



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

PAULO TÚLIO DE SOUZA SILVEIRA

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

SALVADOR

2016

PAULO TÚLIO DE SOUZA SILVEIRA

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

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

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

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

SALVADOR

2016

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Silveira, Paulo Túlio de Souza.

Prospecção de proteases e determinação da atividade de suas isoenzimas em dois cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no Sul da Bahia, Brasil / Paulo Túlio de Souza Silveira. - 2016.

94 f.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares.

Coorientadora: Profª Drª Eliete da Silva Bispo.

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

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

CDD - 615.35

CDU - 615.355



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

TERMO DE APROVAÇÃO

PAULO TÚLIO DE SOUZA SILVEIRA

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

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

Aprovada em 20 de janeiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sérgio Eduardo Soares
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Universidade Federal da Bahia

Dr. Rachel Passos Rezende
Universidade Estadual de Santa Cruz

Dedico

Aos meus pais:

Paulo de Souza Silveira e

Ivaneide Lima de Souza Silveira.

“Nenhuma outra vez a natureza concentrou, num espaço tão pequeno, tanta abundância de suas substâncias valiosas, como o fez na semente do cacau”.

Alexander Von Humboldt (1769-1859)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela sua infinita misericórdia.

A minha fonte de inspiração, meus pais Paulo e Ivaneide, pelo amor incondicional, carinho, paciência e fé que depositaram em mim, confiando sempre em tudo o que fiz, e acreditando sempre na minha vitória. A minha irmã Zayra, pelas palavras, pelo amor incondicional, pelo incentivo, e por sempre acreditar em meu potencial. Assim como a toda minha família, que sempre me auxiliou e me incentivou.

Ao Profº. Drº. Sérgio Eduardo Soares pela orientação, confiança, paciência e companheirismo, estando sempre perto, e auxiliando em todo o percurso do Mestrado.

À Profª. Drª. Eliete da Silva Bispo pela confiança, paciência, e o apoio irrestrito.

Aos Professores, Drº. Ederlan, Drª. Janice, Drª. Alaise, Drº. Celso, Profª. Drª. Rose e, especialmente, a Profª. Drª. Mara Spínola, pela paciência, compreensão, ajuda, apoio e presença, sempre estando disponíveis e lutando para ajudar e auxiliar naquilo que era possível.

Ao Profº. Marcelo Andres e a Profº. Rachel pelas contribuições.

As minhas colegas de mestrado, na qual desenvolveram projetos junto comigo, Adriana e Tábata, pessoas essas que mais do que colegas, são grandes amigos. E, principalmente, a Luciane, pela grande parceria, ajuda, paciência, conselhos e carinho.

Aos demais colegas de mestrado, que apesar de não terem desenvolvido projetos juntos, mas são igualmente especiais, principalmente Cíntia, Lorena, Adrielle e Priscila, inclusive pela confiança depositada em mim para representá-los no Colegiado.

Ao colegiado do PGAlí pela oportunidade e experiência.

Aos alunos do LAPAAC, na qual sempre trabalhamos juntos, e dividimos momentos bons e momentos difíceis, como Gabriela, Mariana Novaes, Mariana Barros, Priscila e Natan.

E, principalmente, Fátima, Lorena, e Alexandre, pela paciência, pelo comprometimento, pela parceria para desenvolvemos projetos juntos, na qual um laço de amizade se formou ao longo dos anos.

Aos grandes amigos Fred, Ismara, Graciete, Gabriela e Estefânia, pelo amor, carinho, companheirismo, ajuda e auxílio dispensando.

Aos meus amigos/irmãos Marcos Teixeira, Ivo Costa, Samuel Guimarães, Natanael Guimarães, Guilherme Guimarães, Caik Veiga, Eliane Moraes e Ionara Porto, por todo o amor, carinho, paciência, ajuda, orações e compreensão. Sendo parte fundamental da minha vida.

A Adrielle Leão, pela ajuda, benevolência e contribuições sempre tão produtivas, e m pela parceria firmada.

A Universidade Federal da Bahia pelo suporte.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela oportunidade.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia pela concessão da bolsa de estudos.

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

Aos laboratórios LAPESCA, BROMATOLOGIA, ANÁLISE INSTRUMENTAL, LEMA e MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, assim como seus funcionários, professores e alunos, pela parceria, ajuda e toda a compreensão dispensada.

Agradeço especialmente a Fazenda Lajedo do Ouro, nas pessoas do Srº. Pedro, Srº. Pedro Neto e Srª. Ângela, pelo amor, afabilidade, disponibilização do material de estudo, e pela parceria firmada.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão desse trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
OBJETIVOS.....	18
CAPITULO I – Revisão Bibliográfica.....	19
1. Cacau.....	20
1.1. Histórico e Aspectos Gerais.....	20
1.1.1. Produção.....	23
1.2. Variedades do cacau.....	26
1.3. Pré-processamento do cacau.....	27
1.3.1. Fermentação	31
2. Enzimas.....	34
2.1. Características gerais.....	34
2.2. Atividade enzimática no cacau.....	36
2.2.1. Protease.....	39
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO II - Caracterização das proteases e determinação da atividade de suas isoenzimas em dois cultivares de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.) produzidos no sul da Bahia, Brasil.....	52
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAIS E METODOS.....	57
2.1. Materiais.....	57
2.2. Métodos.....	57
2.2.1. Fermentação.....	57
2.2.2. Coleta das amostras.....	57
2.2.3. Caracterização das proteases e determinação da atividade de suas isoenzimas.....	57
2.2.3.1. Extração das proteases das polpas.....	58
2.2.3.2. Purificação parcial das proteases das polpas.....	58
2.2.3.3. Extração das proteases das sementes.....	58
2.2.3.4. Purificação parcial das proteases das sementes.....	58
2.2.3.5. Determinação da atividade das proteases.....	59

2.2.3.6. Determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmax das proteases.....	59
2.2.3.7. Efeito do pH e Temperatura na atividade das proteases.....	59
2.2.3.8. Determinação da atividade da aminopeptidase.....	59
2.2.3.9. Determinação da atividade da carboxipeptidase.....	60
2.2.3.10. Determinação da atividade da endoprotease.....	60
2.3. Correlação entre os parâmetros de fermentação e a atividade enzimática dos extratos.....	61
2.4. Determinação do teor de proteína nos extratos.....	61
2.5. Análise Estatística.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Determinação da atividade das Proteases.....	62
3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	64
3.3. Efeito do pH na atividade da Protease.....	64
3.4. Efeito da temperatura na atividade da Protease.....	66
3.5. Determinação da atividade das isoenzimas (aminopeptidase, carboxipeptidase e endoprotease).....	67
3.6. Parâmetros de fermentação.....	71
3.7. Correlação entre os parâmetros de fermentação e a atividade enzimática dos extratos.....	74
4. CONCLUSÕES.....	77
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
CAPÍTULO III - Estudo prospectivo relativo às proteínas do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	84
RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	85
INTRODUÇÃO.....	85
MATERIAIS E MÉTODOS.....	86
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÃO.....	92
PERSPECTIVAS.....	92
REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1 - Cronologia do Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	21
Figura 2 - Etapas de pré-processamento do cacau.....	28
Figura 3 - Fases da fermentação do cacau.....	32

CAPITULO II

Figura 1 - Atividade das Proteases nas duas variedades de cacau em diferentes substratos e concentrações.....	63
Figura 2 - Efeito do pH na atividade das Proteases.....	65
Figura 3 - Efeito da temperatura na atividade das Proteases.....	67
Figura 4 - Atividade das três isoenzimas das proteases nos dois cultivares de cacau.....	68
Figura 5 - Monitoramento do pH para polpa e semente e da temperatura durante o processo de fermentação.....	71
Figura 6 - Correlação entre o pH da polpa e da semente e a temperatura da fermentação, com o pH e a temperatura ótima da atuação das proteases para o cultivar PH 16.....	74
Figura 7 - Correlação entre o pH da polpa e da semente e a temperatura da fermentação, com o pH e a temperatura ótima da atuação das proteases para o cultivar TSH 1188.....	75

CAPITULO III

Figura 1 - Distribuição das patentes relacionadas às enzimas peptidases por	90
--	----

códigos da classificação internacional na Seção A (Necessidades Humanas)....

Figura 2 - Inventores com maiores números de patentes relacionadas às enzimas peptidases depositadas.....	90
Figura 3 - Depositantes com maior número de patentes depositadas relacionadas às enzimas peptidases.....	91
Figura 4 - Número de Patentes relacionadas às enzimas peptidases depositadas por País.....	91
Figura 5 - Evolução anual de depósitos de patentes sobre enzimas peptidases entre 1983 e 2013.....	92
Figura 6 - Distribuição dos tipos de patentes depositadas sobre enzimas peptidases.....	92

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Composição de sementes do cacau (<i>Forastero</i>) do Oeste Africano..	22
Tabela 2 - Maiores produtores mundial de cacau (mil toneladas).....	24
Tabela 3 - Principais enzimas ativas na fermentação do cacau.....	37

CAPITULO II

Tabela 1 - Km e Vmax das proteases com o substrato albumina bovina sérica.	64
---	----

CAPITULO III

Tabela 1 - Descrição dos Códigos Internacionais de Patentes utilizados.....	87
Tabela 2 - Total de patentes depositadas para os Códigos da Classificação Internacional pesquisados.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

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

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

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

CEPEC - Centro de Pesquisa do Cacau

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

CNPC – Conselho Nacional dos Produtores de Cacau

CSV - *Comma separated values* (Valores separados por vírgulas)

EEG - Estação Experimental de Goitacazes

EP - *Espacenet*

et al. - E outros

EU – Unidade Enzimática

g – Grama

h – Hora

HCl – Ácido Clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB - Instituto do Cacau da Bahia

ICCO - International Cocoa Organization (Organização Internacional do Cacau)

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

IUBMB - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

K_m - Constante de Michaelis

M – Molar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mMol – Milimol

N – Normal

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanômetro

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

pH - Potencial hidrogeniônico

PSD – Peso Seco e Desengordurado

SIAL - Estação Instituto Agrônômico do Leste

TCA – Ácido Tricloroacético

Ton - Toneladas

UFBA – Universidade Federal da Bahia

V_{max}– Velocidade máxima

x_g - Força equivalente à da gravidade

β – Beta

RESUMO

O interesse no cultivo do cacau está na utilização de suas amêndoas para a produção de chocolate e gordura. Para a produção do chocolate, além dos fatores genéticos, modificações que ocorrem no seu beneficiamento também são fundamentais para a formação do *flavour* característico. O beneficiamento começa após a colheita, onde a semente e a polpa são retiradas e levadas à fermentação. O processo fermentativo do cacau serve para proporcionar uma série de reações bioquímicas, sendo esta etapa a principal responsável pelo desenvolvimento dos precursores do sabor e odor do chocolate. Essas reações bioquímicas ocorrem mediante à ação de enzimas, dentre as quais se destaca as proteases, que são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, liberando assim aminoácidos que, na torração, participam da Reação de *Maillard*. Diante disso nosso objetivo foi caracterizar a atividade enzimática da protease e determinar a atividade de suas isoenzimas nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188, produzidos na região Sul da Bahia, relacionando-a com as condições do processo fermentativo. As proteases e suas isoenzimas foram extraídas e semi-purificadas das polpas e sementes dos dois cultivares de cacau. Para as proteases as atividades foram determinadas variando o tipo de substrato, o pH e a temperatura, além disso, os valores das atividades foram confrontados com os parâmetros das fermentações (pH e temperatura), e ainda determinado os parâmetros cinéticos e a atividade de suas isoenzimas: aminopeptidase, carboxipeptidase e a endoprotease. No estudo foi evidenciado diferenças nas atividades das proteases quanto aos diferentes cultivares do cacau, para as diferentes condições analisadas, apresentando uma maior atividade das proteases nas polpas e no cultivar PH 16, com exceção das isoenzimas, onde as maiores atividades foram nas sementes e no cultivar TSH 1188. Quando correlacionado os parâmetros de fermentação com as condições ótimas encontradas nesse estudo, pode-se perceber que as condições para a atividade enzimática não são as melhores no cocho de fermentação. Tal fato justifica a necessidade de estudos que caracterizem o processo fermentativo do cacau, para futuras intervenções, com o intuito de utilizar as condições iniciais para a melhor atividade da enzima durante todo o processo, e, conseqüentemente, a obtenção de um produto final de melhor qualidade.

Palavras-chave: Aminopeptidase, carboxipeptidase, endoprotease, cinética enzimática, proteínas.

ABSTRACT

The interest in cocoa cultivation is the use of its beans for production of chocolate and fat. For the production of chocolate, in addition to genetic factors, changes that occur in its processing are also essential for the formation of the characteristic flavor. The processing begins after harvest, where the seed and pulp are removed and taken to the fermentation. Cocoa fermentation process serves to provide a series of biochemical reactions, and this step primarily responsible for the development of the taste and odor of chocolate precursors. These biochemical reactions occur by the action of enzymes, among which stands out the proteases, which are enzymes that hydrolyze peptide bonds, thus releasing amino acids that, in roasting, participate in the Maillard reaction. Therefore our aim was to characterize the enzymatic activity of the protease and determine the activity of its isoenzymes in cacao cultivars PH 16 and TSH 1188, produced in southern Bahia, linking it to the conditions of the fermentation process. The protease and its isoenzymes were extracted and semi-purified pulps and seeds of both cocoa varieties. For protease activities were determined by varying the type of substrate, the pH and the temperature, furthermore, the values of the activities were compared with the parameters of fermentation (pH, temperature), and yet determined kinetic parameters and activity of its isoenzymes: aminopeptidase, carboxypeptidase and endoprotease. In the study evidenced differences in the activities of proteases as the different cacao cultivars for different conditions analyzed, with an increased activity of proteases in the pulps and cultivate PH 16, with the exception of isoenzymes, where the major activities were the seeds and cultivate TSH 1188. When correlated the fermentation parameters with the optimal conditions found in this study, it can be seen that the conditions for enzymatic activity are not the best in the trough fermentation. This fact justified the need for studies characterizing the fermentation of the cocoa, to further interventions, in order to use the initial conditions for optimal enzyme activity throughout the process and, consequently, obtaining a final product of better quality.

Keywords: Aminopeptidase, carboxypeptidase, endoprotease, enzyme kinetics, protein.

INTRODUÇÃO

Originário da Bacia Amazônica, o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é cultivado em regiões tropicais por todo o mundo. O interesse em seu cultivo está na utilização de suas sementes (amêndoas) para a produção de gordura e chocolate (ALVES, 2002).

O chocolate, um dos alimentos mais apreciados do mundo, tem seu *flavour* (sabor e aroma) não apenas condicionado a atributos genéticos (variedade) do cacaueteiro, mas às modificações que ocorrem no seu beneficiamento (BECKETT, 1994).

O beneficiamento dos frutos do cacaueteiro se inicia após a colheita, onde os frutos são amontoados ainda na plantação e abertos com facões. A casca e a placenta são retiradas, já o material interno (semente e polpa) é levado às etapas posteriores de fermentação e secagem. Durante a fermentação serve para proporcionar a ocorrência de uma série de reações bioquímicas, que facilitam a separação da polpa e da semente. Essa etapa é responsável pelo desenvolvimento dos precursores e dos compostos do sabor (OETTERER, 2006).

Na fermentação, a polpa envoltória é degradada pela ação de leveduras, bactérias ácido-lácticas e ácido-acéticas, presentes naturalmente no ambiente e responsável pelo aumento da temperatura para cerca de 50 °C (CRUZ et al., 2013).

Esses microrganismos agem sobre os açúcares e ácidos orgânicos, transformando-os em etanol, ácido láctico e principalmente ácido acético (SCHWAN; WHEALS, 2004). Esses ácidos, que tem como consequência a diminuição do pH, aliados ao aumento da temperatura, são responsáveis pela morte do embrião e acidificação do tecido armazenado, ocasionando a perda da permeabilidade seletiva das membranas, possibilitando o contato das enzimas com os substratos. Essas enzimas endógenas são as principais responsáveis pelos precursores do sabor no chocolate (LOPEZ, 1986; CRUZ et al., 2013).

A atividade enzimática na fermentação da amêndoa do cacau já é estudada desde a segunda metade do século XX, e acredita-se que as principais enzimas para a formação do *flavour* do chocolate seja a polifenoloxidase, a invertase e a protease (ROBINSON; ESKIN, 1991; HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). As proteases são enzimas que hidrolisam as ligações covalentes que unem os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas. Essas enzimas são encontradas em todas as células e tecidos, e ainda ajudam na digestão de alimentos protéicos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Após a fermentação, as amêndoas são secas e torradas. A secagem além de eliminar água, possuem o intuito de estabilizar o sabor e produzir o aroma e a cor característicos do chocolate, sendo que a secagem possibilita a continuidade de mudanças bioquímicas, que se

iniciaram na fermentação, e a torração impede a continuação de reações de oxidação (ROHAN; STEWART, 1967; LOPEZ; QUESNEL, 1973; BECKETT, 1994; LOPES, 2000).

Um grande problema para a indústria de chocolate é a baixa qualidade das amêndoas de cacau, já que o processo de fermentação e secagem são realizados nas fazendas, sem qualquer controle, o que resulta em uma parte significativa das sementes que não sofreram as alterações necessárias (acidificação e aumento da temperatura) para as reações enzimáticas. O acompanhamento e a intervenção no processo de fermentação, para caracterizar os compostos, enzimas e as melhores condições de processo são uma alternativa para solucionar esse problema, padronizando assim o processo, aumentando a qualidade das amendoas de cacau produzidas (AQUARONE et al., 2001).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar a atividade enzimática das proteases e determinar a atividade de suas isoenzimas em dois cultivares de cacau, PH 16 e TSH 1188, produzidos na região Sul da Bahia, relacionando-as com as condições do processo fermentativo, contribuindo assim para futuras intercessões tecnológicas para melhoria da qualidade da matéria-prima na produção de chocolates.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a protease presente na polpa e semente dos dois cultivares, antes do início da fermentação (Tempo zero), quanto a afinidade pelo substrato, pH e temperatura ótimos.
- Determinar os parâmetros cinéticos da protease.
- Determinar a atividade enzimática da endoprotease, da carboxipeptidase e da aminopeptidase.
- Monitorar o processo de fermentação dos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188, através da medida do pH e temperatura.
- Correlacionar os parâmetros de fermentação, temperatura e pH, com a atividade da enzima.

CAPITULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Cacau

1.1. Histórico e Aspectos Gerais

Originário da Bacia Amazônica e cultivado em regiões tropicais de todo o mundo, o cacauéiro é uma planta da família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L. O interesse de cultivo desta espécie está no aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de cacau, de gordura 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). Ele é uma árvore diplóide, que é propagada por sementes, típica dos trópicos úmidos, normalmente 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: safra temporã (março a agosto) e safra principal (setembro a fevereiro) (PEREIRA, 1990; SILVA NETO et al., 2001).

