivo, obtido somente de sementes fermentadas, secas e torradas de *Teobroma cacao L.* não podendo ser sintetizado artificialmente. O genótipo, variedade do cacau, processamento pós-colheita (fermentação, secagem e torração) exercem influência tanto na qualidade, quanto na intensidade do sabor de chocolate, com relevância para a etapa de fermentação onde os precursores do *flavor* são formados (LUNA et al., 2002; POSSIGNOLO, 2010; TAYLOR, 2002).

Segundo os pesquisadores Lehrian e Patterson (1983), as reações que levam à formação de precursores do sabor de chocolate são conduzidas por enzimas endógenas da semente do cacau, e que a principal consequência da fermentação é a redução do pH, favorecendo assim a ação destas enzimas. A atividade enzimática, em amêndoas de cacau, durante a fermentação, é conhecida e estudada desde a segunda metade do século XX, e acredita-se que as principais enzimas envolvidas na formação dos precursores responsáveis pelo *flavor* de chocolate seja a polifenoloxidase, a invertase e as proteases. Porém, a confiabilidade e comparação das atividades das enzimas do cacau são difíceis de serem realizadas, principalmente devido às variações causadas por diferentes genótipos, origem geográfica, métodos de fermentação utilizados e tipos de cochos empregados (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

Embora o papel essencial das enzimas endógenas durante a fermentação do cacau tenha sido evidenciado há muitos anos, ainda é escasso estudos sistemáticos abordando o comportamento entre diferentes cultivares de cacau (HANSEN, DEL OLMO e BURRI, 1998). No entanto, sabe-se que as proteases ao realizarem a proteólise produzem precursores (peptídeos e aminoácidos livres) que juntamente com os açúcares redutores participarão da

Reação de *Maillard* durante a torrefação das amêndoas, contribuindo para o desenvolvimento do aroma e sabor do cacau, conseqüentemente do chocolate (VOIGT et al., 1994a; 1994b; HUANG e BARRINGER, 2010).

Diante do exposto, é que estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de contribuir com a ampliação do conhecimento científico sobre as mudanças que ocorrem durante o processo de fermentação do cacau, com vista a fornecer subsídios para futuras intervenções tecnológicas ligadas à biotecnologia enzimática, contribuindo assim para a melhoria da qualidade do cacau, matéria-prima para a produção de chocolate. AQUARONE et al., (2001) relatam em estudo que o acompanhamento e a intervenção no processo de fermentação é uma alternativa para solucionar os problema referentes a baixa qualidade das amêndoas produzidas, uniformizando assim o método de fermentação.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.A.M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicios* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba.**2002. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, 2002.
- AMIN, J.; JINAP, S.; JAMILAH B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase e Carboxypeptidase) of Cacao Bean during Fermentation. **Journal of Science Food Agriculture**. 76, p. 123-128, 1998.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biociologia Industrial**. São Paulo: E. Blucher, vol. 4. 2001.
- BECKETT, S.T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Zaragoza: Editorial Acribica, p.432. 1994.
- BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. London Edited by Stephen T. Beckett, Blackwell Publishing Ltd., 732p, 2009.
- CEPLAC (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA). **Cacau: história e evolução**. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em: 20 julho. 2015.
- CRUZ, J. F. M.; LEITE, P. B.; SOARES, S. E.; BISPO, E.S. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in South in Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**.12, 5218-5225. 2013.
- DOMINGUES, E.S. **Seleção de linhagens de leveduras pectinolíticas para fermentação das sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2010. 80p. Dissertação. (Mestrado) - Escola Superior de agricultura Luis de Queiroz. 2010.
- FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. Princípios e prática. 2º Edição. Ed Artmed, p 183-205, 602, 2006.
- GUILLOTEAU, M.; LALOI, M.; MICHAUX, S.; BUCHELI, P.; MCCARTHY, J. Identification and characterisation of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma Cacao* seeds. **Journal Science Food Agriculture**. 85:549–562, 2005.
- HANSEN, C.E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, 273-81. 1998.
- HUANG, Y.; BARRINGER, S.A. Alkylpyrazines and Other Volatiles in Cocoa Liquors at pH 5 to 8, by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, 2010.
- LAGUNES GÁLVEZ, S.; LOISEAU, G.; PAREDES, J. L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J.-P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal Food Microbiology** 114, 124–130, 2007.

- LEHRMAN, D.W.; PATTERSON G.R. Cocoa fermentation, **In: Biotechnology, a Comprehensive Treatise**, v. 5, p. 529–575, 1983.
- LOPEZ, A. S. Chemical changes occurring during the processing of cacao. **In: Symposium Cacao Biotechnology**. Proceedings. University Park: The Pennsylvania State University, Pennsylvania, p.19-54, 1986.
- LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V.C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate *flavour*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 24, n. 3, p. 319-324, 1973.
- LUNA, F; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Jornal of Agricultural an Food Chemistry**, Easton, v. 50, p.3527-3532, 2002.
- OETTERER, M. **Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate**. In: OETTERER, M; M., Regitano d'Arce A.; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, v. 1, p. 1-50. 2006.
- POSSIGNOLO, A. A. **Perfil protéico de sementes de acessos de cacau no desenvolvimento do sabor de chocolate**. 2010. 116p.Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba – SP, 2010.
- SCHWAN, R.F; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science e Nutrição**. Boca Raton, 44(4): 205-221, 2004.
- SINDONI, N.R. **Beneficio Del cacao (*Theobroma cacao L.*)**. Venezuela: Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. p. 32. 2006.
- TAYLOR, A. J. **Food flavor technology**. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, 2002.
- VOIGT, J.B.; BIEHL, H.; HEINRICHS, S.; KAMARUDDIN, G.G.; MARSONER, A. HUGI. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. **Food Chemistry**. Volume 49, Issue 2, 173-180, 1994a.
- VOIGT, J.; HEINRICHS, H.; VOIGT, G.; WRANN, D.; BIEHL, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. **Food Chemistry**. 50: 177-184, 1994b.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade enzimática das proteases e de suas isoenzimas, sob condições previamente determinadas, durante o processo de fermentação em dois cultivares de cacau (*Teobroma cacao* L.), produzidos na região Sul da Bahia, Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade enzimática das proteases em dois cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188), sob condições previamente determinadas de temperatura, pH e concentração de substrato, na polpa e na semente em diferentes tempos de fermentação;
- Determinar a atividade enzimática das isoenzimas (endoproteases, carboxipeptidase e aminopeptidase) em dois cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188), na polpa e na semente em diferentes tempos de fermentação;
- Comparar o comportamento das proteases na polpa e na semente entre os dois cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188), em diferentes tempos de fermentação;
- Comparar o comportamento das isoenzimas na polpa e na semente entre os dois cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188), em diferentes tempos de fermentação;
- Determinar a contagem de bolores e leveduras em dois cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188), em diferentes tempos de fermentação;
- Determinação a contagem de bactérias aeróbias mesófilas em dois cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188), em diferentes tempos de fermentação;

CAPITULO I



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ASPECTOS HISTÓRICOS DO CACAU

As primeiras evidências históricas do uso do cacau e obtenção do chocolate são datadas de 1.500 a.c., e remetem aos povos olmeca, maia, inca e principalmente o asteca, de onde derivaram os termos *cacao* ou *Kakaw e xocolati, tchocolath ouchocoati*, sinônimos, respectivamente, do fruto e de um líquido pastoso, resultante de sua polpa e semente (VIVANT, 2004; COENTRÃO, 2005). Quando os primeiros colonizadores espanhóis chegaram à América, o cacau já era cultivado no México pelos Astecas e na América Central pelos Maias (SEAGRI, 2012). Neste tempo, o cacau tinha duas funções: era usado para preparar uma bebida e também era utilizado como uma forma de pagamento (CAMPOS; BENEDET, 1994; LIMA, 2008), sendo assim, considerado símbolo de riqueza (FRANCO, 2001).

Os nativos mesoamericanos consideravam as sementes de cacau tão valiosas que as usavam como “moeda”; as unidades monetárias eram o countle, o xiquipil e a carga. O countle equivalia a 400 sementes, o xiquipil equivalia a 20 countles (8.000 sementes) e a carga representava três xiquipiles (24.000 sementes) (YANES, 1994; COE; COE, 2013). No Códice Mendocino está registrado que no ano de 1485, Ahuizotl, o oitavo governante dos mexicas, ordenou uma marcha de arrecadação de tributos por todas as terras da região de Chiapas, chegando a arrecadar cerca de 3.200 cargas de cacau, aproximadamente 96 toneladas de amêndoas (CASTELLANOS, 2014). Relata-se, também, que o imperador Montezuma costumava receber anualmente 400.000 countles (160 milhões de sementes) como tributo da cidade de Tabasco, que corresponderiam hoje a aproximadamente 30 sacas de 60 quilos (SALAZAR, 1936; CEPLAC, 2014).

No século XVI, em 1519, o espanhol Hernán Cortez ao chegar à América Central, mostrou-se entusiasta do valor monetário e medicinal que Montezuma, imperador asteca e seu povo atribuíam ao cacau (PIMENTEL, 2007), permanecendo o cultivo do cacau nesse período restrito a América Central, embora outros estudos apontem como origem do cacau as regiões de florestas pluviais da América Tropical (CEPLAC, 2006). Aproximadamente em 1528, Cortez dizimou a população nativa, colonizou suas terras e levou para a Espanha as sementes de cacau e as ferramentas necessárias para o seu cultivo e preparo do chocolate (FARAH, 2008).

No início do século XVII, o cacau foi citado pela primeira vez na literatura botânica, por Charles de L'Écluse que o descreveu com o nome de *Cacao fructus*, contudo em 1737 Linneu classifica como *Theobroma fructus*, que significa alimento dos deuses, em referência à origem divina atribuída ao cacau pelos povos mesoamericanos (LOPES et al., 2011; EFRAIM, 2009).

Em 1753 a denominação do cacau foi modificada para *Theobroma cacao* L., permanecendo até os dias atuais. É uma planta típica dos trópicos úmidos, cultivado em regiões onde o clima apresenta variações relativamente pequenas durante o ano, especialmente em termos de temperatura, radiação solar e comprimento do dia (SILVA NETO, 2001).

Então, a partir do século XVII houve uma ampla expansão comercial do produto no sul da América Central, África, Europa e Ásia. Devido à rápida ascensão comercial dos produtos do cacau com o processo de industrialização da amêndoa do fruto em chocolate em barras (ALVARENGA et al., 1941; PONTILLON, 2009). O chocolate deixou de ser um produto consumido apenas pela nobreza e se tornou objeto de comercialização (HERMÈ, 2006).

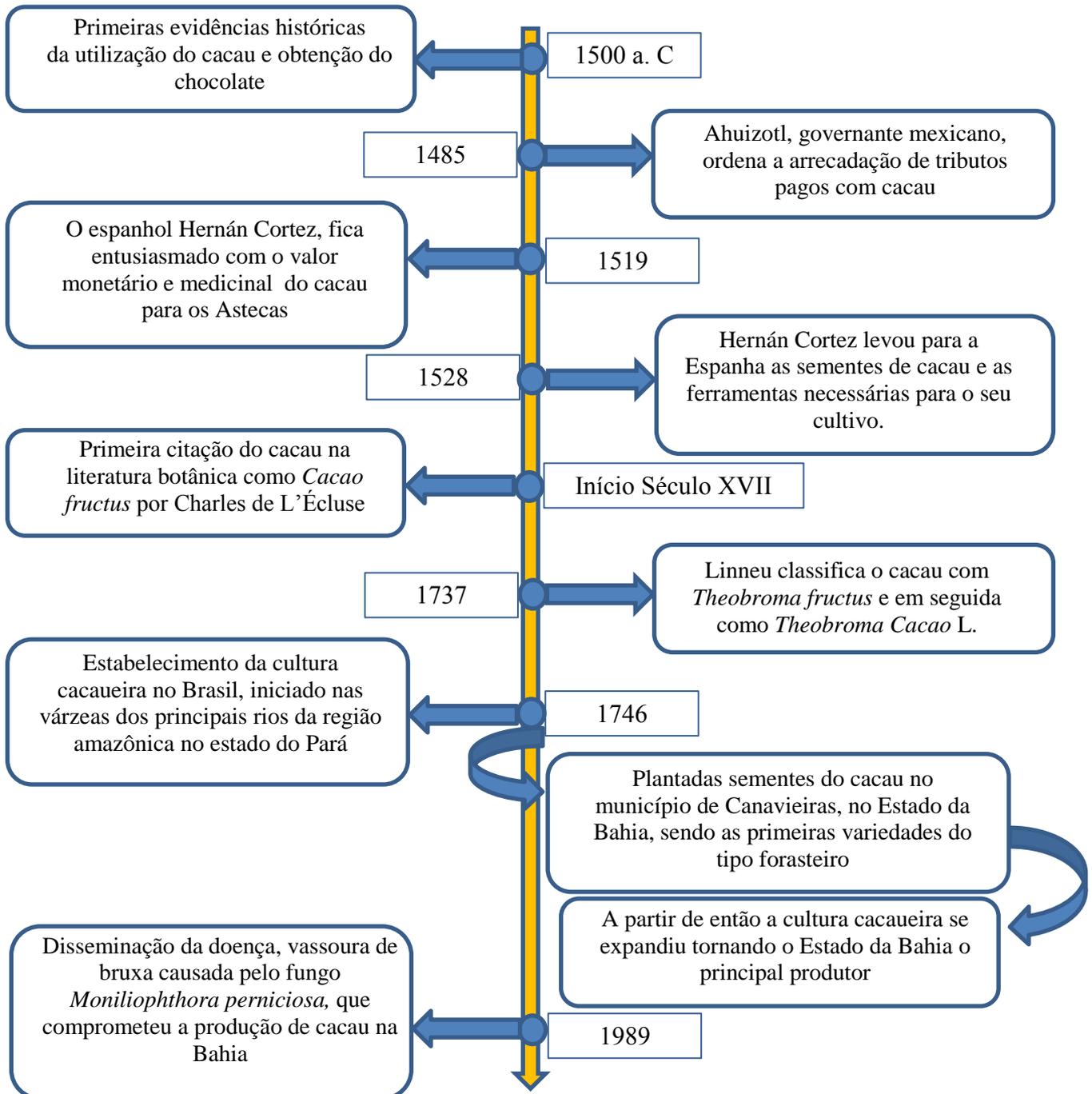
Em referência ao Brasil, as condições edafoclimáticas do território brasileiro favoreceram o estabelecimento da cultura cacauera nas várzeas dos principais rios da região amazônica no estado do Pará. Em 1746, foram plantadas sementes do cacau no município de Canavieiras, no Estado da Bahia, sendo as primeiras variedades do tipo forasteiro (RANGEL, 1982). A partir daí a cultura se expandiu nessa região, onde as condições climáticas e a riqueza dos recursos naturais contribuíram bastante para torná-la a principal produtora de cacau do país (GRAMACHO et al., 1992; SANCHES, 2006).

O cacau, além de ter sido de grande importância para a economia brasileira e para o Estado da Bahia principalmente na década de setenta, foi determinante para gerar riquezas de muitos outros países produtores. Neste período, cerca de 90% da produção brasileira era exportada (BASTOS, 1987), sendo que desde 1997, a grande queda na produção principalmente em virtude da doença vassoura-de-bruxa, tem obrigado o Brasil a importar subprodutos de cacau para consumo da indústria de alimentos (ALVES, 2002).

Apesar de ser um alimento antigo, as propriedades nutricionais das amêndoas de cacau para o consumo humano são temas muito atuais (LIPPI, 2009; ARAUJO et al., 2013; WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013). Além de serem matéria-prima para a indústria chocolateira, as amêndoas de cacau também fornecem subprodutos para abastecer outros setores industriais como o farmacêutico (ARAUJO et al., 2014). São utilizados para a

elaboração de produtos como pastas e extração de gorduras (manteiga de cacau), além da exploração de compostos como flavonóides e alcalóides purínicos amplamente estudados (AMORES e JIMÉNEZ, 2007; AMORES et al., 2009; AMORIM, 2011).

Figura 1 – Cronologia do Cacau (*Theobroma cacao* L.)



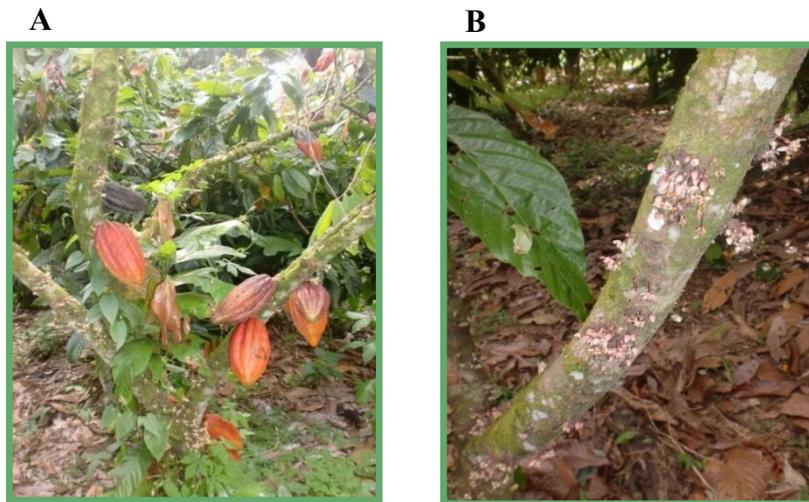
Fonte: Autoria própria

2. CACAU

2.1. Aspectos Gerais

O cacaueteiro é uma planta da família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L. (Figura 2-A), nativa da floresta tropical úmida americana e cultivada nas regiões tropicais do mundo (ROSS, 2001; BATALHA, 2009). O gênero possui 22 espécies, sendo o *Theobroma cacao* L. (cacau) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) as espécies cultivadas comercialmente (SILVA; FIGUEIRA; SOUZA, 2001; SODRÉ, 2007), consistindo a importância do cultivo do *Theobroma cacao* L está no aproveitamento de suas sementes para produção de derivados do cacau (ALVES, 2002).

