



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ADRIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS INVERTASE E  
POLIFENOLOXIDASE DURANTE A FERMENTAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE  
CACAU (*Theobroma cacao* L.)**

SALVADOR

2016

ADRIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS INVERTASE E  
POLIFENOLOXIDASE DURANTE A FERMENTAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE  
CACAU (*Theobroma cacao* L.)**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliete da Silva Bispo

SALVADOR

2016

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Silva, Adriana Barros de Cerqueira e.

Determinação da atividade das enzimas invertase e polifenoxidase durante a fermentação de dois cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) / Adriana Barros de Cerqueira e Silva. - 2016. 81 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares.

Co-orientadora: Profª. Drª. Eliete da Silva Bispo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2016.

1. Enzimas. 2. Fermentação. 3. Chocolate. 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

ADRIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS INVERTASE E  
POLIFENOLOXIDASE EM DOIS CULTIVARES DE CACAU (*Theobroma  
cacao* L.) DURANTE A FERMENTAÇÃO

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 29 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Sérgio Eduardo Soares  
Universidade Federal da Bahia  
Orientador

---

Dr.ª Astria Dias Ferrão Gonzales  
Universidade do Estado da Bahia

---

Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez  
Universidade Federal da Bahia

*“O Amor me explicou tudo.”*

(São João Paulo II)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me deixar faltar força e saúde durante a execução do trabalho;

Ao meu pai João Alfredo, por acreditar em mim incondicionalmente;

Aos meus irmãos, mãe e madrasta, pela alegria de viver;

À minha irmã, amiga e colega de profissão Mariana, exemplo de dedicação e amor, por representar a palavra PRESENÇA em todos os sentidos e pelo apoio incessante ao meu trabalho;

Ao Vinícius, meu companheiro, por ter sido o primeiro incentivador da realização desse trabalho e pelo amor em todos os momentos;

Aos Professores Sérgio Soares e Eliete Bispo, pela orientação e confiança;

À Prof<sup>a</sup> Clícia Capibaribe, pelo apoio e pela oportunidade de proporcionar a execução do trabalho de forma mais tranquila;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiarem o presente estudo;

À Fazenda Lajedo do Ouro, pela concessão das amostras analisadas;

Ao LAPAAC, por acolher o projeto e fornecer subsídios para a execução do mesmo;

Ao LAPESCA e seus colaboradores, pelo auxílio nas análises;

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e seus colaboradores, pelo apoio;

Aos Professores Ederlan Ferreira, Mara Spínola, Janice Druzian, Alaíse Gil e demais docentes do PGAl, pelo apoio acadêmico;

Aos amigos que se mostraram verdadeira parte integrante do trabalho e da vida, Túlio Silveira, Cíntia Matos, Lene Nascimento, Luciane Sousa e Gilson Machado;

Aos ICs do LAPAAC, Priscila Anjos, Caio Alexandre, Mariana Novais, Gabriela Ribeiro e Natã Cruz, pela alegria diária no laboratório;

A Adrielle Macedo, Jaff Ribeiro e Leonardo Maciel, pela colaboração;

Aos amigos da Comunidade Católica Shalom, pela compreensão e orações;

A todos que participaram direta ou indiretamente,

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>08</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
OBJETIVOS GERAIS.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>1. CACAU.....</b>	<b>17</b>
1.1. História do cacau.....	17
1.2. Introdução do cacau na região sul da Bahia.....	18
1.3. Características do cacau.....	20
1.4. Variedades de cacau.....	23
1.5. Produção de cacau no Brasil e no mundo.....	26
<b>2. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU.....</b>	<b>27</b>
2.1. Colheita e quebra dos frutos.....	28
2.2. Fermentação.....	29
2.3. Secagem e armazenamento.....	31
<b>3. ENZIMAS.....</b>	<b>33</b>
3.1. Características gerais.....	33
3.2. Atividade enzimática no cacau.....	34
3.3. Invertase.....	36
3.4. Polifenoloxidase (PPO).....	37
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## **CAPÍTULO II**

<b>ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE O USO DA ENZIMA INVERTASE NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA SOB O ENFOQUE EM PEDIDOS DE PATENTES DEPOSITADOS NO MUNDO ENTRE 1945 E 2014.....</b>	<b>48</b>
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>2. DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA.....</b>	<b>51</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>52</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
4.1. Evolução anual do depósito de patentes.....	53
4.2. Patentes por Código de Classificação Internacional.....	53
4.3. Patentes depositadas por país.....	55
4.4. Perfil dos depositantes.....	56
4.5. Detentores da tecnologia.....	57
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>
REFERÊNCIAS.....	60

## **CAPÍTULO III**

<b>EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE E POLIFENOLOXIDASE DURANTE A FERMENTAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE CACAU (<i>Theobroma cacao</i> L.) PRODUZIDOS NO SUL DA BAHIA, BRASIL.....</b>	<b>62</b>
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
2.1. Material e coleta de amostras.....	66
2.2. Fermentação.....	66
2.3. Extração e purificação parcial da invertase.....	67
2.4. Extração e purificação parcial da PPO.....	68
2.5. Determinação da atividade das Invertases nos extratos parcialmente purificados.....	69



2.6. Determinação da atividade da PPO nos extratos parcialmente purificados.....	70
2.7. Determinação do teor de proteína dos extratos.....	71
2.8. Análise estatística.....	71
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>77</b>
<b>6. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>78</b>
REFERÊNCIAS.....	79

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.1.</b> Astecas oferecendo chocolate ao deus Vitzilipuztli.....	17
<b>Figura 1.2.</b> Cacaueiros com frutos (A) e flor de cacau (B).....	20
<b>Figura 1.3.</b> Zona de cultivo do cacau ao redor do mundo (cor laranja).....	21
<b>Figura 1.4.</b> Corte longitudinal de um fruto de cacau (A): 1 – Placenta, 2 – Polpa mucilaginosa, 3 – Casca; Corte longitudinal de semente de cacau (B): 4 – Testa, 5 – Cotilédone, 6 – Embrião ou gérmen.....	22
<b>Figura 1.5.</b> Variedades de cacau: <i>Criollo</i> e a semente oval (A), <i>Forastero</i> e a semente achatada (B), <i>Trinitário</i> (C).....	24
<b>Figura 1.6.</b> Variedades de cacau: <i>Criollo</i> (A), <i>Forastero</i> (B) e <i>Trinitário</i> (C).....	25
<b>Figura 1.7.</b> Etapas de pré-processamento do cacau.....	28

### CAPÍTULO II

<b>Figura 2.1.</b> Evolução anual de depósitos de patentes relacionadas ao uso da enzima invertase na indústria alimentícia entre 1945 e 2014.....	54
<b>Figura 2.2.</b> Distribuição das patentes relacionadas ao uso da invertase na indústria de alimentos por códigos da classificação internacional. A23L1/307: produtos dietéticos com valor nutricional reduzido; A23L1/236: agentes adoçantes artificiais; A23L1/30: alimentos ou gêneros alimentícios; sua preparação ou tratamento, contendo aditivos; A23L1/09: xaropes contendo açúcares, hidratos de carbono, alcoóis de açúcar e hidrolisados de amido dextrina; A23L1/00: alimento ou alimentos, sua preparação ou tratamento; A23L3/00: preservação de alimentos ou produtos alimentares, em geral, especialmente adaptados para alimentos ou produtos alimentares.....	55
<b>Figura 2.3.</b> Patentes depositadas na base europeia <i>Espacenet</i> classificadas por países no período estudado (1945-2014).....	56
<b>Figura 2.4.</b> Distribuição dos documentos de patentes relacionados por tipo de depositante.....	57
<b>Figura 2.5.</b> Depósitos de patentes por empresas/indústrias particulares.....	58

### **CAPÍTULO III**

<b>Figura 3.1.</b> Atividade da Invertase ácida para o substrato sacarose 0,2M na polpa (A) e substrato sacarose 0,4M na semente (B) dos cultivares PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação (12 a 156h).....	<b>72</b>
<b>Figura 3.2.</b> Acompanhamento do pH para polpa e semente durante o processo de fermentação. (A) Cultivar PH 16; (B) Cultivar TSH 1188.....	<b>73</b>
<b>Figura 3.3.</b> Atividade da Invertase neutra para o substrato sacarose 0,3M na polpa e semente dos cultivares PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação (12 a 156h).....	<b>74</b>
<b>Figura 3.4.</b> Atividade da PPO para o substrato catecol0,1M na polpa (A) e semente (B) dos cultivares PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação (12 a 156h).....	<b>75</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.1.</b> Composição média das sementes do cacau ( <i>Forastero</i> ) do Oeste Africano.....	<b>23</b>
<b>Tabela 1.2.</b> Produção mundial de cacau entre 2012 e 2015.....	<b>27</b>
<b>Tabela 1.3.</b> Principais enzimas que atuam na fermentação do cacau.....	<b>35</b>

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 2.1.</b> Busca de patentes por palavras-chave, agrupamento das palavras e códigos da classificação internacional de patentes na base de dados europeia ( <i>Espacenet</i> – EP).....	<b>53</b>
--	-----------

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 3.1.</b> Condições ótimas de substrato, temperatura e pH para a atuação da Invertase nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação.....	<b>69</b>
<b>Tabela 3.2.</b> Condições ótimas de substrato, temperatura e pH para a atuação da Polifenoloxidase (PPO) nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação.....	<b>70</b>

## RESUMO

O interesse no cultivo do cacau (*Theobroma cacao* L.) está ligado ao aproveitamento de suas sementes para produção de derivados, principalmente chocolate. Após sua colheita, são efetuadas as etapas de separação da casca do material interno (sementes e polpa) que é conduzido à fermentação, etapa indispensável para a obtenção de amêndoas de boa qualidade devido a complexas reações bioquímicas que provocam a morte do embrião, hidrólise de açúcares e proteínas, liberação das enzimas e substratos e difusão de compostos fenólicos que entram em contato com as enzimas. Embora o papel essencial de enzimas endógenas durante essa etapa tenha sido evidenciado há muitos anos, existem ainda poucos estudos sistemáticos abordando a comparação entre diferentes genótipos de cacau, sob diferentes condições de cultivo, com diferentes métodos de fermentação. Além disso, não está ainda elucidado como os processos enzimáticos são regulados durante a fermentação, que substratos enzimáticos/produtos estão relacionados com o sabor de amêndoas com qualidade superior e quais os fatores limitantes para os processos enzimáticos (disponibilidade de substrato ou enzima, genótipo, condições de cultivo ou processo de fermentação). O presente trabalho determinou a atividade das enzimas Invertase e PPO nos cultivares PH 16 e TSH 1188, produzidos no sul da Bahia, em cinco tempos distintos da fermentação, baseado nas condições ótimas de atividade previamente estabelecidas no tempo zero (momento antes do início da fermentação). A atividade de ambas as enzimas foi determinada espectrofotometricamente para os substratos sacarose e catecol, respectivamente. Os resultados demonstram a diferença e particularidade existente entre os cultivares de cacau, e entre polpa e semente de cada cultivar, além de elucidar a atividade equilibrada das enzimas durante as 156h de fermentação, evidenciando a capacidade das mesmas em se manter ativas ao longo do processo, apesar das intempéries fermentativas. A partir dos resultados obtidos, podem ser realizadas recomendações de intervenções tecnológicas (como controle de pH e temperatura no cocho) que contribuam para melhoria da qualidade da matéria-prima na produção de chocolates monovarietais, que possuem maior valor agregado.

**Palavras-chave:** enzimas, chocolate monovarietal, precursores de sabor.

## ABSTRACT

The interest in cocoa cultivation (*Theobroma cacao* L.) is linked to the use of its seeds for the production of derivatives, especially chocolate. After harvesting, the separation steps of the inner material is made (seeds and pulp) followed by fermentation, essential step to obtain good quality beans due to the complex biochemical reactions that cause the death of the embryo, sugars and proteins hydrolysis, release of enzymes and substrates and dissemination of phenolic compounds that come into contact with enzymes. While the essential role of endogenous enzymes during this step has been evident for many years, there are few systematic studies addressing the comparison between different cacao genotypes under different growing conditions, with different methods of fermentation. Moreover, it is not clear how enzymatic processes are regulated during the fermentation, which enzyme substrates / products are related to the flavor of almond with superior quality and what are the limiting factors for the enzymatic processes (substrate or enzyme availability, genotype, culture conditions or fermentation process). This study determined the activity of Invertase and PPO enzymes in PH 16 and TSH 1188 cultivars, produced in the south of Bahia, in five different times of fermentation, based on optimal conditions of activity previously established at time zero (moment before the fermentation). The activity of both enzymes was determined spectrophotometrically for substrates sucrose and catechol, respectively. The results show the difference and particularity existing between cocoa cultivars and between pulp and seed of each plant variety, in addition to elucidate the balanced activity of enzymes during 156h of fermentation, evidencing their ability of remain active throughout the process despite the fermentative elements. From the results obtained, recommendations technological interventions can be performed (such as pH and temperature control in the trough) to contribute to improving the quality of the raw material in the production of monovarietal chocolates, which have higher added value.

**Keywords:** enzymes, monovarietal chocolate, flavor precursors.

## INTRODUÇÃO GERAL

O cacau (*Theobroma cacao* L.) representa, especialmente para a região sul da Bahia, tempos de glória e desenvolvimento, fonte de trabalho e sustento para muitos que vêem no cultivo de sua espécie um símbolo de identidade regional e memória. Após a chegada do fungo *Moniliophthora perniciosa* na região, toda a economia local se viu profundamente abalada e sem alternativas para a recuperação de muitas lavouras devastadas pela doença conhecida como “vassoura-de-bruxa”. Muitas famílias que dependiam das colheitas, outrora abundantes, ficaram sem alternativa para sua própria subsistência, visto que o cacau era a fonte principal de geração de emprego e renda diretos e indiretos em todo o sul do estado.

Aqueles que conseguiram manter suas propriedades rurais apesar da crise, o fizeram graças ao incentivo de pesquisas sobre o fruto e a doença, especialmente da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), pioneira em experimentos com clonagem e outras intervenções genótípicas. Graças ao apoio intelectual de organizações governamentais e não-governamentais, atualmente a região voltou a ser bastante produtiva (embora ainda não como antes) e a ter representatividade na produção nacional de cacau.

Além disso, alguns produtores passaram a ter interesse não somente na exportação de suas amêndoas, mas também no aproveitamento das mesmas para a produção de chocolate em suas próprias fazendas, dada a recente popularização de tipos de chocolate com uma proposta diferenciada, como os orgânicos e os *gourmet*. Dessa forma, aprender a manejar o fruto de forma mais cuidadosa em todas as etapas de produção é crucial; o controle de processos sabidamente críticos na formação de compostos que influenciam diretamente no *flavour* do produto final é decisivo para a qualidade do mesmo, e sua conseqüente valorização econômica. É nesse contexto que o estudo das enzimas Invertase e Polifenoloxidase (PPO) durante a fermentação do cacau se mostra importante, pois estas são determinantes, através da liberação de açúcares redutores e de reações oxidativas, na formação de um produto final agradável e capaz de dar novo fôlego econômico a uma região que ainda luta para resgatar sua autonomia.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade das enzimas Invertase e PPO nos cultivares PH 16 e TSH 1188, produzidos no sul da Bahia, em cinco tempos distintos da fermentação, baseado nas condições ótimas de atividade previamente estabelecidas no tempo zero (antes do início da fermentação), visando contribuir com futuro fornecimento de subsídios para possíveis intervenções tecnológicas que possam contribuir para melhoria da qualidade da matéria-prima na produção de chocolates monovarietais, que possuem maior valor agregado.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar o processo de fermentação dos cultivares de cacau através da medida do pH e temperatura;
- Extrair, purificar parcialmente e determinar a atividade da invertase e suas isoenzimas em dois cultivares de cacau, na polpa e na semente em cinco diferentes tempos de fermentação;
- Extrair, purificar parcialmente e determinar a atividade da polifenoloxidase (PPO) em dois cultivares de cacau, na polpa e na semente em cinco diferentes tempos de fermentação;
- Comparar o comportamento das invertases na polpa e na semente em dois cultivares de cacau em diferentes tempos de fermentação;



- Comparar o comportamento da polifenoloxidase (PPO) na polpa e na semente em dois cultivares de cacau em diferentes tempos de fermentação;
- Correlacionar os parâmetros de fermentação, temperatura e pH, com a atividade da enzima.