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

Acredita-se que o cacau foi encontrado pela primeira vez no México, pelos Astecas, que o consumiam e comercializavam, usando para preparar uma bebida e também como forma de pagamento. Recentemente estudos apontam como os povos Olmec e Maia, antecessores dos Astecas, como os mais antigos usuários, sendo as primeiras evidências históricas datadas de 1500 a.c., sendo atribuídos a esses povos a origem de termos como *cacao* ou *Kakaw*, e *xocolati*, *tchocolath* ou *chocoati*, sinônimos, respectivamente, do fruto e de um líquido pastoso, obtido da polpa e da semente. As sementes de cacau eram consideradas tão valiosas pelos nativos mesoamericanos 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). A Figura 1 demonstra um breve histórico sobre a cultura do cacau (GRAMACHO et al., 1992; CAMPOS; BENEDET, 1994; YANES, 1994; FRANCO, 2001; SILVA NETO et al., 2001; VIVANT, 2004; COENTRÃO, 2005; HERMÈ, 2006; SANCHES, 2006; PIMENTEL, 2007; EFRAIM, 2009; LIMA, 2010; KOBLITZ, 2011; LOPES et al., 2011; COE; COE, 2013, CASTELLANOS, 2014).

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



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA.

Com grande valor nutricional, a composição do cacau (Tabela 1) varia com o tamanho do fruto, clima, época de colheita, tipo de solo, grau de maturação e manipulação pós-colheita (ZOUHAS; KREISER; MATIN, 1980).

O fruto de um modo geral possui forma oval com 15 a 20 cm de comprimento do eixo maior, e normalmente apresenta cor amarela quando maduro. As sementes (gêrmen e cotilédone) são revestidas por uma película denominada testa e por uma polpa branca com tons rosados, mucilaginosas e adocicadas (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 mucilaginosas. No cotilédone encontram-se células contendo reservas protéicas, lipídeos, amido e células polifenólicas. As sementes apresentam um grande e único vacúolo preenchido por polifenóis sendo responsáveis pela cor dos cotilédones (MARTINI, 2004). Este vacúolo é lisado durante a fermentação (URBANSKI, 1992). Quanto às proteínas, o principal destaque no cacau é para a fração globulina (VOIGT; BIEHL, 1995).

Apesar de ser um alimento antigo, as propriedades nutricionais do cacau para o consumo humano é um tema atual (LIPPI, 2009; ARAUJO et al., 2013; WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013). O cacau além de ser matéria-prima para a produção de chocolate,

suas amêndoas e seus subprodutos podem ser utilizados também pela indústria farmacêutica (ARAÚJO et al., 2013), para a preparação de pastas e extração de gorduras (manteiga de cacau), e ainda para a exploração de compostos como flavonóides e alcalóides purínicos amplamente estudados (AMORES; JIMÉNEZ, 2007; AMORES et al., 2009; AMORIM, 2011).

Tabela 1 - Composição centesimal média de 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.

Novos estudos têm sido realizados no intuito de recuperar e apoiar a plantação do cacauero, com o plantio de variedades resistentes, como forma de incluir fatores de resistência distintos dos até então encontrados, dificultando assim a evolução de patógenos e consequentes danos. Hoje, para os agricultores baianos, por meio do Instituto Biofábrica de

Cacau (Organização social vinculada ao Governo da Bahia), está sendo disponibilizado material genético de cacau tolerante a vassoura-de-bruxa e de alta produtividade, tendo como finalidade básica o apoio complementar ao programa de Recuperação da Lavoura Cacaueira Baiana. Alguns tipos destes materiais são: TSH 516, 565, 774, 1188; TSA 654, 656, 792; CCN 51; EET 397; CEPEC 42, 2001, 2002, 2003; LCTEEN 37 A; SJ 02 (LIMA, 2007).

Além disso, além de estudos em torno de variedades resistentes, atualmente a busca por chocolates *gourmet* tem induzido a produção do cacau fino no Brasil, com os primeiros conceitos de controle de qualidade nas lavouras desta *commodity*. Estabelecendo as boas práticas de fabricação como a seleção apenas de frutos intactos com o correto grau de maturação, procedimentos de higienização do fruto, bem como dos equipamentos de fermentação, secagem e estocagem, sendo os primeiros passos em busca do produto superior (SANTOS, 2010).

1.1.1. Produção

Segundo projeções da Organização Internacional do Cacau (International Cocoa Organization – ICCO) para o período de 2014/15, os maiores produtores mundiais de cacau serão a Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Equador, Nigéria, Camarões e Brasil, respectivamente, com destaque ao continente africano. A produção mundial para esse mesmo período está estimada em 4.168 milhões de toneladas, o que pode ser verificado na Tabela 2 (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, mas em 2015 deverá sofrer uma queda de 21,25%, chegando assim a uma produção de 141.110 mil toneladas.

Entre as regiões produtoras baianas temos a da cidade de Ilhéus, onde o cacau adaptou-se perfeitamente as condições edafoclimáticas, trazendo muita prosperidade a região, constituindo-se num dos pilares fundamentais para o enriquecimento de muitas famílias de cacaicultores e contribuiu muito para o desenvolvimento regional. Essa cultura se desenvolveu muito e se estendeu ao sul do recôncavo baiano e ao extremo sul, chegando até o estado do Espírito Santo, dando a essa região do sul baiano a denominação de “Região Cacaueira”, sendo os municípios de Ilhéus e Itabuna durante muitos anos os principais produtores de cacau do país (CUENCA; NAZARIO, 2004; OLIVEIRA, 2008).

Tabela 2 - Maiores produtores mundial de cacau (mil toneladas)

	Estimativa		Previsão
	2012/13	2013/14	2014/15
África	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
América	622	708	729
Brasil	185	228	215
Equador	192	220	250
Outros	246	260	264
Ásia e Oceania	487	454	455
Indonésia	410	375	370
Papua Nova Guiné	41	40	42
Outros	36	38	43
Total Mundial	3945	4359	4168

Fonte: ICCO, 2015.

Segundo Souza e Dias (2001), no ápice da sua produção, praticamente 100 municípios do Sul da Bahia possuíam suas economias baseadas no cacau, que chegou a ser cultivado em 29 mil propriedades, em área superior a 700 mil hectares.

O cultivo do cacau ganhou força em meados do século passado, entretanto, a partir de 1989, foi comprometido pela queda de preços, descapitalização e endividamento dos produtores, já antes desestimulado pela baixa competitividade do setor, por políticas governamentais desfavoráveis, manejo inadequado da lavoura, exploração de plantações já antigas e em decadência, estresse hídrico por mais de dois anos consecutivos na região (GRAMACHO et al., 1992; COUTO, 2000; SANCHES, 2006) e a ocorrência do fungo causador da “vassoura-de-bruxa” do cacauzeiro – *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; SANCHES, 2006). Esses fatos resultaram em danos grandes o suficiente para diminuir significativamente a cacauicultura na região, diminuindo a produção de 400.000 t/ano para menos de 150.000 t/ano (DIAS, 2001), e desde 1997 a grande queda na

produção tem obrigado o Brasil a importar subprodutos de cacau para consumo da indústria de alimentos (ALVES, 2002).

Para o combate á vassoura de bruxa pesquisas foram desenvolvidas sobre cultivares de cacau mais resistentes, produtivos e que dêem origem a matérias-primas com qualidade industrial, além de pesquisas na área genética e de agentes químicos ou biológicos com capacidade de controlar a doença. Uma das formas já encontradas têm sido a seleção e utilização de clones de cacau provenientes de cultivares mais resistentes, desenvolvidos pelo Centro de Pesquisa do Cacau – CEPEC, da Comissão Executiva do Plano da lavoura cacauera – CEPLAC, e dos próprios cacauicultores com orientação técnica do CEPEC. Assim, a produção voltou a aumentar no Brasil, com uma baixa em 1999/2000 de 196 mil toneladas, apresentou elevação da produção para 221 mil toneladas em 2006/2007, de acordo com valores da FAO (FAO, 2008), devendo chegar a 225 mil toneladas em 2014 (ICCO, 2015). Entretanto, segundo Buamah, Dzogbeia e Oldham (1997) o aproveitamento econômico das sementes de cacau depende não só da sua disponibilidade em quantidade, mas também da sua boa qualidade.

A importância econômica do cacau está no fato de ser uma *commodity* com participação relevante nas importações e exportações de produtos agrícolas no mundo, gerando riquezas e divisas para inúmeros países (GOYTON, 2003). De acordo com o Conselho Nacional dos Produtores de Cacau - CNPC (2001) o cacau no Brasil é importante fonte de divisas agrícolas nos estados de Rondônia, Amazonas, Para, Mato Grosso, Espírito Santo e Bahia, sendo ainda para o nosso país uma importante fonte de receitas públicas, renda e emprego, chegando a movimentar, em amêndoas e derivados, cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais.

Além de sua irrefutável importância econômica, a cacauicultura apresenta um grande valor ecológico. Cultivado racionalmente em condições que se assemelham às do seu "habitat" natural em florestas, com um sombreamento permanente de árvores de maior porte, o cacauero protege o solo dos efeitos da erosão e da lixiviação (carreamento de elementos nutritivos pelas águas). Suas lavouras substituem a floresta nativa sem destruir o ambiente ecológico existente, poupando a diversidade e com ela o microclima e a vida das espécies vegetais e animais das áreas cultivadas. Sob este aspecto, o cacauero difere de outros cultivos brasileiros que por suas próprias características se transformaram em lavouras itinerantes, deixando ao longo de sua passagem, vastas áreas de terras esgotadas e improdutivas. Na paisagem rural brasileira, há vários exemplos de cultivos que empobrecem e degradam o ambiente. O cacauero, embora mais exigente quanto às condições de clima e solo, restitui à

terra grande parte daquilo que dela retira, mantém o equilíbrio ecológico e se constitui num cultivo perene, renovável e permanente. Este caráter de lavoura eminentemente estável confere ao cacau uma significativa importância ambiental (CEPLAC, 2003).

1.2. Variedades do cacau

Quanto às variedades do cacau três se destacam: *Criollo*, *Forastero* e *Trinitário*. 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 cacauzeiros dos grupos *Criollos* e *Forasteros* Amazônicos, apresentando, portanto, características intermediárias (BASTOS, 1987; YOUNG, 1994).

O *Criollo* possui sementes de forma oval e normalmente solta na polpa, sua superfície externa é enrugada e possuem 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 tipo *Forastero* 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 a polpa. É considerado bem mais resistente a pragas. Encontrado principalmente na Bahia, Amazonas, países da Ásia e oeste da África, e ainda em todos os países produtores de cacau do mundo. Possui frutos com cerca de 25 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro. Cada fruto contém entre 30 e 50 sementes de sabor doce e ácido. 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, o cacau da variedade *Forastero* tem um sabor mais ácido e característica adstringente (LAJUS, 1982; BECKETT, 2009; SOUZA, 2010).

O terceiro é um híbrido das duas variedades anteriores chamado de *Trinitario*, 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 branca 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).

Os três tipos são reconhecidos pelo conjunto geral de suas características, mas possuem ampla variabilidade. Entretanto, existem algumas distinções mais claras: os *Criollos* normalmente possuem sementes brancas ou de coloração rósea clara e frutos com casca verde ou vermelha, quando imaturos; Os *Forasteros* são frutos verdes quando novos e possuem sementes intensamente pigmentadas; e os *Trinitários* são identificados pela associação das características de ambos os tipos anteriores, com sementes e coloração de frutos variáveis (PIRES, 2003).

As primeiras seleções das variedades de cacau pelos agricultores na Bahia só iniciaram nas décadas de 1940 e 1950, pois só então tal prática foi liberada pelo ICB (Instituto do Cacau da Bahia), SIAL (Estação Instituto Agrônomo do Leste) e a 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).

1.3. Pré-processamento do cacau

As tecnologias de colheita e pós-colheita do cacau possuem grande importância para se obter qualidade nos grãos, sabor e aroma desejáveis, devendo assim se manter atenção aos fatores como a variedade do cacaueiro, manejo agrônomo, condições climáticas, fatores do solo e a tecnologias pós-colheita (BRUNETTO et al., 2007).

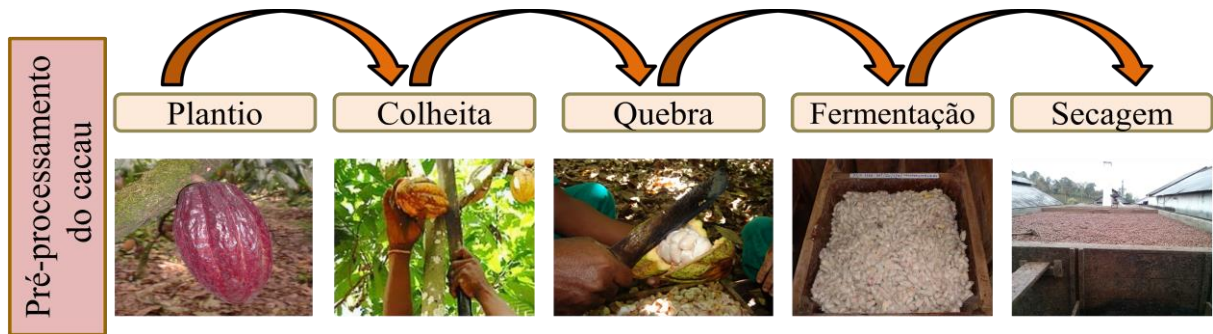
No Brasil o cacau é colhido praticamente durante o ano inteiro, distinguindo-se dois períodos de safra: o principal de outubro a janeiro e o secundário de maio a agosto, sendo que o cacau colhido no segundo período da safra é conhecido como cacau temporão (CRUZ, 2002). O pré-processamento do cacau é demonstrado na figura 1.

Entre o plantio até a primeira colheita são necessários de três a cinco anos, e a polinização e o amadurecimento do fruto decorrem cerca de 180 dias, dependendo da variedade (SEAGRI, 2012).

Quando da colheita, essa é realizada com podões, e a seguir os frutos do cacau são amontoados e abertos com facões, no chão da plantação de cacau. Na colheita é essencial colher apenas frutos maduros, pois somente estes possuem açúcar e outros substratos em quantidade adequada para uma boa fermentação, além disso, é importante não causar nenhum dano aos frutos, caso isso ocorra, poderá dar início à fermentação antes de as sementes serem colocadas no cocho, o que compromete a qualidade das amêndoas de cacau. O intervalo para quebra dos frutos não deve exceder 3 dias após a colheita, pois antes desse período a separação das sementes da casca é fácil, caso o tempo seja maior pode comprometer a qualidade das sementes ocasionando germinação no interior dos frutos, impedindo assim

todas as reações do sabor e aroma do chocolate (LOPES, 2000; CRUZ, 2002; SERRA, 2004). Após a separação da casca, o material interno constituído de amêndoas e polpa (25% do fruto) é movido para a fermentação (OETTERER, 2006).

Figura 2 - Etapas de pré-processamento do cacau.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA.

As sementes do cacau têm forma de amêndoas, sendo por esta razão denominadas também de amêndoas de cacau. Entretanto, de um modo geral, esta denominação é reservada às sementes que já perderam sua capacidade de germinação, o que ocorre durante a fermentação. A semente é composta de casca, membrana prateada ou endosperma, dois cotilédones e radícula. Possui, em geral, 2,5cm de comprimento em média (LAJUS, 1982).

Comumente as sementes de cacau depois de colhidas possuem cor púrpura ou ainda branca, dependendo da variedade plantada, além de sabor amargo e adstringente, não tendo assim nenhum valor como alimento. Após o processo chamado de “cura” é que as sementes/amêndoas terão valor para a indústria, adquirindo uma cor marrom característica, sabor típico do cacau, e sua qualidade definida, boa ou má, dependendo das etapas de fermentação e secagem (OETTERER, 2006).

Zamalloa (1994) afirma que além de estar intimamente relacionado às características genéticas, o sabor dos produtos do cacau é bastante influenciado pelas técnicas de pré-processamento, sendo que o desenvolvimento potencial do sabor depende principalmente das etapas de fermentação e secagem.

No processo fermentativo, a polpa envoltória é degradada devido a ação de leveduras, bactérias ácido-lácticas e ácido-acéticas, presentes naturalmente no ambiente e responsável por uma elevação considerável da temperatura, para cerca de 50°C (CRUZ et al., 2013). Esses microrganismos agem sobre os açúcares e ácidos orgânicos, transformando-os em etanol, ácido láctico e principalmente ácido acético (SCHWAN; WHEALS, 2004).

A sucessão desses microrganismos é influenciada pelos fatores ambientais, como temperatura, pH e quantidade de oxigênio, e a composição da polpa, as condições de colheita do fruto e a contaminação inicial proveniente do meio: cocho de fermentação, mãos dos manipuladores e equipamentos utilizados na quebra dos frutos (CAMU et al., 2007). A quantidade, natureza e distribuição dos microrganismos presentes vão determinar a velocidade e a intensidade da fermentação, bem como a qualidade do cacau fermentado e do chocolate produzido. Mesmo quando as fermentações são realizadas na mesma fazenda, com frutos do mesmo cultivar e nas mesmas condições de fermentação, podem ser obtidas características de sabor diferentes, devido à variabilidade microbiana em cada “monte” de fermentação. Ainda assim, a fermentação do cacau continua a ser realizada de forma tradicional, com fermentações naturais resultando em uma grande diversidade na produção e nas características organolépticas dos produtos finais (CAMU et al., 2008).

O tempo requerido para a fermentação do cacau é variável, e segundo estudos esse tempo sofre influências do material genético, porém, para a ocorrência das principais reações que levam à formação dos principais precursores de sabor do chocolate, as sementes de cacau, devem ser, geralmente, fermentadas por período superior a cinco dias (BECKETT, 1994), não devendo ultrapassar oito dias devido à decomposição protéica e consequente liberação de amônia, obtendo-se assim, um chocolate com odores e sabores estranhos (OTTERER, 2004).

Os açúcares redutores, aminoácidos e oligopeptídeos que são utilizados como substratos pelas enzimas durante a fermentação, originam os precursores que durante a torração geram centenas de compostos voláteis. Os açúcares redutores (glicose e frutose) derivam da hidrólise da sacarose do cotilédono, pela ação das invertases, já os diversos oligopeptídeos e aminoácidos são produzidos pela ação das proteases, principalmente na fermentação. Na torração esses compostos passam por reações não enzimáticas, conhecida como Reações de *Maillard*, com a formação de compostos de *Amadori* e da degradação de *Strecker*, produzindo um grande número de compostos químicos, produção essa que é influenciada ainda pelas condições de secagem e torração, e, essencialmente, da composição de aminoácidos, oligopeptídeos e açúcares redutores (VOIGT; BIEHL, 1995).

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

Após a fermentação inicia-se a secagem, que não deve ser realizada de forma lenta ou mal conduzida, pois pode possibilitar o desenvolvimento de fungos, e assim alterar o sabor do

produto final. Por outro lado, não deve ser demasiada, nem com temperaturas elevadas, pois pode causar problemas com a gordura (manteiga de cacau) e com o desenvolvimento do sabor do chocolate (EFRAIN, 2004). A secagem, assim como a fermentação, é uma etapa fundamental na formação dos precursores do sabor e odor (BECKETT, 2009).

Dependentemente da quantidade de amêndoas de cacau e das condições climáticas, a secagem pode ser efetuada utilizando métodos naturais ou artificiais (NDUKWU, 2009). A secagem natural, ou secagem solar, consiste em dispor o cacau fermentado em áreas cimentadas ou assoalhadas, bandejas, plásticos ou no próprio solo (PONTILLON, 2009).

No Brasil normalmente é feita em barcaças, que são construções típicas constituídas por um lastro de madeira sobre pilares de alvenaria, e uma cobertura que desliza sobre trilhos. A cobertura (chapas de alumínio ou zinco) deve expor as amêndoas ao sol, e quando fechada, deve proteger contra chuva, sereno e calor excessivo. As amêndoas devem ser revolvidas com um rodo de madeira, para evitar aglomerados (OETTERER, 2006).