Figura 2 - (A). Cacaueteiro; (B) Flor do cacaueteiro



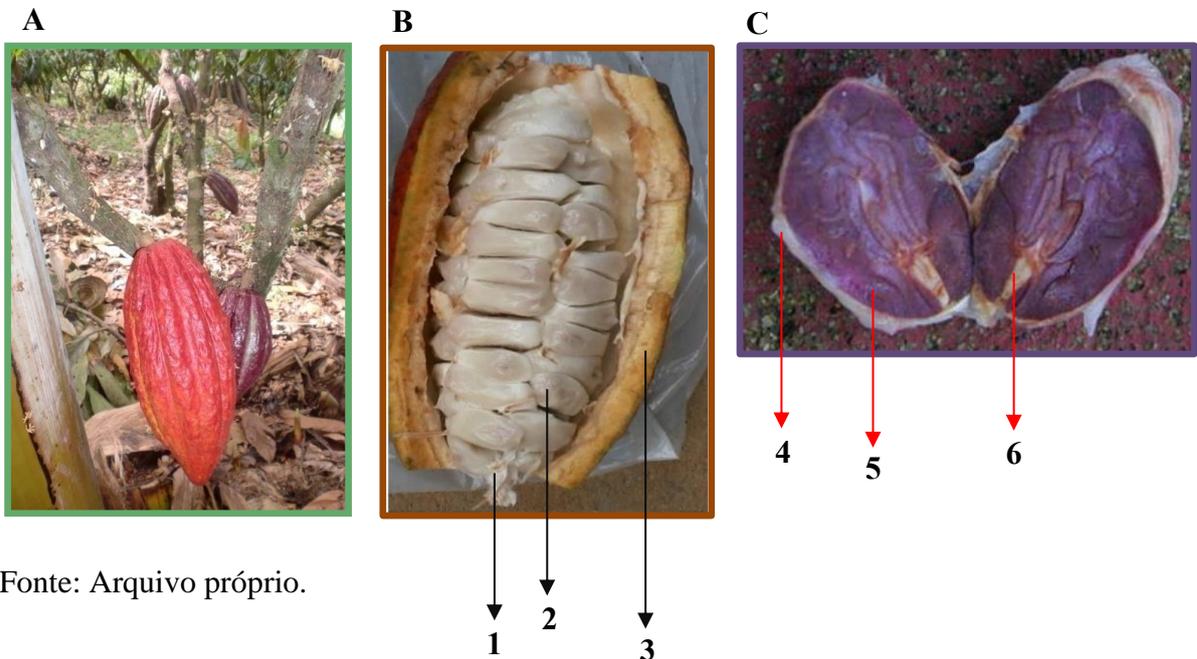
Fonte: Arquivo próprio

Apresenta-se como uma árvore de altura mediana, com ramificação proeminente e com folhas longas e pendentes, as quais atingem até 35 cm de comprimento. Suas flores são reunidas em grupos que surgem no caule (Figura 2-B). As flores, brancas, amarelas ou róseas, polinizadas por pequenos insetos, ao longo de todo o ano, são hermafroditas e surgem em inflorescências no tronco ou nos ramos lenhosos, nas chamadas almofadas florais, de onde se desenvolvem e formam os frutos (EFRAIM, 2004). Entre a polinização e o amadurecimento do fruto decorrem cerca de 180 dias, e do plantio até a primeira colheita são necessários de três a cinco anos, dependendo da variedade (SEAGRI, 2012).

O cacau, fruto do cacaueteiro tem forma oval (Figura 2-A) com 15 a 20 cm de comprimento do eixo maior, no processo de amadurecimento do fruto ocorre mudança na cor verde ou vermelha para amarelo ou laranja. Cada fruto contém entre 20 a 40 sementes envoltas numa polpa branca, macia com tons rosados, mucilaginosa e adocicadas, fixadas em uma placenta com as mesmas características (BECKETT, 2009).

A semente é composta de membrana prateada ou endosperma (testa), dois cotilédones e um eixo embrionário (Figura 2-B). O cotilédone é um pequeno gérmen de planta embrionária (Figura 2-C), constituído por dois tipos de células: o primeiro apresenta pigmentos compostos de polifenóis e o segundo, são células de reserva, que contém amido, gorduras, proteínas e enzimas (BECKETT, 1994; MARTINI, 2004; BATALHA, 2009). As sementes apresentam um grande e único vacúolo preenchido por polifenóis sendo responsáveis pela cor dos cotilédones (MARTINI, 2004).

Figura 3 - (A) Cacau; (B) Corte longitudinal de um fruto de cacau - 1: Placenta; 2: Polpa Mucilaginosa; 3: Casca; (C) Corte longitudinal de uma semente de cacau - 4: Testa; 5: Cotilédone; 6: Gérmen ou embrião.



Fonte: Arquivo próprio.

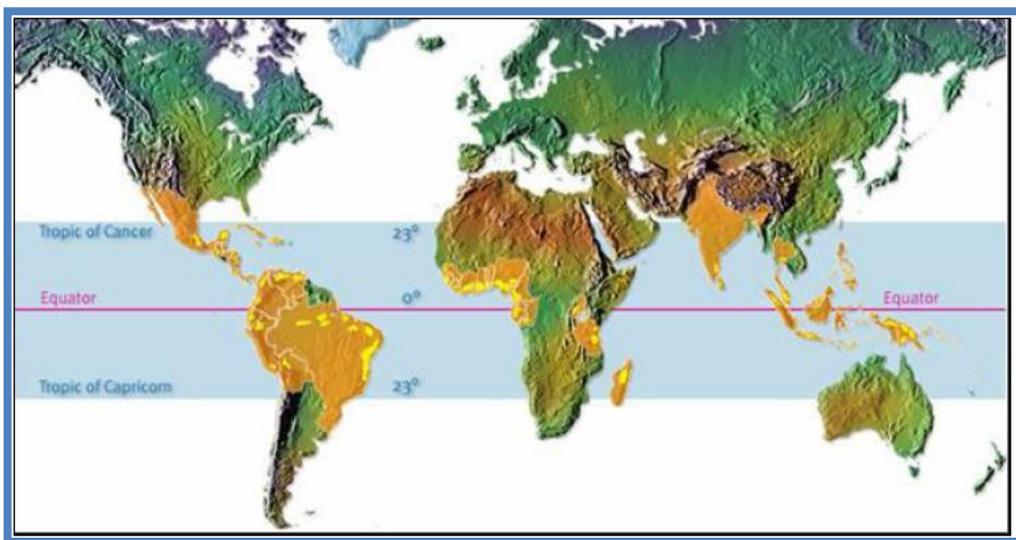
2.2 Aspectos Agrícolas

O cultivo do cacau necessita de chuvas regulares, temperatura média de 25°C e precipitação anual entre 1500 e 2000 mm. O crescimento é melhor em solo profundo e fértil, pH de neutro a ligeiramente ácido (intervalo 5-7,5). Atinge entre 5 a 10 metros de altura, podendo viver mais de cem anos, começando a frutificar com 5 anos após o plantio, produzindo abundantemente a partir do oitavo ano e mantendo produção satisfatória até os trinta anos. (MARTINI, 2004; EFRAIM, 2004; BATALHA, 2009; BECKETT, 2009; LOPES et al., 2011). Segundo Lajus (1982) e Efraim (2004) temperaturas inferiores a 12 °C impedem ou reduzem a frutificação

O cacau, por exigir solos profundos, clima quente e úmido, sem período de estiagem prolongada, é cultivado ao redor do mundo em regiões tropicais (SAINATO et al., 2004;

SILVA NETO, 2001; SEAGRI, 2012). Os principais países produtores localizam-se em uma região de até 15° a 20° de latitude em torno da linha do equador, onde as condições climáticas encontram-se mais favoráveis ao desenvolvimento do fruto (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; MCSHEA; RAMIRO-PUIG; MUNRO, 2008), sendo que na América o cultivo do cacau estendeu-se da Colômbia, para a Venezuela, América Central e México, alcançou as Guianas e se dispersou ao longo do rio Amazonas (MARTINI, 2004; LOPES et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4 - Zona de cultivo do cacau na cor laranja.



Fonte: SAINATO et al., 2004.

No Brasil, a maior área cultivada encontra-se na região Sul da Bahia abrangendo 90 municípios e gerando aproximadamente 85% de todo o cacau nacional. Até os anos 70 o cacau foi o principal gerador de divisas do estado, responsável por quase 60% de toda a sua arrecadação. Oficialmente o cultivo no Brasil iniciou em 1679, através da Carta Régia que autorizava os colonizadores a plantá-lo em suas terras (VAINSENER, 2015).

O cacau apresenta grande valor ecológico além de sua importância econômica, uma vez que as condições do seu cultivo se assemelham às do seu "habitat" natural, em florestas, com um sombreamento permanente de árvores de maior porte, o cacaueteiro protege o solo dos efeitos da erosão e da lixiviação (carreamento de elementos nutritivos pelas águas). Suas plantações substituem a floresta original sem destruir o ambiente ecológico existente, preservando a heterogeneidade e com ela o microclima e a vida das espécies vegetais e animais das áreas cultivadas (EFRAIM, 2004).

3. PRODUÇÃO MUNDIAL DE CACAU

O cacau tem importância econômica no contexto internacional por ser uma *commodity* de participação relevante no comércio mundial de produtos agrícolas tanto em importações quanto em exportações (GUYTON, 2003), sendo uma das principais culturas neotropicais em todo o mundo (CHARLES; WILKINSON, 2000).

A Tabela 1 demonstra os dados consolidados e divulgados pela International Cocoa Organization (ICCO, 2015) sobre a produção de cacau no mundo.

Tabela 1 - Produção de amêndoas de cacau (mil Toneladas).

	Estimativa 2013/14	Previsão 2014/15
ÁFRICA	3197	2984
Camarões	211	220
Costa do Marfim	1746	1740
Gana	897	696
Nigéria	248	235
Outros	95	93
AMÉRICA	708	729
Brasil	228	215
Equador	220	250
Outros	260	264
ÁSIA E OCEANIA	454	455
Indonésia	375	370
Papua Nova Guiné	40	42
Outros	38	43
TOTAL MUNDIAL	4359	4168

Fonte: ICCO (2015).

É possível observar a estimativa de 2013/14 e a previsão de 2014/15, sendo que a estimativa foi de 4.359 milhões de toneladas e a previsão é de 4.168 milhões de toneladas, respectivamente. O continente africano é responsável por cerca de 70% da produção. O maior produtor é a Costa do Marfim, seguido por Gana e Indonésia. Com relação ao Brasil o mesmo ocupou a 5ª posição na estimativa de 2013/2014 com 228 mil toneladas, podendo ser superado

em 2014/2015 por Equador e Camarões, passando assim a ocupar a 7ª colocação (ICCO, 2015).

A produção de cacau é muito bem monitorada pelos governos e organizações internacionais, suas balanças comerciais, preços e contratos futuros dependem de estimativas de abastecimento (WCF, 2014). Em relação às exportações de cacau em amêndoas no Brasil, elas tiveram redução e ainda apresentam essa redução (ICCO, 2015), principalmente devido ao câmbio flutuante, ora desvalorizando ora valorizando a moeda nacional, refletindo uma indecisão quanto à valorização dos produtos a serem exportados ou importados no país (ZUGAIB, 2008).

No Brasil, o Sul da Bahia é a principal região produtora de cacau, com destaque para a região de Itabuna e Ilhéus, sendo responsável por 60% da produção nacional no período de 2012/2013, de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2014). Atualmente, segundo dados do IBGE (2015) a produção baiana foi de 179.179 mil toneladas em 2014, mas em 2015 deverá sofrer uma queda de 21,25%, chegando assim a uma produção de 141.110 mil toneladas.

Durante muito tempo a cacauicultura foi apresentada como um dos principais fatores do desenvolvimento econômico do Estado da Bahia e de grande importância na produção agrícola da região Amazônica (PINTO; PIRES, 1998).

A partir da década de 90, devido a um acentuado déficit hídrico nas regiões produtoras do Estado da Bahia e Espírito Santo, bem como à disseminação da doença vassoura-de-bruxa através do fungo *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; SANCHES, 2006; EFRAIM, 2009) nos cacauzeiros da região sul da Bahia, quase dizimou a cacauicultura na região (DIAS, 2001), associado a saturação de recursos naturais gerados por erros de manejo como queimada nas florestas e subsequente ausência de sombras no plantio, envelhecimento sem replantio ou plantação espacialmente desorganizada, poda insuficiente e ausência de controle de pragas contribuíram intensamente para uma acentuada redução da produção e na produtividade caucueira no Brasil (LEITER e HARDING, 2004).

De acordo com Guittard (2005), a pressão exercida pelas indústrias processadoras aos cacauicultores em busca da redução de preços aliada à própria competição dos produtores entre si os leva a buscar cacauzeiros que apresentem maior produtividade e resistência às pragas e doenças. Entre os esforços concentrados no controle da vassoura-de-bruxa no Brasil, destacam-se as pesquisas sobre novos cultivares de cacau resistentes, produtivos e que originam matérias-primas de qualidade industrial, além de estudos genéticos e de agentes químicos ou biológicos capazes de controlar a doença. No entanto, a forma mais eficiente

encontrada para a recuperação da lavoura cacaueteira baiana tem sido a seleção e utilização de clones de cacau provenientes de materiais resistentes à doença, ou seja, o uso de variedades clonais resistentes, por meio de enxerto, trabalho que tem sido realizado com o apoio de instituições de pesquisa, como o Centro de Pesquisa do Cacau – CEPEC, da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueteira – CEPLAC, e dos próprios cacauicultores com orientação técnica do CEPEC.

A cacauicultura abrange diversas etapas para a produção do cacau, desde o manejo fitotécnico da cultura, com preparo do solo, implantação da cultura e produção, até o beneficiamento de amêndoas, comercialização primária, processamento industrial e comercialização secundária dos subprodutos das amêndoas (BECKETT, 2009; VALLE, 2012).

4. VARIEDADES DO CACAU

Tradicionalmente, as duas principais variedades de cacau são: *Criollo* originado do lado ocidental dos Andes e *Forastero*, do lado oriental, tendo sido definido com base em características morfológicas e origens geográficas do cacau. Um terceiro grupo, *Trinitario*, é reconhecido e consiste de um híbrido (cruzamento) entre *Criollo* e *Forastero*, sendo considerado como uma primeira tentativa de melhoramento genético, e de alta qualidade (GRAMACHO et al., 1992; SANCHES, 2006; MOTAMAYOR, et al., 2008; BATALHA, 2009), apresenta os cotilédones das sementes como coloração variando de branca a violeta-pálida (PIRES, 2003).

Os frutos de cacau *Criollo* são caracterizados pela forma alongada, com ponta proeminente, sua superfície externa é enrugada, possuindo cinco sulcos longitudinais profundos e cinco menos pronunciados. As sementes são ovais e se encontram relativamente soltas na polpa. Os cotilédones não contêm células pigmentadas, sendo, portanto, de coloração branca e aroma suave. São encontrados principalmente na Venezuela, América Central, México, Java, Ceilão e Samoa (LAJUS, 1982; LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001).

Os frutos da variedade *Forastero* possuem forma mais arredondada, casca dura e superfície quase lisa. As sementes são achatadas, de forma quase triangular e se encontram firmemente alojadas à polpa. Os cotilédones têm coloração violeta por possuírem células pigmentadas. Possuem sabor mais ácido e característica adstringente (LAJUS, 1982).

As variedades *Trinitario* e *Criollo* produzem um chocolate considerado de qualidade excelente pelo suave aroma e sabor (BECKETT, 2009). As formas híbridas (Trinitário) entre as variedades *Forastero* e *Criollo*, conservam características das duas variedades que as

originaram: sabor frutal e suave da variedade *Criollo* e maior resistência a pragas da variedade *Forastero* (LAJUS, 1982).

5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CACAU

O cacau é uma matéria-prima com grande valor nutricional e a composição química de suas amêndoas varia com a época da colheita, tamanho do fruto, grau de maturação, clima, tipo de solo e manipulação pós-colheita (ZOUMAS; KREISER; MARTIN, 1980). Esta matéria-prima é ingrediente base para formulação de chocolates, achocolatados, biscoitos entre outros (ISAE, 2003).

A composição aproximada de amêndoas de cacau fermentadas e secas está apresentada na Tabela 2, e pode variar ligeiramente com a variedade plantada, origem geográfica, grau de maturidade das amêndoas, manejo, particularidades ambientais e culturais de cada região produtora (AMORES et al., 2009; KOBLITZ, 2011).

Tabela 2 - Composição centesimal média das amêndoas de cacau fermentadas e secas.

Componente	%
Umidade	35
Lipídios	31,3
Proteínas	8,4
Teobromina	2,4
Cafeína	0,8
Polifenóis (taninos)	5,2
Carboidratos, ácidos e fibras	13,7
Cinzas	3,2

Fonte: KOBLITZ, 2011.

O cacau possui ainda na sua composição antioxidantes fenólicos que neutralizam os radicais livres que danificam as células (MARTIN, 2006). As sementes de cacau são ricas em polifenóis, particularmente catequinas e procianidinas que apresentam contribuição positiva como antioxidantes na nutrição humana, principalmente pela redução no risco de desenvolvimento de doenças cardíacas (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007; KRAUSS; ECKEL; HOWARD, 2001), além de ser rico em inúmeros minerais essenciais,

como magnésio, cobre, potássio, zinco e manganês e a quantidade desses minerais presente no cacau tem grande importância nutricional (SILVA et al., 2006; RICHTER; LANNES, 2007).

A concha (testa) representa 10-14 % do peso da semente do cacau. O cotilédono corresponde cerca de 86-90%, e confere as características de sabor e aroma do chocolate (OSMAN; NAZARUDDIN; LEE, 2004; AFOAKWA et al., 2008) sendo composto de dois tipos de células de parênquima de reserva. A primeira são as células polifenólicas (14-20% do peso da amêndoa) que contêm um único grande vacúolo preenchido com os polifenóis e os alcalóides, incluindo cafeína, teobromina e teofilina (OSMAN; NAZARUDDIN; LEE, 2004), e a segunda as células lipídeo-protéicas, que por outro lado, tem citoplasma fortemente empacotado com múltiplos pequenos vacúolos de proteínas e lipídeos e outros componentes, tais como grânulos de amido, que desempenham diversos papéis na definição de características de sabor e aroma de chocolate (NAZARUDDIN; YATIM; HOK, 2001; AFOAKWA et al., 2008).

De acordo com Koblitz (2011), a fração lipídica das amêndoas é conhecida como manteiga de cacau. Apenas três ácidos graxos respondem por cerca de 95% da composição dessa manteiga: palmítico, oléico e o esteárico. Essa composição é responsável pela característica mais interessante da manteiga de cacau, que a torna um produto muito procurado e de alto custo, sendo também a responsável pela propriedade que o chocolate tem de derreter na boca: ponto de fusão entre 32 e 35°C, uma faixa de temperatura de derretimento estreita (apenas 3°C) e ligeiramente abaixo da temperatura do corpo humano.

Quanto ao nitrogênio protéico presente no cacau fermentado, 31,7% são de albuminas; 3,1% de globulinas; 8,3% de prolaminas; 13,5% de glutelinas; e 43,5% de peptídeos diversos (BIEHL; WEWETZER; PASSERN, 1982; PETTIPHER, 1990; SPENCER; HODGE, 1992; VOIGT et al., 1994).