## **CAPÍTULO I**

---

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. CACAU

#### 1.1 Histórico

Com origem provável na bacia amazônica, o cacau (*Theobroma cacao* L.) já era cultivado por índios astecas e maias antes da chegada dos primeiros colonizadores espanhóis à América Central (SEAGRI, 2012). Sabe-se que, além de consumido (através de bebida amarga, apimentada e altamente energética, denominada “*tchocolath*”), suas sementes também eram comercializadas e utilizadas como forma de pagamento. Os astecas e outros grupos de língua *nahuatl* denominavam o cacauero de “*cacaohoaquahuitl*”, os frutos de “*cachocentli*” e suas sementes de “*cacaoatl*”, nome utilizado atualmente para a espécie. (LOPES et al, 2011). A primeira citação do cacau na literatura botânica data do início do século XVII, feita por Charles de L'Écluse que o descreveu com o nome de *Cacao fructus*, entretanto, Linneu o classificou como *Theobroma fructus* em 1737, e por fim foi modificado para *Theobroma cacao* L., denominação que permanece até os dias de hoje, a idéia do nome *Theobroma* significa “alimento dos deuses” (Figura 1.1), em referência a origem divina atribuída ao cacauero pelos povos mesoamericanos (EFRAIM, 2009).

**Figura 1.1.** Astecas oferecendo chocolate ao deus Vitzilipuztli



Fonte: Sousa, 2016.

As sementes de cacau eram consideradas muito valiosas pelos nativos da região que as usavam como “moeda”, sendo as unidades monetárias 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, 2013). Diz-se que um bom escravo podia ser trocado por 100 sementes (CEPLAC, 2014).

Em 1520, os primeiros carregamentos de cacau chegaram à Espanha; aos poucos, os próprios espanhóis diminuíram o sabor amargo adoçando-os com mel e açúcar, e a partir daí se espalhou por toda a Europa (FRANCO, 2001). Sendo assim, foi atribuída aos espanhóis a responsabilidade pela disseminação do cacau nos continentes da Europa e da África, vindo a se tornar uma importante fonte de divisas para diversos países (HERMÈ, 2006). Segundo Koblitz (2011), o chocolate só adquiriu o caráter de objeto de comercialização comum após a Revolução Industrial; antes disso, era consumido apenas pela nobreza. No século XIX, sua fabricação foi aperfeiçoada por holandeses e suíços.

À medida que o cacau ia ganhando importância econômica com a expansão do consumo de chocolate, várias tentativas foram feitas visando à implantação da lavoura cacauífera em outras regiões com condições de clima e solo semelhantes às do seu habitat natural. Em consequência, as suas sementes foram se disseminando gradualmente pelo mundo. Em meados do século XVIII, o cacau tinha atingido o sul da Bahia e, na segunda metade do século XIX, foi levado para a África. As primeiras plantações africanas foram feitas por volta de 1855, nas ilhas de São Tomé e Príncipe, colônias portuguesas ao largo da costa ocidental africana (CEPLAC, 2014).

## **1.2 Introdução do cacau na região sul da Bahia**

Oficialmente, o cultivo do cacau começou no Brasil em 1679, através da Carta Régia que autorizava os colonizadores a plantá-lo em suas terras. Várias tentativas feitas no Pará para concretizar essa diretriz fracassaram principalmente por causa da pobreza dos solos daquela região. Apesar disso por volta de 1780, o Pará

produzia mais de 100 arrobas de cacau. O cultivo, entretanto, não se estabeleceu naquele tempo e permaneceu como uma simples atividade extrativa até anos recentes (CEPLAC, 2014).

Em 1746, Antônio Dias Ribeiro recebeu algumas sementes de cacau do tipo *Forastero* do colonizador francês Luiz Frederico Warneau, oriundas do Pará, e as introduziu na Bahia. O primeiro plantio no estado foi feito na fazenda Cubículo, às margens do rio Pardo, no atual município de Canavieiras. Só em 1752 foram feitos plantios no município de Ilhéus. 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, sendo responsável, no seu auge, por cerca de 95% da produção do cacau brasileiro (GRAMACHO et al, 1992; SILVA NETO, 2001; SANCHES, 2006; EFRAIM, 2009; LOPES et al, 2011).

A partir de 1860, o cacau se tornou o objeto de desejo das fábricas de chocolate da Europa e dos EUA; praticamente toda a safra era exportada, pois não existia o costume de se consumir o fruto e seus derivados no Brasil. As primeiras manufaturas nacionais só apareceram na virada para o século XX, auge da cacauicultura. O Brasil ocupou o posto de maior produtor mundial até meados da década de 1920. No mesmo período, a região sul da Bahia assistiu a uma competição acirrada entre os fazendeiros em busca de terra (CEPLAC, 2015).

No início dos anos 1990, as fazendas de cacau foram alvo de uma praga chamada “vassoura-de-bruxa”, que destruiu plantações inteiras, levando os coronéis à falência. Causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (antes chamado de *Crinipellis perniciosa*), a vassoura-de-bruxa tem esse nome por deixar os ramos do cacau seco como uma vassoura velha. A doença foi descoberta em 1895, no Suriname, e já tinha demonstrado seu poder devastador ao atingir, em 1920, as lavouras de cacau do Equador. Quase 100 anos após o primeiro registro da doença, foi verificado um segundo ciclo de expansão do fungo, que atingiu o Panamá em 1978 e a Bahia, em 1989 (PEREIRA, 1996; PIRES, 2003), levando a uma queda brusca na produção.

### 1.3 Características do cacau

O cacauero é uma planta da família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L. (Figura 1.2). O interesse de cultivo desta espécie está no aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de cacau, de manteiga de cacau e de chocolate (ALVES, 2002). Das 22 espécies conhecidas do gênero *Theobroma*, o *Theobroma cacao* L. é uma das poucas utilizadas com fins econômicos (SODRÉ, 2007). Suas folhas são longas, nascem avermelhadas e logo ficam de um verde intenso, medindo até 30 cm; a flor do cacau tem cinco pétalas e é polinizada por pequenos insetos, ao longo de todo o ano (Figura 1.2). Entre a polinização e o amadurecimento do fruto decorrem cerca de 180 dias. Ele é uma árvore diplóide, propagada por sementes, típica dos trópicos úmidos, e normalmente é cultivada onde o clima apresenta pequenas variações durante o ano, principalmente na temperatura, radiação solar e comprimento do dia, possuindo normalmente duas fases de produção: temporão (março a agosto) e safra (setembro a fevereiro) (PEREIRA, 1990; SILVA NETO et al, 2001).

**Figura 1.2.** Cacaueiros com frutos (A) e flor de cacau (B).

**A.**



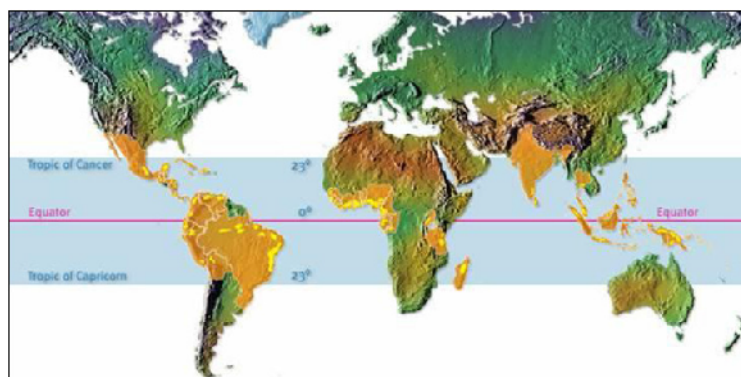
**B.**



Fonte: CEPLAC, 2015.

Tal espécime desenvolve-se em clima quente e úmido numa faixa geográfica compreendida entre os paralelos 20°N e 20°S (BATALHA, 2009). O cacau é normalmente cultivado nos trópicos, por pequenos agricultores em países do terceiro mundo (Figura 1.3).

**Figura 1.3.** Zona de cultivo do cacau ao redor do mundo (cor laranja)



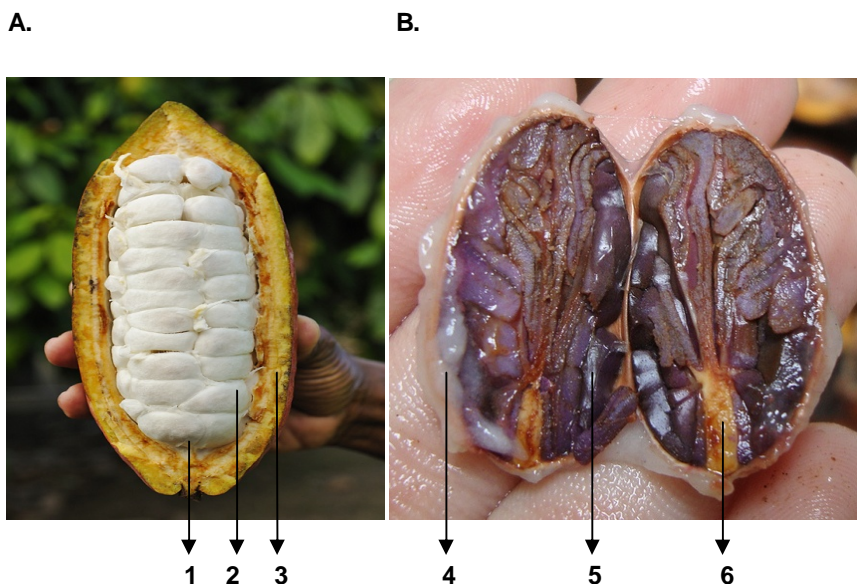
Fonte: Sainato et al (2004).

Para cultivo do cacau são necessárias chuvas regulares, temperatura média de 25°C e precipitação anual entre 1500 e 2000 mm. O solo deve ser profundo e fértil, sendo muito susceptível a pragas e fungos. Atinge entre 5 a 10 metros de altura, e os primeiros frutos são colhidos cerca de cinco anos após a plantação.

O fruto de um modo geral possui forma oval com 15 a 20 cm de comprimento do eixo maior (Figura 1.2); as amêndoas (gêrmen e cotilédone) são revestidas por uma película denominada testa e por uma polpa branca com tons rosados, mucilaginoso e adocicado (BECKETT, 1994; MARTINI, 2004; BATALHA, 2009). A polpa é constituída por um parênquima de células esponjosas mucilaginosas contendo água, frutose, glucose, sacarose, pentosanas, ácido cítrico, proteínas e vários sais inorgânicos. A testa secreta a mucilagem e atua como via de transporte entre os cotilédones e a polpa mucilaginoso. O cotilédone apresenta células contendo reservas protéicas, lipídeos, amido e células polifenólicas. As sementes apresentam um grande e único vacúolo preenchido por polifenóis responsáveis pela cor dos cotilédones (MARTINI, 2004). Este vacúolo é lisado durante a fermentação

(URBANSKI, 1992) (Figura 1.4). Quanto às proteínas, o principal destaque no cacau é para a fração globulina (VOIGT e BIEHL, 1995).

**Figura 1.4.** Corte longitudinal de um fruto de cacau (A): 1 – Placenta, 2 – Polpa mucilaginosa, 3 – Casca; Corte longitudinal de semente de cacau (B): 4 – Testa, 5 – Cotilédone, 6 – Embrião ou gérmen.



Fonte: CEPLAC, 2015.

O cacau possui importante valor nutricional, e sua composição química depende de diversos fatores, principalmente da espécie e origem das amêndoas, das práticas agrícolas e do grau de maturação dos frutos (ZOUMAS et al, 1980). A composição química média da amêndoa do cacau está apresentada na Tabela 1.1. Sua importância está associada tanto à indústria chocolateira, como àquelas que aproveitam seus sub-produtos; como a polpa de cacau, por exemplo, pode-se fazer suco, geléias, destilados finos, fermentados (vinho e vinagre), xaropes para confeito, néctares, sorvetes, doces e iogurtes (CEPLAC, 2015). Além disso, a indústria farmacêutica faz uso na preparação de pastas e extração de gorduras (manteiga de cacau), e ainda na exploração de compostos como flavonóides e alcalóides purínicos (AMORES e JIMÉNEZ, 2007; AMORES et al, 2009; AMORIM, 2011; ARAÚJO et al, 2014).



**Tabela 1.1.** Composição média das sementes do cacau (*Forastero*) do Oeste Africano.

CONSTITUINTES	PESO SECO (%)
Cotilédone	89,60
Testa	9,63
Embrião	0,77
Lipídeos	53,05
Umidade	3,65
Cinzas	2,63
Nitrogênio total	2,28
Nitrogênio protéico	1,50
Teobromina	1,71
Cafeína	0,085
Glicose	0,30
Sacarose	1,58
Amido	6,10
Pectina	2,25
Fibras	2,09
Pentosana	1,27
Polifenóis	7,54
Acético	0,014
Oxálico	0,29

Fonte: Afoakwa (2010).

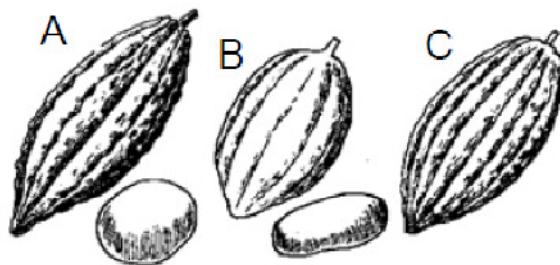
#### 1.4 Variedades de cacau

Inicialmente, três variedades se destacam: *Criollo*, *Forastero* e *Trinitário*. Os termos *Forastero* e *Criollo* foram aplicados, inicialmente, na Venezuela, para distinguir o material nativo (*Criollo*) de material introduzido (*Forastero*). A variedade *Criollo* se desenvolveu na América Central, já o *Forastero* evoluiu na região Amazônica, dispersou-se para o lado leste ao longo do Rio Amazonas, posteriormente cruzou os Andes, e chegou também a América Central e México. Os *Trinitários* representam uma categoria à parte e são considerados híbridos entre os

cacaueiros dos grupos *Criollos* e *Forasteros* Amazônicos, apresentando, portanto, características intermediárias (BASTOS, 1987; YOUNG, 1994); porém, evidências bioquímicas sugerem que o cacau *Trinitario* seja mais próximo do cacau *Criollo*. É considerado por muitos como um híbrido de alta qualidade (BATALHA, 2009).

Todos os tipos têm ampla variabilidade, sendo reconhecidos pelo conjunto geral de características (Figura 1.5). Há, no entanto, algumas distinções mais claras: os *Criollos* possuem sementes brancas ou de coloração rósea clara e frutos com casca vermelha ou verde, quando imaturos; *Forasteros* possuem sementes intensamente pigmentadas e frutos verdes, quando novos; e *Trinitários* são identificados pela associação de caracteres de ambos os tipos anteriores, com coloração de frutos e sementes variáveis (PIRES, 2003).