Dentre os fatores essenciais para a secagem das amêndoas de cacau, está a velocidade de remoção da água. A secagem rápida ocasiona perda de umidade na superfície da amêndoa, entretanto o interior continua úmido, depreciando o produto, e proporcionando o 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 abolido em processos posteriores. Além disso, ocorre o endurecimento com eventual ruptura da testa. No caso da secagem demasiada, ocorre perda de peso, tornando as amêndoas quebradiças (SOARES, 2001; EFRAIM et al., 2006).

Lopes (2000), Oetterer (2006) e Afoakwa (2010) afirmam que durante a secagem as enzimas atuam no interior da amêndoa, promovendo as reações bioquímicas que vão estabilizar o sabor e a cor, características do chocolate, com acidez reduzida. A temperatura da secagem é importante na qualidade final das amêndoas, sendo o ideal na faixa de 35 a 40°C, ótima para as enzimas. O uso de temperaturas menores ou maiores à perda na qualidade, pois as enzimas agem mais lentamente ou são desnaturadas. O período ótimo é de 4 a 5 dias, e a umidade das amêndoas deve ser reduzida de 40-50% para 6-8%, maior que 8% de umidade pode ocorrer crescimento de fungos no armazenamento e transporte.

Após serem secas, cuidados devem ser tomados no armazenamento, as condições que as amêndoas são armazenadas dever ser observadas, evitando o armazenamento de grandes volumes em ambientes com elevada umidade e pouca circulação de ar, já que as amêndoas de cacau são higroscópicas e seu ganho de umidade pode levar ao desenvolvimento de fungos e outros microrganismos indesejáveis (BECKETT, 1994).

O armazenamento normalmente é feito em sacos de aniagem de 60 kg e permanecem nos armazéns dos portos por cerca de 15 dias e nas cooperativas vários meses. As amêndoas devem ter 7% de umidade e estar em equilíbrio com a umidade relativa do ar (70%) (OETERRER, 2006). Segundo Serra (2004) é importante que as instalações destinadas ao armazenamento de cacau tenham luminosidade e aeração adequadas.

E, por fim, antes do início do preparo do chocolate, o cacau deve ser torrado, que apesar de não ocorrer normalmente na fazenda, potencializa os resultados das etapas anteriores. A etapa de torração é importante já que durante esse processo as mudanças bioquímicas ocorridas no interior dos grãos e iniciadas na fermentação e delongadas pela secagem são paralisadas, a atividade enzimática é mantida até que as enzimas são inativadas pela ação do calor e diminuição drástica da umidade, dando assim abertura a outras reações não enzimáticas (DAUD; TALIB; KYI, 2007; FERRÃO, 2008).

Segundo Possignolo (2010) o sabor e o aroma (*flavour*) de chocolate são únicos e exclusivos, obtidos somente de sementes fermentadas, secas e torradas de *Theobroma cacao* L., não podendo ser sintetizados artificialmente. O *flavour* deriva da interação de centenas de compostos (mais de 400 foram descritos), incluindo pirazinas, tiazóis, oxazóis, derivados de pirróis, piridinas e furanos, sendo que o desenvolvimento de métodos analíticos resulta num aumento de substâncias reconhecidamente associadas ao sabor de chocolate. Entretanto, nem todos os componentes individuais identificados devem ser considerados como componentes significativos de sabor e aroma, já que o impacto depende das suas concentrações e das intensidades (BONVEHÍ, 2005).

1.3.1. Fermentação

Dos frutos, após abertos, são retiradas as sementes e as polpas manualmente, sendo essas imediatamente contaminadas por microrganismos do meio ambiente (presentes nas superfícies dos frutos, folhas, facas, cestos, etc.), dando assim início de forma espontânea a fermentação (SCHWAN; WHEALS, 2004; DE VUYST et al., 2010). Para Lagunes-Galvez et al. (2007) a fermentação é uma das etapas da pós-colheita que mais afetam a qualidade dos produtos obtidos a partir do cacau.

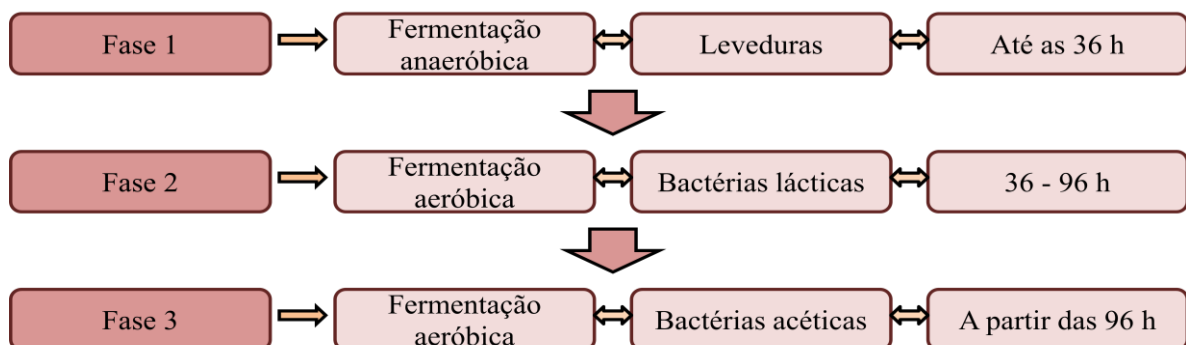
Segundo Dias (1987) a Comissão Executiva de Plano de Lavoura Cacaueira – CEPLAC recomenda o uso de caixas de madeira, conhecidas como cochos de fermentação, construídas medindo de 0,90 a 1,20 m de largura por 0,90 a 1,00 m de altura e comprimento variável de 2,00 a 6,00 m. As caixas devem ser dotadas de paredes divisórias removíveis para facilitar o revolvimento das sementes durante a fermentação. O fundo e as laterais devem

conter orifícios com 0,6 a 1,0 cm de diâmetro, espaçados de 15 em 15 cm para a drenagem dos líquidos liberados durante o processo e aeração da massa.

Durante a fermentação as sementes e as polpas do cacau podem ser empilhadas aos montões ou em caixas, essa etapa é realizada de forma tradicional e pode durar de quatro a seis dias (WOOD; LASS, 2001; SCHWAN; WHEALS, 2004; OETTERER, 2006; PONTILLON, 2009; DE VUYST et al., 2010). Esse processo é imprescindível, por ser o responsável pelo desenvolvimento dos precursores e os inúmeros compostos do sabor (BECKETT, 2009). É importante salientar que durante o processo fermentativo é essencial o revolvimento das sementes, para aeração da massa e uniformização da taxa de fermentação, evitando a aglomeração dos grãos de cacau e mantendo a temperatura e do pH adequados (SENANAYAKE; JANSZ; BURKLE, 1997).

Segundo Schwan e Wheals (2004) normalmente em três fases ocorre o processo de fermentação, que é simplificado na figura 2 e descrito a seguir.

Figura 3 - Fases da fermentação do cacau.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA.

- ✓ 1ª Fase: Ação de leveduras anaeróbicas: Nas primeiras 24-36 horas as leveduras transformam o açúcar da polpa em álcool sob condições anaeróbicas em um pH abaixo de 4,0. Devido à presença do álcool e do ácido acético no segundo dia, as sementes morrem, e a partir desse momento passam a ser chamadas de amêndoas de cacau. A partir do segundo dia até o final do processo se faz o revolvimento da massa, isso para que a temperatura não passe de 45 °C favorecendo assim a ação das enzimas. A presença do álcool produzido inibe o desenvolvimento dessas leveduras, ocorrendo assim à autólise das células das leveduras com conseqüente liberação das enzimas (enzimas exógenas), também importantes para promover o *flavour* de chocolate. Dentre as leveduras presentes, as principais espécies são *Saccharomyces cerevisiae* e a *Candida krusei*, predominantes na Bahia. A polpa, que durante a fermentação se transforma em um líquido, escorre e é

drenada. Como resultado da drenagem, o ar é introduzido no sistema e começa a segunda fase de fermentação (BISPO, 1999; KATTENBERG; WILLENSEN, 2002; SCHWAN; WHEALS, 2004; OETTERER, 2006).

- ✓ 2ª Fase: Ação de bactérias lácticas: Estão presentes desde o início da fermentação, mas só predominam após a diminuição das leveduras, entre 48 e 96 horas. Essas bactérias convertem açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido láctico. Nessa fase, existe uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações com alterações de sabor, aroma e cor da semente. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50 °C. A partir das 48 horas sugere-se revolver as amêndoas regularmente para que a temperatura e a fermentação sejam uniformes em todos os grãos (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; SCHWAN; WHEALS, 2004).
- ✓ 3ª Fase: Ação de bactérias acéticas: São as responsáveis pela conversão do álcool em ácido acético, o que tornam o tegumento permeável, fazendo com que as amêndoas sofram a ação das enzimas. Vale ressaltar que a oxidação dos polifenóis que formam ou não complexos com as proteínas e peptídeos levam a redução da adstringência e do amargor (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Neste processo, o pH, a acidez da polpa e do cotilédone, a temperatura do ambiente e da massa, o tipo de sistema, o revolvimento da massa e a microflora presente são fatores de grande importância (ROHAM; CONNEL, 1964; LOPEZ; QUESNEL, 1973).

Conforme Ferrão (2008), conhecer, em termos práticos, o fim da primeira e o início da segunda etapa da fermentação do cacau são de enorme importância, não só para que se possa criar as condições ideais, mas também para encurtar o tempo de fermentação. Segundo o autor, o pigmento púrpura da cianidina cora todas as células dos cotilédones, podendo ser visto a “olho nu”, observando a superfície da testa da semente no ponto em que ela é mais sensível, isto é, na extremidade correspondente ao embrião. No momento em que a coloração violácea aparecer nesta região, é considerado o término da primeira fase da fermentação, ainda na concepção do autor, isto ocorre entre 36 e 48 horas, e a partir daí deve ser feito o revolvimento ou a passagem da massa para outra caixa, contudo esta conclusão deve ser cautelosa, já que existem diferenças na microbiota natural, clima e variedade de frutos entre as fermentações nas fazendas produtoras, o que poderá causar alterações nas etapas fermentativas.

Com a morte do embrião, é perdida a permeabilidade seletiva de membranas, possibilitando o contato entre enzimas e substratos. Assim, após a morte do gérmen, uma série de reações bioquímicas complexas são induzidas, dentro e fora das amêndoas, gerando

os precursores (aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores) de sabor, aroma e cor do chocolate, que são produtos das reações de proteólise e desmontagem de polissacarídeos (LOPEZ, 1986; HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004; AFOAKWA, et al., 2008; BECKETT, 2009; FOWLER, 2009; DE VUYST et al., 2010; THOMPSON et al., 2013). Estas reações e transformações afetam significativamente a qualidade do produto final, principalmente os aspectos que envolvem a formação de sabor (SCHWAN, 1996).

É importante ressaltar que as proteases são encontradas naturalmente nas sementes de cacau (enzimas endógenas) antes do processo de fermentação, porém, não são ativas quando as sementes estão no interior dos frutos, ou seja, quando os mesmos ainda não foram partidos, devido às compartimentações celulares que impedem seu contato com o substrato (EFRAIM, 2004).

Atualmente já tem sido demonstrado através de estudos que as reações que possibilitam a formação de precursores de sabor do chocolate, são induzidas por enzimas endógenas presentes na semente do cacau, essas enzimas existem inerentes às sementes de cacau e são ativadas depois da ruptura da célula e acidificação durante a fermentação (AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2009; CRUZ et al., 2013). Entretanto, outros pesquisadores, realizando estudos paralelamente, acreditam que enzimas provenientes de microrganismos também possuem importância no desenvolvimento dos precursores do *flavour* do chocolate (LEVANON; ROSSETINI, 2001).

Na fermentação a secreção de algumas enzimas por microrganismos é útil para a produção de enzimas pectinolíticas, que podem melhorar a aeração da massa; enzimas amilolíticas, que aumentam a concentração de açúcares redutores por hidrólise do amido, e as enzimas proteolíticas que geram aminoácidos livres (SCHWAN, 1996; AMIN; JIMAP; JAMILAH, 1998).

Além das leveduras já citadas, estudos demonstraram que leveduras do gênero *Candida* são capazes de produzir lipases, poligalacturonases e proteases, assim como outras leveduras e fungos já foram associados à produção destas ou outras enzimas, como algumas espécies de *Aspergillus* que possuem atividade lipolítica, celulolítica e proteolítica (RIBEIRO, 1990; OYEWOLE, 2001; D'ANNIBALE et al., 2006; ZOUMPANIOTI et al., 2006).

2. Enzimas

2.1. Características gerais

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

No surgimento das primeiras civilizações, as enzimas já eram utilizadas empiricamente como catalisadores biológicos em diversos processos metabólicos na produção de alimentos, como vinho, queijo e pães. Deste modo, a utilização biotecnológica das enzimas foi estabelecida previamente à obtenção de conhecimentos a respeito da natureza e dos mecanismos moleculares nos quais se encontram envolvidas (SPIER, 2005; LEHNINGER; NELSON, 2007). Assim, atualmente os conhecimentos sobre a constituição e função protéica permitiram a aplicação das enzimas em diversos processos biotecnológicos (LEADLEY, 1993).

O pH, temperatura, concentração de substrato e a presença de inibidores são os principais alteradores da ação enzimática (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

As enzimas, sem exceções, são sensíveis às variações da concentração de H^+ do meio. Existe uma faixa de pH para qual a atividade enzimática é máxima. Habitualmente cada enzima possui um pH ótimo porque, como outras proteínas, estas possuem muitos grupos ionizáveis, pertencentes a resíduos de aminoácidos da molécula, de maneira que as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a sua atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Isto pode acarretar em uma troca na velocidade máxima de reação ($V_{máx}$), uma troca na afinidade da enzima pelo substrato (K_m) ou uma alteração na estabilidade da enzima, sendo esta dependente, exclusivamente, do tempo em que a enzima se mantém exposta ao pH desfavorável. De forma semelhante, os grupos ionizáveis do substrato podem ser afetados pelo pH, já que cada pH possui estados de ionização diferentes, influenciando a formação do complexo enzima-substrato (THYS, 2004).

De modo análogo ao pH, existe uma zona de temperatura para qual a atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é decorrência de duas disposições adversas. De um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura amplia a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e, de outro, a desnaturação da enzima, frente à ação do calor. A desnaturação da proteína leva mais tempo para ocorrer, mesmo que o aumento da velocidade de reação se produza de

maneira momentânea. Desta forma, a uma determinada temperatura, a atividade real, medida em unidades, irá diminuindo, à medida que se aumenta o tempo de incubação, assim esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e a quaternária da proteína e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade (TREVAN et al., 1990).

Além dos já citados, as enzimas podem ser influenciadas pela presença de inibidores, sendo que inibidor enzimático de proteases é todo o componente que reduz a medida da taxa de hidrólise de um dado substrato. Podem ser conhecidos como inibidores reversíveis ou irreversíveis, dependendo da forma de atuação desses inibidores normalmente no sítio ativo da enzima (WISEMAN, 1991).

Tortora, Funke e Case (2005) afirmam 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; VIEIRA, 2002).

2.2. Atividade enzimática no cacau

A ação de enzimas sobre os carboidratos, proteínas e polifenóis, aliados a ação de microrganismos presentes na polpa, são os responsáveis pelos precursores do aroma e sabor do cacau. Diferente de outras matérias-primas fermentadas, as enzimas endógenas desempenham um papel crucial nesse desenvolvimento (LEHRIAN; PATTERSON, 1983). A fermentação e, conseqüentemente, a morte das sementes facilitam a atuação da enzima, principalmente pelo acesso ao substrato (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

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

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

Tabela 3 - Principais enzimas ativas na fermentação do cacau.

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

Fonte: LOPEZ, 1986.

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

Na verdade, desde a segunda metade do século XX a atividade enzimática na fermentação de amêndoas de cacau já é conhecida. Entretanto, devido às diversas variações causadas pelos diferentes genótipos, a origem geográfica, os tipos de cochos empregados e os métodos de fermentação utilizados, tornam a confiabilidade e a comparação das atividades enzimáticas do cacau complicadas, com uma falta de estudos sistemáticos abordando a sua atividade em diferentes cultivares submetidos às mesmas condições de fermentação, secagem e torração, assim como com variações controladas desses atributos (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998; EFRAIM, 2004).

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).

Macêdo (2014) caracterizou as polifenoloxidasas e as invertases dos mesmos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188 na mesma fazenda localizada no Sul da Bahia. O estudo demonstrou uma boa afinidade das polifenoloxidase (PPO) com o catecol, e evidenciou que para o cultivar TSH 1188 a semente apresentou atividade inferior que a polpa, e para o cultivar PH 16, as atividades possuem comportamentos similares. Foi evidenciado que a ação da PPO na semente em ambos os cultivares, é favorecida pelo pH no estágio inicial da fermentação (primeiros 3 dias). A polifenoloxidase apresentou queda em sua atividade com o aumento gradativo da temperatura, o que implica na necessidade de manter temperaturas entre 25 e 30°C para a melhor atividade da enzima. Ao analisar o pH percebeu-se que a invertase neutra atua fora da faixa de pH durante todo o processo fermentativo, não possuindo assim a enzima atividade nas condições de fermentação encontrados. Também foi evidenciado que a atividade da enzima é potencializada com temperaturas entre 50 e 52°C. A autora verificou ainda que a atividade da invertase ácida é de 4 a 5 vezes maior do que a invertase neutra. O estudo chama a atenção para a necessidade de intervenção no processo fermentativo, no intuito de prolongar o período de atuação das enzimas no processo.

2.2.1. Protease

As proteases, também chamadas de peptidases, como recomendado pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), são enzimas do grupo das hidrolases que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, transformando-as em peptídeos de peso molecular menor ou em aminoácidos, e podem ainda apresentar atividade sobre ligações éster e amida. O grau de especificidade das proteases está relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e os adjacentes a eles (BARRETT, 1980; TURK, 2006; KOBLITZ, 2008).

As enzimas proteolíticas constituem um grupo único de enzimas que ocupam uma posição central com aplicações em vários campos, tais como, processos fisiológicos e patológicos e aplicações comerciais em várias áreas (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Essas enzimas são classificadas de acordo com sua fonte (animal, vegetal, microbiana), sua ação catalítica (exoproteases e endoproteases) ou de acordo com a natureza do seu sítio catalítico (serino, sulfidrílicas, ácidas e metalo) (PALMA et al., 2002).

Quanto ao modo de ação são divididas em exopeptidases, que operam nas terminações da cadeia polipeptídica, e endopeptidases, que agem nas ligações no interior da cadeia protéica. Dentre as exopeptidases temos aquelas que catalisam a clivagem de seus substratos a partir de sua porção carboxi- terminal, as carboxipeptidases, liberando um único aminoácido ou um dipeptídeo, ou amino- terminal, as aminopeptidases, sendo que essa última pode liberar um único aminoácido, um dipeptídeo, ou um tripeptídeo. As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino- e carboxi- terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores. De modo geral apresentam maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos, e maior atividade em valores de pH ácido (BARRETT, 1980; TURK, 2006; KOBLITZ, 2008).