Em estudos realizados por de Hurst et al. (2002) demonstram que os grãos do cacau são constituídos por mais de 500 substâncias, sendo que o número de compostos voláteis supera a 300, incluindo ésteres, hidrocarbonetos, lactonas, pirazinas e pirróis, entre outros. Os componentes mais importantes para o *flavor* dos produtos derivados do cacau são os ésteres alifáticos, os polifenóis, as pirazinas, as dicetopiperazinas e a teobromina (FAO, 2004).

6. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU

6.1. Colheita e quebra dos frutos

A tecnologia de colheita e pós-colheita do cacau possui grande importância e dessa forma para se obter qualidade dos grãos, sabor e aroma, deve-se ficar atento a fatores como a

variedade do cacaveiro, manejo agrônômico, fatores do solo, condições climáticas e a própria tecnologia pós-colheita (BRUNETTO et al., 2007).

A colheita é a fase inicial no beneficiamento do cacau e deve ser realizada quando os frutos estiverem totalmente maduros. Na prática a maturidade do fruto, é reconhecida geralmente pela mudança da cor da casca e depende da variedade. Só os frutos maduros possuem açúcar e outros substratos em quantidade adequada para uma boa fermentação, gerando assim precursores de sabor e aroma como resultado do processo (CRUZ, 2002; LOPES, 2000). Estudos como o de Daniel et al. (2009) descrevem que o sabor do chocolate é o resultado de um conjunto de compostos que são ativados durante a tecnologia pós-colheita dos frutos de cacau.

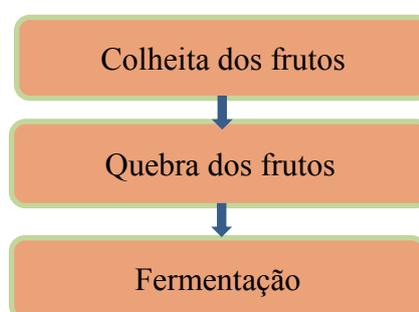
No Brasil o cacau é colhido praticamente durante o ano inteiro, distinguindo-se dois períodos de safra: o principal de outubro a janeiro e o secundário de maio a agosto. O cacau colhido no segundo período da safra é conhecido como cacau temporão (CRUZ, 2002).

Na Figura 5 está representado o fluxograma do processo de beneficiamento do cacau, composto basicamente por cinco etapas.

Na etapa de colheita o fruto é inicialmente colhido com podões ou tesouras, e a seguir são amontoados no chão da plantação de cacau para serem abertos com o auxílio de facões, devendo-se ter cuidado de não cortar o pedúnculo do fruto e evitar danificar a almofada floral, para não comprometer a produtividade da planta. Outro fator que deve ser levado em consideração nessa etapa é não causar nenhum corte nos frutos, pois desta forma iniciaria o processo fermentativo antes mesmo de serem colocados nos cochos, comprometendo a qualidade das amêndoas (SERRA, 2004).

Após a colheita, os frutos devem ser quebrados, a casca é então separada e deles retiradas as sementes envolvidas em uma polpa branca e rica em carboidratos (mucilagem), que serão submetidas à fermentação (DANIEL, et al., 2009). O período entre a quebra e o início da fermentação não deve ser superior a 24 horas para que não ocorram reações químicas indesejáveis. Sementes provenientes de quebras em dias diferentes não devem ser fermentadas juntas, pois isso conduz a uma fermentação desigual (BECKETT, 1994; EFRAIM, 2004).

Figura 5 - Fluxograma do processamento das sementes de cacau até obtenção das sementes fermentadas e secas.



Fonte: COHEN e JACKIX (2004), adaptado.

A polpa dos frutos de cacau por sua vez é isenta de micro-organismos, contaminando-se imediatamente durante a quebra dos frutos e remoção das sementes pelas mãos dos operadores, levando assim a uma inoculação natural de micro-organismos do ambiente para a polpa (BECKETT, 2009) e depois pela exposição ao ar, superfície dos recipientes usados no transporte das sementes para a fermentação e mucilagem da fermentação anterior que cobriu a parede das caixas de fermentação, por isso há variação na microbiota (LAJUS, 1982; OETTERER, 2004). Desta forma, a polpa passa a ser um excelente meio para o crescimento de micro-organismos, sendo que no decorrer da fermentação, a proliferação desses altera as características físico-químicas que ocasiona a seleção dos mesmos prevalecendo aqueles que melhor se adaptem às condições físico-químicas oferecidas durante o processo (DIMICK, 1991). A microflora, que pode naturalmente variar de acordo com as condições existentes e com a atividade microbiana, desenvolve-se na seguinte sequência: leveduras, bactérias produtoras de ácido láctico, bactérias produtoras de ácido acético (EFRAIM, 2004).

Ainda em relação as sementes de cacau recém-colhidas, essas possuem cor púrpura (mais comum) ou branca, a depender da variedade plantada, sabor amargo e odor adstringente, não tendo qualquer valor como alimento. Tão somente após a chamada “cura”, resultado do calor e das transformações bioquímicas ocorridas (FADINI, 1998; SCHAWN, 1998) é que o cacau poderá ser um produto de valor para a indústria. Nesta etapa adquire cor marrom característica, sabor típico de cacau e qualidade definida (OETTERER, 2006). Fato também relatado por Nielsen et al. (2007) onde descrevem que as amêndoas de cacau são naturalmente amargas, desagradáveis e adstringentes e precisam ser fermentadas, secas e torradas para adquirirem o aroma característico do chocolate.

Durante todo o tratamento pós-colheita do cacau três fatores fundamentais devem ser considerados para que haja garantia da qualidade das sementes, são eles: período e qualidade

da fermentação, temperatura, umidade e tempo de armazenamento das sementes (DAUD; TALIB; KYI, 2007).

6.2. Fermentação

A fermentação é um processo essencial para reduzir a acidez, adstringência e amargor nas sementes, bem como promover a formação de açúcares redutores e aminoácidos, que são os precursores da Reação de *Maillard* durante a torrefação (HUANG e BARRINGER, 2010). Estudos com os de Beckett (1994) e de Brito (2000) descrevem que é uma etapa indispensável para a obtenção de amêndoas de boa qualidade, devido as complexas reações bioquímicas que provocam a morte do embrião, hidrólise de açúcares e proteínas, liberação de enzimas e substratos, difusão de compostos fenólicos que entram em contato com as enzimas (BECKETT, 1994; BRITO, 2000).

Outro estudo que também descreve que a fermentação é uma das etapas da pós-colheita que mais afeta a qualidade dos produtos obtidos a partir do cacau foi realizado por Lagunes-Galvez et al. (2007). Já Efraim (2004), evidencia a importância de determinados fatores no processo de fermentação como relação direta sobre a qualidade do cacau como: a temperatura do ambiente e da massa, o pH e a acidez da polpa e do cotilédone, o tempo de processo, o revolvimento da massa bem como a microflora presente.

O tempo requerido para a fermentação das sementes é variável, segundo o material genético. Para a ocorrência das principais reações que levam à formação dos principais precursores de sabor e aroma do cacau, conseqüentemente do chocolate, as sementes de cacau, devem ser, geralmente, fermentadas por período superior a cinco dias (BECKETT, 1994), não devendo ultrapassar 8 dias devido a decomposição proteica e conseqüente liberação de amônia levando a obtenção de um chocolate com odores e sabores estranhos (OETTERER, 2004).

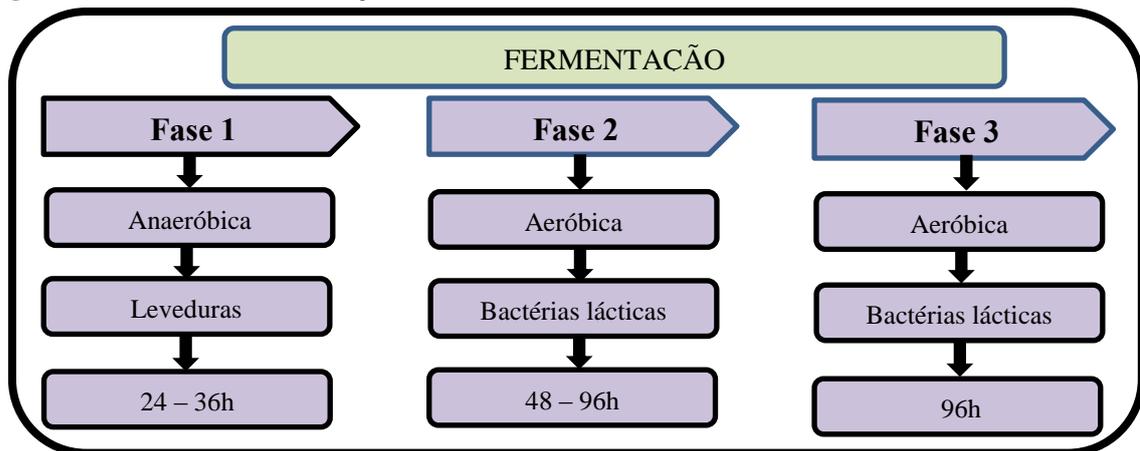
Na etapa de fermentação o cacau pode ser empilhado aos montões ou em caixas. No sistema de montões, método mais primitivo, são utilizados de 10 kg a 2 t, sendo essa massa revolvida com varas de bambu, de tempos em tempos. No sistema de caixas de madeira ou cochos, o fundo e as laterais das caixas possuem furos e os lotes são de 200 kg a 1,5 t, com cerca de 1 m de altura. A massa de cacau é revolvida de uma caixa para outra com auxílio de pás de madeira (Figura 6-A). Durante o processo de fermentação, a massa é coberta com sacos de juta ou folhas de bananeira (Figura 6-B), para reduzir as perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial (WOOD; LASS, 2001; SCHWAN e WHEALS, 2004; OETTERER, 2006; PONTILLON, 2009; DE VUYST et al., 2010).

Figura 6 - (A) Massa de cacau coberta com folha de bananeira; (B) Revolvimento da massa de cacau.



O processo de fermentação pode ser dividido em três fases, segundo Schwan e Wheals (2004), encontra-se simplificado na figura 7 e descrito a seguir:

Figura 7 - Fases da fermentação do cacau.



Fonte: Autoria Própria.

Primeira Fase - Ação das leveduras anaeróbicas: Nas primeiras 24-36 h, as leveduras convertem o açúcar em álcool e dióxido de carbono sob condições anaeróbicas em um pH abaixo de 4,0. Ocorre desintegração da polpa e desprendimento de um exsudado. A morte do germen e consequente perda da capacidade de germinação, geralmente ocorre no segundo dia, causada pela presença de álcool etílico, e em seguida, ácido acético (SCHWAN; WHEALS, 2004; CRUZ et al., 2013). É a partir deste momento que as sementes podem ser chamadas de amêndoas de cacau (LAJUS, 1982). Este processo contribui para modificações estruturais, como a remoção da compartimentação celular das enzimas e de seus substratos (proteínas, compostos fenólicos, entre outros) (WOLLGAST; ANKLAM, 2000). A partir do segundo dia até o final do processo, se faz o revolvimento da massa para que a temperatura não passe de 45°C e favoreça a ação das enzimas. Os revolvimentos podem acontecer de um cocho para o

outro ou de um local para o outro, quando o processo for efetuado em montes, e tem por finalidade uniformizar a temperatura e oxigenar a massa (OETERRER, 2006; FERRÃO, 2008). Algumas das leveduras isoladas da fermentação do cacau são *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces exiguus*, *Candida castelli*, *Candida aitoana*, *Candida guilliermondii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia farinosa* e *Torulopsis* spp. (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Segunda Fase - Ação das bactérias lácticas: Estas estão presentes desde o início da fermentação, mas só se tornam dominantes entre 48 e 96 h. Bactérias lácticas convertem açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido láctico. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50° C. Nessa fase, há uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor das sementes. Segundo Brito (2000), líquidos celulares se movem através das paredes, se espalhando por todo o grão de cacau, sendo que a difusão dos ácidos para o interior do cotilédone contribui para reações enzimáticas. Algumas das bactérias lácticas isoladas da fermentação do cacau são: *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter rancens*, *Acetobacter xylinum*, *Gluconobacter oxydans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus (Streptococcus)* (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Terceira Fase - Ação das bactérias acéticas: responsáveis pela conversão do álcool em ácido acético tornam o tegumento permeável, fazendo com que as amêndoas sofram a ação das enzimas. Ressalta-se a oxidação dos polifenóis que formam ou não complexos com as proteínas e peptídeos levando a redução da adstringência e do amargor. A oxidação iniciada nesta fase continua na etapa de secagem até que a umidade atinja um ponto no qual cessa a atividade da polifenoloxidase. Beckett (2009) evidencia também que o desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma do cacau ocorre nos cotilédones durante fermentação e secagem. Existem dois tipos importantes de células dentro dos cotilédones: células de armazenamento contendo gorduras e proteínas, e as células de pigmento contendo compostos polifenólicos e metilxantinas (teobromina e cafeína). Algumas das bactérias isoladas da fermentação do cacau são: *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Portanto, a fermentação das sementes de cacau envolve processos microbianos e ação de enzimas que promovem a formação de precursores responsáveis pelo desenvolvimento do sabor do cacau, conseqüentemente do *flavor* do chocolate, que serão reveladas posteriormente na fase de industrialização do cacau (PINHO; MULLER; SANTANA, 1992; AFOAKWA et

al., 2008; BECKETT, 2009; CRUZ et al., 2013). Segundo Minifie (1989), a fermentação e a secagem das sementes de cacau são de vital importância, sendo que nenhum outro processamento posterior é capaz de corrigir falhas nesta etapa.

6.3. Secagem

A etapa de secagem é considerada crítica durante o pré-processamento do cacau e pode ser realizada de duas formas: natural ou artificial. Secagem natural, ou secagem solar, consiste em dispor o cacau fermentado em áreas cimentadas ou assoalhadas, bandejas, plásticos ou no próprio solo (PONTILLON, 2009). Secagem artificial é aquela realizada em secadores, através do calor da queima de madeira ou outro combustível, ou ainda através de coletores solares (CRUZ, 2002). Esse tipo de secagem pode aumentar a temperatura dos cotilédones causando endurecimento com eventual ruptura da testa, além de tornar os grãos ácidos e, sendo excessiva, ocorre perda de peso, tornando as amêndoas quebradiças, enquanto que excesso de umidade favorece o desenvolvimento de fungos (LOPES, 2000; SOARES, 2001; EFRAIM et al., 2006; BECKETT, 2009).

Segundo Oetterer (2006) o processo mais utilizado é a pré-secagem ao sol complementada com aquecimento artificial, via estufas aquecidas por combustão de lenha ou gás liquefeito e/ou energia solar. No Brasil, a secagem das amêndoas do cacau é realizada normalmente pelo método de secagem natural em barcaças (Figura 8-A), que são construções típicas constituídas por um lastro de madeira erguido sobre pilares de alvenaria, e uma cobertura que desliza sobre trilhos (Figura 8-B). A cobertura, geralmente feita de chapas de alumínio corrugado ou de zinco, é afastada para expor as amêndoas ao sol e, quando fechada, protege contra chuva, sereno e calor excessivo.

Figura 8 – Vista superior de uma barcaça para secagem de cacau (A); Vista frontal de uma barcaça para secagem de cacau (B).



Fonte: Arquivo próprio

As amêndoas são espalhadas sobre o lastro da barcaça em uma camada uniforme com cerca de 5 cm de espessura. O revolvimento constante é feito com um rodo de madeira, principalmente no início da secagem, a fim de evitar aglomerados (OETTERER, 2006). A velocidade de remoção da água é considerada um fator essencial, durante a secagem. Não deve ser lenta para que não possibilite o desenvolvimento de fungos que, quando presentes, conferem sabor desagradável ao produto final, além da possibilidade de produção de micotoxinas (SOARES, 2001, EFRAIM et al., 2006). Crespo (1985) já relatava que apenas 3% de amêndoas contaminadas já proporcionam sabor desagradável ao *liquor* ou massa de cacau, impossível de ser eliminado em processos posteriores. Por outro lado, a secagem não deve ser efetuada de forma rápida através do emprego de temperaturas elevadas, para evitar problemas com a gordura (manteiga de cacau) e com o desenvolvimento do sabor do chocolate, visto que quanto mais rápida a secagem, maior é a acidez final das amêndoas, pela dificuldade em se eliminar o ácido acético.

A velocidade de secagem deve ser tal que permita a migração da umidade e de compostos voláteis, como o ácido acético formado na fermentação, do interior dos cotilédones para a superfície da amêndoa, de forma que sejam eliminados uniformemente (EFRAIM, 2004).

Além da eliminação da água, a secagem do cacau possibilita a continuidade das mudanças bioquímicas, iniciadas na fermentação, que vão contribuir para o sabor e aroma característico do cacau (LOPES, 2000; SOARES, 2001; EFRAIM et al., 2006; BECKETT, 2009). É, portanto, durante a secagem que as enzimas atuam no interior da amêndoa e promovem as reações químicas que vão estabilizar o sabor do cacau, mantendo também a acidez reduzida. A temperatura da secagem é importante na qualidade final das amêndoas, sendo ideal na faixa de 35 a 40 °C, sendo ótima para as enzimas. O uso de temperaturas mais baixas ou mais altas leva à perda na qualidade, pois as enzimas agem mais lentamente ou são destruídas. Oetterer (2006) e Afoakwa (2010) relatam em estudos que a etapa de secagem tem que ter duração de 4 a 5 dias para que ocorra a ação enzimática, e a umidade das amêndoas deve ser reduzida de 40-50% para 6-7%, maior que 8% de umidade pode ocorrer crescimento de fungos no armazenamento e transporte.

Uma das mais importantes e complexas reações que envolvem a formação do sabor do cacau e, portanto, do *flavor* do chocolate é a Reação de *Maillard*. Os açúcares redutores, aminoácidos e oligopeptídeos que são utilizados como substratos pelas enzimas durante a fermentação, originam os precursores que durante a torração geram centenas de compostos, incluindo voláteis. Os açúcares redutores (glicose e frutose) derivam da hidrólise da sacarose

do cotilédone, pela ação das invertases, já os diversos oligopeptídeos e aminoácidos são produzidos pela ação das proteases, principalmente na fermentação. Na torração esses compostos passam por reações não enzimáticas, as Reações de *Maillard*, com a formação de *Amadori* e a degradação de *Strecker*, produzindo um grande número de compostos químicos, sendo influenciados ainda pelas condições de secagem e torração, e essencialmente da composição de aminoácidos, oligopeptídeos e açúcares redutores (VOIGT e BIEHL, 1995).

As Reações de *Maillard* são condensações entre grupos α -amino e aminoácidos, proteínas ou aminas e o grupo terminal carbonil de açúcares redutores (SCHWAN; WHEALS, 2004) e uma das consequências principais dessa reação é a produção do *flavor* do chocolate (BONVEHÍ, 2005).