**Figura 1.5.** Variedades de cacau: *Criollo* e a semente oval (A), *Forastero* e a semente achatada (B), *Trinitário* (C).



Fonte: Souza, 2010.

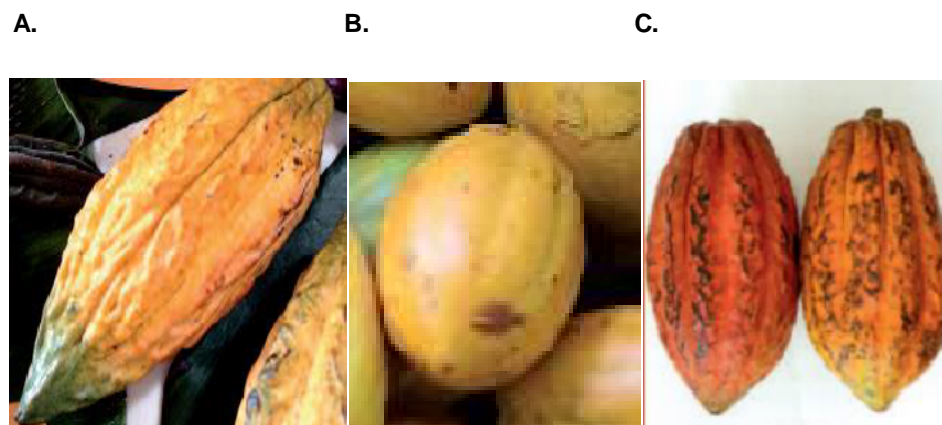
O *Criollo* (Figura 1.6 A) possui sementes de forma oval e normalmente solta na polpa, sua superfície externa é enrugada e possui cinco sulcos longitudinais profundos e cinco menos pronunciados, os cotilédones não contêm células pigmentadas, sendo, portanto, de coloração branca e sabor suave. Essa variedade é encontrada principalmente na Venezuela, América Central, Madagascar, Sri Lanka e Samoa (LAJUS, 1982; LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001; BECKETT, 2009).

O *Forastero* (Figura 1.6 B) foi introduzido na Bahia no século XVIII, e se destaca por ter, quando novos, sementes intensamente pigmentadas e frutos

verdes. Seus frutos são arredondados e sementes achatadas de forma quase triangular e se encontram firmemente alojadas à polpa. É considerado bem mais resistente a pragas. Nos frutos maduros, a placenta se encontra solta entre as sementes. Em comparação ao cacau *Criollo*, cujo aroma é considerado suave e de excelente qualidade, este tem um sabor mais ácido e característica adstringente. (LAJUS, 1982; BECKETT, 2009; SOUZA, 2010).

O *Trinitário* (Figura 1.6 C) é um híbrido das duas variedades anteriores, por isso apresenta características de ambos, como sabor frutal e suave característico do *Criollo* e resistência a pragas do *Forastero*, além de coloração variando entre banca e violeta-pálida. Essa designação ao *Trinitário* foi utilizada inicialmente para materiais provenientes de Trinidad. Os países produtores são essencialmente aqueles que cultivam o tipo *Criollo*: Trinidad, Venezuela, Sri Lanka, Indonésia e Camarões (PIRES, 2003; SOUZA, 2010).

**Figura 1.6.** Variedades de cacau: *Criollo* (A), *Forastero* (B) e *Trinitário* (C).



Fonte: Ferreura, 2013.

As primeiras seleções das variedades de cacau pelos agricultores na Bahia só aconteceram nas décadas de 1940 e 1950, quando houve liberação da prática

pelo ICB (Instituto do Cacau da Bahia), SIAL (Estação Instituto Agrônômico do Leste) e EEG (Estação Experimental de Goitacazes). Atualmente a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) voltou a sua atenção para os híbridos (LOPES et al, 2011); além de ser um fator importante para a sobrevivência da lavoura, o genótipo do cacau é um dos fatores determinantes na qualidade, sabor e intensidade do chocolate (AFOAKWA, 2010).

### **1.5 Produção de cacau no Brasil e no mundo**

De acordo com a Organização Internacional do Cacau (International Cocoa Organization – ICCO), os maiores produtores mundiais de cacau para o período de 2014/15 foram a Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Equador, Nigéria, Camarões e Brasil, respectivamente, demonstrando destaque para continente africano, responsável por cerca de 70% da produção mundial, estimada em 4.168 milhões de toneladas, como descrito na Tabela 1.2.

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).

**Tabela 1.2.** Produção mundial de cacau (toneladas) entre 2012 e 2015.

	<b>2012/13</b>	<b>Estimativa 2013/14</b>	<b>Previsão 2014/15</b>
<b>África</b>	2836	3197	2984
Camarões	225	211	220
Costa do Marfim	1449	1746	1740
Gana	835	897	696
Nigéria	238	248	235
Outros	89	95	93
<b>América</b>	622	708	729
Brasil	185	228	215
Equador	192	220	250
Outros	246	260	264
<b>Ásia e Oceania</b>	487	454	455
Indonésia	410	375	370
Papua Nova Guiné	41	40	42
Outros	36	38	43
<b>Total Mundial</b>	<b>3945</b>	<b>4359</b>	<b>4168</b>

Fonte: ICCO, 2015.

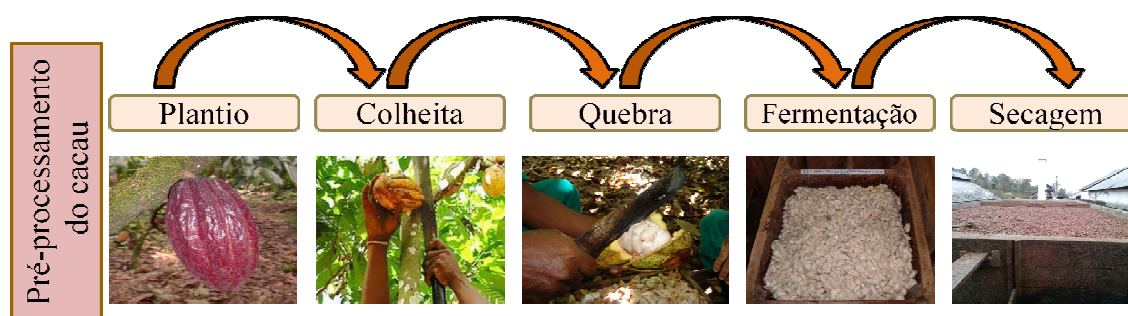
No Brasil a região Nordeste é a maior produtora, sendo o estado da Bahia o primeiro neste cenário. O sul da Bahia, em 2004, respondeu por 80% da produção nacional, com destaque principal para a região de Itabuna e Ilhéus (LOPES et al, 2011). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2015) em 2014 a produção baiana foi de 179.179 mil toneladas, resultado que além de reanimar o setor após muitos anos de baixa produção, põe a cacauicultura no eixo de estabilização da economia das regiões produtoras do Brasil.

## 2. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU

A qualidade dos grãos de cacau depende de muitos fatores como a variedade do cacauero, manejo agrônômico, fatores do solo, condições climáticas, e a

tecnologia pós-colheita. Desta forma, a qualidade dos grãos de cacau, sabor e aroma, dependerão das habilidades e bons cuidados tomados pelos técnicos responsáveis. Por causa disso, é necessária a avaliação dos parâmetros físicos, químicos e organolépticos que permitem determinar a qualidade em relação à variedade e ao meio ambiente (BRUNETTO et al, 2007). Na figura 1.7 está representado o fluxograma do pré-processamento do cacau.

**Figura 1.7.** Etapas de pré-processamento do cacau.



Fonte: Silveira, 2016.

## 2.1 Colheita e quebra dos frutos

O desenvolvimento do fruto, desde a fecundação até a maturação, demanda o tempo de cerca de seis meses. Na prática, a maturidade do fruto é reconhecida geralmente pela mudança da cor do mesmo. Por ocasião da colheita, é essencial colher apenas frutos maduros, pois somente estes possuem açúcar e outros substratos em quantidade adequada para uma boa fermentação (LOPES, 2000; CRUZ, 2002).

A época de colheita depende das condições climáticas de cada região. 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, chamado também de cacau “temporão” (CRUZ, 2002).

Os frutos são colhidos com o auxílio de podões e, após a colheita, devem ser quebrados e deles retiradas as sementes com a polpa aderida, que serão submetidas à fermentação. O período entre a colheita e a quebra não deve ultrapassar três dias, e entre a quebra e o início da fermentação não deve ser superior a 24 horas, para que não ocorram reações químicas indesejáveis (SERRA, 2004). Sementes provenientes de quebras em dias diferentes não devem ser fermentadas juntas, pois isso conduz a uma fermentação desigual (BECKETT, 1994). Além disso, deve-se ter cuidado para não causar nenhum corte nos frutos, pois desta forma o processo fermentativo será iniciado antes mesmo de serem colocados nos cochos, comprometendo a qualidade das amêndoas de cacau (MACEDO, 2014). Após a separação da casca, o material interno constituído de amêndoas e polpa (25% do fruto) é movido para a fermentação (OETTERER, 2006).

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).

## **2.2 Fermentação**

O processo de fermentação das sementes é essencial ao processamento, pois é responsável pelo desenvolvimento dos precursores e inúmeros compostos de sabor (SCHWAN, 1998). No processo de fermentação, o tipo de sistema, 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 são fatores de grande importância (ROHAM e CONNEL, 1964; LOPEZ e QUESNEL, 1973).

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 consequente liberação de amônia, levando a obtenção de um chocolate com odores e sabores estranhos (OETTERER, 2004).

Segundo Schwan e Wheals (2004) o processo de fermentação pode ser dividido em três fases:

- **Fase 1:** Ação das leveduras anaeróbicas: Nas primeiras 24-36h, as leveduras transformam o açúcar em álcool sob condições anaeróbicas em um pH abaixo de 4,0. A morte da semente geralmente ocorre no segundo dia, causada pela presença de ácido acético e álcool. É a partir deste momento que as sementes podem ser chamadas de amêndoas de cacau. Normalmente 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).
- **Fase 2:** Ação das bactérias lácticas: Estas estão presentes desde o início do fermentação, mas só se tornam dominantes entre 48 e 96h. 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 da semente.
- **Fase 3:** Ação das bactérias acéticas: responsáveis pela conversão do álcool em ácido acético com o auxílio das bactérias acéticas que 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.



Segundo Beckett (2009) o desenvolvimento dos precursores do sabor 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). Uma amêndoa de cacau bem fermentada apresenta cotilédones de coloração marrom. Quando há mistura de coloração marrom com violeta, roxo ou púrpura, a amêndoa é classificada como parcialmente fermentada. Caso esta apresente coloração de violeta a púrpura, em grande parte de sua extensão, é considerada como mal fermentada (COHEN e JACKIX, 2004).

A fermentação é um procedimento importante para reduzir a acidez, adstringência e amargor em sementes de cacau. É também um passo fundamental na formação de açúcares redutores e aminoácidos, que são os precursores da reação de Maillard durante a torração (HUANG e BARRINGER, 2010).

### **2.3 Secagem e armazenamento**

A secagem deve ser iniciada imediatamente após a fermentação. Não deve ser lenta ou mal conduzida para que não possibilite o desenvolvimento de fungos que, quando presentes, conferem sabor desagradável ao produto final. Por outro lado, a secagem não deve ser efetuada de forma demasiadamente rápida através do emprego de temperaturas elevadas, para evitar problemas com a gordura (manteiga de cacau) e com o desenvolvimento do sabor do chocolate (EFRAIM, 2004).

Para a secagem do cacau utilizam-se duas técnicas: a secagem natural e a secagem artificial. A natural ou secagem ao sol é uma operação simples e muito utilizada, é realizada em barcaças (espécies de bandeja de madeira fixas com teto móvel) ou bações (bandejas móveis com teto fixo). Quando a colheita coincide com um período chuvoso, ou quando o espaço disponível nas barcaças não é suficiente para comportar o volume da produção, a secagem é realizada em secadores especiais, através do calor da queima de madeira ou outro combustível, ou ainda através de coletores solares (CRUZ, 2002).

Considera-se como fator essencial, durante a secagem, a velocidade de remoção da água. Uma secagem rápida acarreta perda de umidade na superfície da amêndoa, deixando o interior úmido, o que deprecia o produto, e proporciona condições de aparecimento de fungos internos, produzindo manchas brancas, durante o período de armazenamento. Apenas 3% de amêndoas contaminadas já proporcionam sabor desagradável ao *liquor* ou massa de cacau, impossível de ser eliminado em processos posteriores. Além disso, ocorre o endurecimento com eventual ruptura da testa. No caso da secagem excessiva, ocorre perda de peso, tornando as sementes quebradiças (SOARES, 2001; EFRAIM et al, 2006).

Além da eliminação da água, a secagem do cacau dá continuidade às mudanças bioquímicas, iniciadas na fermentação, que vão contribuir para o sabor e aroma característico do chocolate. A secagem é também responsável pela redução da acidez das amêndoas e deve ser conduzida de tal maneira a se obter um teor de umidade em torno de 7%. Secagem excessiva torna a casca quebradiça, enquanto que excesso de umidade favorece o desenvolvimento de fungos (LOPES, 2000).

Após esse processo, 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 microrganismos indesejáveis (BECKETT, 1994).

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%) (OETTERER, 2006). Segundo Serra (2004) as instalações destinadas ao armazenamento de cacau devem possuir luminosidade e aeração adequadas, minimizando os possíveis interferentes negativos na qualidade dos produtos.

### 3. ENZIMAS

#### 3.1 Características gerais

As enzimas são biocatalisadores de um vasto repertório de reações químicas, sendo a principal ferramenta empregada na síntese e quebra de moléculas essenciais ao crescimento de todos os organismos (HOLLIDAY; MITCHELL; THORNTON, 2009). 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). Entretanto, a ação enzimática pode ser alterada de acordo com o pH, temperatura, concentração do substrato e pela presença de inibidores (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

Devido a sua especificidade e seletividade de atuação sobre substratos quando comparada a catalisadores químicos (VOET e VOET, 2006), enzimas vêm sendo utilizadas em processos biotecnológicos e industriais apresentando grande participação no comércio mundial (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

A atividade biológica da enzima se dá no sítio ativo, local constituído pela interação de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica. Apresentando três propriedades essenciais: estabilidade, atividade e especificidade (BAILEY e OLIS, 1986; BLANCH e CLARK, 1997; GALVÃO, 2004):

- Atividade: a enzima age de forma a reduzir a energia necessária para transformar um substrato em produto, aumentando a velocidade da reação.
- Especificidade: é a afinidade da enzima por grupos específicos em um determinado substrato. Duas características principais de suas estruturas são determinantes quanto a sua especificidade: O substrato tem ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se juntam à enzima,

permitindo seu perfeito alinhamento no sítio ativo para que a reação possa ocorrer.

- Estabilidade: é a dependência de uma enzima por sua estrutura nativa, que é mantida por meio de pontes de hidrogênio, ligações de sulfeto, forças de *Van der Waals*, interações apolares e iônicas.