As proteases são encontradas no próprio cacau, mas além dessas, no processo fermentativo, é encontrado enzimas provenientes de vários microrganismos, como bactérias, protozoários e fungos. Elas podem ser extracelulares e intracelulares, e ligadas ou não a membrana (NEURATH, 1989).

Já se tem conhecimento que as proteases ao realizarem a proteólise, produzem precursores (peptídeos e aminoácidos livres) que irão, juntamente com os açúcares redutores, participar da Reação de *Maillard* durante a torração, contribuindo assim para o desenvolvimento do aroma e sabor do chocolate (VOIGT et al., 1994; HUANG; BARRINGER, 2010).

Segundo Nascimento (2010) a atividade enzimática, principalmente proteolítica, e a composição das proteínas dos cotilédones, variáveis de cultivar para cultivar, são a principal influência para a produção de melhores precursores de sabor do chocolate.

Apesar de já apresentada à atividade das proteases no cacau, é importante salientar que a sua utilização pela indústria de alimentos remonta desde a antiguidade (WORKMAN; FEARING, 1986; BARRETT, 2004). Elas são usadas em várias aplicações, como nos processos de fermentação e produção de alimentos orientais, na produção de gelatina hidrolisada e leite de soja. São utilizadas também na clarificação de sucos através da hidrólise das proteínas solúveis neles contidos em altas concentrações, as quais provocam turbidez e formação de sedimentos indesejáveis durante a estocagem (WORKMAN; FEARING, 1986). Na indústria leiteira são úteis na fabricação de queijos, onde as proteases são empregadas para maturação e desenvolvimento da textura e do sabor. Além das já citadas, as proteases são usadas ainda para outros ramos da indústria de alimentos como na panificação, produção de proteínas de soja e carnes, evidenciando assim a sua grande utilização pelo setor de alimentos,

e ainda de detergentes e farmacêuticos (RAO; TANKSALE; DESHPANDE, 1998; SAID; PIETRO, 2002).

Pode-se observar o surgimento de estudos como o realizado por Nascimento (2010), onde foram realizadas intervenções no processo fermentativo do cacau, através de tratamentos com proteases microbianas, animais e vegetais, e avaliados seus resultados através principalmente de análises sensoriais. Nesse trabalho a autora observou que a adição de proteases de origem vegetal foi rejeitada pelos provadores. Mas verificou uma aceitação favorável às amostras conduzidas com enzimas animais e microbianas, sendo essa última, segundo a pesquisa, a mais recomendada, já que além do exposto, ainda representa um menor impacto financeiro pela questão custo/rendimento.

Oliveira (2015) realizando trabalhos com intervenções no processo de fermentação do cacau avaliou a formação de peptídeos que caracterizam o *flavour* de chocolate desejável em amêndoas submetidas a tratamentos com proteases microbianas. O trabalho permitiu concluir uma eficiência do tratamento enzimático devido à presença dos peptídeos fundamentais e demonstra ainda que esse tratamento pode levar à produção de *flavour* de chocolate desejável mesmo partindo de amêndoas de cacau de baixa qualidade.

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. United Kingdom: John Wiley And Sons Ltd, New Delhi, Índia, 2010.
- AFOAKWA, E.O., PATERSON, A., FOWLER, M., RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**.48, 840 e 857. 2008.
- AIME, M.C., PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, n. 97, p. 1012-22. 2005.
- ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba.**Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba – SP, p 70. 2002.
- AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. (1998).Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation.**Journal Scienc Food Agricultural**.v.76, p.123-128. 1998.
- AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. **Aspectos de localidad de cocoa**. 2007, 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 laprovincia de esmeraldas**. Quevedo, Los Ríos, Equador: INIAP. p. 120 (Boletín Técnico, 135). 2009.
- AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillusniger* 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.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.**Biotechnologia industrial**. Sao Paulo: E. Blucher, vol. 4. 2001.
- ARAUJO, Q. R. GATTWARD, J. N.; ALMOOSAWI, S.; SILVA, M. D. C.; DANTAS, P. A.; JÚNIOR, Q. R.Cacao and Human Health: from Head to Foot - A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 24 ago. 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.**Official Methods of Analysis of AOAC International**. 2000.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F.**Biochemical Engineering Fundamentals**.Second edition. New York. 1986.
- BARRETT, A. J. The many forms and functions of cellular proteinases.**Federation Proceedings**, v. 39, n. 1, p. 9-14, Jan. 1980.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F.; JR., E. D. S. Handbook of proteolytic enzymes.**Elsevier**, London: Academic Press, 2004.

BASTOS, E. **Cacau, a riqueza agrícola da América**. São Paulo: Ícone, 103p. 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.

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

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

BISPO, E. S. **Processo de alcalinização dos “nibs” de cacau (*Theobroma cacao* L.) e avaliação da qualidade do pó**. 218p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

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

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

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

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.

BUAMAH. R.; DZOGBEIA, V. P.; OLDHAM, J. H. Pure yeast cultura fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.): effect on yield of sweating and cocoa bean quality. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Utrecht, v. 13, n. 4, p. 457-462, Jul, 1997.

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.

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

CAMU, N.; WINTER, T.; 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**. Washington, v. 73, n. 6, p. 1809 – 1824, Mar. 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.

CEPLAC – **Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira**. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/>> Acesso em 20 de agosto de 2015. 2003.

CNPC - **Conselho Nacional dos Produtores de Cacau**. Coopercacau. Mercado do cacau, Ilhéus, 2001.

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

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

COUTO, V. A. O território do cacau no contexto da mundialização. **Bahia Análises & Dados**. Salvador-BA. SEI v.9, n.4, p.38-52, Março, 2000.

CRUEGER, W. E.; CRUEGER, A. **Biotecnologia: Manual de Microbiologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, 413p. 1993.

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.

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

CUENCA, M. A. G.; NAZARIO, C. C. Importancia Economica e Evolucao da Cultura do Cacau no Brasil e na Regiao dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. **Documentos 72- EMBRAPA Tabuleiros**, Aracaju, 2004.

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

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, May. 2007.

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

DIAS, J. C. **Permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético: evolução na fermentação e efeito da adição de celulasas, antes da secagem, na acides do produto final**. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola superior de Lavras, Lavras, 1987.

DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa: Funape, UFG 578p. 2001.

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

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. **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.

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.

FAO – **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. FAOSTAT, 2008. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 20 de abril de 2015.

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

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

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

FORSYTH, W. G. C; QUESNEL, V. C. Cacau glycosidase and colour changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, p. 505-509, 1958.

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

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

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

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de Bacillus sp.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [Dissertação de mestrado] Faculdade de Agronomia, 80p. 2006.

GRAMACHO, I. DA C. P.; MAGNO, A. E. DE S.; MANDARINO, E. P.; MATOS, A. **Cultivo e Beneficiamento do Cacau na Bahia**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. CEPLAC. Ilhéus - BA – Brasil. 1992.

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

HANSEN, C. E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 77, 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**. 80, p. 1193-119. 2000.

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

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

ICCO (International Cocoa Organization), **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, Vol. XLI, No. 2, Cocoa year 2014/15. Disponível em http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html. Acesso em 04 de setembro de 2015. 2015.

ICCO (International Cocoa Organization), **Origins Of Cocoa And Its Spread Around The World**. Disponível em: <http://www.icco.org/about-cocoa/growingcocoa>. html. Acesso em 28 de março de 2015. 2013.

KATTENBERG, H. R.; WILLEMSSEN, J. H. A. **Aroma extracts from cocoa**. *Manufature Confectioner*, 82, p. 73. 2002.

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

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

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

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

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

LEADLAY, P. F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993.

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

_____.; _____. **Princípios de bioquímica**. 5 ed. São Paulo, Brasil: Sarvier, 2007.

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

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

LIMA, U. A. (Coordenador). **Matérias-primas dos alimentos**. São Paulo, SP: Blucher, XXII, 402 p, 2010.

LIMA, E. M. **Caracterização da produção, resistência à vassoura de - bruxa e diversidade genética molecular de cacau em Itagibá, BA**. 64 p. Dissertação (Mestrado Em Produção vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia. 2007.

LIPPI, D. Chocolate and medicine: dangerous liaisons. **Nutrition**. v. 25, n. 11-12, p. 1100–3 , 2009.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobromacacao 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 - strategiesandresults. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 73-81. 2011.

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

LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V. C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 24, n. 3, p. 319-324.1973.

MACÊDO, A. S. L. **Caractrização de enzimas em dois cultivares de cacau *Theobroma cacao L.*** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Ciência dos alimentos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

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.

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

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

NASCIMENTO, H. S. S. O. **Melhoria do aroma de chocolate, por tratamento enzimático, em amêndoas de cacau de baixa qualidade**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana-BA, 2010.

NDUKWU, M. C. Effect of drying temperature and drying air velocity on the drying rate and drying constant of cocoa bean.**Agricultural Engineering International: CIGR E J.**, Manuscript. v.11. 2009.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Elsevier Science Publishe**.Volume 14, p. 268-271. 1989.

NIELSEN, D. S., TENIOLA, O. D., BAN-KOFFI, L., OWUSU, M., ANDERSSON, T. S., HOLZAPFEL,W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiology*. 114, 168e186. 2007.

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

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

OLIVEIRA, U. B. **(Re) organização da produção agropecuária e o contexto ambiental em Ibicarai – BA 1990 a 2007**. 99 f. Dissertacao (Mestrado em Memoria, Cultura e Desenvolvimento Regional) Universidade do Estado da Bahia – UNEB Santo Antonio de Jesus – BA, 2008.

OLIVEIRA, H. S. S. **Estudo do efeito de tratamento enzimático sobre as características de qualidade de amêndoas de cacau e sua influência no flavor de chocolate**. 151 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, 2015.

PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 521-530, 2002.

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

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

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

PONTILLON, J. Do cacau ao tablete. **A Ciência na cozinha**, São Paulo, v. 1, p. 62-71, 2009.

PORTE, A., REZENDE, C. M., ANTUNES, O. A. C. Produção de voláteis via sistemas modelo de Maillard usando glicose e l-aminoácidos sob diferentes condições de pH. **Revista Universidade Rural. Série Ciências Exatas e da Terra**, Seropédica, RJ, EDUR, vol. 26. 2007.

POSSIGNOLO, A. A. **Perfil protéico de sementes de acessos de cacau no desenvolvimento do sabor de chocolate.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba – SP, p.116, 2010.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p. 597-635, 1998.

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

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.

ROHAN, T. A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: production of reduction sugars during fermentation of cocoa beans. **Journal of Food Science**, v.32, n. 4, p. 399-402, 1967.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico.** Ed. Eventos. p. 121, 2002.

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, Bahia, 2006.

SANTOS, D. S. **Inoculação de leveduras starters na fermentação do cacau para melhoria do flavor.** Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz (Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia Molecular), Ilhéus, Bahia, 2010.

SCHWAN, R. F. **Microbiology of cocoa fermentation: a study to improve quality**. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CACAU, 12, Salvador, BA, nov. Salvador: CEPLAC, 1996.

_____. 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**, v. 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 setembro. 2015.

SENANAYAKE, M.; JANSZ, E. R.; BUKLE, K. A. Effect of Different Mixing Intervals on the Fermentation of Cocoa Beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Davis, v. 74, n.1, p. 42 - 48. May. 1997.

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

SILVA NETO, P. J.; MATOS, P. G. G.; MARTINS, A. C.; SILVA, A. P. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. 125p, Belém, CEPLAC, 2001.

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

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 Theobromacacao: novas perspectivas para a multiplicação de cacauero. Jaboticabal: **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29(2),0-0. 2007.

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, p.110, 2010.

SOUZA, C. A. S; DIAS, L. A. S. **Melhoramento ambiental e socio-economia**. In: DIAS, L. A. S. Melhoramento genético do cacauero. Vicosa: Folha de Vicosa. p.1-47. 2001.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. 178p.

STURM, A. Invertases primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p.1-7, 1999.

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

THYS, R. C. S. **Produção, caracterização purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. Kr 10**. Dissertação de Mestrado (Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 114 p. 2004.

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

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biotecnologia: princípios biológicos**. Zaragoza: Acríbia, 284p. 1990.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, Sept. 2006.

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

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

VIVANT, V. Chocolate: SUS mitos y verdades. **Nutrinfo**, Buenos Aires, p. 1-15. 2004.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3ªed. 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.

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

WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. **Chocolate in health and nutrition**. New York: Humana. p. 553 2013.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Zaragoza: Acribia, 444p. 1991.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. **Food Research International**, n. 33, p. 449-459, 2000.

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

WORKMAN, R. L.; FEARING, H. W. Potential model calculation of proton-proton bremsstrahlung using the Paris potential. **Physics Review C**. v. 34, p. 1158-64, 1986.

YANES, M. G. **El cacao: origen, cultivo e industrializaciónen Tabasco**. Tabasco, México: Centro de Investigación de CienciasAgropecuarias. p. 11. 1994.

YOUNG, A. M. The chocolate Tree. **A natural history of cacao**. Smithsonian Institution Press. 200p. 1994.

ZAMALLOA, W. A. C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ZOUMAS, B. L.; KREISER, W. R.; MARTIN, R. A. Theobromine and caffeine content of chocolate products. **Journal of Food Science**, v 45, p 314-316, 1980.

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

CAPITULO II

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

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

RESUMO

O cacau é cultivado com várias finalidades, mas principalmente para a produção do chocolate. Para a obtenção do *flavour* característico do chocolate, o cacau é submetido a uma série de etapas de beneficiamento, entre as quais, a fermentação da polpa e semente desencadeia determinadas reações bioquímicas que proporcionam o desenvolvimento dos precursores e compostos do sabor e odor. Sabe-se que essas reações bioquímicas são levadas a cabo por enzimas, dentre as quais se destacam as proteases. Assim, nosso objetivo foi caracterizar a atividade enzimática das proteases e suas isoenzimas nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188, produzidos na região Sul da Bahia, relacionando-a com as condições do processo fermentativo. As proteases e suas isoenzimas da polpa e da semente foram extraídas e semi-purificadas das polpas e sementes dos dois cultivares de cacau. As atividades das proteases foram determinadas variando substrato, pH e temperatura, e os valores confrontados com os parâmetros das fermentações (pH e temperatura), e ainda determinado os parâmetros cinéticos e a atividade de suas isoenzimas: a aminopeptidase, carboxipeptidase e a endoprotease. Nas condições de experimento foi evidenciado diferenças nas atividades das proteases quanto aos diferentes cultivares do cacau, para as diversas condições analisadas, sendo o substrato com o qual a enzima apresentou maior atividade a albumina bovina sérica. O pH ótimo foi 5,7 e a temperatura ótima de 50 °C para a polpa e 3,1 e 32 °C para a semente no cultivar PH 16. Para o cultivar TSH 1188 o pH ótimo foi de 4,1 para a polpa e a semente, e a temperatura ótima foi de 50 °C para a polpa e de 29 °C para a semente. Na avaliação dos parâmetros cinéticos a maior afinidade foi observada com a albumina na polpa do PH 16 e na semente do TSH 1188. Quando avaliada a atividade das isoenzimas observa-se uma maior atividade destas nas sementes e no cultivar TSH 1188. Quando correlacionado com os parâmetros fermentativos, pode-se perceber que as condições para a atividade enzimática não são as melhores determinadas.

Palavras-chave: Aminopeptidase. Carboxipeptidase. Endoprotease. Ligações peptídicas. Amimoácidos.

ABSTRACT

The cocoa is grown for various purposes, but mainly for the production of chocolate. To obtain the characteristic flavor of the chocolate, cocoa is subjected to a series of processing steps, including the fermentation of the pulp and seed triggers certain biochemical reactions which provide the development of precursors and compounds of the taste and odor. It is known that these biochemical reactions are carried out by enzymes, among which stand out the proteases. So, our goal was to characterize the enzymatic activity of protease and its isoenzymes in cacao cultivars PH 16 and TSH 1188, produced in southern Bahia, linking it to the conditions of the fermentation process. The protease and its isoenzymes pulp and seed were extracted and semi-purified pulps and seeds of both cocoa varieties. The activities of protease were determined varying substrate, pH and temperature, and the values faced with the parameters of fermentation (pH and temperature), and yet determined the kinetic parameters and the activity of its isoenzymes: aminopeptidase, carboxypeptidase and endoprotease. In the experiment conditions, showed differences in the activities of the different proteases as cocoa cultivars analyzed for the various conditions, the substrate with which the enzyme showed greater activity bovine serum albumin. The optimum pH was 5.7 and the optimum temperature of 50 ° C for pulp and 3.1 and 32 ° C for seed in cultivating PH 16. To cultivate TSH 1188 the optimum pH was 4.1 for the pulp and seed, and the optimum temperature was 50 ° C for pulp and 29 ° C for seed. In assessing the highest affinity kinetic parameters was observed with albumin PH 16 in the pulp and seed TSH 1188. When evaluated the activity of the isozymes observed increased activity of those seeds and the growing TSH 1188. When correlated with fermentative parameters, it can be seen that the conditions for enzymatic activity are not certain the best.

Keywords: Aminopeptidas. Carboxypeptidase. Endoprotease. Peptide bonds. Amino acids.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do cacau se dá com várias finalidades, como para a preparação de pastas e extração de gorduras (manteiga de cacau), para a exploração de compostos como flavonoides e alcalóides purínicos amplamente estudados na indústria farmacêutica, mas principalmente, para a produção do chocolate, um dos alimentos mais apreciados e consumidos do mundo (AMORES; JIMÉNEZ, 2007; AMORES et al., 2009; ARAUJO et al., 2013). Das 22 famílias conhecidas do gênero *Theobroma*, apenas o cacau (*Theobroma cacao* L.) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) são utilizadas com fins econômicos (SODRÉ, 2007).

Para a produção do chocolate a primeira etapa é submeter à polpa e a semente do cacau ao processo de fermentação, no qual acontece uma série de reações bioquímicas necessárias, além da separação da polpa e da semente. Essa etapa é responsável pelo desenvolvimento dos precursores e dos compostos do sabor nas amêndoas de cacau (OETTERER, 2006).

Durante o processo de fermentação a polpa envoltória é degradada, através da ação de bactérias ácido-acéticas, ácido-lácticas e de leveduras, presentes naturalmente no ambiente, elevando assim a temperatura do processo fermentativo para cerca de 50°C. A formação de ácidos possibilita a diminuição do pH, que aliado ao aumento da temperatura, são responsáveis pela morte do embrião e acidificação do tecido armazenado, possibilitando a perda da permeabilidade seletiva das membranas, e, conseqüentemente, o contato das enzimas com os substratos. Essas enzimas endógenas são as principais responsáveis pelos precursores do sabor no chocolate (CRUZ et al., 2013).

Desde a segunda metade do século XX já é estudada a atividade enzimática na fermentação da amêndoa de cacau, e as principais enzimas para a formação do *flavour* do chocolate acreditam-se que sejam a polifenoloxidase, a invertase e a protease (HANSEN; DEL ORMI; BURRI, 1998; ROBINSON; ESKIN, 1991).

As proteases são enzimas que atuam sobre as proteínas transformando-as em peptídeos de peso molecular menor ou em aminoácidos (LIMA et al., 2001). Já se tem conhecimento que as proteases ao realizarem a proteólise, produzem precursores (peptídeos e aminoácidos livres) que irão, juntamente com os açúcares redutores, participar da Reação de *Maillard* durante a torração, contribuindo assim para o desenvolvimento do aroma e sabor do chocolate (VOIGT et al., 1994; HUANG; BARRINGER, 2010).