6.4. Armazenamento

Além da importância das etapas de fermentação e secagem à qualidade dos produtos obtidos, as condições de estocagem das amêndoas devem ser observadas, evitando-se o armazenamento de grandes volumes em ambientes com elevada umidade e pouca circulação de ar, uma vez que as amêndoas de cacau são higroscópicas e seu ganho de umidade pode levar ao desenvolvimento de fungos e outros micro-organismos indesejáveis (BECKETT, 1994).

Segundo Serra (2004) as instalações destinadas ao armazenamento de cacau devem possuir luminosidade e aeração adequadas. Esta etapa assume importância devido ao longo tempo em que o cacau pode permanecer armazenado. Começa na fazenda produtora em sacos de aniagem de 60 kg por cerca de 30 dias, fica nas cooperativas vários meses e nos armazéns dos portos por cerca de 15 dias. A amêndoa armazenada deve ter 7% de umidade e estar em equilíbrio com a umidade relativa do ar (70%) (OETERRER, 2006).

7. ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos, constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Os catalisadores atuam diminuindo a energia de ativação de uma determinada reação, tornando assim mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para ser iniciada, por isso, sua velocidade é menor que as reações catalisadas. As enzimas têm sua atividade terminada pelas características estruturais das proteínas, onde a sequência de aminoácidos (estrutura primária) de uma proteína, determina a sua estrutura tridimensional, que por sua vez, determina as suas propriedades.

Cada enzima tem seu próprio mecanismo de catálise, uma vez que são altamente específicas (CAMPBELL, 2000; LENINGHER, 1989).

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas. Uma vez sintetizada por uma célula, uma enzima poderá atuar de forma independente se as condições apropriadas forem mantidas (FELLOWS; 2006). A sua atividade catalítica é a propriedade mais significativa de uma enzima e depende por sua vez da integridade da sua conformação proteica nativa. No entanto, a atividade catalítica é sempre destruída quando uma enzima é rompida em seus aminoácidos componentes. Assim, as estruturas proteicas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das enzimas são efetivas para a função da atividade catalítica e estando sob condições apropriadas, a velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações da enzima e do substrato, e os resultados são expressos em unidades (U) enzimáticas; 1 U é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1mmol de produto por minuto sob condições definidas. (LEHNINGER, 1995; SANT'ANA JR, 2001)

A ligação covalente mais importante que une os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas é denominada de ligação peptídica. As ligações peptídicas podem ser hidrolisadas por determinadas enzimas chamadas de proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas encontradas em todas as células e tecidos, onde degradam proteínas que se tornaram desnecessárias ou danificadas (LEHNINGER, 1995).

Em estudo Fatibello-Filho e Vieira (2002) destacam que a ação enzimática pode ser alterada de acordo com o pH, temperatura, concentração do substrato e pela presença de inibidores. O local onde os substratos se ligam para que as reações se processem, é chamado de sítio ativo, constituído pela interação de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia proteica, sendo o responsável pela atividade biológica da enzima, ou seja, é no sítio ativo que ocorre a reação catalítica. Essencialmente as enzimas apresentam três propriedades principais: estabilidade, atividade e especificidade (GALVÃO, 2004; BLANCH; CLARK, 1997; BAILEY; OLLIS, 1986).

Estabilidade: a capacidade de uma enzima depende de sua estrutura nativa, a qual é mantida por meio de forças de interação (pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto, forças de Van der Waals, interações apolares e iônicas). Alterações no ambiente reacional podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total da sua funcionalidade biológica. Assim a estabilidade pode ser afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

Atividade: esta propriedade de uma enzima atua na diminuição da energia de ativação requerida para transformar um substrato em produto, aumentando a velocidade de reação. A capacidade catalítica da enzima reside no seu sítio ativo e este compreende um número pequeno de aminoácidos. O sítio ativo é uma estrutura complexa cuja configuração permite alojar a molécula de substrato na posição correta para que os grupos funcionais da enzima efetuem sua transformação química.

Especificidade: a especificidade define a afinidade de uma enzima por grupos específicos em um determinado substrato. Esta é uma propriedade imprescindível das enzimas enquanto catalisadores. Duas características estruturais são determinantes na especificidade da enzima: o substrato possui ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se unem à enzima, permitindo seu correto alinhamento no sítio ativo para que a reação possa ocorrer.

8. ENZIMAS E SUAS ATIVIDADES NO CACAU

A atividade enzimática, em amêndoas de cacau, durante a fermentação, é conhecida e estudada pelo menos desde a segunda metade do século XX (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). Entretanto, as primeiras enzimas reconhecidas estavam ligadas às alterações de coloração e à perda de adstringência, sendo principalmente da classe das oxidases (polifenoloxidase, peroxidase). Entre as hidrolases, foram estudadas inicialmente, as carboidrases (amilases e β -glicosidases) e lipases. Em 1964 era conhecida a habilidade de sementes moídas de cacau de coagular o leite (atividade proteolítica). Segundo Lopez e Dimick (1991) e Hansen, Del Olmo e Burri (1998) acredita-se que as seguintes enzimas tenham importância fundamental na formação do sabor do cacau e conseqüentemente no *flavor* do chocolate.

a. Endoproteases e Exopeptidases – envolvidas na geração de peptídeos e aminoácidos livres considerados os principais precursores de *flavor*;

b. Invertase e Glicosidases – Na fermentação do cacau são responsáveis pela liberação de açúcares redutores indispensáveis à formação do *flavor* durante a torrefação. A enzima invertase também chamada de β -frutofuranosidase, hidrolisa a sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose.

Glicosidases atuam ainda na desglicosilação de compostos terpênicos ou fenólicos (linalol, antocianinas, por ex.) interferindo na geração de sabor e na cor (RUBIO; RUNCO; NAVARRO, 2002; BOFO; CASTRO; MEDEIROS, 2005).

c. Polifenoloxidase (PFO) – responsável pela oxidação de compostos fenólicos tendo como consequência o fim da adstringência e redução do amargor. Durante a fermentação do cacau, os compostos fenólicos, originalmente compactados dentro de vacúolos de células específicas, difundem-se dentro do cotilédone.

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 polissacarídeos, sendo estas reações importantes na formação do *flavor* do cacau (De BRITO; GARCIA; AMÂNCIO, 2002). Segundo Hansen, Del Omo e Burri (1998), a polifenoloxidase é fortemente inativada durante a fase aeróbica da fermentação, porém, mesmo em baixos níveis sua atividade é suficiente para realizar as reações oxidativas.

Através da atuação das enzimas presentes no cacau durante o processo fermentativo, umas das reações mais importantes e complexas para a formação do *flavour* do chocolate ocorrem na torração, que é a Reação de *Maillard*, devido à presença de aminoácidos livres (ação das proteases) e açúcares redutores (ação da invertase) formados, reação essa que se dá entre carbonilas e aminas (PORTE et al., 2007). Através destas reações, todos os precursores de aroma do cacau interagem para produzir componentes de sabor, como álcoois, éteres, furanos, tiazoles, piroles, ácidos, ésteres, aldeídos, iminas, aminas, oxazolas, pirazinas e pirróis (MISNAWI et al., 2003).

As principais enzimas ativas durante a fermentação do cacau estão demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais enzimas ativas durante a fermentação de sementes de cacau

Enzimas	Substrato	Localização	Produto	T (°C)	pH
Proteases	Proteínas	Semente e cotilédone	Peptídeos e aminoácidos	55	4,7
Polifenoloxidase	Polifenóis (epicatequina)	Semente e Cotilédone	O-quinona e O-diquinona	31,5- 34,5	6,0
Invertase	Sacarose	Semente e testa	Glicose e frutose	37	4,0-5,25
Glicosidade β -galactosidase	Glicosídeos, 3- β -galactosidilcianidina e 3- α -	Semente e cotilédone	Cianidina e açúcares	45	3,8-4,5

FONTE: LOPEZ, 1986

As enzimas apresentam diferentes estabilidades durante o processo de fermentação do cacau, que é causada pela formação de ácidos, presença de polifenóis e o calor gerado durante o processo, sendo assim curto o tempo de atuação das enzimas sobre os substratos. As aminopeptidases, invertases e polifenoloxidasas são fortemente inativadas durante a fermentação. Já as carboxipeptidases, são parcialmente inativadas, enquanto que as endoproteases e glicosidasas permanecem ativas durante todo o processo (HANSEN et al., 2000).

A quantificação e comparação das atividades das enzimas do cacau são difíceis de serem realizadas, devido às variações causadas por diferentes genótipos, a origem geográfica, métodos de fermentação, tipos de cochos e de secagem empregados, diferenças nos frutos, entre outros (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). Na tabela 3 encontram-se as principais enzimas que catalisam reações durante a fermentação das sementes de cacau, seu principal substrato e suas condições ideais de atuação.

Brito (2000) em estudo descreve que as glicosidasas e proteases são encontradas naturalmente nas sementes de cacau; porém, não são ativas quando as sementes estão no interior dos frutos, ou seja, quando os mesmos ainda não foram partidos, devido às compartimentações celulares que impedem seu contato com o substrato. Durante as etapas de fermentação e secagem, as enzimas podem ou não ser ativadas, dependendo das condições do meio, que são bastante adversas por causa da elevação da temperatura, modificações na acidez e no pH e presença de oxigênio.

As glicosidasas são responsáveis pela hidrólise das antocianidinas, levando à perda da coloração violeta dos cotilédones, adquirindo uma coloração mais clara (SOARES, 2001). As proteases não têm relação direta com a degradação de compostos fenólicos nas etapas de pré-processamento, elas estão relacionadas com a hidrólise das proteínas vacuolares a peptídeos, que serão disponibilizados para a posterior complexação com polifenóis formando compostos insolúveis (BIEHL; WEWETZER; PASSERN, 1982).

Estudos mostram, no entanto, que o período real da acessibilidade das enzimas aos substratos, e o período de atuação é curto, sendo o acesso ao substrato facilitado pela morte das sementes. No que se refere a inativação, as enzimas exibem diferentes estabilidades durante o processo de fermentação, sendo a inativação causada pelo calor gerado e pelas elevadas concentrações de ácido acético e etanol. As proteases, aminopeptidases, invertases e

polifenoloxidasas são fortemente inativadas durante a fermentação, ao passo que as carboxipeptidasas, são parcialmente inativadas, enquanto que as endoproteases e glicosidasas permanecem ativas durante todo o processo (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

Contudo o desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma do cacau envolve a ação de vários micro-organismos presentes na polpa e a ação de enzimas sobre os carboidratos, proteínas e polifenóis. Ao contrário de muitas outras matérias primas fermentadas, enzimas endógenas desempenham um papel crucial no desenvolvimento do sabor e aroma do cacau (LEHRIAN; PATTERSON, 1983; BECKETT, 2009).

Nesse sentido estudos evidenciaram que na fermentação completa do cacau a secreção de algumas enzimas por micro-organismos é muito útil com as enzimas pectinolíticas que, em contato com o substrato, podem melhorar a aeração da massa; enzimas amilolíticas, que produzem o aumento da concentração de açúcares redutores pela hidrólise do amido e as enzimas proteolíticas que geram a melhor concentração de aminoácidos livres um dos precursores do sabor e aroma característicos dos produtos do cacau (OETERRER, 1995; AMIN; JINAP; JAMILAH, 1998; FELLOWS, 2006; AFOAKWA et al., 2008; EFRAIM et al., 2009; DOMINGUES, 2010).

9. MICROBIOTA DO CACAU

No decorrer da fermentação do cacau, a proliferação de micro-organismos altera as características físico-químicas que ocasiona uma seleção, prevalecendo aqueles que melhor se adaptem às condições físico-químicas oferecidas durante o processo (LOPEZ; DIMICK, 1991). No entanto esse fato natural (fermentação) acontece pela ação consecutiva de leveduras, bactérias ácido-lácticas e bactérias ácido-acéticas (CRUZ et al., 2013).

Apesar dos estudos mostrarem que as reações que levam à formação de precursores de sabor e aroma do chocolate serem conduzidas por enzimas endógenas presentes nas sementes do cacau (CRUZ et al., 2013; AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2009), em paralelo, pesquisas tem evidenciado a importância de enzimas provenientes de micro-organismos que também tem relevância no desenvolvimento dos precursores de sabor e aroma do cacau e como consequência obtenção também do sabor e aroma de chocolate (LEVANON; ROSSETINI, 2001; AQUARONE, et al., 2001).

Dentre as leveduras presentes na fermentação do cacau as principais espécies são *Saccharomyces cerevisiae* e a *Candida krusei*, predominantes na Bahia (OETTERER, 2006). Cerca de 15 diferentes espécies de leveduras são normalmente encontradas em processos fermentativos, no Brasil e no mundo. Em geral a espécie mais abundante é *Saccharomyces*

cerevisiae, uma espécie altamente eficiente na produção de álcool, nas condições normalmente encontradas. Entretanto, linhagens de *S. cerevisiae* não costumam produzir pectinases de modo eficiente, contribuindo muito pouco para liquefação da polpa. Outras espécies, como *Kluyveromyces marxianus*, além de diversos fungos filamentosos (*Aspergillus* spp., por exemplo), são apontadas como responsáveis pela remoção da mucilagem (KOBBLITZ, 2011; NIGAM; SINGH, 2014; COPETTI et al., 2011).

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).

Thompson, Miller e Lopez (2001) e Schwan e Wheals (2004) constataram o crescimento de *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* *Kluyveromyces*. Também foi observado crescimento de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*) e acéticas (*Acetobacter* e *Gluconobacter* spp.). Investigando a ecologia microbiana de cacau originário da Indonésia, Ardhana e Fleet (2003) encontraram como principais espécies *Penicillium citrinum*, *Kloeckeraapis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter pasteurianus*.

10. PROTEASES

As proteases são enzimas que atuam sobre as proteínas transformando-as em peptídeos de peso molecular menor ou em aminoácidos (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL et al., 2001; VITOLO, 2001). As proteases pertencem ao grupo das hidrolases as quais tem em comum o envolvimento da água na formação do produto, onde durante a reação de hidrólise das ligações peptídicas ocorre à transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994). Esse processo proteolítico resulta em mudança específica da função da proteína sendo um importante mecanismo biológico (LOPEZ; OVERALL, 2002).

As proteases são provenientes de diversas fontes naturais podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana (RODRIGUES; SANT'ANNA, 2001). As proteases microbianas são encontradas em bactérias, protozoários e fungos, podem ser de origem extracelular e intracelular, e ligadas ou não a membrana (NEURATH; BEYNON; BOND, 1989). 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 estresse oxidativo. Em consequência as plantas são excelentes fontes de proteases (SAID; PIETRO, 2004). Essas enzimas geralmente são sintetizadas junto à membrana celular, numa forma precursora e depois liberadas na forma final ativa por proteólise (TORNERO et al., 1996; BEERS; JONES; DICKERMAN, 2004).

São classificadas basicamente de acordo com dois critérios: seu modo de ação e a natureza química do seu sítio ativo. De acordo com o modo de ação são divididas em exopeptidases, que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, e endopeptidases, que agem nas ligações no interior da cadeia proteica. Dentre as exopeptidases encontram-se as carboxipeptidases e aminopeptidase. Estas, de importância para o cacau, são proteases que agem na extremidade carboxi- e amino- terminal da cadeia polipeptídica, respectivamente; liberando aminoácidos livres, dipeptídios ou tripeptídeos. As endopeptidases, por sua vez, são normalmente classificadas pela natureza química de seu sítio ativo e por seu mecanismo de ação em quatro grupos distintos, dentre os quais encontram-se as proteases aspárticas, também de interesse na formação do sabor e aroma do cacau. Estas contêm ácido aspártico em seu sítio ativo. Em geral apresentam maior atividade em valores de pH ácido e têm maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos (KOBBLITZ, 2008).

No processo de fermentação do cacau a proteólise catalisada por endoproteases aspárticas e carboxipeptidases origina oligopeptídeos e aminoácidos, o que é essencial para a formação do *flavor*. As endoproteases aspárticas lisam proteínas, preferencialmente nos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, para produzir oligopeptídeos que têm resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em suas extremidades finais. As carboxipeptidases têm a importante função de converter oligopeptídeos hidrofóbicos em precursores de sabor e aroma de cacau: oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos livres hidrofóbicos, os quais são requeridos para formação dos componentes de sabor de chocolate típicos na presença de açúcares redutores, durante a torrefação (VOIGT et al., 1994; MISNAWI et al., 2002).

Todas as proteases apresentam certo grau de especificidade de substrato, em geral relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a eles. Já se tem conhecimento que as proteases ao realizarem a proteólise, produzem precursores (peptídeos e aminoácidos livres) que irão, juntamente com os açúcares redutores, participar da Reação de *Maillard* durante a torrefação, contribuindo assim para o desenvolvimento do sabor e aroma do cacau e conseqüentemente do chocolate (VOIGT et al.,

1994; HUANG; BARRINGER, 2010). Estudos mostram ainda que a produção microbiana de protease obedece a condições próprias de cada espécie e também ao meio utilizado para fermentação, estando sujeita a diferenças de produção (ABIDI; LIMAN; NEGIB, 2008; SANDHYA et al., 2005).

REFERENCIAS

ABIDI, F.; LIMAN, F.; NEGIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. **Process Biochemistry**. 43:1202-1208, 2008.

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd, New Delhi, Índia, 2010.

AFOAKWA, E. O., PATERSON, A., FOWLER, M., RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 48, 840 e 857. 2008.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, p.290-298, 2007.

AIME, M. C., PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, n. 97, p. 1012-22, 2005.

ALVARENGA, P; AMAROLI, P.; CÁCERES, J.; EGUIZÁBAL, C.; FERNÁNDEZ, J. A.; FOWLER, W.; LAURIA, A.; FUENTES, H. L.; MELHADO, O. E.; PANAMENO EWALTER, K. História de El Salvador. **El Salvador: Ministério de Educación**. Centro América, n. 249, p. 49-52, 1941.

ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba**. 2002.70p Dissertação (Mestrado em

Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. **Journal Science Food Agricultural**. v.76, p.123-128, 1998.

AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. **Aspectos de localidade de cacaó**. Quevedo, Equador: INIAP (Estación Experimental Tropical Pichilingue), 2007. p.1–3, 2007.

AMORES, F.; PALACIOS, A.; JIMÉNEZ, J.; ZHANG, D. **Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao em el nor oriente de la provincia de esmeraldas**. Quevedo, Los Ríos, Equador: INIAP. p. 120 (Boletín Técnico, 135). 2009.

AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. 2011. 77f. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Itapetinga, Bahia.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blucher, vol. 4. 2001.