Tortora et al (2005) afirma que a atividade catalítica da enzima é sempre destruída quando ela é corrompida em seus aminoácidos componentes. Assim, as estruturas protéicas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das enzimas são efetivas para a função de atividade catalítica (LEHNINGER, 1995). O local onde os substratos se ligam para que as reações se processem, o sítio ativo, é constituído pela interação de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica, sendo o responsável pela atividade biológica da enzima, ou seja, é no sítio ativo que ocorre a reação catalítica (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

### **3.2 Atividade enzimática 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. A confiabilidade e comparação das atividades das enzimas do cacau são complicadas, devido a variações causadas por diferentes genótipos, a origem geográfica, métodos de fermentação utilizados e tipos de cochos empregados (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). A ação de enzimas sobre os carboidratos, proteínas e polifenóis, aliados a ação de microrganismos presentes na polpa, são os precursores do aroma e sabor do cacau. Diferente de outras matérias-primas fermentadas, as enzimas endógenas desempenham um papel crucial nesse desenvolvimento (LEHRIAN e PATTERSON, 1983). A fermentação e conseqüentemente a morte das sementes facilitam a atuação da enzima, principalmente pelo acesso ao substrato. Entretanto, embora a ação das enzimas endógenas durante a fermentação do cacau tenha sido evidenciado há muitos anos, existe ainda a falta de estudos sistemáticos abordando o comportamento entre diferentes cultivares de cacau (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

Na tabela 1.3 estão relacionadas as principais enzimas que catalisam reações que ocorrem durante a fermentação das sementes de cacau, seu principal substrato e suas condições ideais de atuação (LOPEZ e DIMICK, 1991).

**Tabela 1.3.** Principais enzimas que atuam na fermentação do 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 $\beta$ -galactosidase	Glicosídeos, 3- $\beta$ -galactosidilcianidina e 3- $\alpha$ -arabinosidilcianidina	Semente e cotilédone	Cianidina e açúcares	45	3,8 – 4,5

Fonte: Lopez, 1986.

As enzimas exibem diferentes estabilidades durante o processo de fermentação, principalmente no que se refere à inativação. Esta é causada pelo calor gerado durante o processo, pela formação de ácidos e presença de polifenóis, portanto o período real da acessibilidade e atuação das enzimas aos substratos é curto (HANSEN et al, 2000).

Estudos extensivos vêm sendo realizados na tentativa de determinar a influência de fatores externos sobre o processo de fermentação e para aprimorar práticas tradicionais, com o intuito de alcançar produtos finais de melhor qualidade (SCHWAN, 1998; NIELSEN et al, 2007; CAMU et al, 2007, 2008). Apesar de já se ter conhecimento sobre trabalhos que foram realizados com genótipos de cacauzeiros e verificado a sua influência nas características físicas, físico-químicas e sensoriais, ainda não há uma conclusão sólida e generalizada sobre a real influência de genótipos no sabor do chocolate (BUCHELI et al, 2000).

### 3.3 Invertase

A invertase (ou  $\beta$ -D-frutofuranosidase) é a principal enzima utilizada na indústria alimentícia para a hidrólise da sacarose, visando especialmente a obtenção de xarope de açúcar invertido. Comumente encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Sacharomyces cerevisiae*, invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (VITOLLO, 2004), apresenta-se em duas formas e pode estar localizada entre a membrana plasmática e a parede celular ou desprovida de carboidratos e localizada no citoplasma (ISIK et al, 2003). Capaz de atuar no terminal não redutor do resíduo  $\beta$ -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos, também catalisa reações de transferência com outros aceptores além da água, resultando na formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (DAVID et al, 2006). O mecanismo de ação da invertase não é totalmente conhecido, mas estudos sugerem que há um envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica desta enzima (MARQUEZ, 2007).

Na fermentação do cacau, são responsáveis pela liberação de açúcares redutores indispensáveis à formação do sabor durante a torração (HANSEN et al, 1998; LOPEZ e DIMICK, 1991). As invertases são, usualmente, classificadas de acordo com seu pH e localização celular: uma invertase ácida com atividade máxima em pH 5,5, e outra neutra, com um máximo de atividade em pH 7,0 (HUSSAIN et al, 2008). Sua atividade pode ser medida seguindo-se vários caminhos: polarimetricamente, seguindo-se as mudanças na rotação ótica; determinação da presença de açúcares redutores; ou estimando-se a concentração de glicose resultante da hidrólise pelo uso de glicose oxidase (MARQUEZ, 2007).

A indústria alimentícia é hoje uma das principais beneficiárias das enzimas, que podem tornar os alimentos mais saborosos, nutritivos, digestivos e até mais bonitos, especialmente os produtos de confeitaria e panificação, que têm seu brilho e cor aumentados a partir da introdução do açúcar invertido na composição. Segundo Coelho et al (2008), o interesse no uso de enzimas para o processamento de alimentos se deve a diversos fatores, entre eles a especificidade de ação, ação rápida e eficiente em baixas concentrações, atividade em condições brandas de pH,

temperatura e pressão, fácil controle da reação e pequena toxicidade. Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, o uso de células microbianas como fonte de enzimas foi largamente implementado em escala industrial, permitindo não só o aumento na produção de enzimas já obtidas por outros processos, mas também a produção de novas enzimas de interesse comercial.

### **3.4 Polifenoloxidase (PPO)**

A PPO está presente em um grande grupo de frutas e vegetais (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981), e faz parte de um grande número de enzimas conhecidas como oxirredutases, podendo promover uma variedade de reações. Amplamente distribuída na natureza, é responsável pela oxidação de compostos fenólicos na presença de oxigênio, transformando-os em quinonas coloridas que participam, posteriormente, das reações de polimerização para dar origem às melonoidinas, caracterizadas pelo aparecimento da coloração marrom-escura (ROELOFSEN, 1958; VÁMOS -VIGYÁZÓ, 1981; WONG, et al, 1990).

Desde a sua descoberta no século passado, o PPO tem sido objeto de extensas pesquisas científicas. Com isso, considerável importância tem sido acumulada sobre as suas propriedades moleculares e catalíticas, como também sobre o papel que exercem no ciclo da vida das plantas e, em alguns casos, na tecnologia de alimentos (VÁMOS -VIGYÁZÓ, 1981; ROBINSON, 1987, 1991), uma vez que a continuidade da atividade enzimática pode ocasionar mudança na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e até modificações na textura (CLEMENTE, 1998; EVANGELISTA, 2001; VALDERRAMA et al, 2001; LAURENTE, 2005).

A atividade das enzimas oxidativas é desencadeada quando a integridade da célula é rompida. Nesta ocasião, os substratos fenólicos, de localização vacuolar, entram em contato com as enzimas catalisadoras das reações de oxidação de polifenóis. O processo oxidativo ocorre quando os substratos fenólicos, as enzimas, o íon metálico e o oxigênio se encontram em condições ideais de pH, temperatura e

atividade de água (VITTI, 2007). A oxidação de fenóis se dá em função da captura de elétrons por dois átomos de cobre que se encontram no sítio ativo da enzima, havendo o consumo de oxigênio durante o processo; a PPO contém cobre no centro ativo e catalisa dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio (MAZZAFERA et al, 2002).

Durante a fermentação e a secagem das amêndoas de cacau, um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento dos precursores do sabor, começando na fase oxidativa da fermentação e continuando na secagem, é a presença da PPO (ROELOFSEN, 1958; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; WONG, et al, 1990), embora seu papel na produção do sabor característico de chocolate não esteja bem compreendido.



## REFERÊNCIAS

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

ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso* (STAHÉL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba.** 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, 2002.

AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. **Aspectos de la calidad de cacao**. Quevedo, Equador: INIAP (Estación Experimental Tropical Pichilingue), 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**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), 2011.

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

BAILEY, J. E. e OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2 ed. New York. 1986.

BASTOS, E. **Cacau, a riqueza agrícola da América**. São Paulo: Ícone, 1987.

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

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

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.

- 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.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BUCHELI, P. et al. **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.; WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, L.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; 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. **Applied and Environmental Microbiology**. Qashington, v 73, n 6, p 1809 – 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 the Science of Food and Agriculture**, 88, 2288 e 2297. 2008.
- COE, S. D.; COE, M. D. **The true history of chocolate**. 3 ed. New York: Thames & Hudson, 2013.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.
- 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**. v 7, n 1, p 57-67. 2004.
- CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Cacau: história e evolução**. 2014. Disponível em: <[http://www.ceplac.gov.br/radar/radar\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm)>. Acesso em: 20 jul 2015.
- CEPLAC – **Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacacueira**. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/>>. Acesso em: 20 ago 2015.
- CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, v 49, n 1, p 29-36, 1998.
- CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. Campinas. 101p.

Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2002.

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 5, p 867 – 875. 2007.

DAVID, A. E.; WANG, N. S.; YANG, V. C.; YANG, A. J. Chemically surfaced modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 395-407, 2006.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas. 2004.

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

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**. 226p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2009.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

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**. 2 ed. Ed Artmed, p 183-205, 602. 2006.

FERREURA, A. C. R. et al. **Guia de Beneficiamento de cacau de qualidade**. Instituto Cabruca, 2013.

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

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

GRAMACHO, I. C. P. et al. **Cultivo e Beneficiamento do Cacau na Bahia**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. CEPLAC. Ilhéus: 1992.

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, p 273-81. 1998.

HANSEN, C, E; ÄEZ, A, M; BURRI, C; BOUSBAINÉ, A. Comparison of enzyme activities involved in flavour precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v 80, p. 1193-119. 2000.

HERMÉ, P. **Larousse do chocolate**. São Paulo: Larousse, 2006.

HOLLIDAY, G. L.; MITCHELL, J. B.; THORNTON, J. M. Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v 390, p 560–577. 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.

HUSSAIN, A.; RASHID, M.; PERVEEN, R.; ASHRAF, M. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane. **Plant Physiology et Biochemistry**, 2008.

ICCO – International Cocoa Organization. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, v 41, n 2. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html)>. Acesso em: 04 set 2015. 2015.

ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE L.; CIANGA, I.; YAĞCI, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. **European Polymer Journal**, v. 39, p. 2375-2381, 2003.

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

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

LAURENTE, C.; CLEMENTE, E. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia avertroa*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum**, v 27, n 1, p 159-163. 2005.

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

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

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

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

LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V. C. Volatil e 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.

LOPEZ, A. P.; DIMICK, P. S. Enzymes involved in cocoa. cap 25. p 211-236. In: **Food Enzymology**. v 2. Elsevier Applied Science. 1991.

MACÊDO, A. S. L. **Caracterização de enzimas em dois cultivares de cacau *Theobroma cacao* L.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Salvador: 2014.

MARQUEZ, L. D. S. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas. 124p. Dissertação (Mestrado). Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

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

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)**. Campinas. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2001.

MAZZAFERA, P. et al. Extração e dosagem da atividade da polifenoloxidase do café. **Sci. agric**, v 59, p 695-700. 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. **Journal of Food Microbiology**. 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: <[www.esalq.usp.br/departamento/lan/pdf/cacau%20chocolate.pdf](http://www.esalq.usp.br/departamento/lan/pdf/cacau%20chocolate.pdf)>. Acesso em: ago 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.

PEREIRA, J. L. et al. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growings region of Brazil. **Tropical Agriculture**. v 67, n 2, p.188-189. 1990.

PEREIRA, J. L. Renewed advance of witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In: **Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference**. Salvador: Cocoa Producer's Alliance, p 287-292. 1996.

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

ROBINSON, D. S. **Food Biochemistry & Nutritional Value**, Longman Scientific & Technical, Essex, 1987.

ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. Oxidative Enzymes in Foods. **Elsevier Applied Science**. cap 1, p 1-47; cap 6, p 217-273. 1991.

ROHAN, T. A.; CONNELL, M. The precursors of chocolate aroma: a study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of Food Science**, v 29, n 4, p 460-463. 1964.

ROELOFSEN, P. A. Fermentation drying and storage of cocoa beans. **Advances in Food Research**, San Diego, p 226-229. 1958.

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**. v 4, 23 p. 2004.

SANCHES, C. L. G. **Murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis cacaofunesta*) no sul da bahia: metodologia para seleção de genótipos de cacau resistentes e estudos preliminares descritivos do patógeno**. Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA. 2006.

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, v 4, n 44, p 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 de maio de 2015. 2012.

SERRA, W. S. **Manual do Cacaicultor**: com perguntas e respostas. p 177-207, 2004.

SILVA NETO, P. J. **Sistema de Produção de cacau para a Amazônia brasileira**. CEPLAC. Belém: 2001.

SILVEIRA, P. T. S. **Caracterização das proteases e determinação da atividade de suas isoenzimas em dois cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no sul da Bahia, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Salvador: 2016.

SOARES, M. S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através da ação enzimática durante a fermentação**. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2001.

SODRÉ, G. A. A espécie *Theobroma cacao*: novas perspectivas para a multiplicação de cacauzeiro. Jaboticabal: **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2007.

SOUSA, R. G. Astecas - Religião, culinária e cultura. **Brasil Escola**. Disponível em <<http://brasilescola.uol.com.br/historia-da-america/astecas3.htm>>. Acesso em 18 de abril de 2016. 2016.

SOUZA, A. S. L. **Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Metabolismo microbiano**. In: Microbiologia. 8.ed. Porto Alegre: Artmed. cap 5, p 111-121. 2005.

URBANSKI, J. J. Chocolate flavor/origins and descriptions. The effects of process and bean source. **The Manufacturing Confectioner**, v. 72, p.69-82. 1992.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F., CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v 21, n 3, p 321-325, 2001.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruit and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n 49,1981.

VITOLO, M. In: SAID, S., PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Legis Suma, 2004.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3 ed. Artmed. São Paulo, 2006.

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.

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 jul 2015. 2014.

WONG, M. K.; DIMICK, P. S.; HAMMERSTEDT, R. H. Extraction and high performance liquid chromatographic enrichment of polyphenol oxidase from *Theobroma cacao* seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v 55, n 4, p 1108-1111. 1990.

YANES, M. G. **El cacao: origen, cultivo e industrialización en Tabasco**. Tabasco, México: Centro de Investigación de Ciencias Agropecuarias. p 11. 1994.

YOUNG, A. M. The Chocolate Tree. **A natural history of cacao**. Smithsonian Institution Press. 200p. 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.

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.



## **CAPÍTULO II**

---

**ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE O USO  
DA ENZIMA INVERTASE NA INDÚSTRIA  
ALIMENTÍCIA SOB O ENFOQUE EM  
PEDIDOS DE PATENTES DEPOSITADOS  
NO MUNDO ENTRE 1945 E 2014**

**ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE O USO DA ENZIMA INVERTASE NA  
INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA SOB O ENFOQUE EM PEDIDOS DE PATENTES  
DEPOSITADOS NO MUNDO ENTRE 1945 E 2014**

Adriana Barros de Cerqueira e Silva<sup>1</sup>; Sérgio Eduardo Soares<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia – UFBA – Salvador/BA – Brasil  
adrianabarro\_ufba@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia – UFBA – Salvador/BA – Brasil  
ssoares.ssa@hotmail.com

## **RESUMO**

A invertase é a principal enzima utilizada na indústria alimentícia para a hidrólise da sacarose, visando especialmente a obtenção de xarope de açúcar invertido. Tal açúcar é amplamente utilizado na indústria de confeitos, na panificação, na formulação de cremes para recheio e geléias, entre outros. A indústria alimentícia investe na adição de enzimas para o melhoramento sensorial de seus produtos devido à sua ação rápida e eficiente em baixas concentrações, atividade em condições brandas de pH, temperatura e pressão, fácil controle da reação e baixa toxicidade. Dessa forma, o presente estudo prospectivo tem por objetivo identificar patentes depositadas nas bases de dados on line do escritório europeu Espacenet (EP), com o intuito de mensurar as técnicas mais utilizadas para aplicação da enzima invertase na indústria de alimentos, a fim de se avaliar a dinâmica das reais condições do processo e/ou planejar intervenções tecnológicas que contribuam para uma maior qualidade dos produtos finais.