Quanto ao modo de ação as proteases são divididas em exopeptidases, que operam nas terminações da cadeia polipeptídica, e endopeptidases, que agem nas ligações no interior da

cadeia protéica. Entre as exopeptidases temos aquelas que catalisam a clivagem de seus substratos a partir de sua porção carboxi- ou amino- terminal, as carboxipeptidases e as aminopeptidases, respectivamente (BARRETT, 2004; TURK, 2006).

Apesar da importância das enzimas participantes do processo de fermentação da amêndoa do cacau ter sido elucidada há vários anos, ainda é deficiente a quantidade de estudos sistemáticos que abordem a comparação entre os diversos cultivares do cacau (HANSEN; DEL ORMI; BURRI, 1998). A identificação e a caracterização das enzimas no cacau são sensíveis e trabalhosas, principalmente por diversas variações que ocorrem durante todas as etapas de processamento do cacau para a produção do chocolate (STURM, 1999).

Diante do exposto o nosso objetivo foi caracterizar a atividade enzimática das proteases e determinar a atividade de suas isoenzimas em dois cultivares de cacau, PH 16 e TSH 1188, produzidos na região Sul da Bahia, relacionando-as com as condições do processo fermentativo, contribuindo assim para futuras intercessões tecnológicas para melhoria da qualidade da matéria-prima na produção de chocolates.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Materiais

Os cultivares de cacau PH 16 (Híbrido Forastero) e o TSH 1188 (Híbrido Trinitário) foram produzidos na Fazenda Lajedo do Ouro (S 14° 06' 15.2" WO 39° 38' 45.8"), situada na cidade de Ibirataia, no sul do estado da Bahia, Brasil. 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 cacauzeiros híbridos da Fazenda Porto Híbrido, no município de São José da Vitória – BA. Já o cultivar TSH -1188 (Trinidad Selected Hybrids - híbrido trinitario), é originário de Trinidad e Tobago, localizada próximo a costa oriental da Venezuela e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa e excelente produtividade. O material em estudo foi cedido pelos produtores, segundo a disponibilidade no período de realização do experimento.

2.2. Métodos

2.2.1. Fermentação

A fermentação foi realizada na própria fazenda em cochos de madeira: o cultivar PH 16 em cochos com dimensões de 70 x 70 x 65 cm, e TSH 1188 em cochos com dimensões de 40 x 40 x 35 cm, ambos com furos (1,27 cm cada um) na parte inferior e nas laterais para permitir o escoamento do líquido produzido durante a fermentação. A diferença nos tamanhos dos cochos foi devido a disponibilidade de material no período da coleta.

O processo foi acompanhado por sete dias para o cultivar PH 16 e a cada 48 horas a massa de cacau foi revolvida, e para o cultivar TSH 1188 foram seis dias de fermentação e o revolvimento a cada 24 horas, tendo por finalidade oxigenar a massa e uniformizar a temperatura. A massa de cacau foi coberta com folhas de bananeira com o intuito de reduzir as perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial.

2.2.2. Coleta das amostras

Foram coletadas amostras no início da fermentação, tempo zero, e a cada 6 horas, até o final do processo. Durante toda a fermentação foram aferidos a temperatura (Digital Thermometer MINIPA, modelo MT – 450) e pH (pH metro digital Digimed DM-23) da massa (AOAC, 2000).

2.2.3. Caracterização das proteases e determinação da atividade de suas isoenzimas na polpa e na semente dos cultivares de cacau

As proteases foram caracterizadas na polpa e semente dos dois cultivares de cacau no início da fermentação (Tempo zero), tendo como parâmetros, a temperatura, o pH e o substrato preferencial da enzima, além da atividade das isoenzimas. Os resultados obtidos para temperatura e pH da enzima foram confrontados com aqueles obtidos durante o processo de fermentação, visando indentificar a etapa do processo na qual as condições são mais favoráveis a ação da protease e suas isoenzimas.

2.2.3.1. Extração das proteases das polpas

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

2.2.3.2. Purificação parcial das proteases das polpas

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

2.2.3.3. Extração das proteases das sementes

As sementes removidas da extração das polpas foram liofilizadas (Liofilizador Liotop, modelo L108) e posteriormente, desengorduradas, utilizando-se éter de petróleo como solvente (YUSEP et al., 2002) e tratadas com acetona para remoção dos polifenóis, como descrito por Hansen, Del Olmo e Burri, 1998. Após a evaporação do solvente, o pó das sementes tratadas foram suspensos em 0,2 M de tampão fosfato sódio, pH 7,5 a 4°C na

proporção 1:5 (p/v) e homogeneizado em agitador magnético durante 30 minutos a 4°C. Após a mistura, a suspensão foi centrifugada a 20000xg durante 10 min a 4°C, e reservado o sobrenadante a -18°C, para as etapas posteriores (MISNAWI et al., 2002).

2.2.3.4. Purificação parcial das proteases das sementes

Para a semente a purificação também foi realizada segundo o descrito por Deuner et al. (2005), onde foi adicionado aos extratos sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, em quantidade suficiente para fornecer 80 % de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda a 4 °C e a mistura centrifugada a 20000 x g por 60 minutos a 4 °C, reservando-se o precipitado. A seguir, o extrato foi dialisado por 48 horas a 4 °C com solução tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5 em membrana de celulose (43MM) obtendo-se o extrato parcialmente purificado (SILVA et al., 2003), que foi estocado a -18 °C para realização das análises.

2.2.3.5. Determinação da atividade das proteases

A atividade das proteases na polpa e na semente foi determinada tomando-se alíquotas de 100 µl do extrato purificado e misturando-se a 100µl de tampão Tris-HCl 0,01M pH 9. A essa mistura foi adicionado 100µl de diferentes substratos (azocaseína, albumina bovina sérica e gelatina) com diferentes concentrações (0,5; 1; 2; 3 e 4 mg/ml) que foram incubados a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida através da adição de 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10 %. Após centrifugação a 10000 x g por 5 minutos, foi adicionado ao sobrenadante 200 µl de NaOH 1,8 N. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro (Biochrom, Modelo Libra S50) no comprimento de onda de 420 nm para azocaseína e a 280 nm para os outros substratos. Para quantificação foi considerada uma Unidade Enzimática (UE) a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01. Um controle foi utilizado com a adição do TCA anteriormente a incubação da amostra (GIONGO, 2006).

2.2.3.6. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} das proteases

Os valores de K_m e V_{max} foram calculados para o substrato com maior atividade nas diferentes concentrações analisadas. Os resultados foram obtidos de acordo com o método de LINEWEVER-BURK (1934).

2.2.3.7. Efeito do pH e Temperatura na atividade das proteases

Para determinação do pH ótimo da polpa e da semente nos dois cultivares de cacau foi utilizado o substrato de maior atividade, e houve a substituição dos tampões utilizados por citrato de sódio 0,1 M (pH 2, 3, 4, 5) e fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,7 e 8). Para determinação da temperatura ótima foi utilizado o substrato e o pH de maior atividade, e as temperaturas de incubação foram de 20, 30, 40, 50 e 60 °C (GIONGO, 2006).

2.2.3.8. Determinação da atividade da aminopeptidase

A aminopeptidase foi extraída através da incubação de 30mg do pó tratado de semente e da polpa (liofilizados) com 60 mg de polivinil polipirrolidona, 1,8 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e 1 % de Triton X-100 durante 30 minutos a 4 °C. Após a obtenção do extrato, eles foram novamente incubados com uma mistura composta por 890 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1% Triton X-100, 100 µl do extrato e 10 µl da solução de 200 mM leucina-*p*-nitroanilina. O substrato foi composto de 200 mM de leucina-*p*-nitroanilina (H-Leu-*p*NA) que foi preparado através da dissolução em dimetilsulfóxido (DMS). A reação foi realizada durante 30 minutos a 37 °C e a absorbância medida a 405 nm. A atividade enzimática foi medida no sobrenadante após duas centrifugações de 10 minutos a 10000 e 20000 x *g*. A atividade da enzima foi calculada a partir de uma curva padrão de leucina-*p*-nitroanilina (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

2.2.3.9. Determinação da atividade da carboxipeptidase

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

2.2.3.10. Determinação da atividade da endoprotease

Para determinação da atividade da endoprotease, alíquotas de 500 µl do extrato purificado foram incubadas a 45 °C durante 30 minutos com uma mistura contendo 20 mg de albumina bovina e 2,0 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 3,5. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 ml de solução de ácido tricloroacético a 20 % e em seguida centrifugada a 10000 x g durante 15 minutos (AMIN; JINAP; JAMILAH, 1998; HANSEN, DEL OLMO E BURRI, 1998). A quantidade de produtos da proteólise foi determinada pela reação de ninidrina, que foi realizada por mistura de 400 uL do sobrenadante com 400 uL do reagente de ninidrina. As misturas foram incubadas durante 15 minutos num banho de água em ebulição e arrefecida em gelo, foi por fim adicionado etanol (50 %, 1 ml), misturado rapidamente, e a absorbância foi medida a 570 nm. Uma unidade de endoprotease foi considerada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de grupos amino por minuto. A L-leucina foi utilizada como o padrão (MISNAWI et al., 2002; HANSE; DEL OLMO; BURRI, 1998).

2.3. Correlação entre os parâmetros de fermentação e a atividade enzimática dos extratos

Os resultados da atividade enzimática das proteases nos extratos da polpa e semente dos cultivares no Tempo Zero, foram confrontados com os parâmetros de fermentação (pH e temperatura), para projetar e avaliar o comportamento da enzima no decorrer do processo.

2.4. Determinação do teor de proteína nos extratos

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

2.5. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas com duas repetições em quintuplicatas e as médias com os seus respectivos desvios padrão dos dados foram determinadas.

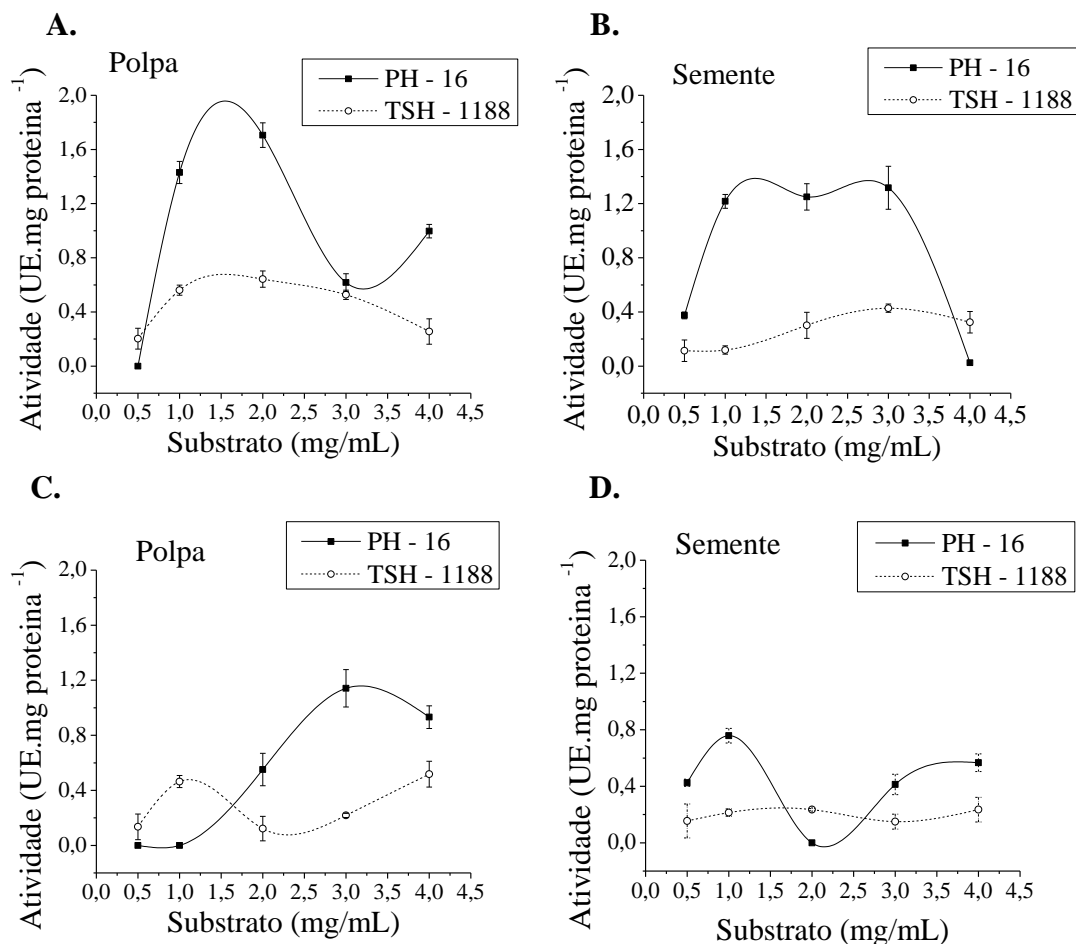
Para as atividades das isoenzimas foi o utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), submetendo os dados à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade, por meio do programa ASSISTAT Versão 7.7 beta – 2012 (SILVA; AZEVEDO, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da atividade das Proteases

Dentre os substratos testados para a azocaseína nenhuma atividade enzimática nos dois cultivares de cacau foi encontrado. Na Figura 1 foi expressa a atividade enzimática específica das proteases nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188, para os substratos albumina bovina sérica e gelatina. Quanto ao substrato albumina bovina sérica (Figura 1 A) a atividade máxima da polpa do cultivar PH 16 foi de 2,0 UE.mg proteína⁻¹, e para o TSH 1188 foi de 0,7 UE.mg proteína⁻¹, sendo os valores máximos para os dois cultivares alcançados com 1,5 mg/mL de albumina bovina sérica como substrato. Já na semente a atividade máxima do PH 16 foi de 1,4 UE.mg proteína⁻¹, com 1,4 mg/mL de substrato, e para o TSH 1188 foi de 0,4 UE.mg proteína⁻¹, com 3 mg/mL de substrato (Figura 1 B).

Figura 1 – Atividade específica das Proteases nos cultivares de cacau PH 16 e TSH 1188 em diferentes substratos e concentrações. (A) Albumina Polpa; (B) Albumina Semente; (C) Gelatina Polpa; (D) Gelatina Semente.



Para o substrato gelatina a atividade da polpa da variedade PH 16 chegou a 1,2 UE.mg proteína⁻¹ com 3,1 mg/ml de substrato, enquanto para o TSH 1188 a atividade não foi superior a 0,5 UE.mg proteína⁻¹, com 4 mg/mL de gelatina (Figura 1 C). Na semente a atividade máxima do PH 16 foi de 0,8 UE.mg proteína⁻¹, com 1 mg/mL de substrato, enquanto na variedade TSH 1188 a atividade enzimática máxima foi de 0,3 UE.mg proteína⁻¹, sendo esse valor máximo alcançado com 1,6 mg/mL de gelatina (Figura 1 D).

Diante do exposto é possível perceber uma maior atividade enzimática na polpa em relação a semente nos dois cultivares analisados, considerando atividades máximas tendo a albumina como substrato, representando uma diferença de 28,86% para o cultivar PH 16 e de 36,42% do TSH 1188, evidenciando uma maior presença das proteases na polpa do cacau, e não na semente.

Quando testado a albumina bovina sérica e a gelatina pode se observar uma maior atividade enzimática para o cultivar PH 16, independente do substrato. Outros autores como Biehl, Wewetzer e Passern (1982), Amin, Jinap e Jamilah (1997) e Hansen et al. (2000) em seus estudos já haviam observado que existe diferença na atividade das proteases nos diferentes genótipos de cacau. Afoakwa (2010) concluiu que um dos fatores determinantes na qualidade e sabor do chocolate é o genótipo do cacau. Zamalloa (1994) e Efraim et al. (2006) também encontraram variações significativas entre os diferentes genótipos do cacau, ao avaliarem suas características químicas, físico-químicas e sensoriais.

Os resultados confirmam com o encontrado por Mundo, Muñoz e Flores (2010), que ao trabalhar com proteases provenientes de cacau *criollo* cultivado no México, observaram diferenças nas atividades das proteases quando em diferentes substratos e variando as concentrações dos mesmos, os autores salientaram ainda que a dificuldade em conseguir a solubilização completa das enzimas de cacau se deu, provavelmente, devido a falta de informações disponíveis sobre as suas propriedades, o que justifica o reduzido número de informações sobre as características bioquímicas de proteases como as aminopeptidases e carboxipeptidases presentes no cacau.

Bytof et al. (1995) avaliou a atividade da carboxipeptidase extraída de sementes de cacau provenientes da Malásia e observou, assim como verificado para as proteases no presente estudo, que essa isoenzima apresenta atividades variadas em diferentes substratos analisados. Voigt et al. (1994) ao trabalhar com amostras de cacau provenientes também da Malásia avaliou a atividade enzimática das proteases com dois substratos, albuminas e globulinas, e observou uma maior atividade enzimática na utilização das albuminas como substrato.

Entretanto, ainda que se tenham dados de alguns trabalhos conduzidos com genótipos de cacauero e de suas influências físicas, físico-químicas e sensoriais, ainda não há uma conclusão concreta e generalizada sobre a real influência de genótipos no sabor do chocolate, isso devido a escassez de trabalhos que tenham utilizado materiais distintos submetidos aos mesmos protocolos de fermentação, secagem e torração (BUCHELI; PÉTIARD, 2000).

Com base nos valores descritos acima, para a determinação do pH e da temperatura ótima da enzima, foi utilizada a albumina bovina sérica como substrato preferencial, na concentração de 1,5 mg/mL para realização das demais análises.

3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

A Tabela 1 demonstra os valores de Km e Vmax para a protease nos cultivares PH 16 e TSH 1188, na polpa e na semente, com a albumina bovina sérica como substrato.

Tabela 1 - Km e Vmax da protease com o substrato albumina bovina sérica.

Albumina	PH 16		TSH 1188	
	Polpa	Semente	Polpa	Semente
Km mg.mL ⁻¹	0,54	8,1	0,67	0,13
Vmax mg.mL min ⁻¹	0,73	6,94	0,55	0,49

As proteases apresentaram maior afinidade com o substrato analisado para a polpa no cultivar PH 16 e para a semente no cultivar TSH 1188, uma vez que quanto menor o valor de Km maior será a afinidade da enzima com o substrato.

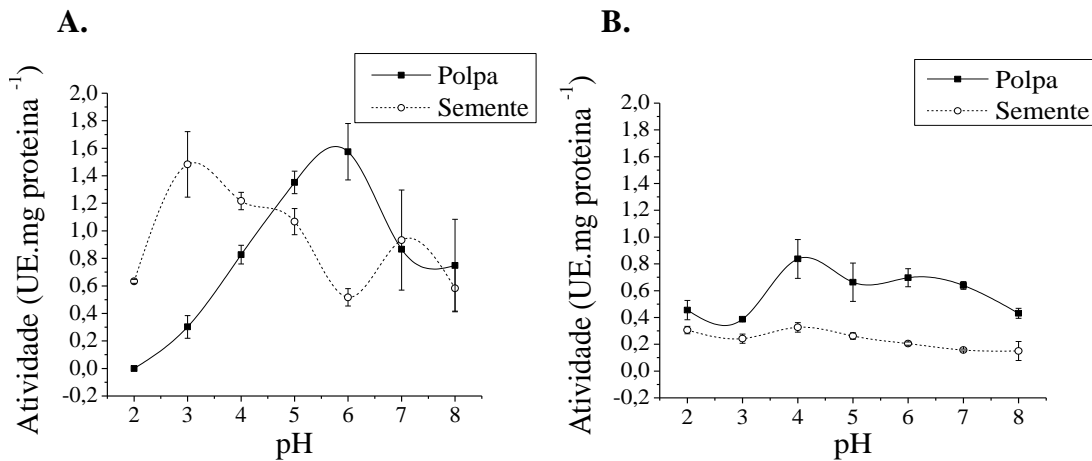
3.3. Efeito do pH na atividade das Proteases

A Figura 2 mostra os resultados da atividade das proteases quanto as variações do pH de 2 á 8. Os resultados explanam uma maior atividade para o cultivar PH 16, chegando a 1,6 UE.mg proteína⁻¹ com o pH 5,7 na polpa, e 1,5 UE.mg proteína⁻¹, com o pH 3,1 na semente. Já o cultivar TSH 1188 apresentou sua maior atividade com o pH 4,1, sendo na polpa de 0,8 UE.mg proteína⁻¹, e na semente de 0,3 UE.mg proteína⁻¹.