ARAÚJO, Q. R. GATTWARD, J. N.; ALMOOSAWI, S.; SILVA, M. D. C.; DANTAS, P. A.; JÚNIOR, Q. R. Cacao and Human Health: from Head to Foot - A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 24 ago. 2013.

ARAÚJO, Q. R.; FERNANDES, C. A. F.; RIBEIRO, D. O.; EFRAIM, P.; STEINMACHER, D.; LIEBEREIR, R.; BASTIDE, P.; ARAÚJO, T. G. Cocoa Quality Index - a Proposal. **Food Control**, v. 46, p. 49–54, 2014.

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**86: 87– 99, 2003.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Second edition. New York, 1986.

BASTOS, E. Cacaó: a riqueza agrícola da América. São Paulo: **Ícone**, p.130, 1987.

BATALHA, P. G. **Caracterização do cacao catongo de São Tomé e Príncipe**. 2009. Lisboa. Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos – Tecnologia de Produtos vegetais) Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia.

BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Zaragoza: Editorial Acribica, p.432, 1994.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. London Edited by Stephen T. Beckett, Blackwell Publishing Ltd., 732p, 2009.

BEERS, E. P.; JONES, A. M.; DICKERMAN, A. W. The S8 cerine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. **Phytochemistry**, 65:43-58, 2004.

BIEHL, B.; WEWETZER, C.; PASSERN, D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **Journal Science Food Agriculture**.33:1291.1304. 1982.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. Estados Unidos. 1997.

BOFO, D. C. S.; CASTRO, H. F.; MEDEIROS, M. B. Immobilization efficiency comparison between *saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerant) and *S. cerevisiae* ATCC 9763 yeasts in sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Food Tecnology**, Campinas, p. 121 -124, Mar. 2005.

BONVEHÍ, J. S. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 221, p. 19-29, 2005.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. Campinas. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BRUNETTO, M. R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A., GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, p. 459–467, 2007.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**.3. ed. Porto Alegre: Artmed, 752 p. 2000.

CAMPOS, C. T.; BENEDET, H. D. Aceitabilidade de bombons (recheio - sabor passas ao rum) adicionados de proteína de soja. Bol. **SBCTA**, v.28, n. 2, p. 113-119, 1994.

CAMU, N.; WINTER, T.; ADDO, S. K.; TAKRAMA, J. S.; BERNAERT, H.; VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the *flavour* of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Davis, v.88, n. 13, p. 2288 – 2297, Oct. 2008.

CASTELLANOS, H. **Kakaw: labebdia de losdioses mesoamericanos**. 2014. Disponível em: <<http://www.kakaw.org/recursos/kit>>. Acesso em: 2 mar. 2015.

CEPLAC (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA). **Cacau: história e evolução**. 2014. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em: 20 julho. 2015.

CEPLAC (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA). Disponível Em: http://Www.Ceplac.Gov.Br/Radar/Radar_Cacau.Htm. **Manual técnico**. 2006. Acesso Em: 28 de Julho de 2015.

CEPLAC COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. Disponível Em: Http://Www.Ceplac.Gov.Br/Radar/Radar_Cacau.Htm. **Boletim**. Acesso em: 28 de Julho de 2015.

CHARLES, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as “in groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 160-166.2000.

COE, S. D.; COE, M. D. **The true history of chocolate**. 3. ed. New York: Thames & Hudson. p. 280. 2013.

COENTRÃO, P. A. M. **Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo**. 2005. 111p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal Fluminense, Niterói.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Obtenção e caracterização física, química e físico-química de líquido de cupuaçu e cacau. **Brazilian Journal Food Technology**. Vol. 7, nº1, p. 57-67. Jan/jun., 2004.

COPETTI, M. V.; IANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PEREIRA, J. L. TANIWAKI, M. H. Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. **Food Microbiology**. vol. 28: 1499 – 1504. 2011.

CRESPO, S. **Judging the quality of cocoa beans**. The Manufacturing Confectioner, Chicago, v. 4; p. 59-64, 1985.

CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. 2002. 101p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP.

CRUZ, J. F. M.; LEITE, P. B.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**. 12, 5218-5225. 2013.

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.

DANIEL, H. M.; VRANCKEN, G.; TAKRAMA, J.F.; CAMU, N.; DE VOS, M.; VUYST, L. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **FEMS Yeast Research**, Utrecht, v. 9, n. 5, p. 774 – 783, Aug, 2009.

DAUD, W. R. W.; TALIB, M. Z. M.; KYI, T. M. Drying with chemical reaction in cocoa beans, **Drying Technology**, London, UK, v. 25, n. 867 – 875, May, 2007.

De BRITO, E. S.; GARCIA, N. H. P.; AMÂNCIO, A. C. Effect of poliphenol oxidase and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 22(1): 45-48. 2002.

DE VUYST, L.; LEFEBER, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria — Novel Applications**. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, pp. 301–325, 2010.

DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa-MG. FUNAPE, UFG. 578 pág., 2001.

DIMICK, P. S. Principles of cocoa butter crystalization. **The Manufacturing Confectioner**. v. 72, n.5, p. 1099-114, 1991.

DOMINGUES, E. S. **Seleção de linhagens de leveduras pectinolíticas para fermentação das sementes de cacau (*Theobroma cacao*)**. 2010. 80p. Dissertação. (Mestrado) - Escola Superior de agricultura Luis de Queiroz.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, através da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura de bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. 226p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonoides durante a fermentação de sementes para produção de chocolate**. 2004. 110 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCIA, N. H.; HADDAD R.; EBERLIN, M. N. Teores de Compostos Fenólicos de Sementes de Cacauero de Diferentes Genótipos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229-236, 2006.

FADINI, A. L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração do cacau frente ao processo por microondas**. 1998 139p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP.

FAO - (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Agricultural Commodities: profiles and relevant WTO negotiating issues**. Rome, Italy: FAO. p. 89. 2003.

FAO – (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **FAOSTAT**, 2004. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 20 de maio de 2015. 2004.

FARAH, R. **Chocolate: Energia e Saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial. .151p. 2008.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.455-464. 2002.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. Princípios e prática. 2º Edição. Ed Artmed, p 183-205, 602, 2006.

FERRÃO, J. E. M. A “morte da semente” sua importância na tecnologia pós-colheita do cacau. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v.31, n. 1, p. 262 – 267, jan. 2008.

FRANCO, A. **De caçador a gourmet – Uma história da gastronomia**. 3 ed. São Paulo: Ed. Senac, 45p, 2001.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes**. 2004. 191p. (Tese de doutorado em engenharia química). São Carlos, São Paulo, 2004.

GRAMACHO, I. C. P.; MAGNO, A. E. S.; MANDARINO, E. P.; MATOS, A. **Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia**. Ilhéus, Bahia: CEPLAC. p. 124. 1992.

GUITTARD, G. W. Origin Cocoa: Vive la Diferérence. **The Manufacturing Confectioner**. v.85, n.9, p.81-84, 2005.

GUYTON, B. **Commodities – Cocoa Review**. 2003 Issues, trends and performance of the chocolate and confectionery industries, New York. 40p. 2003.

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

HANSEN, C. E.; MAÑEZ, A.; BURRI, C.; BOUSBAINÉ, A. Comparison of enzyme activities involved in *flavour*precursors formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.80: 1193-1198, 2000.

HERMÈ, P. **Larrousse do chocolate**.São Paulo: Larrousse, 56p. 2006.

HUANG, Y.; BARRINGER, S. A. Alkylpyrazines and Other Volatiles in Cocoa Liquors at pH 5 to 8, by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, 2010.

HURST, W. J.; TARKA, S. M.; POWIS, T. G, VALDEZ, F.; HESTER, T. R. Cacao usage by earliest Maya civilization. **Nature**, v. 418, p. 280-290, jul. 2002.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Previsão de safra**. Disponível em:<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.aspt=1&z=t&o=26&u2=1&u3=1&u4=1&u1=27>. Acessado em 09 de agosto de 2015.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção Agrícola Nacional**. 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 14 ago. 2015.

ICCO (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION). **Annual Report 2013/2014**. Disponível em:<<http://www.icco.org/>>. Acesso em: 29 de ago. 2015.

ISAE, F. G. V. Cacau: **Pontencialidades regionais e estudo de viabilidade econômica**. Manaus: Suframa, 2003.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 301 p, 2011.

KRAUSS, R. M.; ECKEL, R. H.; HOWARD, B. AHA scientific statement: AHA dietary guidelines: revision 2000: A statement for health care professionals from the nutrition

committee of the American Heart Association. **Journal of Nutrition**, v. 131,p. 132–146, 2001.

LAGUNES GÁLVEZ, S.; LOISEAU, G.; PAREDES, J. L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J. P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**. 114, 124–130, 2007.

LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. 1982. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 1982.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 725p. 1989.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2ªed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEHRMAN, D.W.; PATTERSON, G.R. Cocoa fermentation, **In: Biotechnology, a Comprehensive Treatise**, v. 5, p. 529–575, 1983.

LEITER, J.; HARDING S. T. Brazil and Ghana: three melting moments in the history of cocoa. **Journal of Rural Studies**. 20, 113-130. 2004.

LEVANON, Y.; ROSSETINI, S. M. O. Cacau. In: *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. 1 Ed. Volume 4. **Ed. Edgard Blucher**. Ltd.387-420. 2001.

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; BARBERY, S. D. F.; GARCIA, N. H. P.; DE BRITO, E. S.; LIMA, C. A. A. Obtenção e utilização de enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha madura no melhoramento do sabor de cacau. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 23(3): 709-713. 2001.

LIMA, R. Gastronomia com pouco açúcar. **Revista Veja**, São Paulo, v.4 n° 9,p.82-84,jan, 2008.

LIPPI, D. Chocolate and medicine: dangerous liaisons. **Nutrition**. v. 25, n. 11-12, p. 1100–3, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818277>>. Acesso em: 8 julho. 2015.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. Campinas, 2000. 130p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil – strategie sand results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 73-81, 2011.

LOPEZ, A. P.; DIMICK, P. S. Cap. 25: Enzymes involved in cocoa curing págs. 211-236. In: **Food Enzymology**. Vol.2. Elsevier Applied Science. 1991.

LOPEZ, A. S. **Chemical changes occurring during the processing of cacao**. In: **Symposium Cacao Biotechnology**. Proceedings. University Park: The Pennsylvania State University, Pennsylvania, p.19-54, 1986.

LOPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, 3: 509-519, 2002.

MARTIN, P. Técnicas gastronômicas Le Cordon Bleu. **Revista Nutrição em Pauta**, São Paulo. n. 77, mar./abr. 2006.

MARTINI, M. H. **Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao* L.** 2004. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP.

MATTIETO, R. A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).** 2001. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MCSHEA, A.; RAMIRO-PUIG, E.; MUNRO, S. B., CASADESUS, G., CASTELL, M.; SMITH, M.A. Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing. **Nutrition Reviews**. 66, 630–641, 2008.

MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology.** 3. ed. New York: An AVI Book published by Van Nostrand Reinhold. 904 p. 1989.

MISNAWI; JINAP, S.; NAZAMID, S.; JAMILAH, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. **Food Chemistry**, v. 78, 407-17. 2002

MOTAMAYOR, J. C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J. W. S.; LOOR, R.; KUHN, D. N.; BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.) **PloS ONE**, Chicago, v. 3, n 10, p. 1-8, 2008.

NAZARUDDIN, R.; YATIM, A. M.; HOK, C. H. HPLC Determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. **Malaysian Journal Analytical Science**, 7:377—386. 2001.

NEURATH H.; BEYNON, R. J.; BOND, J. S. The diversity of proteolytic enzymes. **Proteolytic Enzymes a Practical Approach**, Oxford, UK: Prees, 1-13, 1989.

NIELSEN, E. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 114, n.2, p.168, Mar. 2007.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Cocoa and Coffee Fermentations. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Ed. 2: 485 – 492. 2014.

OETTERER, M. Cacau. In: SOUZA, J.S.I. (Org.). **Enciclopédia Agrícola Brasileira**, São Paulo: EDUSP, v.2 – C – D. p.33 – 40, 1995.

OETTERER, M. **Tecnologias de obtenção do cacau e do chocolate.** Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2004. Disponível em

www.esalq.usp.br/departamento/lan/pdf/cacau%20chocolate.pdf. Acessado em agosto de 2015.

OETTERER, M. **Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate**. In: OETTERER, M.; M., Regitano d'Arce A.; SPOTO, M. H. F. (Org.). Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Barueri: Manole, v. 1, p. 1-50. 2006.

OSMAN, H.; NAZARUDDIN, R.; LEE, S. L. Extracts os cocoa (*Theobroma cacao* L.) Leaves and their antioxidation potencial. **Food Chemistry**, Barking, v. 86, p. 41-45, 2004.

OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. Int. **Journal Food Science**. Vol. 65, Issue 3, p. 213-218, 2001.

PETTIPHER, G. L. **The extraction and partial puri`ucation of cocoa storage proteins**. **Cafe, Cacao**, The 34:23–26. 1990.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação do poder antioxidante do chocolate amargo: um comparativo com o vinho tinto**. 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de Plantas de Cacau Resistentes à vassoura-de-bruxa. **Boletim Técnico n. 181** – Ministério da Agricultura e do Abastecimento. CEPLAC/CEPEC. Ilhéus-BA, 1998.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento de cacauero com ênfase na produtividade, qualidade dos frutos e resistência à doenças**. 2003. 226p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas): Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

PONTILLON, J. Do cacao ao tablete. **A Cência na cozinha**, São Paulo, v. 1, p. 62 – 71, ago. 2009.

RANGEL, J. F. Ceplacicaca V Ano 25. Brasília, Iica. **Desenvolvimento Institucional**, n. 16. p. 1-L 1, 1982.

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

RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 43, n. 3, jul./set., 2007.

RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. v. 21, p.63-66. 2001.

ROSS, J. **Cocoa and Chocolate as Funtinal Foods**. Disponível em: <http://www.uoguelph.ca/nhptc/Jessica1.html>. Acesso em: 12 de maio de 2015. 2001.

- RUBIO, M. C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A. R. **Invertase from a strain of Rhodotorulaglutinis**. *Phytochemistry*, v.61, p.605-609, 2002.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos, ed. **Legis Summa**, Ribeirão Preto, 2004.
- SAINATO, A. B.; RIVERA, D. M. O; MESÉN, J. R. H.; ROJAS, J. C. Q. Micro propagación de *Theobroma cacao* L. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escola de Biología. **Engenharia e Biotecnologia: Cultivo de Tecidos**. 23 p. 04. 2004.
- SALAZAR, F. C. **Crónicas de Nueva España**. México: Museo Nacional de Arqueología y Etnografía, p. 107. 1936.
- SANCHES, C. L. G. **Murcha-de-ceratocystis (*cerato cystis caçõ funesta*) no sul da bahia: metodologia para seleção de genótipos de cacauero resistentes e estudos preliminares descritivos do patógeno**. 2006. Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia.
- SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, UK, v.40, p.2689-2694, 2005.
- SANT'ANA JR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1. Ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blucher, Cap.14. p.351-362, 2001.
- SARMENTO, L. A. V. **Obtenção e separação de polifenóis de sementes de cacau por extração supercrítica associada a membranas**. 2007. 103p. Tese (Doutorado em engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2. São Paulo: Ed. Blucher, 541 p. 2001.
- SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and environmental microbiology**. Lavras – MG. v.64, p.1477-1483, 1998.
- SCHWAN, R. F.; WHEALS, A, E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, 44(4): 205-221, 2004.
- SEAGRI (SECRETARIA DA AGRICULTURA PECUÁRIA IRRIGAÇÃO REFORMA AGRÁRIA PESCA E AQUICULTURA). **Cacau fino é aposta para compensar a baixa produtividade**. Disponível em: <<http://www3.seagri.ba.gov.br/noticias/2012/06/11/cacau-fino-é-aposta-para-compensar-abaixa-produtividade>>. Acesso em: 13 maio. 2015. 2012.
- SERRA, W. S. **Manual do Cacaicultor: com perguntas e respostas**. P 177-207, 2004.
- SHAUGHNESSY, W.J. Cocoa beans – plant through fermentation – its effect on sabor. **The Manufacturing Confectioner**, v. 72, n. 11, p. 51-58, 1992.
- SILVA NETO, P. J. **Sistema de Produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém, PA. CEPLAC. 125p, 2001.

SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; SOUZA, C. A. S. Diversidade no gênero *Theobroma*. In: DIAS, L. A. S. (Org.). **Melhoramento genético do cacau**. 1. Ed. Goiânia; FUNAPE, v. 1; p. 49-80. 2001.

SILVA, E. G. P.; SANTOS, A. N.; COSTA, A. C. S.; FORTUNATO, D. M. N.; JOSÉ, N. M.; KORN, M. G. A.; SANTOS, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry, **Micro chemical Journal**, Louisiana, v.82, p.159–162, 2006.

SOARES, M. S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através de ação enzimática durante a fermentação**. 2001. 107 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas.

SODRÉ, G.A. A espécie *Theobroma cacao*: novas perspectivas para a multiplicação de cacau. Jaboticabal: **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29(2),0-0, 2007.

SPENCER, M.E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. Identification of the proteins as members of the vicilin class of storage proteins. **Planta**. 186:567– 576. 1992.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, DC, pp. 721–736, 2001.

TORNERO, P.; MAYDA, E.; GOMEZ, M.D.; CANAS, L.; CONEJERO, V.; VERA, P. Characterisation of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. **The Plant Journal**, 10:315-330, 1996.

VAINSENER, S. A. Cacau. **Pesquisa Escolar Online**, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/>>. Acesso em: 08 de agosto de 2015.

VALLE, R. R. M. **Ciência, tecnologia e manejo do cacau**. Brasília, DF: MAPA, p. 688. 2012.

VITOLO, M. Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: Biotecnologia Industrial: **Biotecnologia na Produção de Alimentos**. 1 Ed. Volume 4. Ed. Edgard Blucher Ltd..387-420. 2001.

VIVANT, V. **Chocolate: SUS mitos y verdades**. Nutrinfo.com, Buenos Aires. 2004. p. 1-15. Disponível em: <<HTTP://www.nutrinfo.com/pagina/monografias>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

VOIGT, J.; BIEHL, B. Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* L. seeds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, p. 299-307, 1995.

VOIGT, J.B.; BIEHL, H.; HEINRICHS, S.; KAMARUDDIN, G.G.; MARSONER, A. HUGI. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. **Food Chemistry**. Volume 49, Issue 2, 173-180, 1994.

- WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. **Chocolate in health and nutrition**. New York: Humana, p. 553, 2013.
- WCF (WORLD COCOA FOUNDATION). **Cocoa Market Update**. Disponível em: <<http://worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Market-Update-as-of-4-1-2014.pdf>>. Acesso em: 12 julho. 2015.
- WHITAKER, J. R. *Principies of Enzymology for the Food Sciences*; 2ed, New York: Marcel Dekker, Cap: **Introduction to the hydrolases**, p. 387-389, 1994.
- WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. **Food Research International**, Italia, v. 33, p. 449- 459, 2000.
- WOOD, G. A. R., LASS, R. A. **Cocoa, fourth**. Ed. Blackwell Science, Oxford, 2001.
- YANES, M. G. **El cacao: origen, cultivo e industrialización en Tabasco**. Tabasco, México: Centro de Investigación de Ciencias Agropecuarias, p. 11.1994.
- ZOUMAS, B. L.; KREISER, W. R.; MARTIN, R. A. Theobromine and caffeine content of chocolate products. **Journal of Food Science**, v 45, p 314-316, 1980.
- ZOUMPANIOTI, M.; KARALI, M.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H. Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsion-like ternary systems and related organogels. **Enzyme and microbial Technology**. Vol. 39, Issue 4, P. 531-539, 2006.
- ZUGAIB, A. C. C. **Mudanças cambiais e o efeito dos fatores de crescimento ou declínio das receitas de exportações**. Bahia Agrícola, Ilhéus, v. 8, n.2, p.43 – 48, 2008.

CAPITULO II

ARTIGO

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS PROTEASES E SUAS ISOENZIMAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM DOIS CULTIVARES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) PRODUZIDOS NO SUL DA BAHIA, BRASIL.

RE
SU

MO

A fermentação das sementes de cacau envolve processos microbianos e ação de enzimas que atuam principalmente nas reações bioquímicas e são responsáveis pelo desenvolvimento dos precursores de aroma do cacau, conseqüentemente do *flavor* (sabor e aroma) do chocolate. Visando identificar as possíveis diferenças no processo de fermentação do cacau, no que se refere à proteólise, é que se optou por determinar a atividade das proteases (sob condições previamente determinadas de temperatura, pH e concentração de substrato) e suas isoenzimas em dois cultivares de cacau, PH-16 e TSH-1188 na polpa e na semente em diferentes tempos de fermentação do cacau, além da determinação da carga microbiana (bactérias e leveduras e mesófilos aeróbios). As proteases e suas isoenzimas foram extraídas da polpa e da semente, parcialmente purificadas e as atividades enzimáticas determinadas por espectrofotometria. Os resultados evidenciaram que a atividade das proteases foi maior em 66 h de fermentação para ambos os cultivares, no entanto o cultivar PH-16 apresentou valores mais elevados quando comparado como o cultivar TSH-1188 tanto na polpa (2,49 UE.mg proteína⁻¹) quanto na semente (1,73 UE.mg proteína⁻¹). Quando avaliada a atividade das isoenzimas os resultados demonstraram que o comportamento da atividade foi semelhante para os dois cultivares (PH-16 e TSH-1188) na polpa e na semente no que se refere as isoenzimas aminopeptidase e carboxipeptidase, no entanto o comportamento da atividade da isoenzima endoprotease mostrou-se pouco diferente para o cultivar TSH-1188, apresentado valores maiores de atividade nesse cultivar, tanto na polpa quanto na semente. Em relação as análises microbiológicas foram evidenciadas que a contagem de bactérias e leveduras aumentou de nas primeiras 36 h para o cultivar PH-16 e para o cultivar TSH-1188 aumentou nas primeiras 24 h, em oposição a contagem para mesófilos aeróbios que apresentou

acrécimo a partir de 48 h (PH-16) e 36 h (TSH-1188) evidenciando elevação da contagem após a diminuição da carga microbiana de bolores e leveduras. Diante dos resultados encontrados é possível concluir que o comportamento das proteases e das isoenzimas (aminopeptidase e carboxipeptidase) foi semelhante nos dois cultivares tanto na polpa quanto nas sementes. Houve apenas uma leve mudança no comportamento da endoprotease no cultivar TSH-1188. O período seguinte a redução da contagem da carga microbiana relativa a bolores e leveduras condiz com o período de aumento da atividade das proteases.

Palavras-chave: Cacau. Proteólise. Aminopeptidase. Carboxipeptidase. Endoprotease.

ABSTRACT

The fermentation of cocoa seeds and microbial processes involving the action of enzymes that act mainly in biochemical reactions and are responsible for development of cocoa flavor precursors therefore the *flavor* (taste and aroma) of chocolate. To identify the possible differences in the cocoa fermentation process, with regard to proteolysis, that it was decided to determine protease activity (under predetermined conditions of temperature, pH and substrate concentration) and its isoenzymes in two cultivars cocoa, PH-16 and TSH-1188 in the pulp and seed on different cocoa fermentation times, besides determination of microbial load (yeasts and molds and aerobic mesophilic). The protease and its isoenzymes were extracted from the pulp and seed, and partially purified enzyme activities determined by spectrophotometry. The results showed that the activity of proteases was higher at 66 h of fermentation for both cultivars, however the cultivar PH-16 showed higher values compared to the TSH-1188 growing both in the flesh ($2.49 \text{ UE.mg protein}^{-1}$) as the seed ($1.73 \text{ UE.mg protein}^{-1}$). When evaluated the activity of the isoenzymes the demonstrated results that the behavior of the activity was similar for both cultivars (PH-16 and TSH-1188) in the pulp and seed as regards aminopeptidase and carboxypeptidase isoenzymes, however activity behavior isoenzyme endoprotease showed little different to the TSH-1188 cultivar, showed higher activity values that grow both in the flesh and in the seed. Regarding microbiological analyzes were shown that the mold count and yeast increased in the first 36 h for PH-16 cultivar and TSH-1188 cultivar increased in the first 24 h, as opposed to count for aerobic mesophilic which rose to from 48 h (PH-16) and 36 h (TSH-1188) showing elevated count after lowering the microbial load of molds and yeasts. Considering the results it can be concluded that the

behavior of proteases and isoenzymes (aminopeptidase and carboxypeptidase) was similar in both cultivars both in the flesh and the seeds. There was only a slight change in behavior in endoprotease cultivar TSH-1188. The next period count reduction of microbial load on the molds and yeasts matches the period of increased activity of proteases.

Keywords: Cocoa. Proteolysis. Aminopeptidase. Carboxypeptidase. Endoprotease.

1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma cultura perene, cultivado em regiões tropicais ao redor do mundo (ARDHANA; FLEET, 2003). Seu fruto é o ingrediente principal na produção de chocolate e de seus derivados, sendo um componente importante na economia de muitos países entre eles o Brasil. O estado da Bahia se destaca como maior produtor do país, mesmo com a crise na produção de cacau em virtude da disseminação da doença vassoura-de-bruxa que se abateu sobre o setor cacauero nas últimas décadas (LOPES et al., 2011).

A qualidade do cacau depende de vários fatores, não apenas em relação à cultura, mas também em relação ao processamento pós colheita, principalmente na fermentação (WOOD; LASS, 2001; AFOAKWA et al., 2008; HII et al., 2009; DE VUYST et al., 2010). As sementes e as polpas do cacau são removidas manualmente após abertura dos frutos no campo, sendo imediatamente contaminadas por diferentes micro-organismos provenientes e predominantes no meio ambiente (superfícies dos frutos de cacau, folhas, insetos, cestos, facas, etc.) (SCHWAN; WHEALS, 2004; DE VUYST et al., 2010). A polpa é rica em carboidratos e serve de substratos para os micro-organismos durante o processo de fermentação (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; ARDHANA; FLEET, 2003; JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2007; CAMU et al., 2007, 2008 a, b; GARCIA-ARMISEN et al., 2010; PAPALEXANDRATOU et al., 2011 a, b, c).

Após a etapa de remoção das sementes e polpas inicia-se a etapa de fermentação do cacau que é um dos processos fundamentais no processamento pós-colheita, e é geralmente realizada de maneira tradicional e podendo durar de quatro a seis dias, sendo realizado em pilhas, caixas, cestos, bandejas, ou em plataformas (WOOD; LASS, 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004; DE VUYST et al., 2010).

Esse fenômeno espontâneo (fermentação) é realizado pela ação sucessiva de micro-organismos (leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas) naturais do ambiente (CRUZ et al., 2013). Como consequência das ações microbianas a polpa envoltória das sementes de cacau é degradada, produzindo metabólitos como produtos finais, entre eles álcoois e ácidos orgânicos, que se difundem pela membrana e em combinação com o aumento da temperatura promovem a morte do gérmen (embrião). Essas alterações induzem por sua vez uma série de reações bioquímicas complexas dentro e fora das amêndoas, gerando os precursores (aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores) de sabor e aroma do cacau, que são produtos das reações de proteólise e desmontagem de polissacarídeos (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004; AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2009; FOWLER, 2009; DANIEL et al., 2009; DE VUYST et al., 2010; THOMPSON et al., 2013).

Estudos sobre a atividade enzimática em amêndoas de cacau durante a fermentação são realizados desde a segunda metade do século XX. Acredita-se que as enzimas a polifenoloxidase, a invertase e as proteases tenham importância fundamental na formação do sabor de cacau e conseqüentemente no *flavor* do chocolate, uma vez que são responsáveis pela formação dos precursores de sabor (aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores) desenvolvidos durante a fermentação. Porém, a confiabilidade e comparação das atividades das enzimas do cacau são complicadas, devido a variações causadas por diferentes genótipos, origem geográfica, métodos de fermentação utilizados e tipos de cochos empregados (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

Atualmente estudos mostram que as reações que levam à formação de precursores de sabor de aroma do cacau são conduzidas por enzimas endógenas presentes nas sementes do cacau (AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2009). No entanto, paralelamente, outros pesquisadores acreditam que enzimas provenientes do metabolismo de micro-organismos também tenham importância no desenvolvimento dos precursores de aroma do cacau e, portanto, do chocolate (LEVANON; ROSSETINI, 2001).

Embora o papel essencial das enzimas endógenas durante a fermentação tenha sido evidenciado há muitos anos, existe ainda a falta de estudos sistemáticos abordando a

comparação entre diferentes cultivares de cacau (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). Além disso, ainda não está elucidado como os processos enzimáticos são regulados durante a fermentação, quais substratos enzimáticos/produtos estão relacionados com o sabor de amêndoas com qualidade superior e quais os fatores limitantes para esses processos (disponibilidade de substrato e/ou enzima, genótipo, condições de cultivo ou processo de fermentação). Sabe-se, no entanto, que as proteases ao realizarem a proteólise produzem precursores (peptídeos e aminoácidos livres) que juntamente com os açúcares redutores participarão da reação de *Maillard* durante a torrefação das amêndoas contribuindo assim para o desenvolvimento do sabor e aroma cacau (HUANG; BARRINGER, 2010; VOIGT et al., 1994a; 1994b).

Estudos extensivos acontecem buscando determinar a influência de fatores externos sobre o processo de fermentação do cacau e melhoria das práticas tradicionais, de modo a alcançar produtos finais de melhor qualidade. (SCHWAN, 1998; NIELSEN et al., 2007; CAMU et al., 2007, 2008a). Entretanto, uma das principais dificuldades em avaliar comparativamente as diferenças entre variedades de cacau encontra-se na escassez de trabalhos que tenham utilizado materiais distintos submetidos aos mesmos protocolos de fermentação, secagem e torração (EFRAIM; TUCCI; PEZOA-GARCIA, 2006). Ainda que se tenham dados de alguns trabalhos conduzidos com genótipos de cacau e de sua influência nas características sensoriais, físicas, físico-químicas, não há uma conclusão sólida e generalizada sobre a real influência de genótipos no sabor do chocolate (BUCHELI; KANCHANOMAI; MEYER, 2000).

Diante do exposto este estudo tem por objetivo determinar a atividade enzimática das proteases (sob condições previamente determinadas de temperatura, pH e concentração de substrato) e suas isoenzimas em diferentes tempos de fermentação de dois cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188) produzidos na região Sul da Bahia, Brasil, bem como determinar a carga microbiana referentes a bolores e leveduras e mesófilos aeróbios, podendo por sua vez possibilitar a ampliação do conhecimento científico sobre as mudanças que ocorrem durante o processo fermentativo, com vista a fornecer subsídios para futuras intervenções tecnológicas ligadas à biotecnologia enzimática, contribuindo assim para a melhoria da qualidade da matéria-prima na produção de chocolate.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foram estudados dois cultivares de cacau, PH 16 e TSH-1188, produzidos na Fazenda Lajedo do Ouro (S 14° 06' 15.2" WO 39° 38' 45.8") região sul do estado da Bahia, Brasil. O material em estudo foi cedido pelos produtores, segundo sua disponibilidade no período de realização do experimento. O cultivar PH-16 (Híbrido Forastero - resultado do cruzamento do Forastero do Alto Amazônico com o Trinitario) foi identificado em 1996 em uma população de cacaueiros híbridos da Fazenda Porto Híbrido, no município de São José da Vitória – BA. Já o cultivar TSH-1188 (Trinidad Selected Hybrids - híbrido trinitario), é originário de Trinidad e Tobago, localizada próximo a costa oriental da Venezuela e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa e excelente produtividade.

2.2 Métodos

2.2.1 Fermentação dos cultivares de cacau (PH-16 e TSH-1188)

A fermentação foi conduzida em cochos de madeira, contendo furos de 1,27 cm de diâmetro, localizados na parte inferior e nas laterais, para permitir o escoamento do líquido produzido durante a fermentação. O processo de fermentação foi acompanhado por sete dias para o cultivar PH-16 e por seis dias para o cultivar TSH-1188, no entanto o revolvimento das massa de cacau nos cochos foi realizado em tempos diferentes para os dois cultivares, o PH-16 foi revolvido a cada 48 h e o TSH-1188 a cada 24 h. O revolvimento tem como objetivo oxigenar a massa e uniformizar a temperatura. A massa de cacau foi recoberta com folhas de bananeira para reduzir as perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial.

2.2.2 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas (aproximadamente 500g) em diferentes tempos de fermentação até o final do processo, sendo congeladas imediatamente após a coleta e mantidas nessa condição até o momento das análises. Foram analisadas 10 amostras das 19 coletadas referente ao cultivar PH-16, equivalentes ao tempo zero (início da fermentação) e a 12, 24, 48, 66, 84, 96, 120, 138 e 156 horas de fermentação e para o cultivar TSH-1188 também foram analisadas 10 amostras das 16 coletadas, sendo equivalentes aos tempos zero, 12, 24, 36, 48, 66, 84, 96, 114 e 132 horas. Durante toda a fermentação foram realizadas análises de temperatura (Digital Thermometer MINIPA, modelo MT – 450) e pH (pH metro digital Digimed DM-23) da massa de cacau conforme AOAC (2000).

2.2.3 Determinação da atividade das Proteases e suas isoenzimas

A atividade das proteases suas isoenzimas foi determinada na polpa e semente dos dois cultivares de cacau sob condições previamente determinadas de temperatura, pH e substrato.

2.2.3.1 Extração das proteases das polpas

A extração das proteases foi realizada segundo o descrito por Gomez, Lajolo e Cordenunsi (1999) utilizando-se 100g de sementes de cacau, das quais foram retiradas manualmente as polpas e depois imersas em solução tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5 na proporção de 1:2 (p/v), em seguida trituradas por 3 minutos e homogeneizadas durante 30 minutos a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada HITACHI, modelo CR22GIII a 20000×g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante (extrato) foi estocado em freezer a -18°C até a realização da purificação parcial.

2.2.3.2 Purificação parcial das protease das polpas

A purificação parcial foi realizada segundo o descrito por Deuner et al. (2005), sendo adicionado aos extratos o sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda a 4 °C e em seguida a mistura foi centrifugada a 20000×g por 60 minutos a 4°C, reservando-se o precipitado. Em seguida o extrato foi dialisado por 24 horas a 4°C contra o tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,5 em membranas de celulose (43mm) obtendo-se o extrato enzimático parcialmente purificado (SILVA et al., 2003), que foi estocado em freezer a -18°C até a realização das análises.

2.2.3.3 Extração das proteases das sementes

As sementes removidas manualmente da extração das polpas foram liofilizadas (Liofilizador Liotop, modelo L108) e posteriormente trituradas e desengorduradas utilizando-se éter de petróleo como solvente (YUSEP et al., 2002), tratadas em seguida com acetona para remoção dos polifenóis, como descrito por Hansen, Del Olmo e Burri (1998). Depois da evaporação do solvente, o pó das sementes tratadas foi suspenso em tampão fosfato sódio 0,2M pH 7,5 a 4°C na proporção 1:5 (p/v) e homogeneizado em agitador magnético durante

30 minutos a 4°C. Após a mistura, a suspensão foi centrifugada a 20000×g durante 10 min a 4°C, e reservado o sobrenadante sendo estocado a -18°C para a etapa de purificação parcial (MISNAWI et al., 2002).

2.2.3.4 Purificação parcial das proteases das sementes

A purificação parcial foi realizada segundo o descrito por Deuner et al. (2005), onde foi adicionado aos extratos sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] em quantidade suficiente para fornecer 80 % de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda a 4 °C e a mistura centrifugada a 20000×g por 60 minutos a 4°C, reservando-se o precipitado. Em seguida o extrato foi dialisado por 48 horas a 4°C contra o tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5 em membranas de celulose (43mm) obtendo-se o extrato enzimático parcialmente purificado (SILVA et al., 2003) que foi estocado em freezer a -18°C para a realização das análises.

2.2.3.5 Determinação da atividade das proteases (Polpa e Semente)

A atividade das proteases na polpa e na semente foi determinada tomando-se alíquotas de 100 µl do extrato parcialmente purificado, adicionando-se 100 µl de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 5,7 para a polpa e tampão citrato de sódio 0,1M pH3,1 para a semente. A essa mistura foi acrescentado 100 µl de substrato (solução final contendo 1,5 mg/mL de albumina bovina sérica para polpa e semente), em seguida incubados a 50°C (polpa) e 31°C (semente) para os dois cultivares por 30 minutos. A reação foi interrompida através da adição de 500µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após centrifugação a 10000×g por 5 minutos foi adicionado ao sobrenadante 200 µl de NaOH 1,8N. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm. Para quantificação foi considerada uma unidade enzimática a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01. Um controle foi utilizado com a adição do TCA anteriormente à incubação da amostra (GIONGO, 2006).