**Palavras-chave:** enzima, aplicação industrial,  $\beta$ -frutofuranosidase

## **ABSTRACT**

The invertase is the main enzyme used in the food industry for the hydrolysis of sucrose, especially to obtaining invert sugar syrup. This sugar is widely used in the candies industry, bakery, in the formulation of creams for filling, jellies, etc. The food industry invests in addition of enzymes for improvement of their products because of its fast and efficient action in low concentrations, activity in mild conditions of pH, temperature and pressure, easy control of the reaction and low toxicity. Thus, the present prospective study aims to identify patents registered in the databases online from European Patents Office Espacenet (EP) in order to measure the most used techniques for application of the enzyme invertase in the food industry, in order to evaluate the dynamics of the actual process conditions and / or planning technological interventions that contribute to a higher quality of final products.

**Key words:** enzyme, industrial application,  $\beta$ -fructofuranosidase

## 1. INTRODUÇÃO

A invertase (ou  $\beta$ -D-frutofuranosidase) é a principal enzima utilizada na indústria alimentícia para a hidrólise da sacarose, visando especialmente a obtenção de xarope de açúcar invertido. Comumente encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Sacharomyces cerevisiae*, invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (VITOLLO, 2004), apresenta-se em duas formas e pode estar localizada entre a membrana plasmática e a parede celular ou desprovida de carboidratos e localizada no citoplasma (ISIK et al., 2003).

Capaz de atuar no terminal não redutor do resíduo  $\beta$ -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos, também catalisa reações de transferência com outros aceptores além da água, resultando na formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (DAVID et al., 2006).

A indústria alimentícia é hoje uma das principais beneficiárias das enzimas, que podem tornar os alimentos mais saborosos, nutritivos, digestivos e até mais bonitos. Segundo Coelho et al (2008), o interesse no uso de enzimas para o processamento de alimentos se deve a diversos fatores, entre eles a especificidade de ação, ação rápida e eficiente em baixas concentrações, atividade em condições brandas de pH, temperatura e pressão, fácil controle da reação e pequena toxicidade. Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, o uso de células microbianas como fonte de enzimas foi largamente implementado em escala industrial, permitindo não só o aumento na produção de enzimas já obtidas por outros processos, mas também a produção de novas enzimas de interesse comercial.

Dessa forma, o presente estudo prospectivo tem por objetivo identificar patentes depositadas nas bases de dados *on line* do escritório europeu *Espacenet* (EP), com o intuito de rastrear as técnicas mais utilizadas para aplicação da enzima invertase na indústria de alimentos, a fim de se avaliar a dinâmica das reais condições de uso da mesma.

## 2. DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA

Em processos industriais, a invertase ou  $\beta$ -D-frutofuranosidase é usada para obtenção do xarope de açúcar invertido. O açúcar invertido (xarope de glicose e frutose) é amplamente utilizado na indústria de confeitos, na panificação, na formulação de cremes para recheio e de geléias. O uso da invertase está principalmente relacionado à indústria alimentícia, tanto na fabricação do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) quanto com a formação dos frutooligosacarídeos (SAID e PIETRO, 2004). Os processos enzimáticos industriais empregam as enzimas nas formas livres ou imobilizadas. A hidrólise de sacarose catalisada por ambas as formas produz um xarope de alta qualidade, com baixas concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e sem desenvolvimento de cor (CHEN et al., 2000; ALMEIDA et al., 2005), o que garante um produto com maior valor comercial.

Após a hidrólise da sacarose, é produzida uma solução equimolar dos monossacarídeos constituintes, e que tem como característica marcante ser mais doce que a própria sacarose, devido à frutose (UHLIG, 1998). O açúcar invertido é de grande aplicação nas indústrias de alimentos e bebidas, mas também pode ser utilizado diretamente como adoçante de mesa. Praticamente todo açúcar invertido é produzido por hidrólise ácida, que necessita de neutralização, forma resíduos tóxicos e necessita de altas temperaturas. A hidrólise enzimática, por sua vez, não gera resíduos, não necessita de altas temperaturas e ainda tem a vantagem de uma taxa de conversão maior que a ácida devido à especificidade da enzima pela sacarose (GOULART et al., 2003).

A utilização de açúcar invertido é vantajosa em relação à sacarose diluída pelas suas características próprias: estável em altas concentrações (alta solubilidade); baixa atividade de água, cor e turbidez; maior doçura relativa; maior *shelfie life* e maciez devido a uma melhor distribuição da umidade; inibição da cristalização (higroscopicidade); redução do ponto de congelamento e menor custo de frete por ocupar menor volume (BERTO, 2001).

### 3. METODOLOGIA

Para o levantamento da tecnologia do uso da enzima invertase na indústria alimentícia protegida na forma de documentos de patentes, foi elaborada uma estratégia de busca que combinou os campos da Classificação Internacional de Patentes (ICP), nas quais os documentos relativos a esta tecnologia estão classificados e associados a um conjunto de palavras-chave. A pesquisa foi realizada nas bases de dados *on line* do escritório europeu *Espacenet* (EP), visto que abrange patentes depositadas e publicadas em mais de 90 países, incluindo os pedidos de patentes depositadas no Brasil (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI), norte americanos (*United States Patent and Trademark Office* - USPTO) e via *Patent Cooperation Treaty* (PCT). Com objetivo de refinar o tema da pesquisa, foram analisados para o estudo os documentos relacionados com as palavras chaves invertase\* and food\* e os códigos (A23L), (A23L1/30), (A23L1/09) e (A23L1/236), limitando o tipo de tecnologia aplicada para a indústria alimentícia.

O estudo prospectivo foi elaborado por meio de coleta, tratamento e análise das informações contidas nos documentos de patentes selecionados, sendo escolhidos aqueles alusivos às referências de tecnologia protegida (métodos), bem como tecnologias correlatas (equipamentos). Vale destacar que o termo documento de patente pode abranger pedidos de patente publicados ou patentes concedidas.

A interpretação de dados a partir das informações obtidas da tecnologia patenteada sobre o uso da invertase na indústria alimentícia geraram gráficos que mostram os resultados da evolução anual de depósitos, a quantidade de patentes depositadas por códigos, os principais campos de aplicação dos documentos de patentes, o tipo de metodologia, países detentores da tecnologia, depositantes e aplicantes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa dos documentos de patentes foi realizada através da combinação de palavras-chave e códigos de Classificação Internacional de Patentes. Inicialmente, a pesquisa identificou 55 patentes na base europeia *Espacenet* selecionadas em dezembro de 2014; entretanto, os números encontrados não representam o total de invenções protegidas nesta área, devido à possibilidade de uma mesma patente poder ser depositada em diferentes países, com o objetivo de garantir o direito de exclusividade aos seus inventores nos mercados considerados como mais relevantes, uma vez que o referido direito é territorial.

Para as patentes selecionadas no portal *Espacenet*, realizou-se uma exclusão de quatro patentes cujo resumo evidenciado não possuía estudo de interesse e com o propósito desta prospecção. A Tabela 2.1 apresenta o número de patentes depositadas na base de dados europeia, *Espacenet* (EP).

**Tabela 2.1.** Busca de patentes por palavras-chave, agrupamento das palavras e códigos da classificação internacional de patentes na base de dados europeia (*Espacenet* – EP)

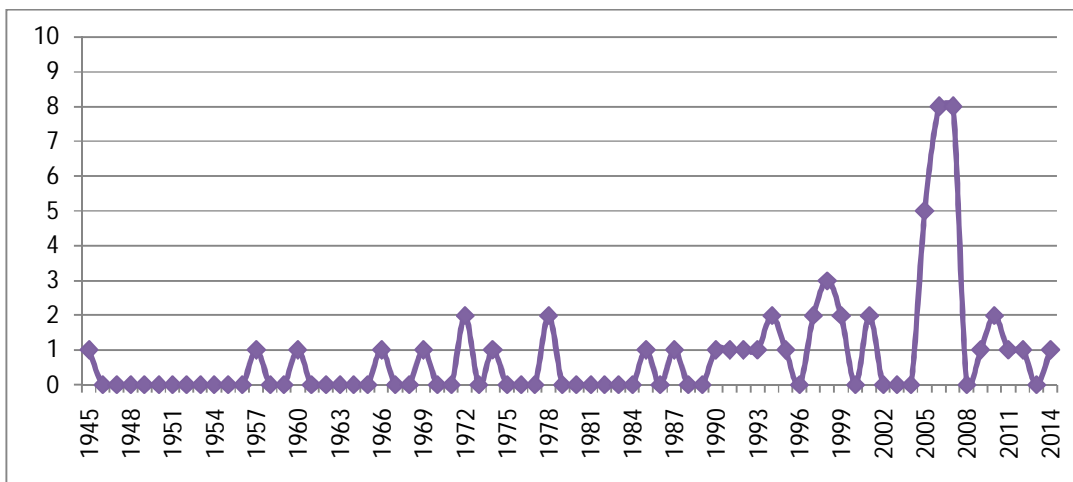
<b>Códigos e/ou Palavras-Chave</b>	<b>Número de Patentes Depositadas</b>
Invertase*	576
<b>Invertase* and food*</b>	<b>55</b>
Invertase* and industry*	14
Invertase* and A23L1/09	11
Invertase* and food* and industry*	9
Invertase* and A23L1/30	9
Invertase* and A23L1/236	4

### 4.1. Evolução anual do depósito de patentes

A evolução anual do depósito de patentes no *Espacenet* (Figura 2.1) evidencia que o primeiro depósito foi feito em 1945, seguido de doze anos sem a realização de novos depósitos. Nos anos subsequentes, menos quatro depósitos de

patentes por ano foram protegidas, podendo indicar pouco incentivo à pesquisa para aplicação e melhorias desta tecnologia. Destacam-se os anos de 2005, 2006 e 2007 com o maior número de depósitos, 5, 8 e 8 patentes respectivamente.

**Figura 2.1.** Evolução anual de depósitos de patentes relacionadas ao uso da enzima invertase na indústria alimentícia entre 1945 e 2014.



Entre os anos de 1994 e 2014, foram depositadas cerca de trinta e nove (70,9% do total) patentes de tecnologias e métodos aplicáveis ao uso da invertase na indústria alimentícia, provavelmente pelo incentivo recebido para pesquisadores das áreas como também pelo aumento da demanda por produtos de melhor qualidade e estímulo pela busca de melhores tecnologias que pudessem apresentar total aproveitamento da aplicabilidade enzimática industrial.

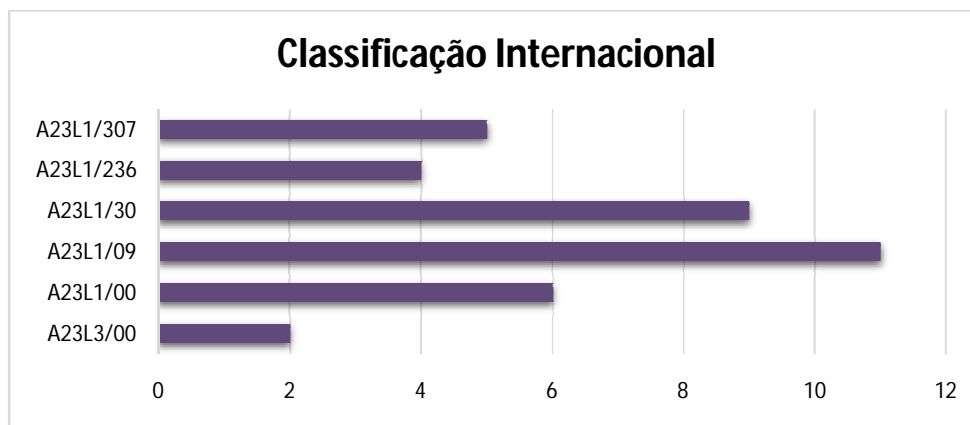
#### 4.2. Patentes por Código de Classificação Internacional

Inovações tecnológicas vêm sendo cada vez mais comuns, com o objetivo de atender às exigências dos consumidores e também como vantagem competitiva na indústria de um modo geral, especialmente na alimentícia. Neste sentido foi feita uma pesquisa com os códigos da classificação internacional de patentes na tentativa de buscar um maior número de documentos depositados (Figura 2.2). Observa-se a



maior presença de patentes que apresentam o código A23L1/09, que trata de xaropes contendo açúcares, hidratos de carbono, alcoóis de açúcar e hidrolisados de amido dextrina.

**Figura 2.2.** Distribuição das patentes relacionadas ao uso da invertase na indústria de alimentos por códigos da classificação internacional. A23L1/307: produtos dietéticos com valor nutricional reduzido; A23L1/236: agentes adoçantes artificiais; A23L1/30: alimentos ou gêneros alimentícios; sua preparação ou tratamento, contendo aditivos; A23L1/09: xaropes contendo açúcares, hidratos de carbono, alcoóis de açúcar e hidrolisados de amido dextrina; A23L1/00: alimento ou alimentos, sua preparação ou tratamento; A23L3/00: preservação de alimentos ou produtos alimentares, em geral, especialmente adaptados para alimentos ou produtos alimentares.

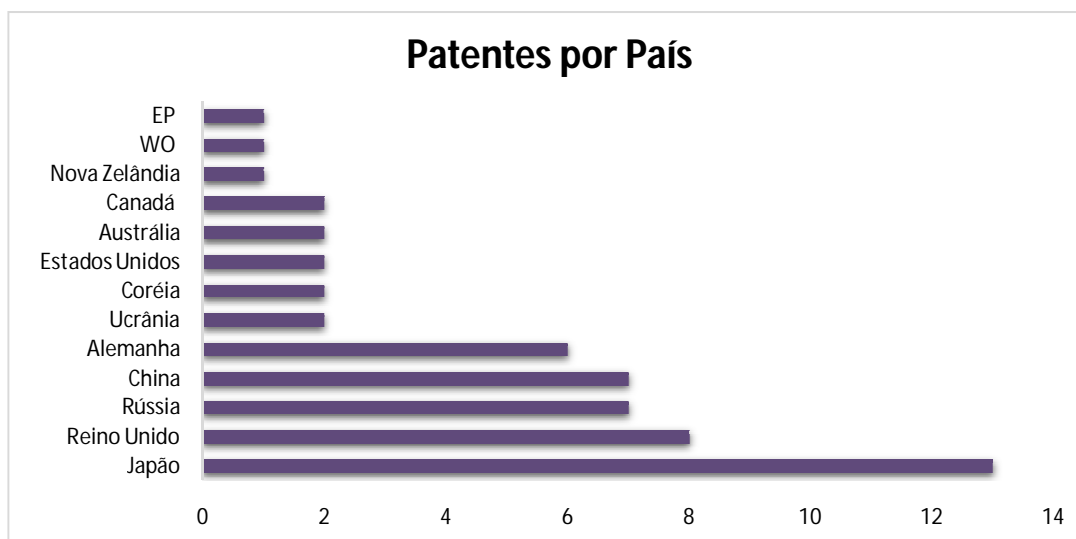


#### 4.3. Patentes depositadas por país

Em relação aos países de origem dos documentos depositados, a análise foi realizada a partir de pesquisa através da identificação do país de depósito da tecnologia patenteada. A pesquisa revelou que os métodos de aplicação da enzima invertase na indústria alimentícia encontram-se bastante centralizados nos países mais desenvolvidos, especialmente no Japão (detentor de 13 patentes). Reino Unido, Rússia, China e Alemanha sucedem com 08, 07, 07 e 06 patentes, respectivamente.