Uma diferença grande é perceptível quanto às atividades máximas das duas variedades de cacau, sendo a atividade do TSH 1188 46,86 % menor do que a atividade do PH 16, isso para a polpa. Já na semente essa diferença é ainda mais acentuada de 78,02 %.

Quando comparadas as atividades máximas dentro de uma mesma variedade, pode-se perceber novamente uma maior atividade das proteases para a polpa do que para a semente. No cultivar PH 16 a diferença é de 5,84 %, no TSH 1188 há uma diferença significativa de 61,05 %.

Figura 2 - Efeito do pH na atividade das Proteases. (A) PH 16; (B) TSH 1188.



A atividade da enzima é reduzida consideravelmente na polpa do PH 16, em pH menor que 4, até a inibição da atividade enzimática quando atingir o pH 2. Para a semente a principal redução ocorre após o pH 5, chegando a uma redução de 61,16 % no pH 8, quando comparado com o pH ótimo de 3,1.

Já na polpa do TSH 1188 observa-se uma reduzida atividade em meios muito ácidos ou alcalinos, pH 3 e 8, com uma diminuição de atividade de 46,15 % e 48,99 % quando comparados ao pH ótimo, respectivamente, assim como para a semente, sendo que nessa última a redução foi de 54,41 % no pH 8.

Os resultados evidenciam uma faixa ótima de atividade das proteases entre o pH 3 e 6, em todos os genótipos e quanto as variáveis polpa e semente, além disso, os resultados mostram o já observado na determinação do substrato preferencial, onde a maior atividade observada foi na polpa, e no cultivar PH 16.

Estudos demonstraram as variações da atividade das proteases com mudanças de pH. Hansen, Del Olmo e Burri (1998) ao trabalharem com as três isoenzimas das proteases em amostras de cacau (ICS-95) provenientes do Equador, determinaram o pH ótimo delas, verificando uma ampla variação entre elas, que foi de 3, 7 e 6 para a endopeptidase, aminopeptidase e carboxipeptidase, respectivamente. Entretanto, eles observaram também que

apesar de suas atividades diminuírem em determinadas faixas de pH, elas demonstram atividade em toda a faixa de pH analisado (pH 3 ao 7).

Voigt et al. (1994) avaliaram o efeito da variação do pH frente a atividade da endoprotease e da carboxipeptidase em amostras de cacau provenientes da Malásia, e também observaram a atividade enzimática em uma faixa de pH de 3 a 7, mas relataram a preferência das isoenzimas por pH específicos, entre 3 e 4 para a endoprotease, e próximo de 6 para a carboxipeptidase.

Bytof et al. (1995) avaliaram a atividade da carboxipeptidase extraídas em cacaus provenientes da Malasia utilizando como substrato o Z-dipeptídeo, e observou, assim como percebido para as proteases no presente estudo, que essa isoenzima apresenta atividades variadas em uma ampla faixa de pH (3-9), com um pico máximo no pH 5,5, ressaltando que em todos os pH analisados a carboxipeptidase apresentou atividade. Segundo Voigt et al. (1994) para estabelecer as condições ótimas de fermentação é fundamental conhecer o pH ótimo das enzimas envolvidas no processo.

Pelos resultados obtidos utilizou-se para a determinação da temperatura ótima das proteases o pH 5,7 e 3,1 para polpa e semente do PH 16, respectivamente, e o pH 4,1 para a polpa e semente do TSH 1188.

3.4. Efeito da temperatura na atividade das Proteases

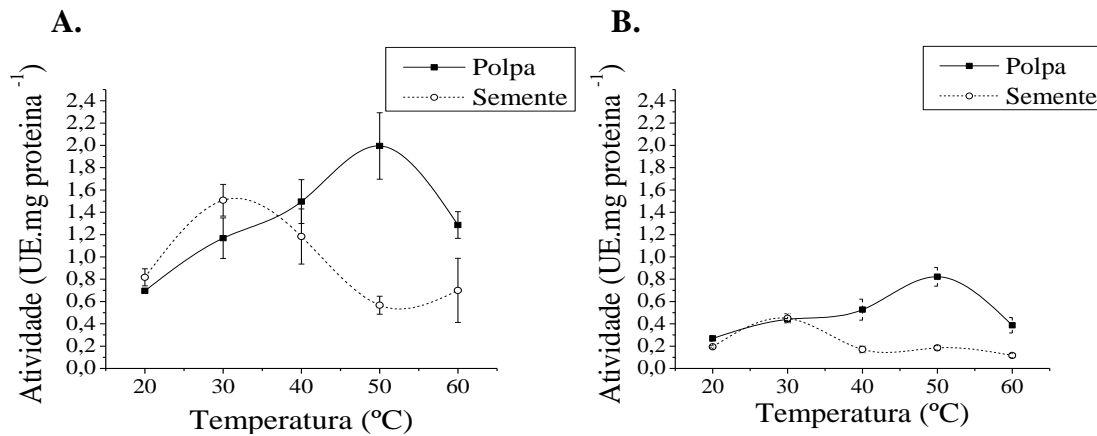
Os efeitos das diferentes temperaturas (20 á 60 °C) na atividade das proteases foram expressos na Figura 3. O cultivar PH 16 alcançou uma atividade máxima (2,0 UE.mg proteína⁻¹) para polpa a 50 °C, já a semente apresentou uma atividade reduzida (1,5 UE.mg proteína⁻¹) nessa temperatura, alcançando seu pico máximo a 32 °C. O cultivar TSH 1188 apresentou sua atividade máxima (0,8 UE.mg proteína⁻¹) na polpa também em 50 °C, já a semente apresentou sua atividade máxima de 0,5 UE.mg proteína⁻¹ a 29 °C.

Na avaliação da temperatura também se observa uma maior atividade enzimática nas polpas do que nas sementes, sendo essa diferença de 58,79 % para a polpa do PH 16, maior do que a atividade da polpa do TSH 1188, e 67,21 % maior da semente do PH 16 do que o TSH 1188, quando comparado as atividades máximas. Já quando avaliado as maiores atividades dentro de uma mesma variedade se percebe também uma maior atividade para polpas, quando comparados com as sementes, sendo uma diferença de 23,56 % entre a polpa e a semente do cultivar PH 16 e 39,17 % do TSH 1188.

Assim, verifica-se que as proteases da polpa apresentaram uma atividade ótima em 50 °C, e as da semente em uma faixa de 29-32 °C, nas duas variedades, apresentando maior

atividade nas polpas, edentre as variedades, no PH 16. Pode-se ainda observar que a atividade da enzima é reduzida substancialmente para a polpa, quando abaixo de 40 °C, sendo essa redução de 65,11 % para o PH 16 e de 67,27 % para o TSH 1188 quando em 20 °C, se comparado com a atividade máxima. Já para a semente essa redução se deu acima de 40 °C, sendo de 54,1 % para o PH 16 e de 76,8 % para o TSH 1188, quando em 60 °C, em contraste com a atividade ótima.

Figura 3 - Efeito da temperatura na atividade das Proteases. (A) PH 16; (B) TSH 1188.



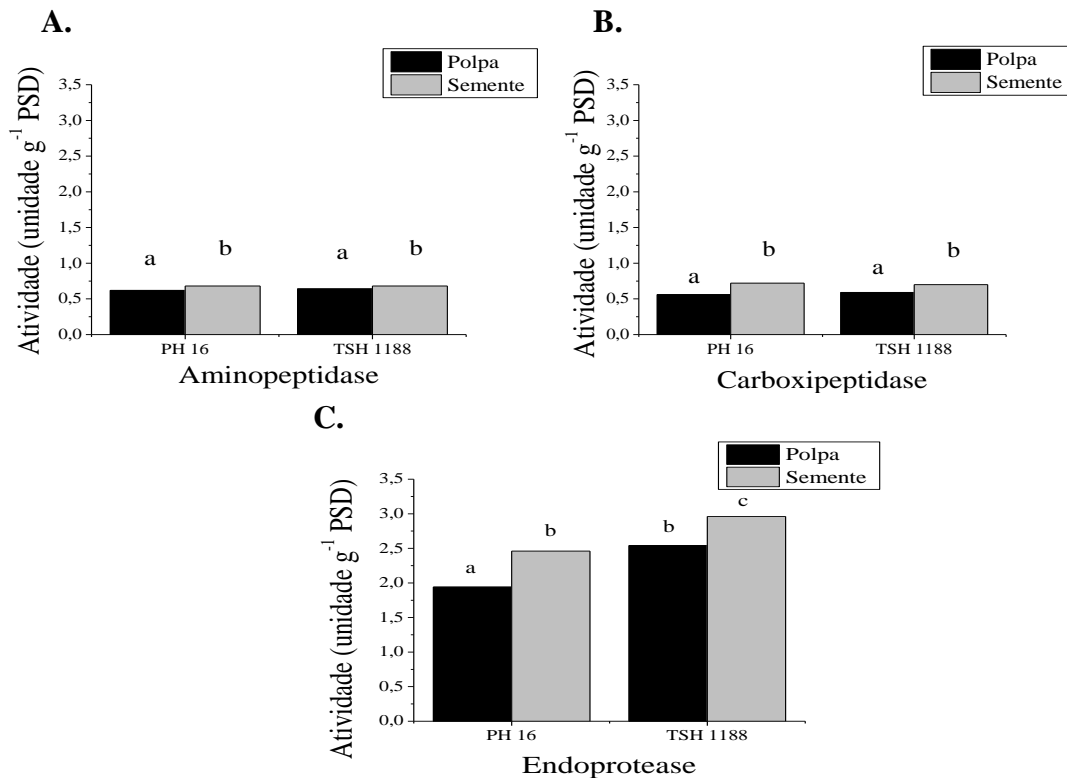
Estudos demonstram as variações da atividade das proteases com mudanças também de temperaturas. Marco e Felix (2002) extraíram e analisaram proteases provenientes de fungos isolados do cacau brasileiro avaliaram o seu comportamento em diferentes temperaturas, onde se pode perceber uma atividade das enzimas em temperaturas de 30 á 70 °C, mas com um pico máximo em 40 °C. O que comprova a capacidade das proteases de realizarem suas funções em uma larga faixa de temperatura, e, conseqüentemente, durante toda a fermentação, apesar de não conseguir desempenhar sua atividade máxima devido a variações encontradas no processo. Larcher et al. (1992) e Wang et al. (2005) também reportaram a produção de protease por *Aspergillus fumigatus* isolados do cacau com atividade ótima em temperaturas de 42 °C e 40 °C, respectivamente.

3.5. Determinação da atividade das isoenzimas (aminopeptidase, carboxipeptidase e endoprotease)

A atividade das três isoenzimas das proteases, a aminopeptidase, a caboxipeptidase e a endoprotease, são expressas na Figura 4. Na figura observa-se uma diferença quanto as suas atividades, sendo a endoprotease a de maior atividade, maior inclusive que a soma das outras duas isoenzimas, indicando uma maior presença dessa isoenzima nas variedades de cacau

analisadas. Entretanto, é importante salientar que segundo Barrett (1980) existem proteases que possuem tanto atividade exopeptídica quanto endopeptídica.

Figura 4 - Atividade das três isoenzimas das proteases nos dois cultivares de cacau. (A) Aminopeptidase; (B) Carboxipeptidase; (C) Endoprotease. Letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,001$).



Reisdorff et al. (2004) identificaram a presença da carboxipeptidase e da endoprotease no cacau e no cupuaçu, constatando ainda pequena diferença na atividade destas enzimas entre os dois frutos. Já Hansen, Del Olmo e Burri (1998) verificaram a presença da aminopeptidase no cacau, e afirmaram a presença dessas três isoenzimas durante todo o processo fermentativo.

A aminopeptidase, representada na Figura 4 (A), apresentou uma atividade de 0,62 unidades g⁻¹ de Peso Seco Desengordurado – PSD e de 0,64 unidades g⁻¹ PSD para a polpa dos cultivares PH 16 e TSH 1188, respectivamente, não tendo assim nenhuma diferença significativa pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade. Já as sementes apresentaram para os cultivares PH 16 e TSH 1188 uma atividade de 0,68 unidades g⁻¹ PSD, também sem diferenças significativas entre si. Quando comparado entre polpas e sementes podemos observar uma menor atividade para polpa, apresentando diferenças significativas, pelo mesmo teste estatístico aplicado.

A atividade da carboxipeptidase está demonstrada na Figura 4 (B), e apresentou para o cultivar PH 16 uma atividade de 0,56 unidades g^{-1} PSD e 0,72 unidades g^{-1} PSD, e o cultivar TSH 1188 uma atividade de 0,59 unidades g^{-1} PSD e 0,7 unidades g^{-1} PSD, para as polpas e para as sementes respectivamente. Segundo o teste de Tukey a 1% de probabilidade não existe diferença significativa entre as atividades das polpas dos dois cultivares e entre as das sementes também entre os cultivares. Mas quando comparado a atividade das polpas com a das sementes observa-se uma diferença significativa, com uma maior atividade apresentada na semente.

Ao trabalhar com o cultivar ICS-95, procedente do Equador, Hansen, Del Olmo e Burri (1998) determinaram a atividade da aminopeptidase de 1,14 unidades g^{-1} PSD, antes de iniciar a fermentação, valor acima do encontrado nesse estudo, para as duas variedades analisadas, já para a carboxipeptidase, antes do início da fermentação, a atividade foi de 0,3 unidades g^{-1} PSD, valor inferior ao encontrado nesse estudo.

Hansen et al. (2000) ao avaliar a atividade da aminopeptidase em 10 cultivares de cacau provenientes do Equador e da Malásia, encontrou valores entre 0,5 e 2,75 unidades g^{-1} PSD, e no mesmo trabalho, avaliando a carboxipeptidase nas mesmas 10 variedades de cacau encontrou valores entre 0,3 e 0,7 unidades g^{-1} PSD. Estes trabalhos evidenciam uma diferença na atividade das isoenzimas quando em diferentes cultivares de cacau, sendo que o presente estudo apresentou atividade dentro a faixa encontrada pelo autor (HANSEN et al., 2000).

A endoprotease (Figura 4 C) apresentou a maior atividade entre as isoenzimas analisadas, sendo de 1,94 unidades g^{-1} PSD para a polpa e 2,46 unidades g^{-1} PSD para a semente do cultivar PH 16. Já para o cultivar TSH 1188 obteve-se para a polpa uma atividade de 2,54 unidades g^{-1} PSD e para a semente de 2,96 unidades g^{-1} PSD. Pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade as atividades das polpas e das sementes tiveram diferenças significativas, sendo nos dois casos uma maior atividade para o cultivar TSH 1188, as únicas amostras que não diferiram estatisticamente foi a semente do PH 16 e a polpa do TSH 1188. Essa maior atividade no TSH 1188 evidencia uma maior presença da endoprotease no cultivar, quando comparado com o PH 16, entretanto, assim como as outras isoenzimas, precebe-se uma maior atividade, e, conseqüentemente, maior presença na semente do que na polpa.

Segundo Mundo, Muñoz e Flores (2010) a endoprotease é a isoenzima mais predominante em amêndoas de cacau fermentadas. Ela é a principal responsável pela hidrólise da globulina e albumina (proteínas de armazenamento do cacau) durante a fermentação. E acredita-se que a sua elevada estabilidade permite a proteólise ao longo de todo o processo fermentativo (HANSEN, DEL OLMO e BURRI, 1998).

Misnawi et al. (2002) ao extrair as isoenzimas de amostras de cacau oriundos da Indonésia encontraram para a endoprotease uma atividade de 2,47 unidades $g^{-1}PSD$, dentro da faixa encontrada no presente estudo. Entretanto, para a carboxipeptidase, os valores foram inferiores aos encontrados nesse estudo (0,413 unidades $g^{-1}PSD$).

De um modo geral, observa-se uma predominância das isoenzimas analisadas (aminopeptidase, carboxipeptidase e endoprotease) na semente, diferindo estatisticamente em todas as amostras das polpas. Sendo que entre a aminopeptidase e a carboxipeptidase observou-se valores próximos quando comparado a atividade enzimática entre os dois cultivares, sem demonstrar nenhuma diferença significativa polpa-polpa e semente-semente, entretanto essa diferença já pode ser percebida para a endoprotease. Além disso, as maiores atividades encontradas permitem concluir a maior presença das isoenzimas no cultivar TSH 1188, diferindo estatisticamente do cultivar PH 16, o que já havia sido observado por Hansen et al. (2000), que afirma que há diferenças estatísticas nas atividades das isoenzimas nos mais diversos cultivares de cacau

A diferença encontrada nas atividades das isoenzimas nesse estudo, assim como quando comparado com estudos feitos por outros pesquisadores, podem ser resultados de diferenças nos processos, onde a fermentação não segue nenhum padrão estabelecido, e principalmente o genótipo de cacau, fatores já observados por outros pesquisadores (ZAMALLOA, 1994; EFRAIM et al., 2006; AFOAKWA, 2010).