2.2.3.6 Determinação da atividade da endoprotease (Polpa e Semente)

Para determinação da atividade da endoprotease, alíquotas de 500µl do extrato parcialmente purificado foram incubadas a 45°C durante 30 minutos com uma mistura contendo 20mg de albumina bovina e 2,0 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 3,5. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 ml de solução de ácido tricloroacético a 20% e em seguida centrifugada a 10000×g durante 15 minutos (AMIN; JINAP; JAMILAH, 1998; HANSEN;

DEL OLMO; BURRI, 1998). A quantidade de produtos da proteólise foi determinada pela reação de ninidrina, misturando-se 400µl do sobrenadante com 400µl do reagente de ninidrina. As misturas foram incubadas durante 15 minutos em um banho de água em ebulição e arrefecida em gelo, por fim foi adicionado etanol (50%, 1 ml), misturado rapidamente, sendo a absorbância medida a 570 nm. Uma unidade de endoprotease foi considerada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1mmol de grupos amino por minuto. A L-leucina foi utilizada como o padrão (MISNAWI et al., 2002; HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

2.2.3.7 Determinação da atividade da carboxipeptidase (Polpa e Semente)

Uma solução de 1 mL do extrato parcialmente purificado foi incubado com uma solução de Pepstatina A (10µg/ml), durante 1 hora em banho de gelo, para inibição da endoprotease (AMIN; JINAP; JAMILAH, 1998; VOIGT et al., 1994a). A uma alíquota (0,5 ml) dessa mistura foi adicionado 0,5ml de tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 5,8 contendo 5mM de Z-Phe-Leu-OH como substrato e que foi preparado a partir de uma solução estoque 125mM em metanol. A mistura foi então incubada a 45°C durante 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,5ml de solução de ácido tricloroacético a 20%, os tubos foram mantidos durante 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 10000×g durante 10 minutos. A reação da ninidrina foi realizada como descrito para a endoprotease e a atividade também foi calculada a partir de uma curva padrão de leucina. Uma unidade de carboxipeptidase foi considerada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de leucina por minuto a um pH 5,8 e a 45°C (MISNAWI et al., 2002; HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

2.2.3.8 Determinação da atividade da aminopeptidase (Polpa e Semente)

Os extratos foram preparados através da incubação de 30mg do pó tratado de semente e da polpa (liofilizados) com 60mg de polivinilpirrolidona, 1,8ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e 1% de Triton X-100 durante 30 minutos a 4°C. O substrato foi composto de 200mM de leucina-*p*-nitroanilina (H-Leu-*p*NA) dissolvido em dimetil sulfóxido (DMS). A mistura para incubação foi constituída por 890µl de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, 1% Triton X-100, 100µl do extrato e 10µl da solução de 200mM H-Leu-*p*NA. A reação foi realizada durante 30 minutos a 37°C e a absorbância medida a 405nm. A atividade enzimática foi medida no sobrenadante após duas centrifugações de 10 minutos a 10000 e 20000×g. A atividade da

enzima foi calculada a partir de uma curva padrão de leucina-*p*-nitroanilina (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

2.2.4 Determinação do teor de proteína nos extratos (Polpa e Semente)

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), e os valores foram usados para o cálculo da atividade enzimática específica.

2.2.5 Determinação da contagem de bolores e leveduras e mesófilos aeróbios

Pesou-se 25 g de amostra em sacos estéreis e adicionou-se 225 mL do diluente estéril (água peptonada: 0,1g/100 mL) e homogeneizou-se vigorosamente em Stomacher (Homogeneizador MC 1204/DIGITAL BLENDER MC 1204). Esta foi a diluição 1/10 ou 10^{-1} , a partir da qual, retirou-se uma alíquota de 1 mL e passou-se para um novo tubo contendo 9 mL de diluente, fazendo-se assim a diluição 10^{-2} e 10^{-3} sucessivamente. Feitas as diluições, partiu-se para a execução das seguintes análises: contagem padrão em placas de bolores e leveduras e mesófilos aeróbios. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

Contagem padrão em placas de bolores e leveduras. A metodologia utilizada foi a descrita pelo American Public Health Association (APHA, 2001). Transferiu-se 0,1 mL de cada diluição para a superfície de placas de Petri estéreis contendo aproximadamente 15 mL de Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski e, após, incubou-se as placas invertidas a 25°C por 5 dias. Acompanhou-se o crescimento das colônias durante este período e efetuou-se a contagem. Calculou-se o número de UFC por mililitro da amostra, multiplicando-se o número de colônias em cada placa pelo fator de diluição (10).

Contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios. Utilizou-se metodologia descrita pelo American Public Health Association (APHA, 2001). Transferiu-se 1,0 mL de cada diluição para a superfície de placas de Petri estéreis vazias. Em seguida, colocou-se 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) fundido. Homogeneizou-se a amostra com o meio de cultura através de movimentos circulares até a solidificação do meio. As placas foram incubadas, invertidas, a 35°C por 48 horas. Após a incubação efetuou-se a contagem direta das colônias. Calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro da amostra.

2.3 Análise dos dados

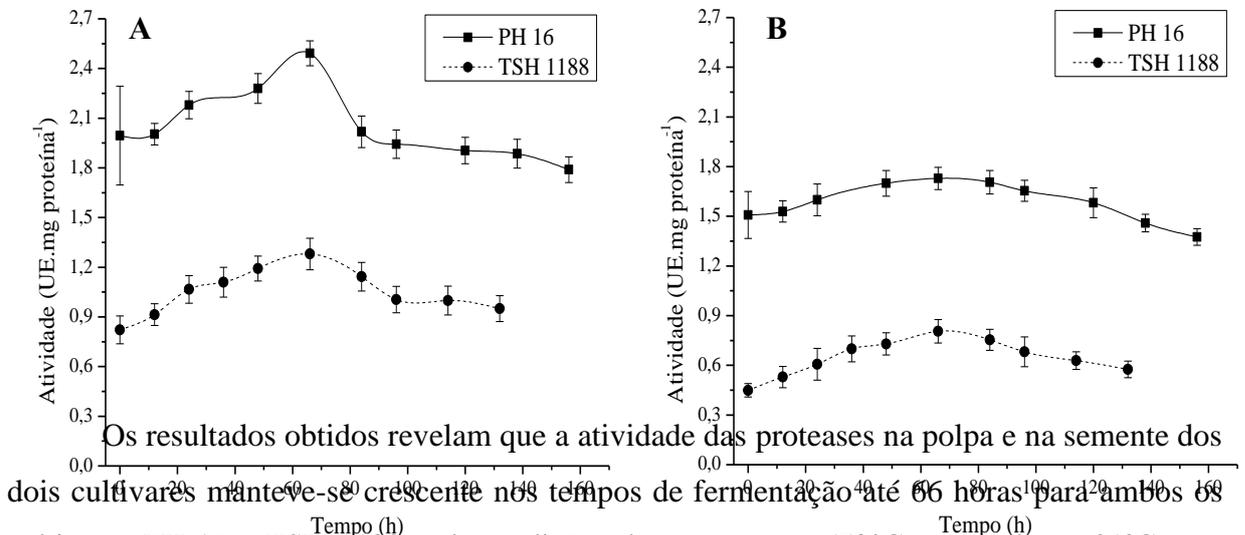
Todas as análises foram realizadas com duas repetições em quadruplicatas e obtidos os desvio padrão dos dados, exceto as análises microbiológicas que foram feitas em duplicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação das Proteases dos extratos (Polpa e Semente)

O período de fermentação para o cultivar PH-16 foi de 7 dias e para o cultivar TSH-1188 foi de 6 dias. Estudos demonstram que o tempo requerido para a fermentação das sementes é variável, segundo o material genético, porém para a ocorrência das principais reações que levam à formação dos principais precursores de sabor e aroma do cacau, as sementes de cacau, devem ser, geralmente, fermentadas por período superior a cinco dias (BECKETT, 1994), não devendo ultrapassar oito dias devido à decomposição proteica e consequente liberação de amônia, obtendo-se assim, um chocolate com odores e sabores estranhos (OTTERER, 2004). Na Figura 1 é possível observar o comportamento da atividade das proteases na polpa e na semente dos cultivares PH-16 e TSH-1188.

Figura 1 – Atividade enzimática das proteases na polpa e na semente de cacau. (A) Polpa cultivar PH-16 e TSH-1188. (B) Semente cultivar PH-16 e TSH-1188.



Os resultados obtidos revelam que a atividade das proteases na polpa e na semente dos dois cultivares manteve-se crescente nos tempos de fermentação até 66 horas para ambos os cultivares PH-16 e TSH-1188, sob condições de temperatura (50°C para polpa e 31°C para semente), quantidade de substrato (solução final contendo 1,5 mg/mL de albumina bovina sérica para polpa e semente) e pH (5,7 para polpa e 3,1 para semente), previamente determinados (dados não publicados), após esse tempo a atividade decresceu.

O aumento na atividade das proteases nos primeiros dias de fermentação pode ser decorrente de alguns fatores, dentre eles o descrito por Levanon e Rossetini (2001), que relata que a fermentação do cacau é um processo em que as leveduras atuam diretamente sobre os

carboidratos e fornecem as enzimas importantes para obtenção final do sabor de chocolate. Portanto, as condições iniciais da polpa, pH abaixo de 4.0, limitada disponibilidade de oxigênio e alta concentração de açúcares favorecem o estabelecimento rápido das leveduras que se multiplicam rapidamente nas 12 h, persistindo por um período de 24 a 36 horas na fermentação do cacau (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004; JESPERSEN et al., 2005; CAMU et al., 2007; NIELSEN et al., 2007).

Estudos demonstram ainda que as leveduras convertem os açúcares da polpa em etanol e a presença do álcool produzido inibe o seu próprio crescimento, ocorrendo assim a autólise das células das leveduras com consequente liberação das enzimas, essas por sua vez promovem a formação dos precursores de sabor do chocolate. Dentre as leveduras presentes as principais espécies são *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida krusei*, predominantes na Bahia (OETTERER, 2006). 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).

Outro estudo importante e que corrobora com a indicação de possível lise celular da microbiota fermentativa foi o realizado por Adeyeye et al. (2009), que demonstrou que o nível de proteínas em amêndoas de cacau fermentadas (15,2 g/100 g) foi 10,4% maior do que o nível de proteínas de amêndoas não fermentadas (13,6 g/100 g).

Vale salientar que além das proteases de origem microbiana, existem as que são inerentes às sementes de cacau (endógenas) e que 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 e sabor 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).

Na Figura 1-A e 1-B é possível ainda observar que as proteases se mostraram mais ativa no cultivar PH-16 com valores de atividade variando de 1,79 a 2,49 UE.mg proteína⁻¹ na polpa e de 1,37 a 1,73 UE.mg proteína⁻¹ na semente, enquanto que no cultivar TSH-1188 variou de 0,95 a 1,28 UE.mg proteína⁻¹ na polpa e na semente de 0,57 a 0,81 UE.mg proteína⁻¹. Essa diferença pode derivar de variações nas práticas de fermentação, tais como o regime de revolvimento das sementes e/ou fatores de pré-fermentação, como o tempo de colheita, grau de maturidade das sementes, bem como diferença também de genótipo (BIEHL;

WEWETZER; PASSERN, 1982; AMIN; JINAP; JAMILAH, 1997; LUNA, 2002; TAYLOR, 2002; TAYLOR; ROBERTS, 2004). O revolvimento para o cultivar PH-16 ocorreu a cada 48 horas e para o cultivar TSH-1188 a cada 24 horas, sendo, portanto, a fase anaeróbica maior no cultivar PH-16, o que possivelmente promoveu uma multiplicação maior dos microorganismos (leveduras) e conseqüentemente uma maior produção de enzimas. De acordo com Varnam e Sutherland (1997), as enzimas proteolíticas são as mais importantes na formação do aroma e sabor, sendo mais ativas na fase anaeróbica de fermentação das sementes de cacau. Estudos mostram ainda que a produção microbiana de protease obedece a condições próprias de cada espécie e também ao meio utilizado para fermentação, estando sujeita a diferenças de produção (ABIDI; LIMAN; NEGIB, 2008; SANDHYA et al., 2005).

Os níveis máximos de atividade das proteases foram alcançados em 66 horas de fermentação (Figura 1-A e 1-B) para os dois cultivares, sendo os valores respectivamente nesse tempo de 2,5 UE.mg proteína⁻¹ na polpa e 1,7 UE.mg proteína⁻¹ na semente para o cultivar PH-16 e 1,3UE.mg proteína⁻¹ na polpa e 0,8 UE.mg proteína⁻¹ na semente para o cultivar TSH-1188.

A maior atividade enzimática no cultivar PH-16 possivelmente terá reflexo na concentração e no comportamento das proteases frente aos inúmeros processos celulares vitais nas plantas, tais como a maturação da proteína (GUILLOTEAU et al., 2005), bem como a proteólise que fornecem aminoácidos livres (SÁNCHEZ-MUNDO; BAUTISTA-MUNOZ; JARAMILLO-FLORES, 2010) sendo esses muito importantes para o desenvolvimento do aroma e sabor do cacau (AFOAKWA et al., 2009; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; VOIGT et al., 1994a; 1994b). Uma maior degradação de proteínas na fermentação de cacau após 48 horas foi encontrado em estudo realizado por Biehl, Wewetzer e Passern (1982).

A menor atividade das proteases no cultivar TSH-1188 na polpa e na semente quando comparada com o cultivar PH-16 pode também estar relacionada com uma menor degradação protéica e características da testa, afetando o tempo de entrada de ácidos orgânicos formados durante a fermentação, e em conseqüência, retarda a ativação das enzimas. Portanto há diferenças na atividade enzimática em certos genótipos (HANSEN et al., 2000).

É possível observar ainda que as proteases se mostraram ativas durante todo o processo fermentativo, tanto na polpa quanto na semente dos dois cultivares (total de horas de fermentação respectivamente para o cultivar PH-16 e TSH-1188 foi de 156 e 132 h). Resultados semelhantes foram encontrados por Aragão (1992) que constatou redução linear na concentração das proteínas das sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) durante a

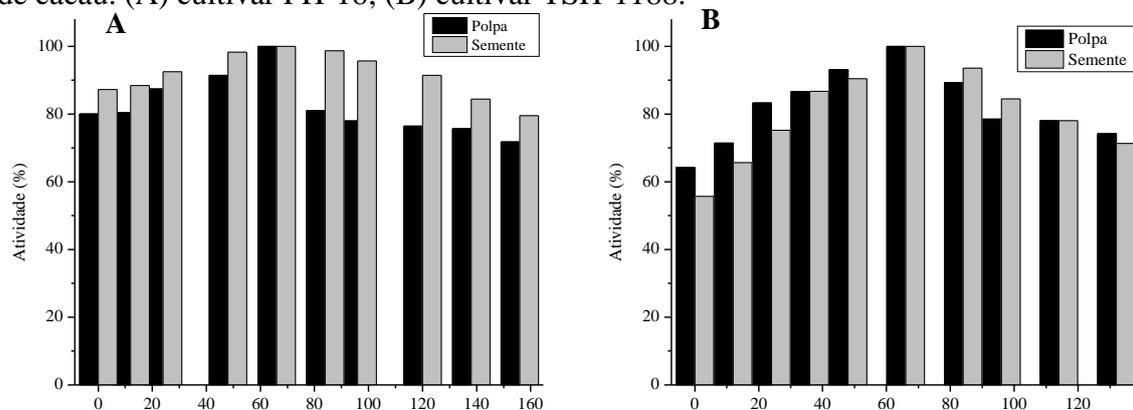
fermentação de sementes frescas do tempo zero até 168 h de fermentação, comprovando a atividade proteolítica durante todo o processo fermentativo.

Nesse estudo os resultados evidenciaram que o potencial de atividade das proteases é maior na polpa do que na semente para os dois cultivares, mostrando assim uma acentuada presença da enzima na polpa. Os sistemas mais usados para a fermentação das sementes de cacau são caixas de madeira, cestas, empilhamentos e bandejas (LOPES; GARCÍA; VASCONCELOS, 2003). Aquarone et al. (2001) defendem que o processamento em caixas é melhor, pois permite certas trocas físico-químicas (oxidação, ativação de enzimas, etc) na polpa. As amostras em estudo foram fermentadas em caixas de madeiras estando em concordância com o descrito anteriormente. Portanto, o tipo de processamento de fermentação colabora de forma positiva para uma maior atividade de enzima principalmente na polpa.

Apesar do comportamento semelhante das proteases nos dois cultivares (Ph-16 e TSH-1188) na polpa e na semente em condições previamente determinadas de pH, substrato e temperatura é possível perceber, através de valores em termos percentuais demonstrado na Figura 2-A e 2-B, que a redução da atividade da protease na polpa do cultivar PH-16 ao fim de 156h de fermentação, foi de 28,21%, quando comparado com a atividade máxima registrada com 66h, já para a semente do mesmo cultivar a redução foi de 20,47%. Em relação ao cultivar TSH-1188 foi constatado uma redução de atividade de 25,78% na polpa com 132h de fermentação, quando comparado com a atividade máxima registrada que também foi em 66h, para a semente desse mesmo cultivar a redução foi de 28,66%.

A redução da atividade das proteases reflete a concentração da enzima nos extratos estudados e os resultados mostram que a concentração das proteases diminuiu depois das 66 h de fermentação para os dois cultivares tanto na polpa quanto na semente, atenuando assim a sua atividade.

Figura 2 - Percentual de redução da atividade enzimática das proteases na polpa e na semente de cacau. (A) cultivar PH-16; (B) cultivar TSH-1188.



Em se tratando de proteases exógena de origem microbiana a redução do potencial da atividade está ligada a um rápido processo de desativação, o que é característico na produção de proteases por micro-organismos (JANSSEN; PEEK; MORGAN, 1994). Além disso, a atividade enzimática pode sofrer interferência tanto dos fatores biológicos como físico-químico como pH e temperatura durante a fermentação (SANOMIYA; NAHAS, 2003; MACCHERONI JUNIOR; ARAÚJO; AZEVEDO, 2004).

Outro estudo muito importante que explica o provável abrandamento da atividade da protease, nesse caso de origem endógena, durante o processo de fermentação de cacau foi realizado por Hansen et al., (2000), que descreve que o período real da acessibilidade das enzimas aos substratos, e o período de atuação é curto.

3.2. Determinação de bolores e leveduras e mesófilos aeróbios

Nas tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados referentes as contagens de micro-organismos bolores e leveduras e mesófilos aeróbios (respectivamente), em diferentes tempos de fermentação do cacau para os dois cultivares PH-16 e TSH-1188.

Os resultados (Tabela 1) demonstram que houve aumento na contagem de bolores e leveduras nos tempos de fermentação equivalentes a 12, 24 e 36 h seguido de um decréscimo a partir do segundo dia (48 h) para o cultivar PH-16 e em relação ao cultivar TSH-1188 houve aumento com 12 e 24 h, seguido de um decréscimo a partir de 36 h. Esses resultados comprovam as informações já descritas nesse estudo, onde foi evidenciado que a fase anaeróbica foi maior no cultivar PH-16 do que no cultivar TSH-1188, o que possivelmente promoveu uma multiplicação maior dos micro-organismos (bolores e leveduras) e conseqüentemente uma maior produção de enzimas.