Não foi identificado nenhum depósito de patente no Brasil. Existe a possibilidade de haver patentes brasileiras relacionadas à investise em outras áreas de aplicação (indústria de medicamentos ou cosméticos, por exemplo); entretanto, sabe-se que, apesar dos avanços no âmbito da proteção intelectual, ainda existe uma falta de conhecimento da população em geral, mesmo dentro das universidades. Existe ainda uma carência de parcerias entre empresas, instituições de ensino e pesquisa e o próprio governo, capaz de desenvolver um sistema sólido e eficaz de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) no intuito de permitir o avanço da inovação do Brasil e de incentivar a proteção da propriedade intelectual. Abaixo, a figura 2.3 relaciona o número de documentos de patentes depositados por país de origem, ou seja, país de origem do depositante da patente.

**Figura 2.3.** Patentes depositadas na base europeia *Espacenet* classificadas por países no período estudado (1945-2014).

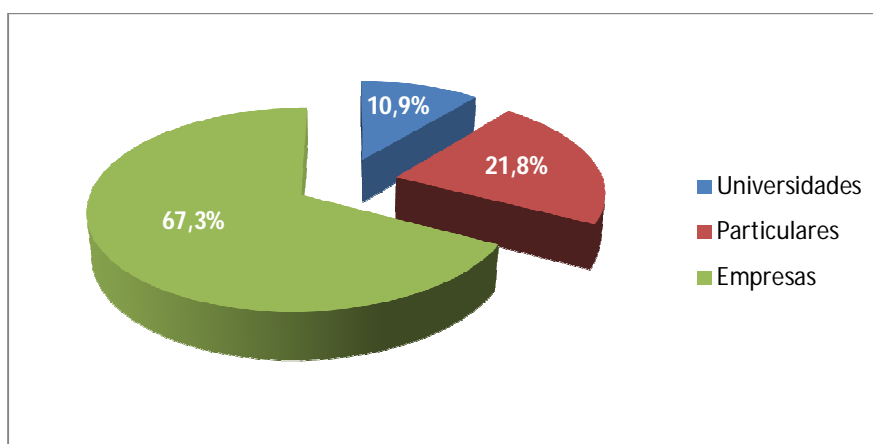


#### 4.4. Perfil dos depositantes

Na figura 2.4, destaca-se que 67,3% dos incentivos e patrocínios relacionados ao depósito de patentes provêm de empresas particulares, 21,8% de incentivos particulares de inventores independentes e apenas 10,9% de universidades e

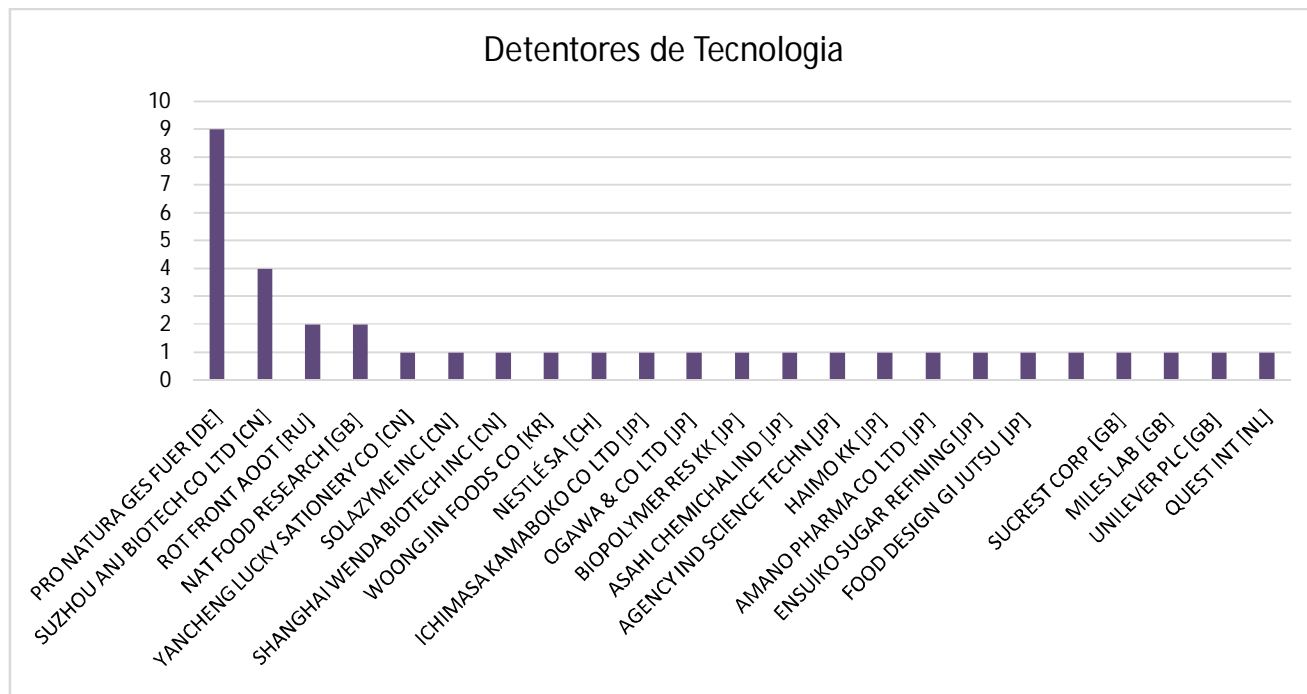
instituições de pesquisa. Esses dados indicam que as pesquisas científicas e tecnológicas desenvolvidas aconteceram devido ao fomento gerado pela competitividade das indústrias particulares, com absorção dos pesquisadores pelas referidas empresas e sem a proteção de universidades e/ou órgãos governamentais. Pode-se inferir, então, que grande parte destas instituições de formação técnico-científicas não protegem invenções com a finalidade de suas tecnologias serem transferidas e patenteadas para benefício coletivo.

**Figura 2.4.** Distribuição dos documentos de patentes relacionados por tipo de depositante



#### 4.5. Detentores da tecnologia

Na figura 2.5 estão representadas as empresas particulares detentoras da tecnologia do uso da invertase na indústria alimentícia.

**Figura 2.5.** Depósitos de patentes por empresas/indústrias particulares

De acordo com o exposto, percebe-se que a detentora do maior número de patentes é a alemã Pro Natura (9 patentes). Entretanto, este número é superado pela soma dos depósitos das empresas japonesas, deixando o Japão à frente da Alemanha em relação ao total de patentes por país, seguida pela China (7 patentes), Grã-Bretanha (5 patentes), Rússia (2 patentes), e Coréia do Sul, Suíça e Holanda (ambos com 1 patente).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do estudo prospectivo tecnológico, pôde-se constatar que houve uma quantidade considerável de depósitos de patentes entre os anos de 1994 e 2014 (70,9% do total) relacionadas à tecnologia e métodos de aplicação da enzima invertase na indústria alimentícia, provavelmente pelo incentivo recebido para pesquisadores das áreas. Destacam-se os anos de 2005, 2006 e 2007, com o maior número de patentes (cinco, oito e oito, respectivamente), o que pode ser explicado tanto pelo provável incentivo recebido para pesquisadores das áreas como também

pelo aumento da demanda por produtos de melhor qualidade e estímulo pela busca de melhores tecnologias que pudessem apresentar total aproveitamento da aplicabilidade enzimática industrial.

O Japão, Reino Unido, China, Rússia e Alemanha apresentam-se como países com maior investimento em relação ao uso da invertase na indústria de alimentos, muito provavelmente pelo nível de exigência dos consumidores e estilo de vida. Observa-se ainda que o perfil de inventores é, na sua maioria, formado por empresas/indústrias privadas (67,3%), evidenciando a absorção dos pesquisadores independentes por essas empresas e o pouco fomento aos centros de pesquisa.

No Brasil não foram detectadas patentes relacionadas ao tema abordado, podendo tal fato ser explicado pela aplicabilidade da invertase em outro foco que não a indústria alimentícia (indústria de medicamentos ou cosméticos, por exemplo), ou pela falta de conhecimento da população em geral, mesmo dentro das universidades, sobre a proteção da propriedade intelectual. Existe ainda uma carência de parcerias entre empresas, instituições de ensino e pesquisa e o próprio governo, capaz de desenvolver um sistema sólido e eficaz de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) no intuito de permitir o avanço da inovação do Brasil e de incentivar a proteção da propriedade intelectual, além de uma falta de maturidade do país em relação ao incentivo, tratamento e posterior proteção das inovações de modo geral.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; COSTA, A. M.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Process Biotechnology**, v. 8, 2005.

BERTO, D. Usineiros apostam no crescimento da demanda do açúcar líquido. **Engarrafador.**, v. 91, p. 26-31, 2001.

CHEN, Y.; KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Covalent immobilization of invertase into the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. **European Polymer Journal**, v. 36, p. 2095-2103, 2000.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.

DAVID, A. E.; WANG, N. S.; YANG, V. C.; YANG, A. J. Chemically surfaced modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 395-407, 2006.

GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Purificação parcial de invertase a partir de *Rhizopus sp* em fermentação semi-sólida. **Alim. Nutr**, Araraquara, v. 14, n. 2, p.199-203, 2003.

ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE L.; CIANGA, I.; YAĞCI, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. **European Polymer Journal**, v. 39, p. 2375-2381, 2003.

SAID, S., PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1. ed. São Paulo: Legis Suma, 2004.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 37-202.

VITOLLO, M. In: SAID, S., PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Legis Suma, 2004.

### CAPÍTULO III

---

**EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA  
ATIVIDADE DA INVERTASE E  
POLIFENOLOXIDASE DURANTE A  
FERMENTAÇÃO DE DOIS CULTIVARES  
DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)  
PRODUZIDOS NO SUL DA BAHIA, BRASIL**

## EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE E POLIFENOLOXIDASE DURANTE A FERMENTAÇÃO DE DOIS CULTIVARES DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) PRODUZIDOS NO SUL DA BAHIA, BRASIL.

Adriana Barros de Cerqueira e Silva<sup>1</sup>, Mariana Barros de Cerqueira e Silva<sup>1</sup>, Eliete da Silva Bispo<sup>1</sup>, Sérgio Eduardo Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, Bahia, Brasil

### RESUMO

A fermentação é uma das etapas da pós-colheita que mais afeta a qualidade dos produtos obtidos a partir do cacau, pois enzimas oriundas deste processo promovem reações químicas de cura, estabilizando sabor e cor característicos do chocolate. Embora o papel essencial de enzimas endógenas durante essa etapa tenha sido evidenciado há muitos anos, existem ainda poucos estudos sistemáticos abordando a comparação entre diferentes genótipos de cacau, sob diferentes condições de cultivo, com diferentes métodos de fermentação. Além disso, não está ainda elucidado como os processos enzimáticos são regulados durante a fermentação, que substratos enzimáticos/produtos estão relacionados com o sabor de amêndoas com qualidade superior e quais os fatores limitantes para os processos enzimáticos (disponibilidade de substrato ou enzima, genótipo, condições de cultivo ou processo de fermentação). O presente trabalho visa determinar a atividade das enzimas Invertase e PPO nos cultivares PH 16 e TSH 1188, em cinco tempos distintos da fermentação, baseado nas condições ótimas de atividade previamente estabelecidas no tempo zero (momento imediato antes do início da fermentação). A atividade de ambas as enzimas foi determinada espectrofotometricamente para os substratos sacarose e catecol, respectivamente. Os resultados demonstram a diferença e particularidade existente entre os cultivares de cacau, e entre polpa e semente de cada cultivar, além de elucidar a atividade equilibrada das enzimas durante as 156h de fermentação, evidenciando a capacidade das mesmas em se manter ativas ao longo do processo, apesar das intempéries fermentativas. A partir dos resultados obtidos, podem ser realizadas recomendações de intervenções tecnológicas (como controle de pH e temperatura no cocho) que contribuam para melhoria da qualidade da matéria-prima na produção de chocolates monovarietais, que possuem maior valor agregado.

**Palavras-chave:** enzimas, chocolate monovarietal, precursores de sabor.



## ABSTRACT

Fermentation is one of the post-harvest steps that mostly affects the quality of the products obtained from cocoa, because enzymes derived from this process promote chemical reactions of healing, stabilizing chocolate's characteristic flavor and color. While the essential role of endogenous enzymes during this step has been evident for many years, there are few systematic studies addressing the comparison between different cacao genotypes under different growing conditions, with different methods of fermentation. Moreover, it is not clear how enzymatic processes are regulated during the fermentation, which enzyme substrates / products are related to the flavor of almonds with superior quality and what are the limiting factors for the enzymatic processes (substrate or enzyme availability, genotype, culture conditions or fermentation process). This study aims to determine the activity of Invertase and PPO enzymes in cultivars PH 16 and TSH 1188, at five different times of fermentation, based on optimal conditions of activity previously established at time zero (immediate moment before the start of fermentation). The activity of both enzymes was determined spectrophotometrically for substrates sucrose and catechol, respectively. The results show the difference and specificity existing between cocoa cultivars and between pulp and seed of each plant variety, in addition to elucidate the balanced activity of enzymes during 156h of fermentation, evidencing their ability of remain active throughout the process despite the fermentative elements. Since then, technological interventions (such as pH and temperature control in the trough) can be performed to contribute to improving the quality of the raw material in the production of monovarietal chocolates, which have higher added value.

**Keywords:** enzymes, monovarietal chocolate, flavorprecursors.

## 1. INTRODUÇÃO

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma planta originária da Bacia Amazônica e cultivada nas regiões tropicais do mundo. O interesse de cultivo desta espécie está no aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de cacau, de manteiga de cacau e de chocolate (ALVES, 2002).

As etapas de pré-processamento do cacau (colheita, fermentação e secagem) são importantes na garantia da qualidade das amêndoas. Para Lagunes-Galvez et al (2007), a fermentação é uma das etapas da pós-colheita que mais afeta a qualidade dos produtos obtidos a partir do cacau, por ser uma atividade indispensável para o desenvolvimento dos precursores do aroma de chocolate. Durante essa etapa, a polpa que envolve as sementes é metabolizada por micro-organismos, produzindo principalmente etanol e ácido acético, que são absorvidos pelos cotilédones, causando a morte da semente e promovendo alterações físico-químicas importantes na constituição do sabor. Entre essas, pode-se ressaltar a formação de aminoácidos e açúcares redutores livres, oxidação de antocianinas e complexação de aminoácidos com compostos fenólicos formando quinonas, contribuindo assim para a redução do amargor e adstringência das amêndoas.

A atividade enzimática em amêndoas de cacau, durante a fermentação, é conhecida e estudada pelo menos desde a segunda metade do século XX. Segundo Hansen et al (1998), acredita-se que as enzimas com importância na formação do *flavor* do chocolate oriundas das amêndoas de cacau são as Proteases, Invertases e a Polifenoloxidase (PPO). Atualmente, sabe-se que reações que levam à formação de precursores de sabor são levadas a cabo por enzimas endógenas da semente do cacau e que a fermentação tem como principal consequência o abaixamento do pH, favorecendo a ação destas enzimas (MACEDO et al, 2016).

A enzima Invertase atua durante este processo na hidrólise da sacarose em glicose e frutose (açúcares redutores), indispensáveis à formação de características sensoriais, que serão potencializados durante a etapa de torração (HANSEN et al, 1998; LOPEZ e DIMICK, 1991). Esta enzima possui duas isoenzimas: uma ácida com atividade máxima em pH 5,5 e outra neutra, com um máximo de atividade em

pH 7,0 (HUSSAIN et al, 2008). Contudo, o conhecimento sobre invertases neutras/ácidas ainda é restrito, devido a dificuldades de purificação (DU et al, 2013) e atividades enzimáticas baixas e instáveis (ROITSCH e GONZALEZ, 2004).