3.6. Parâmetros de fermentação

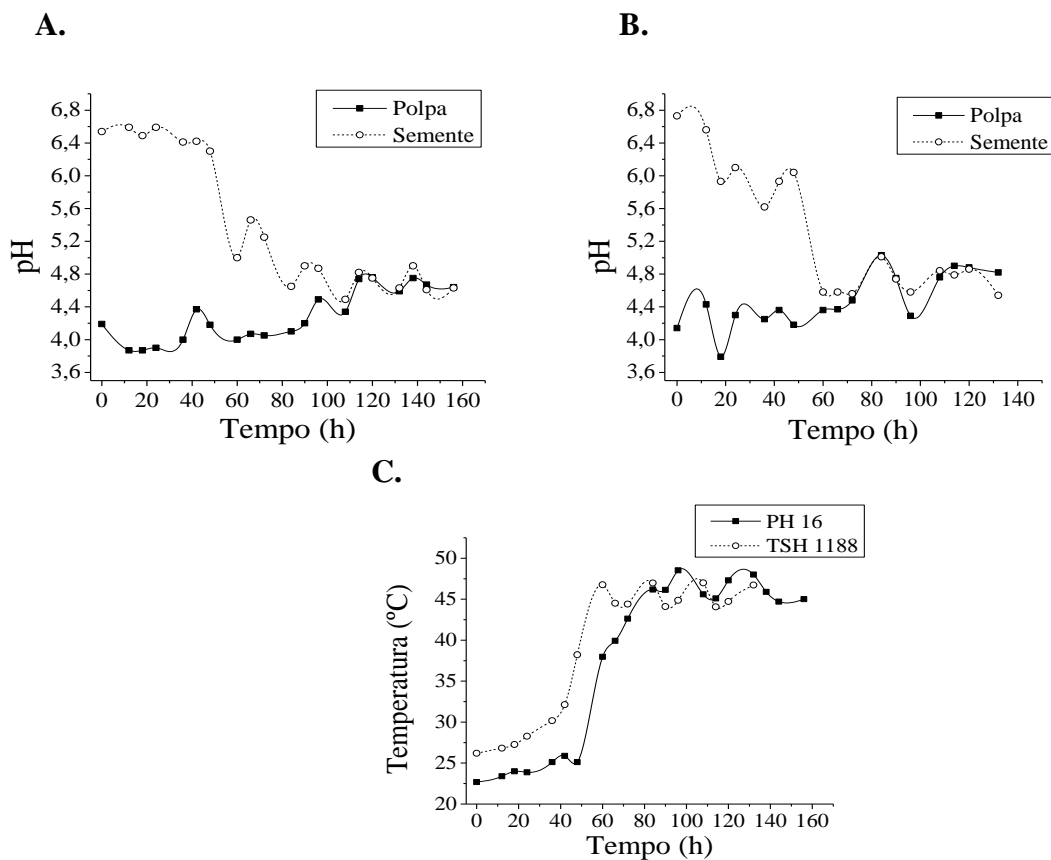
Os parâmetros fermentativos analisados no cocho de fermentação, pH e temperatura, estão expressos na Figura 5. A fermentação do cultivar PH 16 foi mais demorada, de 156 horas, enquanto a fermentação do cultivar TSH 1188 foi de 132 horas. O tempo de fermentação variou devido à quantidade de cacau a ser fermentada, sendo que o primeiro foi fermentado em cochos com dimensões de 70 x 70 x 65 cm, já a variedade TSH 1188 foi fermentada em cochos com dimensões de 40 x 40 x 35 cm, devido a menor quantidade de cacau disponível.

Variações no pH são observadas durante o processo fermentativo, pois as sementes do cacau tornam-se permeáveis, e muitas substâncias de baixo peso molecular e o álcool, ácido acético, bem como outros metabólitos são absorvidos pelas sementes, principalmente para o cotilédone, junto com a água. As leveduras e as bactérias lácticas metabolizam o ácido cítrico da polpa, resultando na sua substituição pelos ácidos acético e lático, pois estes últimos se

dissociam menos, o que favorece o aumento da acidez e a diminuição do pH das amêndoas (VARNAM; SUTHERLAND, 1997; LOPES; DIMICK, 1991).

Quanto as variações do pH (Figura 5 A e B) pouco pode ser diferido entre as duas variedades, as polpas do PH 16 começaram a fermentar com o pH 4,19, e o TSH 1188 com um pH de 4,12, e ao final observaram um leve aumento, de 4,64 e 4,82 para as duas variedades, respectivamente. Já as sementes começaram a fermentar com um pH de 6,54 para o PH 16 e de 6,73 para o TSH 1188, chegando ao final com um pH de 4,63 e 4,54, concomitantemente. Mas o que se pode observar no pH, assim como na temperatura, é um processo de fermentação mais rápido para o TSH 1188, pois este já atinge o pH de 4,58 com apenas 60 horas de fermentação, já a fermentação do cultivar PH 16 só chega ao pH de 4,65 com 84 horas. Segundo Samah et al., (1993) para fermentação do cacau, valores de pH próximo a 5,0 ao final do processo são indicativos de boa fermentação.

Figura 5 - Monitoramento do pH para polpa e semente e da temperatura durante o processo de fermentação. (A) pH - PH 16; (B) pH - TSH 1188; (C) Temperatura.



Os valores conferem com os deparados por outros pesquisadores. Cruz et al. (2013) estudando amêndoas de cacau fermentadas na mesma região da Bahia encontraram o pH da massa final da fermentação próximo 5,0 para o cacau convencional, o PH 16 e o SR 162.

Ouattara et al. (2008) trabalhando com três variedades de cacau fermentados em Costa do Marfim, puderam observar um valor inicial de pH da massa em torno de 3,5, e um pH final em torno de 5,5. Amim, Jinap e Jamilah (1997) acompanharam uma fermentação na Malásia durante 144 horas, em cochos de madeira (0,78 x 0,78 x 0,78 m) e verificaram um pH inicial superior a 6,25, na massa de cacau, mas ao final do processo o pH sofreu uma queda para abaixo de 5, provavelmente pela produção de ácidos devido a ação bacteriana.

A fermentação mais rápida também pode ser percebida com uma elevação precoce da temperatura, verificada na Figura 5 (C), a massa de cacau do cultivar TSH 1188 alcançou aos 46,8 °C às 60 horas de fermentação, já o cultivar PH 16 chegou aos 46,2 °C às 84 horas de fermentação. Quando passado essas horas, as temperaturas das massas de cacau se mantiveram entre os 44 e 48 °C, até o final do processo fermentativo.

Zamalloa (1994) afirma que essa diferença do tempo para atingir temperaturas adequadas pode ser devido o volume do produto em fermentação, flora microbiana presente e inclusive as condições climáticas.

Segundo Nazaré, Barbosa e Viégas (1990) durante o processo fermentativo do cacau, o aumento da temperatura é devido ao trabalho metabólico dos microrganismos presentes no meio sobre os açúcares e ácidos, contidos além de na própria semente, mas também na polpa residual. O calor despreendido deve-se a oxidação do etanol á acido acético e a conversão desse ácido a dióxido de carbono e água (PASSOS; LOPEZ; SILVA, 1984; LOPEZ; DEMICK, 1991; SAMAH et al., 1993). Para uma boa fermentação de cacau, a temperatura da massa deve atingir de 45 á 48 °C, em aproximadamente 3 dias, devendo ser mantidos tais valores até o término do processo (QUESNEL; LOPES, 1975).

Esses resultados corroboram com o encontrado por outros autores. Camu et al. (2008) verificou a temperatura em 7 cochos de fermentação de cacau, realizadas de forma espontânea em Gana, e verificou que as temperaturas iniciais variaram bastante, entre 23 á 30 °C, e ao final dos 6 dias de fermentação ficaram entre 42 e 45 °C, próximos dos encontrados no presente estudo. Cruz et al. (2013), ao trabalhar com cacau convencional, PH 16 e SR 162, produzidos na mesma região da Bahia, encontrou valores de temperatura semelhantes ao desse estudo, chegando próximo dos 50 °C ao final da fermentação. Cohen e Jackix (2004) ao fermentar em cochos de madeira amostras de cacau provenientes do Pará, observaram uma temperatura inicial abaixo de 30 °C, e a temperatura máxima de 49 °C com 72 horas do início da fermentação, mantendo após esse ponto máximo uma temperatura média de 45 °C até o final do processo fermentativo (168 horas). Ouattara et al. (2008) avaliou a temperatura de

massas de cacau em cochos de fermentação na Costa do Marfim, com três variedades, e observou que as temperaturas se mantiveram entre 27 e 50 °C.

Aragão (1992) realizou a fermentação de sementes de cupuaçu em caixas de madeira medindo 40 x 40 x 60 cm, com frestas de 0,5 cm de largura, por 7 dias. O autor verificou que assim como nesse estudo, a temperatura inicial das sementes frescas estiveram próximas (29 °C), e observou ainda que após as 48 horas a temperatura passa dos 40°C. Vasconcelos (1999) também fermentou sementes de cupuaçu por 7 dias, em caixas de madeira com capacidade de 153 Kg. O processo começou a 32 °C e a temperatura máxima foi de 48 °C, após 72 horas. Usando esse mesmo tipo de caixa de fermentação, Lopes, Garcia e Vasconcelos (2003) observaram a temperatura máxima de 49 °C após 72 horas do início do processo fermentativo, encerrando com 168 horas de fermentação.

O comportamento durante a fermentação em estudo corrobora com o encontrado por Efraim (2009) que já havia comprovado que existe diferença no comportamento dos diferentes cultivares de cacau ao serem monitorados os parâmetros de pH e temperatura durante a fermentação.

Segundo Schwan e Wheals (2004) e Cruz et al. (2013) essas variações de pH e temperatura ocorrem durante o processo fermentativo, pois a polpa envoltória é degradada devido à ação de leveduras, bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas, presentes naturalmente no ambiente, que agem sobre os açúcares e ácidos orgânicos, transformando-os em etanol, ácido lático e principalmente ácido acético, sendo assim responsável por uma conseqüente diminuição do pH das amêndoas, e por uma elevação considerável da temperatura, para cerca de 50°C.

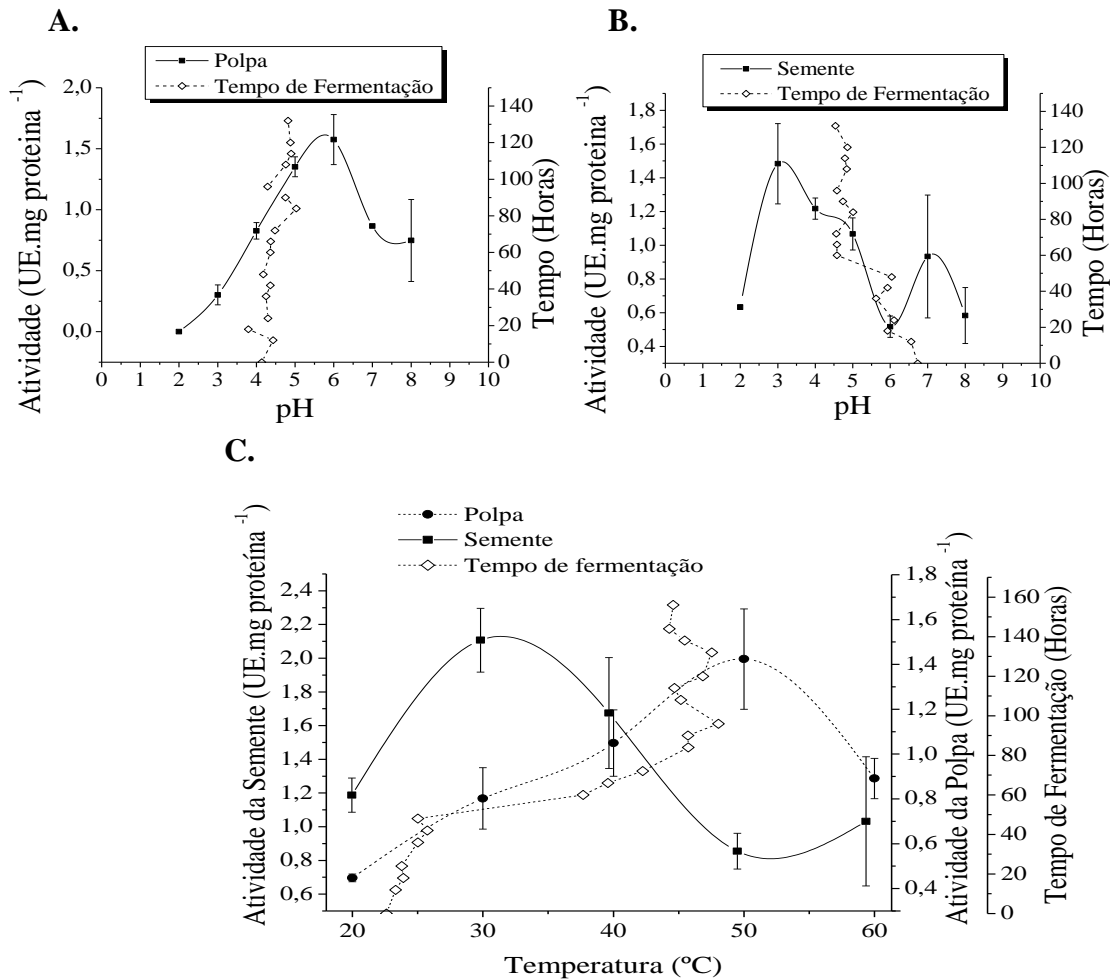
3.7. Correlação entre os parâmetros de fermentação e a atividade das proteases dos extratos

Após a determinação dos parâmetros necessários para atuação ótima da enzima, o pH e a temperatura, uma correlação entre os alcançados nesse estudo e aqueles medidos na massa de cacau nos cochos de fermentação foi realizado, com o objetivo de elucidar o período de atuação das proteases, assim como incitar a necessidade de intervenção em determinados pontos do processo fermentativo.

No cultivar PH 16 (Figura 6 A) podemos observar o pH da polpa próximo de 4 na massa de cacau, entretanto o pH de atuação ótimo da enzima é de 5,7 (Figura 2 A), de igual modo a semente (Figura 6 B), que no cocho sofre uma variação de pH entre 4 e 7, mas tem a sua atividade ótima no pH 3,1 (Figura 2 A).

Quando se avalia a temperatura (Figura 6 C) pode-se perceber que as atividades das proteases nas sementes se dão principalmente no tempo inicial da fermentação, já que sua temperatura ótima é de 31 °C (Figura 3 A), e valores próximos a esses só são observados nas primeiras 48 horas. Já as proteases das polpas possuem como temperatura ótima 50 °C (Figura 3 B), e temperaturas próximas a essa só é atingida após as 84h de fermentação, mas perdura durante todo o restante do processo, o que implica em um maior período de ação das proteases da semente do que da polpa, no processo fermentativo.

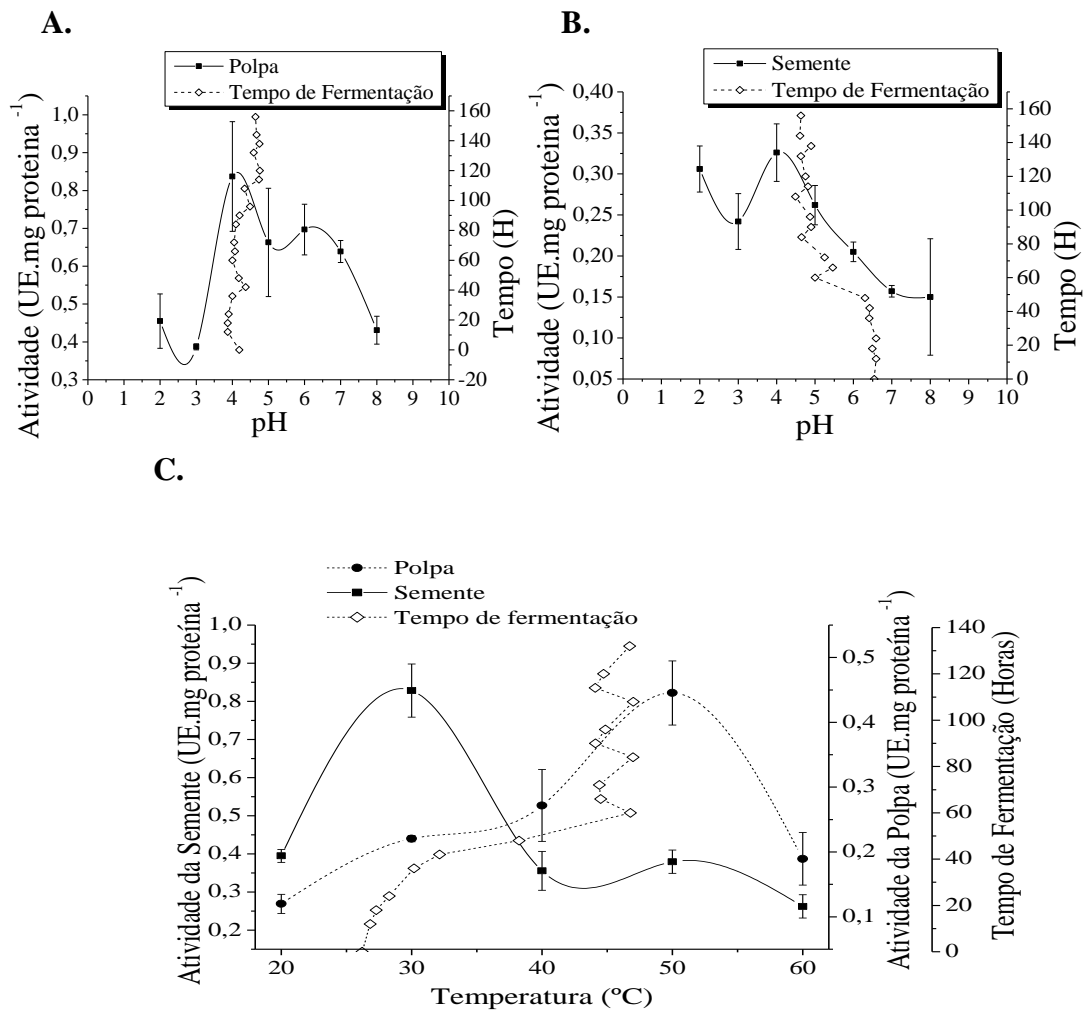
Figura 6 - Correlação entre o pH da polpa e da semente e a temperatura da fermentação, com o pH e a temperatura ótima da atuação da protease para o cultivar PH 16. (A) pH Polpa; (B) pH Semente; (C) Temperatura.



Apesar de provavelmente conseguir realizar seus processos naturais, já que as proteases apresentam atividades no pH e nas temperaturas encontrados na massa de cacau (Figura 6 A e B), possivelmente ocorrerá uma baixa atividade das enzimas, quanto ao máximo que elas poderiam chegar.

Um comportamento diferente do que ocorre no cultivar PH 16, quando correlacionamos os parâmetros de atuação ótima da enzima e seus parâmetros de fermentação, pode ser observado no cultivar TSH 1188 (Figura 7).

Figura 7 - Correlação entre o pH da polpa e da semente e a temperatura da fermentação, com o pH e a temperatura ótima da atuação da protease para o cultivar TSH 1188. (A) pH Polpa; (B) pH Semente; (C) Temperatura.



No cultivar TSH 1188 pode-se perceber um pH no cocho de fermentação próximo de 4 para a polpa (Figura 7 A), sendo que a atuação ótima da enzima também se dá próximo do pH 4, sendo de 4,1 o encontrado nesse estudo (Figura 2 B). Na semente a atuação ótima também se dá em 4,1 (Figura 2 B), mas no cocho o pH fica entre uma faixa de 4 e 7, sendo próximo de 4 a partir das 84 horas de fermentação (Figura 7 B), o que implica em uma maior ação dessa enzima na semente na parte final da fermentação, e sua atuação na polpa durante todo o processo fermentativo.

Já na avaliação da temperatura (Figura 7 C) se pode observar que, assim como para o cultivar PH 16, as atividades das proteases nas sementes se dão principalmente no tempo inicial da fermentação, já que sua temperatura ótima é de 29 °C, e valores próximos a esses só são observados nas primeiras 42 horas. Já as proteases das polpas possuem como temperatura ótima 50 °C, e temperaturas próximas a essa só é atingida após as 60 horas de fermentação, mas perdura durante todo o restante do processo, o que implica em um maior período de ação das proteases da semente no início e da polpa no final do processo fermentativo.

Amin et al., (2002) afirma que para a obtenção dos melhores resultados na qualidade das amêndoas de cacau, o pH da fermentação deve estar na faixa de 5,0 e 5,5. Mas se pode perceber que durante todo o processo fermentativo o pH da polpa não chegou nessa faixa, e que o pH da semente sofreu uma queda rápida de quase 7 para em torno de 4, não possibilitando assim melhores resultados como sugeridos pelo autor.