Tabela 1 – Contagem de bolores e leveduras em sementes de dois cultivares de cacau durante o processo de fermentação.

	Tempo	PH-16	TSH-1188
Bolores e Leveduras (UFC/g)*	Início	$3,6 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$
	12 h	$4,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$
	24 h	$5,7 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$
	36 h	$6,0 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$

48 h	$2,8 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^2$
66 h	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
84 h	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
96 h	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
114 h		$<1,0 \times 10^2$
120 h	$<1,0 \times 10^2$	
132 h		$<1,0 \times 10^2$
138 h	$0,8 \times 10^2$	
156 h	$1,0 \times 10^2$	

* Unidade Formadora de Colônia por grama.

Tabela 2 – Contagem de mesófilos aeróbios em sementes de dois cultivares de cacau durante o processo de fermentação.

	Tempo	PH-16	TSH-1188
Bactérias Aeróbias Mesófilas (UFC/g)*	Início	$2,4 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
	12 h	$2,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
	24 h	$2,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
	36 h	$4,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4$
	48 h	$5,1 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$
	66 h	$5,8 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$
	84 h	$5,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^6$
	96 h	$4,7 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
	114 h		$4,0 \times 10^5$
	120 h	$4,3 \times 10^5$	
	132 h		$4,2 \times 10^5$
	138 h	$4,6 \times 10^6$	
	156 h	$5,3 \times 10^5$	

* Unidade Formadora de Colônia por grama.

Em referência a contagem de mesófilos aeróbios (Tabela 2) o comportamento se opõe ao dos bolores e leveduras. Os resultados evidenciaram um aumento na contagem a partir de 48 h para o cultivar PH-16 e para o cultivar TSH-1188 a partir de 36 h. A diminuição na carga microbiana referente a bolores e leveduras seguida do aumento da contagem de mesófilos aeróbios, para ambos os cultivares, coincide com o início do processo de revolvimento, ou seja, oxigenação da massa de cacau na fermentação. Estudos já evidenciaram a predominância dos bolores e leveduras na fase inicial da fermentação (24-36 horas), entretanto, com a produção de álcool pelos mesmos e a aeração (revolvimento da massa), a fermentação

anaeróbica dá lugar a fermentação aeróbica, e conseqüentemente ocasiona a morte desses fungos, possibilitando assim a proliferação de outros como bactérias, que apesar de já estarem presentes desde o início da fermentação, só se tornam dominantes nesse momento (SCHWAN; WHEALS, 2004; CAMU et al., 2007; VUYST et al., 2010).

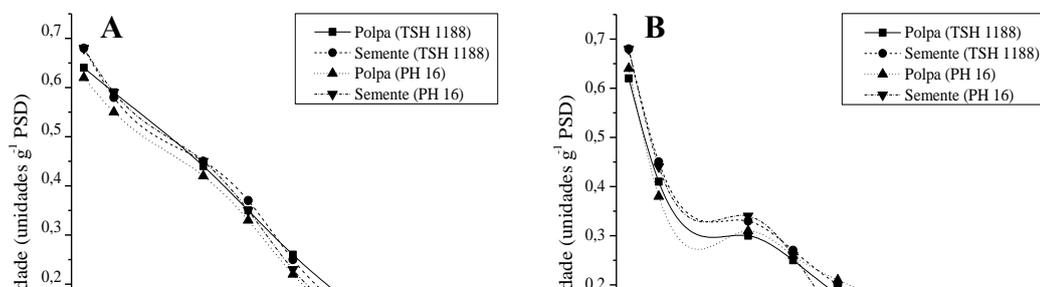
É importante salientar que as sucessões de micro-organismos no processo fermentativo do cacau refletem os fatores ambientais, como temperatura, pH e quantidade de oxigênio, e ainda a composição da polpa, as condições de colheita do fruto, e a contaminação inicial (CAMU et al., 2007).

3.3. Determinação das Isoenzimas dos extratos

As três isoenzimas estudadas mostraram perfis de atividade semelhantes nos dois cultivares (PH-16 e TSH-1188) tanto na polpa como na semente, apresentando-se ativa em todo o processo de fermentação do cacau, apesar de demonstrar decréscimo na atividade.

Em relação à aminopeptidase (Figura 4-A) os valores da atividade no cultivar PH-16 variaram de 0,62 a 0,07 unidades g^{-1} Peso Seco Desengordurado - PSD (polpa) e 0,68 a 0,08 unidades g^{-1} PSD (semente) e para o cultivar TSH-1188 variou de 0,64 a 0,07 unidades g^{-1} PSD (polpa) e 0,68 a 0,068 unidades g^{-1} PSD (semente). Pelos valores encontrados é possível perceber que houve pouca diferença na atividade e no comportamento da aminopeptidase na polpa e na semente de ambos os cultivares. Os valores da atividade nesse estudo decrescem quase que linearmente durante todo o processo de fermentação, estando esses resultados em consonância com o relato dos autores Hansen, Del Olmo e Burri (1998) e Hansen et al. (2000) quando descrevem que as aminopeptidases, invertases e polifenoloxidasas são sensíveis sendo fortemente inativadas durante o processo de fermentação. Os autores observaram ainda um decréscimo na atividade da aminopeptidase iniciando com 1,14 unidades g^{-1} PSD e ao fim do quarto dia, um valor de 0,06 unidades g^{-1} PSD

Figura 4 - Atividade das isoenzimas na polpa e na semente de dois cultivares de cacau. (A) Aminopeptidase; (B) Carboxipeptidase; (C) Endoprotease.



Em se tratando da atividade da carboxipeptidase (Figura 4-B) no cultivar PH-16 apresentou valores entre 0,68 a 0,07 unidades g^{-1} PSD (polpa) e 0,64 a 0,07 unidades g^{-1} PSD (semente) e para o cultivar TSH-1188 0,68 a 0,09 unidades g^{-1} PSD (polpa) e 0,62 a 0,06 unidades g^{-1} PSD (semente). Assim como a aminopeptidase o comportamento foi semelhante para os dois cultivares e os valores pouco diferiram, apesar de uma redução mais branda da atividade da carboxipeptidase entre relação a aminopeptidase. Hansen et al. (2000) também relata que a carboxipeptidase é parcialmente inativada durante a fermentação. Segundo estes autores, a inativação, tanto para a aminopeptidase quanto para a carboxipeptidase, pode ser desencadeada pelo calor, pela presença de ácidos ou pelos polifenóis. Outro estudo realizado por Hansen, Del Olmo e Burri (1998) demonstrou que a atividade inicial da carboxipeptidase foi de 0,33 unidades g^{-1} PSD, e ao final do quarto dia a atividade foi de 0,05 unidades g^{-1} PSD, o que demonstra um valor inicial abaixo do encontrado nesse estudo, porém evidencia a inativação da enzima com resultados finais mais próximos dos encontrados nesse trabalho. Estudo como o realizado por Yusep et al. (2002) demonstra que a concentração de aminoácidos livres é aumentada quando há maior concentração de carboxipeptidase, indicando assim, uma maior presença dos chamados precursores de sabor e aroma do cacau e, portanto, do chocolate.

Já em relação à atividade da endoprotease (Figura 4-C), os resultados encontrados variaram de 1,94 a 0,51 unidades g^{-1} PSD (polpa) e 2,46 - 0,59 unidades g^{-1} PSD (semente)

para o cultivar PH-116 e 2,54 - 0,56 unidades g^{-1} PSD (polpa) e 2,96 - 0,61 unidades g^{-1} PSD (semente) para o cultivar TSH-1188. Portanto, valores maiores da atividade foram obtidos para o cultivar TSH-1188, demonstrando assim uma maior concentração da enzima endoprotease nesse cultivar. Hansen et al. (2000) relatam que as endoproteases e glicosidases permanecem ativas durante todo o processo de fermentação do cacau. Além disso, os autores descrevem que as enzimas exibem diferentes estabilidades durante o processo de fermentação, principalmente no que se refere à inativação, sendo, portanto, mais resistente ao calor, presença de ácidos ou ação dos polifenóis.

4. CONCLUSÕES

- A determinação das proteases nos dois cultivares (PH-16 e TSH-1188) na polpa e na semente indica que há diferença em relação ao potencial de atividade para ambos, apesar de apresentarem comportamento semelhante com atividade crescente até 66 horas de fermentação e posterior decréscimo da atividade enzimática, portanto, o aumento da atividade nos primeiros dias coincide com o período de crescimento de micro-organismos especialmente de fungos e leveduras (fase anaeróbica) que são bons secretores de enzimas entre elas as proteases.
- A protease mostrou-se mais ativa no cultivar PH-16 com valores de atividade variando de 1,79 a 2,49 $\text{UE.mg proteína}^{-1}$ na polpa e de 1,37 a 1,73 $\text{UE.mg proteína}^{-1}$ na semente, enquanto que no cultivar TSH-118 variou de 0,95 a 1,28 $\text{UE.mg proteína}^{-1}$ na polpa e na semente de 0,57 a 0,81 $\text{UE.mg proteína}^{-1}$, indicando uma maior presença da protease na polpa.
- Em relação à determinação das aminopeptidase e carboxipeptidase foi demonstrado que o comportamento da atividade foi semelhante para os dois cultivares (PH-16 e TSH-1188) na polpa e na semente, no entanto o comportamento da endoprotease foi um pouco diferente para o cultivar TSH-1188, apresentado valores maiores de atividade nesse cultivar, tanto na polpa quanto na semente.
- A contagem de bolores e leveduras mostrou-se crescente nos tempos de 12 a 36 h para o cultivar PH-16, e para o cultivar TSH-1188 nos tempos referentes a 12 a 24 h de fermentação, seguida de redução da carga microbiana em ambos os cultivares. Em relação a contagem de mesófilos aeróbios mostrou-se crescente a partir de 48 h para o cultivar PH-16, e para o cultivar TSH-1188 a partir de 36 h de fermentação, esses resultados indicam que o período seguinte a redução da contagem dos bolores e

leveduras condiz com o período de aumento da atividade das proteases, mostrando assim possível produção dessas por esses micro-organismos;

5. PERSPECTIVA FUTURAS

- Mais estudos são necessários para a compreensão do processo de proteólise durante a fermentação do cacau objetivando ampliar o conhecimento sobre as mudanças que ocorrem (ou que possam ocorrer) e que não puderam ser esclarecidas neste estudo.
- Os resultados encontrados nesse trabalho abrem uma perspectiva para futuras intervenções no processo de fermentação do cacau, de modo a otimizar a atuação da protease e suas isoenzimas.

REFERÊNCIAS

ABIDI, F.; LIMAN, F.; NEGIB, M.M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. **Process Biochemistry**. 43. 1202-1208, 2008.

ADEYEYE, E. I.; AKINYEYE, R. O.; OGUNLADE, I.; OLAOFE, O.; BOLUWADE, J. O. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. **Food Chemistry**. 04.127, 2009.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 48, 840 e 857, 2008.

AFOAKWA, E. O., PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. **Food Chemistry**. 113:208–215, 2009.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Vicilin-class globulin and their degradation during cocoa fermentation. **Food Chemistry**. 59, 1-5, 1997.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. **Journal Science Food Agricultural**. v.76, p.123-128, 1998.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blucher, vol. 4, 2001.

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

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**. 86: 87–99, 2003.

BECKETT, S.T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Zaragoza: Editorial Acribica, p.432. 1994.

_____. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. London Edited by Stephen T. Beckett, Blackwell Publishing Ltd., 2009, 732p. 2009.

BIEHL, B.; PASSERN, D. Proteolysis during fermentation like incubation of cocoa seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33; n.12; p.1280-1290, 1982.

BIEHL, B.; WEWETZER C.; PASSERN D. Vacuolar (storage) protein of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, p. 1291-1304, 1982.

BUCHELI, P.; KANCHANOMAI, C.; MEYER, I. **Strategy for assessing cocoa flavour of a large number of samples for selection and breeding.** Proceedings of 13th International Cocoa Research Conference, Kata Kinobalu, Sabah, Malaysia, p. 865-870, 2000.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ Microbiology*. 73, 1809 e 1824, 2007.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; ADDO, S.K.; TAKRAMA, J. S.; BERNAERT, H.; DE VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavor of chocolate. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 88, 2288 e 2297, 2008a.

CAMU, N.; GONZÁLEZ, Á.; DE WINTER, T.; VAN SCHOOR, A.; DE BRUYNE, K.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; ADDO, S. K.; DE VUYST, L. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Appl. Environ. Microbiology*. 74, 86 e 98, 2008b.

CRUZ, J. F. M.; LEITE, P. B.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology*. 12, 5218-5225. 2013

DANIEL, H. M.; VRANCKEN, G.; TAKRAMA, J. F.; CAMU, N.; DE VOS, P.; DE VUYST, L. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res*. 9, 774e783, 2009.

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.

DEUNER, S.; FERREIRA, L. S.; BACARIN, M. A.; BERVALD, C. M. P.; ZANATTA, E. R. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: energia de ativação e efeito de inibidores. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas – RS, v. 11, n. 45-50, 2005.

DE VUYST, L.; LEFEBER, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria — Novel Applications*. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, pp. 301–325, 2010.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCIA, N. H. Teores de Compostos Fenólicos de Sementes de Cacaueiro de Diferentes Genótipos. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 9, n. 4, p. 229-236, 2006.

FOWLER, M. S. Cocoa beans: from tree to factory. In: Beckett, S.T. (Ed.), *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 4th ed. **Blackwell Science**, Oxford, UK, pp. 10–47, 2009.

GARCIA-ARMISEN, T., PAPALEXANDRATOU, Z., HENDRYCKX, H., CAMU, N., VRANCKEN, G., DE VUYST, L., CORNELIS, P. Diversity of the total bacterial community associate dwith Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Appl. Microbiology Biotechnology*. 87: 2281 e 2292, 2010.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (Dissertação de mestrado) Porto Alegre, Brasil, 2006.

GOMEZ, M. L. P. A.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (Carica papaya, L. cv. Solo): influência da radiação gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.19, 246-52.ISSN 0101-2061, 1999.

GUILLOTEAU M.; LALAOI, M.; MICHAUX, S.; BUCHELI, P.; MCCARTHY, J. Identification and characterization of the majoraspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* Seeds. **Journal of the Science of Food Agriculture**. 85: 549–562, 2005.

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

HANSEN, C. E.; MAÑEZ, A.; BURRI, C.; BOUSBAINÉ, A. Comparison of enzyme activities involved in flavour precursors formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80: 1193-1198, 2000.

HII, C. L.; LAW, C. L.; CLOKEA, M.; SUZANNAH, S. Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. **Biosystems Engineering**. 102, 153 e 161, 2009.

HUANG, Y.; BARRINGER, S. A. Alkylpyrazines and Other Volatiles in Cocoa Liquors at pH 5 to 8, by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**. v. 75, n. 1, 2010.

JANSSEN, P. H.; PEEK, K.; MORGAN, H.W. Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. **Applied Microbiology and Biotechnology**.41: 400-406. 1994.

JESPERSEN, L.; NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of Yeast involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research** 5, 441–453, 2005.

LEVANON, Y.; ROSSETINI, S. M. O. Cacau. In: *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. 1 Ed. Volume 4. ed. Edgard Blucher. Ltd.387-420, 2001.

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.). **Brazilian Journal Food Technology**, n°6, p. 309-316, 2003.

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 73-81, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemical**, v.193, p. 265–275, 1951.

LUNA, F; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Jornal of Agricultural an Food Chemistry**, Easton, v. 50, p.3527-3532, 2002.

MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.

MISNAWI; JINAP, S.; NAZAMID,S.; JAMILAH, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. **Food Chemistry**, v. 78, 407-17. 2002.

NIELSEN, D. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL,W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **Int. Journal Food Microbiology**. 114, 168 e 186, 2007.

OETTERER, M. **Tecnologias de obtenção do cacau e do chocolate**. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2004. Disponível em <<http://www.esalq.usp.br/departamento/lan/pdf/cacau%20chocolate.pdf> > Acesso em: 23 jul. 2015.

OETTERER, M. **Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate**. In: OETTERER, M; M., Regitano d´Arce A.; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, v. 1, p. 1-50. 2006

OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. **Int. Journal of Food Science**. Vol. 65, Issue 3, p. 213-218. 2001.

PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N.; FALONY, G.; DE VUYST, L. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. **Food Microbiology**. 28, 964 e9 73, 2011a.

PAPALEXANDRATOU, Z.; FALONY, G.; ROMANENS, E.; JIMENEZ, J. C.; AMORES, F.; DANIEL, H. M.; DE VUYST, L. Species diversity, community dynamics, and metabolite

kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl. Environ Microbiology*. 77, 7698 e 714, 2011b.

PAPALEXANDRATOU, Z.; VRANCKEN, G.; DE BRUYNE, K.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L. Spontaneous organic cocoa bean fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*. 28, 1326 e 1338, 2011c.

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

SÁNCHEZ-MUNDO, M.L, C. BAUTISTA-MUNOZ, M.E. JARAMILLO-FLORES. Characterization of the exopeptidase activity existing in *Theobroma cacao* L. during germination. *Process Biochemistry*.45: 1156–1162, 2010.

SANDHYA. C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, Oxford, UK, v.40, p.2689-2694, 2005.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microorganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. *Ciência Rural*, v.33, p. 835-842, 2003.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44, 205–221, 2004.

SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and environmental microbiology*. Lavras – MG. v.64, p.1477-1483, 1998.

SILVA, M. R. O.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SOUZA, P. M.; CORREIA, J.; SOUZA-MOTTA, C.; MOREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L. **Estudo de Métodos de Extração de Protease Termostável Produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum*** In: Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis/SC. XIV. 2003.

TAYLOR, A. J. **Food flavor technology**. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, 2002.

TAYLOR, A. J.; ROBERTS, D. D. Flavour perception. Oxford Blackwell Publishing, 2004.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Eds.), **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, DC, pp. 721–736, 2001.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A.; CAMU, N. Cocoa and coffee. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 4th ed. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 881–899, 2013.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: Tecnología, Química e Microbiología**, 1997.

VOIGT, J.; BIEHL, H.; HEINRICHS, S.; KAMARUDDIN, G. G.; MARSONER, A.; HUGI, A. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. **Food Chemistry**. Volume 49, Issue 2, 173-180, 1994a.

VOIGT, J.; HEINRICHS, H.; VOIGT, G.; BIEHL, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. **Food Chemistry**. 50: 177-184, 1994b.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa, fourth ed.** Blackwell Science, Oxford, 2001.

YUSEP, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Influence of carboxypeptidases on free amino acid, peptide and methylpyrazine contents of under-fermented cocoa beans. **Journal Science Food Agriculture**. 82, 1584-92, 2002.

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