Outra enzima amplamente distribuída na natureza, a PPO, é responsável por catalisar reações de oxidação de compostos fenólicos, na presença de oxigênio, cujos produtos se polimerizam, formando compostos de cor escura (ROBINSON et al, 1991). Sua presença e atividade durante a fermentação e a secagem das amêndoas de cacau, são fatores responsáveis pelo desenvolvimento dos precursores do sabor, começando na fase oxidativa da fermentação e continuando na secagem (LIMA et al, 2001). A importância da atividade desta enzima é também mencionada de forma implícita na redução do sabor amargo e adstringente do cacau (REEVES et al, 1988).

Embora o papel essencial de enzimas endógenas durante a fermentação do cacau tenha sido evidenciado há muitos anos, existe ainda a falta de estudos sistemáticos abordando a comparação entre diferentes genótipos de cacau, sob diferentes condições de cultivo, com diferentes métodos de fermentação (HANSEN et al, 1998). Além disso, ainda não está esclarecida a regulação dos processos enzimáticos durante a fermentação, que substratos enzimáticos/produtos estão relacionados com o sabor de amêndoas com qualidade superior e quais os fatores limitantes para os processos enzimáticos, tais como disponibilidade de substrato ou enzima, genótipo, condições de cultivo ou condições de pH e temperatura durante o processo de fermentação (MACEDO et al, 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho visa determinar a atividade das enzimas Invertase e PPO nos cultivares PH 16 e TSH 1188, produzidos no sul da Bahia, em cinco tempos distintos da fermentação, baseado nas condições ótimas de atividade previamente estabelecidas no tempo zero (antes do início da fermentação), visando fornecer subsídios para possíveis intervenções tecnológicas que possam contribuir para melhoria da qualidade da matéria-prima na produção de chocolates monovarietais, que possuem maior valor agregado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material e coleta de amostras

Foram estudados dois cultivares de cacau (TSH 1188 e PH 16), produzidos na Fazenda Lajedo do Ouro, situada no município de Ibirataia – BA (S 14° 06' 15.2" WO 39° 38' 45.8). O cultivar TSH 1188 (Trinidad Selected Hybrids – híbrido *Trinitario*) é originário de Trinidad e Tobago e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa e excelente produtividade; já 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.

As amostras foram coletadas (aproximadamente 500 g) a cada 12 horas durante o processo de fermentação e imediatamente congeladas a -18°C para interrupção da atividade enzimática. Durante a fermentação, foram realizadas medidas de temperatura (Digital Thermometer MINIPA MT – 450) e pH (Medidor de pH portátil PHtek Digital) da massa (AOAC, 2000). A atividade das enzimas foi determinada na polpa e semente dos dois cultivares em cinco tempos distintos durante a fermentação (12h, 48h, 84h, 120h e 156h).

### 2.2 Fermentação

O processo fermentativo durou sete dias, com revolvimento da massa de cacau a cada 48 horas visando a oxigenação da mesma e a uniformização da temperatura. O procedimento foi realizado em fevereiro de 2013, simultaneamente para as duas variedades, em cochos de madeira (70x70x75cm) com capacidade para armazenar 400 kg de massa de cacau e apresentando cerca de 20 furos (1,27cm/diâmetro) na parte inferior e nas laterais, a fim de permitir o escoamento do mel do cacau produzido pela polpa durante a fermentação. Para cobrir a massa de cacau, foram utilizadas folhas de bananeira.

## 2.3 Extração e purificação parcial da invertase

Para extração das enzimas da polpa, utilizou-se 100g de cacau. As polpas foram separadas das sementes manualmente e a extração da invertase foi realizada segundo Gomez et al (1999), onde a polpa foi imersa em solução tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,5 contendo NaCl 50mM, glicerol 5%, sulfato de manganês 5mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 1mM, na proporção de 1:2 (p/v) e homogeneizada durante 30 minutos a 4°C em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada HITACHI CR22GIII a 20000.g durante 10 min a 0°C e o sobrenadante (extrato), em seguida, armazenado a -18°C.

As sementes foram então liofilizadas em Liofilizador Liotop L108 e, posteriormente, desengorduradas, utilizando-se éter de petróleo como solvente (YUSEP et al, 2002). A extração da invertase foi realizada segundo o descrito por Gomez et al (1999), assim como descrito para a extração das enzimas na polpa.

Após descongelamento sob refrigeração, foi adicionado aos extratos quantidade suficiente de sulfato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] para fornecer ao meio 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda a 4°C em banho de gelo e a mistura centrifugada a 20000.g por 60 minutos a 4°C, reservando-se o precipitado obtido no processo. A purificação parcial da invertase foi realizada segundo o descrito por Deuner et al (2005), onde o precipitado foi suspenso em 4mL de água deionizada. A seguir, o extrato foi dialisado por 24 horas a em refrigerador 4°C contra tampão fosfato de potássio 100mM e pH 7,0, obtendo-se o extrato enzimático parcialmente purificado. Após a diálise, o extrato foi re-precipitado com acetona na proporção 2:1 (v/v), e sua separação realizada por centrifugação a 11.000.g durante 15 minutos a 0°C. O precipitado foi novamente suspenso em tampão fosfato de potássio 0,02M pH 6,5 e armazenado a -18°C (PERONE et al, 2007).

## 2.4 Extração e purificação parcial da PPO

Para extração das enzimas da polpa, utilizou-se 100g de cacau. As polpas foram separadas das sementes manualmente e a extração da PPO foi realizada segundo o descrito por Lima et al (2001), onde a polpa foi imersa em solução tampão fosfato de potássio 0,02M (pH 7,5), contendo 5% de polietilenoglicol e 5mM de ácido ascórbico, na proporção 1:2 (p/v) e homogeneizada durante 30 minutos a 4°C em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada HITACHI CR22GIII a 11.000.g durante 15 minutos a 0°C e o sobrenadante (extrato), em seguida, armazenado a -18 °C.

As sementes foram então liofilizadas em Liofilizador Liotop L108 e, posteriormente, desengorduradas, utilizando-se éter de petróleo como solvente (YUSEP et al, 2002). A extração da PPO foi realizada segundo o descrito por Lima et al (2001), onde as sementes secas e desengorduradas foram suspensas em solução tampão, assim como descrito para as polpas, porém na proporção 1:10 (p/v). A suspensão foi então centrifugada a 11.000.g durante 15 minutos a 0°C e o sobrenadante (extrato), em seguida, armazenado a -18 °C.

Após descongelamento sob refrigeração, foi adicionado aos extratos quantidade suficiente de sulfato de amônio  $[(NH_4)_2SO_4]$  para fornecer ao meio 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda a 4°C em banho de gelo e a mistura centrifugada a 20000.g por 60 minutos a 4°C, reservando-se o precipitado obtido no processo. A purificação parcial da PPO foi realizada segundo o descrito por Erzengin (2009), onde o precipitado foi suspenso em solução tampão fosfato potássio 0,02M pH 6,5 e dialisado contra o mesmo tampão em membrana de acetato por 24 horas em refrigerador a 4°C. Após a diálise, a fração proteica foi reprecipitada com acetona na proporção 2:1 (v/v), e sua separação realizada por centrifugação a 11.000.g durante 15 minutos a 0°C. O precipitado foi novamente suspenso em tampão fosfato potássio 0,02M pH 6,5 e armazenado a -18°C para realização das demais análises (PERONE et al, 2007).

## 2.5 Determinação da atividade das Invertases nos extratos parcialmente purificados

A atividade da Invertase foi determinada segundo Nascimento et al (1998), por espectrofotometria (Biochrom Libra S50), para o substrato sacarose nas concentrações e condições de pH e temperatura estabelecidas por Macedo (2014) no tempo zero (antes do início da fermentação), ao estudar os mesmos cultivares (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1.** Condições ótimas para a atuação da Invertase nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188 (substrato, temperatura e pH), durante a fermentação.

	INVERTASE ÁCIDA				INVERTASE NEUTRA			
	PH 16		TSH 1188		PH 16		TSH 1188	
	Polpa	Semente	Polpa	Semente	Polpa	Semente	Polpa	Semente
[sacarose] (M)	0,2	0,4	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
T (°C)	33	28	31	27	52	50	50	50
pH	4,5	4,5	4,5	4,5	6,5	7,5	7,5	7,5

A mistura da reação (4,0mL) foi constituída de 0,5mL do extrato enzimático parcialmente purificado, 1,0mL de sacarose e 2,5mL de solução tampão no pH de reação indicado para cada isoenzima, sendo tampão acetato de potássio 0,2M para invertase ácida e tampão fosfato de potássio 0,2M para invertase neutra. O meio de reação foi incubado em estufa durante 30 minutos, e a reação foi interrompida pelo aquecimento a 100°C em banho-maria.

As atividades enzimáticas foram avaliadas pela dosagem de açúcares redutores segundo o protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi Nelson (NELSON, 1960). Uma unidade da enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mg de açúcar redutor por mg de proteína por hora (mg glicose/mg proteína/h).

## 2.6 Determinação da atividade da PPO nos extratos parcialmente purificados

A atividade da PPO foi determinada segundo Erzengin (2009), por espectrofotometria (Biochrom, Modelo Libra S50), através da medida do aumento da absorbância a 420 nm para o substrato catecol nas concentrações e condições de pH e temperatura estabelecidas por Macedo et al (2016) no tempo zero (antes do início da fermentação), ao estudar os mesmos cultivares (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2.** Condições ótimas para a atuação da Polifenoloxidase (PPO) nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188 (substrato, temperatura e pH), durante a fermentação.

	POLIFENOLOXIDASE (PPO)			
	PH16		TSH 1188	
	Polpa	Semente	Polpa	Semente
<b>[catecol] (M)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>T (°C)</b>	27	30	25	25
<b>pH</b>	6,5	5,8	6,6	6,0

A mistura da reação foi constituída de 0,2mL do extrato parcialmente purificado contendo a enzima, 0,3mL de catecol e 2,5mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2M no pH mais adequado para cada amostra, atingindo um volume final de 3,0mL. A amostra em branco teve apenas 0,3 mL de catecol e 2,7 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2M.

A porção linear da curva de atividade foi utilizada para expressar a atividade da enzima. Uma unidade de atividade da enzima (UE) foi definida como a quantidade de enzima que provoca um aumento na absorbância de 0,001/mL/min (ERZENGIN, 2009).



## **2.7 Determinação do teor de proteína dos extratos**

Para o cálculo da atividade enzimática específica, o teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et al (1951).

## **2.8 Análise estatística**

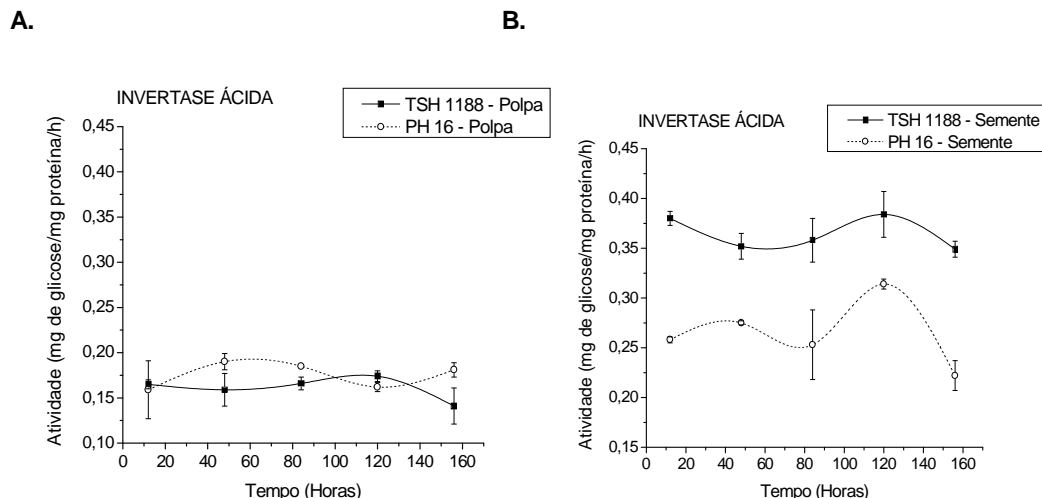
As análises foram feitas em sextuplicata e o desvio padrão dos dados foi determinado.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A enzima invertase atua sobre a sacarose, promovendo a sua hidrólise em glicose e frutose (açúcares redutores) durante o processo de fermentação, e a participação desta enzima na produção dos referidos precursores da reação de Maillard é crucial para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis do chocolate (PEZOA-GARCÍA, 1989). No estágio inicial, essa reação envolve a condensação de grupos carbonila de açúcares redutores com grupos amina provenientes principalmente de aminoácidos livres, seguida da degradação dos produtos originados, formando diversos compostos oxigenados (ROSLI et al, 1996). Esses açúcares são importantes precursores de sabor do chocolate, e suas atuações serão potencializadas nas etapas posteriores do beneficiamento do cacau (PEZOA-GARCÍA, 1989).

A Figura 3.1 representa a atividade da Invertase ácida na polpa e semente dos dois cultivares estudados para o substrato sacarose em diferentes concentrações. Observa-se que, em geral, a referida isoenzima manteve uma atividade constante ao longo das 156h de fermentação, demonstrando que a mesma é capaz de manter-se ativa durante todo o processo, apesar das variações de pH e temperatura ocorridos no cocho.

**Figura 3.1.** Atividade da Invertase ácida para o substrato sacarose 0,2M na polpa (A) e substrato sacarose 0,4M na semente (B) dos cultivares PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação (12 a 156h).

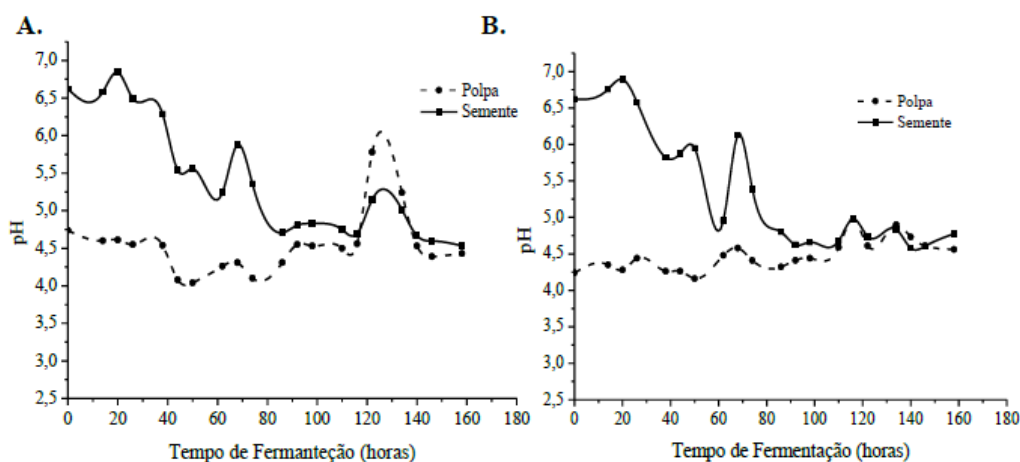


Na Figura 3.1-A, percebe-se um comportamento similar da Invertase ácida na polpa dos dois cultivares. Já na semente (Figura 3.1-B), o cultivar TSH 1188 apresenta maior atividade em relação ao PH 16, indicando uma maior presença da enzima neste cultivar. Além disso, ambos os cultivares apresentaram uma atividade maior na semente do que na polpa; conseqüentemente, a diferença entre a atividade da polpa e da semente do TSH 1188 foi maior que a do cultivar PH 16.

Considerando o teor de açúcares na polpa do cacau (10-15%) e a alta afinidade da Invertase pela sacarose (MACEDO, 2014), deveria-se encontrar uma maior concentração da referida enzima na polpa em relação à semente. Entretanto, após o início da fermentação, os ácidos orgânicos gerados penetram nas sementes e, juntamente com a elevação da temperatura causada pela fermentação aeróbica, causam a morte do embrião e acidificação dos tecidos internos da semente. Com a morte do embrião, é perdida a permeabilidade seletiva das membranas, o que possibilita o contato entre enzimas e substratos, sugerindo, aliado à perda de polpa durante o processo fermentativo, uma migração dessas enzimas da polpa para a semente, justificando os resultados obtidos (LOPEZ, 1986; CRUZ et al, 2013). Na Figura 3.2, está descrito o acompanhamento do pH da polpa e semente dos dois cultivares estudados durante a fermentação. Em ambos, a polpa permanece ácida

até o fim do processo; entretanto, a semente tende a acidificar-se durante o processo, podendo favorecer a atuação da Invertase ácida sobre o substrato presente no tecido, corroborando os valores encontrados.

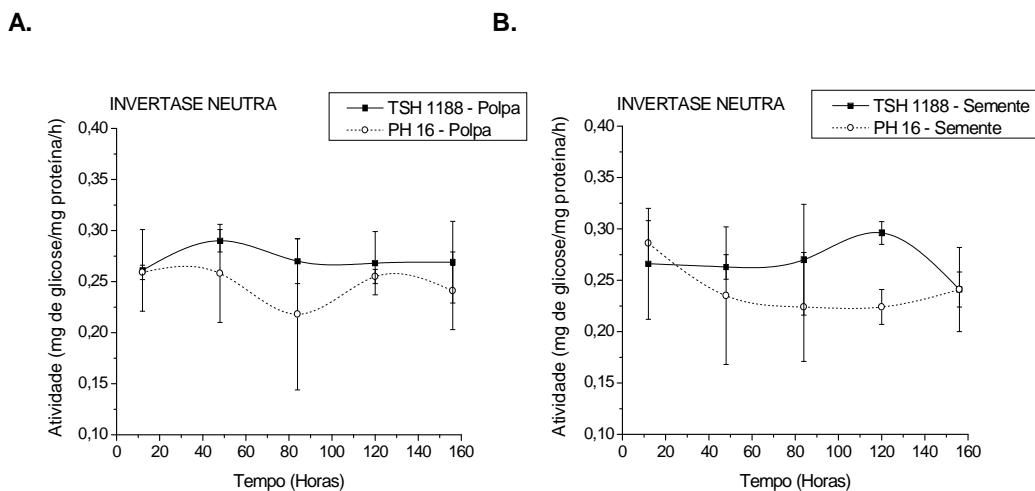
**Figura 3.2.** Acompanhamento do pH para polpa e semente durante o processo de fermentação. (A) Cultivar PH 16; (B) Cultivar TSH 1188.



Segundo Macedo (2014), o pH ótimo para atuação da Invertase ácida encontra-se próximo a 4,5. Dessa forma, a partir dos dados apresentados, pode-se inferir que, em condições reais, a Invertase ácida tem sua ação favorecida na polpa em ambos os cultivares durante os sete dias de fermentação. Já na semente, a ação da referida enzima é favorecida para o cultivar PH 16 a partir de 80h, e para o TSH 1188, a partir de 90h.

A Figura 3.3 mostra a atividade da Invertase neutra na polpa e semente dos dois cultivares estudados para o substrato sacarose 0,3M (MACEDO, 2014). Observa-se que, assim como ocorre com a Invertase ácida, a Invertase neutra também manteve uma atividade equilibrada ao longo de toda a fermentação, reforçando o potencial da enzima em resistir às condições do processo e permanecer ativa ao longo das 156h.

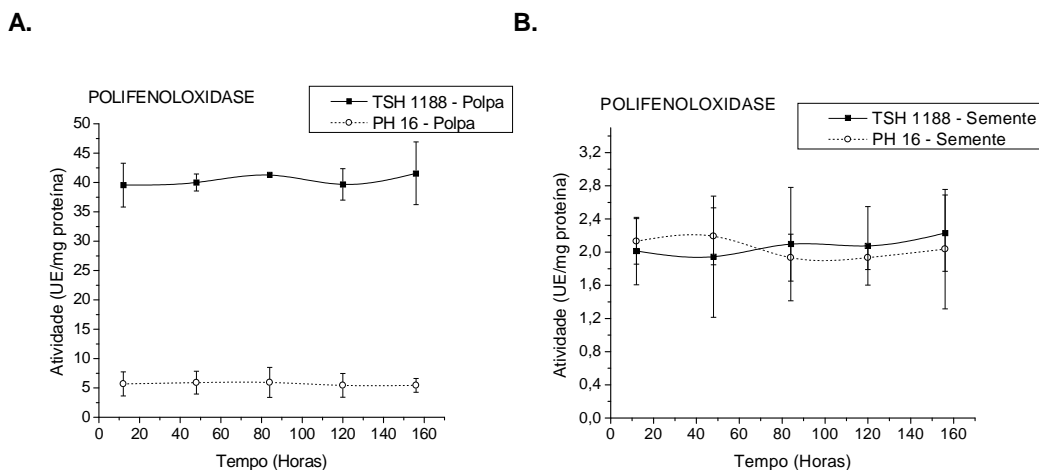
**Figura 3.3.** Atividade da Invertase neutra para o substrato sacarose 0,3M na polpa e semente dos cultivares PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação (12 a 156h).



No caso desta isoenzima, tanto na polpa (Figura 3.3-A) como na semente (Figura 3.3-B) a atividade ocorreu de forma similar, ambas produzindo entre 0,2 e 0,3 mg glicose/mg proteína/h, e o cultivar TSH 1188 apresentou atividade ligeiramente maior em relação ao PH 16, corroborando a maior presença da Invertase no cultivar supracitado. Entretanto, a Invertase neutra, por possuir valores ótimos de pH entre 6,5 e 7,5, atua fora da faixa de pH durante todo o processo de fermentação, como explicitado na Figura 3.2, e isso implica dizer que a invertase neutra não possui atuação nestas condições de fermentação para os cultivares estudados, como já previsto por Macedo (2014) ao realizar a projeção da atividade da enzima durante o processo de fermentação dos mesmos cultivares. Neste caso, pode-se confirmar que a enzima mesmo estando presente no meio, não atua, ou atua muito pouco devidos as condições de pH.

No que diz respeito à atividade da PPO, também se percebe um comportamento regular durante todo o tempo de fermentação. Esse comportamento demonstra que a enzima, assim como a Invertase, é capaz de permanecer ativa apesar das condições fermentativas (Figura 3.4).

**Figura 3.4.** Atividade da PPO para o substrato catecol 0,1M na polpa (A) e semente (B) dos cultivares PH 16 e TSH 1188, durante a fermentação (12 a 156h).



Na Figura 3.4-A, observa-se uma grande diferença na atividade enzimática das polpas dos dois cultivares, sendo cerca de oito vezes maior no TSH 1188 em relação ao PH 16, indicando uma maior presença da enzima neste cultivar. Já nas sementes (Figura 3.4-B), a atuação da PPO é menor que nas polpas e semelhante em ambos os cultivares, devido aos valores de atividade bastante similares; conseqüentemente, a diferença entre a atividade da polpa e da semente do cultivar TSH 1188 é maior que essa mesma diferença no cultivar PH 16. Tais resultados corroboram aqueles obtidos por Macedo et al (2016) no tempo zero, onde a atividade encontrada para a polpa do cultivar TSH 1188 foi cerca de seis vezes maior que a do cultivar PH 16, bem como a atividade das sementes dos dois cultivares apresentou comportamento semelhante e bem menor que a das polpas, permanecendo numa faixa entre 1,0 e 2,5 UE/mg proteína).

A afinidade da PPO pelo substrato não depende apenas da origem da mesma (tipo de vegetal), mas também de outros fatores como espécie e variedade (OKTAY et al, 1995) e do seu estágio de maturação e condições de cultivo (GOMES et al, 2001); além disso, sabe-se que parâmetros cinéticos, como  $K_m$  e  $V_{max}$ , estão diretamente ligados às diferenças de atividade enzimática, de modo que quanto menor o valor de  $K_m$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato (LINEWEVER e BURK, 1934). Ao estudar os referidos cultivares antes da fermentação, Macedo et al

(2016) observaram valores de Km e Vmax coerentes, não somente com uma maior atividade da PPO na polpa em relação à semente, como também com a diferença de atividade entre os cultivares.

Entretanto, apesar da atividade da PPO na polpa ser maior que na semente dos dois cultivares, considerando as condições reais de pH no cocho durante a fermentação (Figura 3.2), percebe-se que a ação da referida enzima será favorecida na semente, principalmente nos três primeiros dias, onde o pH do meio é mais próximo ao seu pH ótimo de atuação.

A elevada atividade da PPO, especialmente na polpa do cultivar TSH 1188, por sua vez, sugere fortemente um reflexo no teor de compostos fenólicos presentes durante e após a fermentação, devido à atuação intensa da PPO sobre esses compostos durante a fase aeróbica, convertendo-os em quinonas (MISNAWI et al, 2002).

Segundo Vamos-Vigyázo (1981), a extensão na qual estes substratos fenólicos contribuem para o escurecimento enzimático depende da sua localização e concentração no substrato, assim como da intensidade de cor dos pigmentos macromoleculares obtidos das referidas quinonas, o que pode acarretar em alterações nas características sensoriais como cor e sabor (MISNAWI et al, 2003). Embora indesejado na maioria dos casos, o escurecimento oxidativo em chá, café, cacau e ameixa seca é desejável (LIMA et al, 2001).

Diante do exposto sugere-se que, como ambas as enzimas permanecem ativas durante todo o processo fermentativo, é possível promover sua atuação apenas controlando fatores como pH e temperatura no cocho, não sendo necessária a adição de outro componente químico ou de enzimas exógenas para tal. Deve-se considerar também, durante esse controle, a especificidade da polpa e da semente de cada cultivar, tomando como base seus parâmetros ideais, proporcionando maior eficiência da enzima ao prolongar seu período de melhor atuação durante o processo fermentativo, podendo contribuir para a melhoria nas características das amêndoas de cacau, e por consequência maior qualidade na produção do chocolate.

#### **4. CONCLUSÕES**

- O estudo evidenciou a capacidade da Invertase e da Polifenoloxidase em permanecer ativas durante as 156h de fermentação, apesar das condições fermentativas do cocho;
- O cultivar TSH 1188 apresentou comportamento que sugere uma maior concentração das enzimas estudadas em relação ao cultivar PH 16;
- A invertase ácida apresentou atividade maior na semente que na polpa; entretanto, sob as condições reais de variação de pH, sua ação é favorecida na polpa em ambos os cultivares durante os sete dias de fermentação. Já na semente, a ação da referida enzima é favorecida para o cultivar PH 16 a partir de 80h, e para o TSH 1188, a partir de 90h;
- A invertase neutra demonstrou atividade semelhante na polpa e semente de ambos os cultivares; entretanto, por apresentar atuação fora da faixa de pH da fermentação, infere-se que a mesma não atua sob essas condições de fermentação para os cultivares estudados.
- A PPO apresentou atividade maior na polpa do que na semente de ambos os cultivares. Apesar da atividade do cultivar TSH 1188 na polpa ter sido muito maior em relação ao cultivar PH 16, a atividade na semente foi semelhante para os dois cultivares. Entretanto, considerando as condições reais de pH no cocho durante a fermentação, percebe-se que a ação da referida enzima será favorecida na semente, principalmente nos três primeiros dias.

#### **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Visando um aprimoramento da produção do chocolate de maior valor agregado, deve-se controlar os fatores pH e temperatura durante a fermentação, considerando a especificidade da polpa e da semente de cada cultivar, tomando como base seus parâmetros ideais, proporcionando maior eficiência da enzima ao prolongar seu período de melhor atuação durante o processo fermentativo, podendo

contribuir para a melhoria nas características das amêndoas de cacau, e por consequência maior qualidade na produção do chocolate.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiarem o presente estudo.



## REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 2000.

ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicios* (STÄHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba.** 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, p 70. 2002.

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**. v 12, p 5218-5225. 2013.

DEUNER, S. et al. 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, p 45-50. 2005.

DU, L. et al. Characterization of an Invertase with pH Tolerance and Truncation of Its N-Terminal to Shift Optimum Activity toward Neutral pH. **Plos One**. 2013.

ERZENGIN, M. Affinity Purification and Characterization of Polyphenoloxidase from *Helianthus tuberosus* L. Hacettepe. **Journal of Biology&Chemistry**. v 37, p 313-25. 2009.

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v 21, p 69-72. 2001.

GOMEZ, M. L. P. A. et al. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya*, L. cv. Solo): influência da radiação gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v 19, p 246-52.1999.

HANSEN, C. E.; OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. **Journal Science Food Agricultural**. v 77, p 273 – 281. 1998.

HUSSAIN, A.; RASHID, M.; PERVEEN, R.; ASHRAF, M. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugar cane. **Plant Physiology et Biochemistry**, 2008.

LAGUNES-GALVEZ, 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**. v 114, p 124-130. 2007.

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. A. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 21, p 98-104. 2001.

LINEWEVER H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemical Society**. v 56, p 658-666. 1934.

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

LOWRY, O. H. et al. Measurement with the Folin fenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v 193, p 265- 275. 1951.

MACEDO, A. S. L. **Caracterização de enzimas em dois cultivares de cacau *Theobroma cacao* L.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. Salvador – BA, 2014.

MACEDO, A. S. L.; ROCHA, F. S.; RIBEIRO, M. S.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Characterization of polyphenol oxidase in two cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars produced in the south of Bahia, Brazil. **Food Science and Technology**. Campinas, 2016.

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, p 407–417. 2002.

MISNAWI, JINAP, S., JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. **Journal of Food Quality and Preference**. v 15, p 403-409. 2003.

NASCIMENTO, R. et al. Distribuição de amido, açúcares solúveis e atividade de invertases em explantes de soja sob várias concentrações de sacarose e diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Viçosa- MG, v 10, p 125-30. 1998.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biologic Chemistry**. Bethesda, Md. v 153, n 2, p 375-380. 1960.

OKTAY, M. et al. Polyphenoloxidase from Amasya apple. **Journal of Food Science**. v 60, n 3, p 494-505. 1995.

PERONE, C. A. S. et al. Purificação parcial e caracterização cinética da enzima Polifenoloxidase de banana nanica (*Musa acuminata*). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. v 25, p 239-46. 2007.

PEZOA-GARCÍA, N. H. **Contribution a l'étude d'un capteur por controlar em continu procede de torrèfaction**. 170p. 1989. These (Docteur) – Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, 1989.

REEVES, S. G. et al. Biochemical studies of Cocoa Bean o-diphenol O<sub>2</sub> oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chemistry**. Kidlington, p 190-219. 1988.

ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative Enzymes in Foods**. Elsevier Applied Science, cap 1, p 1-47; cap 6, p 217-273. 1991.

ROITSCH, T.; GONZALEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends Plant Sci**. v 9, p 606–613. 2004.

ROSLI, W. I. W.; JINAP, S.; RUSSLY, A. R. Effect of roasting time and temperature on volatile components profiles during nib roasting. In: **Proceedings of the 12th Internacional Cocoa Reaserch Conference**. Salvador, Brasil, Cocoa Producers. p 977-991. 1996.

VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Food Science Nutrition**. v 49, p 127. 1981.

YUSEP, I. et al. Influence of carboxypeptidases on free aminoacid, peptide and methylpyrazine contents of under-fermented cocoa beans. **Journal of Science Food Agriculture**. v 82, p 1584-92. 2002.