É importante salientar que as variações do pH, como as encontradas nesse estudo, afetam a ionização dos resíduos de aminoácidos no sítio ativo, o qual está envolvido na ligação do substrato com a enzima. Alguns resíduos ionizáveis podem ser localizados na periferia do sítio ativo, vulgarmente conhecido como resíduos não essenciais. Esta ionização pode provocar distorções no sítio ativo e, portanto, afetar a atividade da enzima (BHATTI et al., 2006).

No que se refere à inativação, as enzimas exibem diferentes estabilidades durante o processo fermentativo. Isso é causado pelo calor gerado durante o processo, pela presença de polifenóis e formação de ácidos, portanto o período da acessibilidade e atuação das enzimas aos substratos é curto (HANSEN et al., 2000).

Cruz et al. (2013) afirmam que avaliar essas diferenças é muito importante, pois é sabido que as reações que levam a formação de precursores de aroma são realizadas principalmente por enzimas endógenas da semente de cacau, e a fermentação desempenha um papel importante na redução do pH e elevação da temperatura para permitir a ação dessas enzimas.

Nascimento e Martins (2006) afirmam que as proteases se mantêm ativas em uma ampla faixa de pH e temperatura, mas observam também, assim como no presente estudo, que essas variações influenciam na atividade enzimática.

4. CONCLUSÕES

- Às atividades das proteases de ambos os cultivares foram encontradas os maiores valores para a albumina bovina sérica.
- O pH exerce influência na atividade das enzimas, apresentando variações entre diferentes cultivares. Sendo que de um modo geral a atividade foi satisfatória em uma faixa entre os pHs 3 e 6.
- A temperatura possui influência na atividade enzimática, apresentando os mesmos valores de temperaturas ótimas para as polpas, mas diferente para as sementes.
- De um modo geral foi evidenciado uma maior atividade para as polpas que para a semente, e para o cultivar PH 16 do que o cultivar TSH 1188.
- Uma maior afinidade foi observada com a albumina na polpa do PH 16 e na semente do TSH 1188.
- A atividade da aminopeptidase, da carboxipeptidase e da endoprotease foi encontrada principalmente nas sementes, com um maior destaque para o cultivar TSH 1188.
- O tempo de fermentação do cultivar PH 16 foi maior devido à maior quantidade de cacau nos cochos de fermentação, o que representou variações quando a velocidade de diminuição do pH da semente e aumento do pH da polpa e da temperatura da massa, quando comparado ao TSH 1188.
- A atividade enzimática não é aproveitada ao máximo, pois os fatores analisados (pH e temperatura) estão fora dos determinados como ótimos para que as suas atividades catalíticas sejam máximas.
- O cultivar PH 16 é o que apresenta suas condições de fermentação mais distantes das encontradas como ótimas para a atuação enzimática conforme avaliado nesse estudo, principalmente na avaliação do pH, já que a temperatura pouco varia entre as duas cultivares.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

- O presente estudo expõe a necessidade de estudos sistemáticos que verifiquem a possibilidade de uma intervenção no processo de fermentação, a fim de controlar condições como pH e temperatura, e avaliar se isso otimizaria a formação dos precursores do sabor e aroma e, conseqüentemente, o processo para obtenção do chocolate.
- Faz se necessário avaliar as proteases em um mesmo cultivar de diferentes regiões, assim como realizar fermentações de diferentes cultivares com os mesmos parâmetros e condições de processo, para assim evidenciar ainda mais o papel do genótipo e a sua interferência na atividade enzimática.
- É válido ressaltar ainda que esta intervenção deve levar em conta outras enzimas, também com papel fundamental na formação do *flavour* do chocolate, como as invertases neutras e ácidas.

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. United Kingdom: John Wiley And Sons Ltd, New Delhi, Índia, 2010.
- AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Vicilin-class globulin and their degradation during cocoa fermentation. **Food Chemistry**. 59, 1-5. 1997.
- _____. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. **Journal Scienc Food Agricultural**. v.76, p.123-128. 1998.
- _____. Analysis of vicilin (7S)- class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 28-732, 2002.
- AMORES, F.; JIMÉNEZ, J. **Aspectos de localidade de cacao**. 2007, Quevedo, Equador: INIAP (Estación Experimental Tropical Pichilingue), 2007. p.1-3.
- AMORES, F.; PALACIOS, A.; JIMÉNEZ, J.; ZHANG, D. **Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización Del cacao en el nor oriente de la provincia de esmeraldas**. Quevedo, Los Ríos, Equador: INIAP, 2009. p. 120 (Boletín Técnico, 135). 2009.
- ARAGÃO, C. G. **Mudanças Físicas e Químicas da Semente de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) Durante o Processo Fermentativo**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Fundação Universidade do Amazonas. Pósgraduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Manaus, 1992.
- ARAUJO, Q. R. GATTWARD, J. N.; ALMOOSAWI, S.; SILVA, M. D. C.; DANTAS, P. A.; JÚNIOR, Q. R. Cacao and Human Health: from Head to Foot - A Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 24 ago. 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 2000.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F.; JR. E. D. S. Handbook of proteolytic enzymes. **Elsevier**, London: Academic Press, 2004.
- BARRETT, A. J. The many forms and functions of cellular proteinases. **Federation Proceedings**, v. 39, n. 1, p. 9-14, Jan. 1980.
- BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. London. Edited by Stephen T. Beckett, Blackwell Publishing Ltd., 2009, 732p. 2009.
- BHATTI, N. H. ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Studies on Kinetics and Thermostability of a Novel Acid Invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54, p. 4617-4623. 2006.
- BIEHL, B.; WEWETZER, C.; PASSERN, D. Vacuolar (storage) protein of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, p. 1291-1304. 1982.

BYTOF, G.; BIEHL, B.; HEINRICH, H.; VOIGT, J. Specificity and stability of the carboxipeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**. v. 54. P. 15-21. 1995.

BUCHELI, P.; PÉTIARD, V. **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.; ADDO, S. K.; TAKRAMA, J. S.; BERNAERT, H.; VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2008.

CARVALHO, H. A. S. **Análise bioquímica e molecular de protease na interação *Theobroma cacao* – *Minilophthora pernicioso***. Ilhéus, BA. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade de Estadual de Santa Cruz. P 71. 2007.

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

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.

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

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

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCÍA, N. H. HADDAD, R. EBERLIN, M. N. Phenolic Compound Content in Cocoa Seeds from Different Genotypes. **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**. 2009. 226 p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2009.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [Dissertação de mestrado] Faculdade de Agronomia, 80p., 2006.

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

HANSEN, C. E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, 273-81. 1998.

HANSEN, C. E; MAÑEZ, A; 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**, London, v. 80, p. 1193-1198, 2000.

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.

LARCHER, G.; BOUCHARA, J. P.; ANNAIX, V.; SYMOENS, F.; CHABASSE, D.; TRONCHIN, G. Purification and characterization of a fibrinolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. **FEBS Letters**, v. 308, p. 65–69, 1992.

LIMA, E. D. P. A. PASTORE, G. M. BARBERY, S. D. F.; GARCIA, N. H. P.; BRITO E. S.; LIMA, C. A. A. Obtenção e utilização da enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura no melhoramento do sabor do cacau (*Theobroma cacao* L) **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jabotivabal – SP, v. 23, n. 3, 709-713. 2001.

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

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

LOPEZ A. S.; DIMICK, P. S. Enzymes Involved in Cocoa Curing. In: Food Enzymology (Vol. 1), ed. Fox, P.F. **Elsevier Science Publisher ltd. London**, V. 16, p. 211-236, 1991.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAAR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin fenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193, 265- 275. 1951.

MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **BMC Biochemistry**. v. 34, p. 33-38. 2002.

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

MUNDO, M. L. S.; MUÑHOZ, C. B.; FLORES, M. E. J. Characterization of the exopeptidase activity existing in *Theobroma cacao* L. during germination. **Process Biochemistry**. V. 45, p. 1156–1162. 2010.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 26(3): 582-588, jul.-set. 2006.

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

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.

OUATTARA, H. G.; KOFFI, B. L.; KAROU, G. T.; SANGARÉ, A.; NIAMKE, S. L.; DIPOH, J. K. Implication of Bacillus sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 24:1753–1760. 2008.

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

QUESNEL, V. C.; LOPEZ, A. A sweat-box for fermentation small samples of cacao. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.4, n.52, p.309-316, 1975.

REISDORFF, C.; ROHSIUS, C.; CLARET DE SOUZA, A. G.; GASPAROTTO, L.; LIEBEREI, R. Comparative study on the proteolytic activities and storage globulins in seeds of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum and *Theobroma bicolor* Humb Bonpl, in relation to their potential to generate chocolate-like aroma. **Journal Science Food Agricultural**, 84/7:693–700, 2004.

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.

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

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

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

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. A New Version of the Assistat - Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FLUSA: **American Society of Agricultural Engineers**, p. 393-396. 2006.

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

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

STURM, A. Invertases primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p.1-7. 1999.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, Sept. 2006.

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

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Ed. Acribia, S.A, 1997. v.2, p. 289-294 .

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

VOIGT, J.; BIEHL, B. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, Oxford, v. 47, p. 145-151, 1993.

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

WANG, S. L.; CHEN, Y. H.; WANG, C. L.; YEN, Y. H.; CHERN, M. K. Purification and characterization of a serine peptidase extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 660–665, 2005.

ZAMALLOA, W. A. C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

CAPITULO III

ESTUDO PROSPECTIVO RELATIVO A DEPÓSITOS DE PATENTES RELACIONADAS ÀS ENZIMAS PEPTIDASES

ESTUDO PROSPECTIVO RELATIVO A DEPÓSITOS DE PATENTES RELACIONADAS ÀS ENZIMAS PEPTIDASES

Ismara Santos Rocha* ; Paulo Túlio de Souza Silveira; Andrea Lobo Miranda; Sérgio Eduardo Soares

Universidade Federal da Bahia - UFBA, Faculdade de Farmácia, Salvador/BA - Brasil
(*ismararocha@hotmail.com)

RESUMO

As enzimas atuam acelerando as reações bioquímicas, dentre elas podem-se destacar as peptidases, peptídeo hidrolases ou proteases que clivam ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo prospectivo para mapear as pesquisas desenvolvidas sobre as enzimas peptidases cujos resultados foram patenteados, verificando a frequência de depósitos nos países que detêm essa tecnologia. A consulta foi realizada na base Espacenet®, utilizando como estratégia de busca o uso das palavras-chaves para determinar os códigos internacionais de classificação de patentes correspondentes. As patentes começaram a ser depositadas em 1960 e o maior número de depósitos ocorreu em 1994, sendo o código da Classificação Internacional de Patentes mais constante encontrado nessa prospecção foi A23J3/34. Os Estados Unidos apresentou-se como o maior depositante e verificou-se que 78,2% dos depositantes realizaram apenas um depósito com esse tema.

Palavras Chave: hidrolases;, patentes, prospecção tecnológica.

ABSTRACT

Enzymes act accelerating biochemical reactions, among them we can highlight the peptidases, hydrolases peptide or proteases that cleave peptide bonds in proteins and protein fragments. The aim of this study was a prospective study to map the developed research on enzymes peptidases whose results were patented by checking the frequency of deposits in countries that have this technology. The consultation was held in Espacenet® basis, using as search strategy the use of keywords to determine the international codes corresponding patent classification. The patents began to be deposited in 1960, the largest number of deposits occurred in 1994, and the code from the International Classification of Patents more constant was found that prospecting A23J3 / 34. The United States presented itself as the largest depositor and it was found that 78.2 % of depositors held only a deposit with that theme.

Keywords: Hydrolases; patents; technological forecasting

Área tecnológica: Ciências de Alimentos; Tecnologia de Alimentos.

INTRODUÇÃO

As enzimas têm como principal função a ação catalítica, ou seja, aceleram as reações bioquímicas, com extrema importância para o controle de processos (TORTORA et al., 2005).

Estas estão presentes na natureza, no nosso organismo, no ambiente e em todos os seres vivos, desempenhando um papel fundamental na conversão da luz ou da energia das ligações químicas em ATP na transformação de nutrientes contendo carbono e metabolitos utilizáveis pelas células, na replicação e expressão da informação genética e na detecção e transdução de sinais químicos externos à célula (DEUTCH, 2007).

O pH, a temperatura, a concentração de substrato e a presença de inibidores são os principais alteradores da ação enzimática (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002). A atividade biológica da enzima se dá no sítio ativo, local que permite a interação de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia proteica.

As enzimas apresentam três propriedades essenciais: a atividade, que é a capacidade da enzima de agir de forma a reduzir a energia necessária para transformar um substrato em produto, aumentando a velocidade da reação; a especificidade, sendo esta a afinidade da enzima por grupos específicos em um determinado substrato; e a estabilidade, que 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 (BAILEY e OLIS, 1986; BLANCH e CLARK, 1997; GALVÃO, 2004).

Entre as enzimas podemos destacar as peptidases, peptídeo hidrolases ou proteases, que são enzimas hidrolíticas e clivam ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas. Elas têm presença universal entre os seres vivos e respondem por cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, em vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Adicionalmente, muitos micro-organismos secretam peptidases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise são fontes de carbono e nitrogênio para o seu crescimento (BARRETT, 1994; BARRETT et al., 2001). O grau de especificidade das peptidases está relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e os adjacentes a eles (KOBBLITZ, 2008).

A maioria das proteases são específicas, ou seja, não hidrolisam moléculas de proteína em qualquer ligação peptídica, mas apenas em ligações entre aminoácidos específicos. Se tais ligações existirem abundantemente na proteína, pode-se esperar uma considerável hidrólise proteica. Por outro lado, existem proteases que não são específicas quanto à composição dos aminoácidos que elas hidrolisam e podem, portanto, hidrolisar a proteína em vários fragmentos menores (VIEIRA, 2013).

As peptidases são classificadas de acordo com o ponto de clivagem proteolítica. Quando degradam os terminais de uma cadeia polipeptídica são denominadas exopeptidases, e, quando catalisam a clivagem de ligações peptídicas internas, são denominadas endopeptidases ou proteinases. As exopeptidases podem ainda ser subdivididas em carboxi ou aminopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas no terminal carboxi ou amino da cadeia de aminoácidos do substrato, respectivamente (MacDONALD, 1994; ROOSE e VAN NOORDEN, 1995).

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo prospectivo para mapear as pesquisas desenvolvidas sobre as enzimas peptidases, cujos resultados foram patenteados, verificando a frequência de depósitos nos países que detêm essa tecnologia.

METODOLOGIA

Para a realização da pesquisa no banco de dados de patentes utilizaram-se os termos: protease, peptidases e enzima. Consultou-se a base de dados de patentes do *European Patent Office* (EPO), conhecida como base *Espacenet*®. Utilizou-se como estratégia de busca o uso das palavras-chaves para determinar os códigos internacionais de classificação de patentes correspondentes. Assim, foi inicialmente identificado como o código de classificação que melhor representava o grupo de patentes de interesse, o código C12Y304/00, que corresponde a “Hidrolases que atuam sobre ligações peptídicas, ou seja, peptidases”. Na busca de patentes a partir deste código C12Y304/00, foram encontradas 466 patentes depositadas e dentre estas realizou-se o *download* de 89 patentes para posterior análise. Isso ocorre porque uma mesma patente pode ser depositada em diferentes países (famílias de patentes), com o objetivo de garantir o direito de exclusividade aos seus inventores nos mercados considerados como mais relevantes, uma vez que o direito da patente é territorial (MACHADO et al., 2012).

A pesquisa prospectiva foi realizada em maio de 2014. Os arquivos dos documentos de patentes foram compactados e exportados para o aplicativo *CSV – Comma separated values* (Valores separados por vírgulas) e posteriormente exportados para o *software Microsoft Office Excel 2007*, no qual foi possível analisar os dados tabelados.

Os resultados encontrados foram apresentados na forma de gráficos para discussão das possibilidades tecnológicas apresentadas pela pesquisa.

A análise dos dados considerou os seguintes indicadores: códigos de classificação internacional, o ano de depósito, os inventores, as empresas com maior número de depósitos realizados e o país de origem da patente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como dito na descrição da metodologia, a partir da estratégia de busca com palavras-chaves, foi inicialmente identificado como o código de classificação internacional de patentes que melhor representava o grupo de patentes de interesse C12Y304/00. Porém além deste, inicialmente foram analisados mais seis códigos. A Tabela 1 mostra a classificação internacional de patentes de cada código utilizado na busca.

Tabela 1: Descrição dos Códigos Internacionais de Patentes utilizados.

Códigos	Classificação
C12Y304/00	Hidrolases que atuam sobre ligações peptídicas, ou seja, peptidases
C12Y304/21104	Ligação de lectina, serina e protease-2
C12Y304/21105	Protease
C12Y304/21112	Protease sítio 1
C12Y304/21014	Protease serina microbiológica
C12Y304/21083	Oligopeptidase B, tripsina, protease
C12N9/00	Enzimas; proenzimas; As composições deste (preparações contendo enzimas para a limpeza de dentes A61K8/66, A61Q11/00; preparações medicinais que contêm enzimas

Tabela 1: Descrição dos Códigos Internacionais de Patentes utilizados.

Códigos	Classificação
	ou pró-enzimas A61K38/43; enzima contendo composições detergentes C11D; {enzimas com estrutura de ácido nucleico, por exemplo, ribozimas, C12N15/113}); Processos para preparar, ativar, inibir, separar ou purificar enzimas (preparação de malte C12C1/00)

Fonte: CPC, 2014.

A Tabela 2 mostra os códigos de classificação internacional de patentes utilizados individualmente ou de dois a dois, na busca de documentos de depósitos de patentes, e o total encontrado de documentos de patentes depositadas cuja classificação internacional corresponde aos códigos pesquisados.

Tabela 2: Total de patentes depositadas para os Códigos da Classificação Internacional pesquisados.

C12Y304/00	C12Y304/ 21104	C12Y304/ 21105	C12Y304/ 21112	C12Y304/ 21014	C12Y304/ 21083	C12N9/00	Total
X							100000
	X						466
		X					3
			X				1
				X			3
					X		128
						X	0
X	X						0
X		X					0
X			X				0
X				X			4
X					X		0
X						X	1
	X	X					0
	X		X				0
	X			X			0
	X				X		0
	X					X	0
		X	X				0
		X		X			0
		X			X		0

Tabela 2: Total de patentes depositadas para os Códigos da Classificação Internacional pesquisados.

C12Y304/00	C12Y304/ 21104	C12Y304/ 21105	C12Y304/ 21112	C12Y304/ 21014	C12Y304/ 21083	C12N9/00	Total
		X				X	0
			X	X			0
			X		X		0
			X			X	0
				X	X		0
				X		X	0
					X	X	0

Fonte: Autoria própria, 2014.

Com base na Tabela 2, pode-se verificar que há um grande número de depósitos de patentes com código de classificação internacional C12N9/00, que se refere a enzimas e proenzimas. Dado o caráter genérico deste código, ele não é capaz de direcionar a pesquisa para a área de interesse: peptidases. Assim, a pesquisa prosseguiu analisando os documentos de patentes relacionados ao código de classificação internacional C12Y304/00.

Ao realizar a pesquisa com os códigos da classificação internacional de patentes na tentativa de buscar um maior número de documentos depositados, foram identificados 89 patentes na área de interesse desta pesquisa: peptidases. Após a análise das patentes encontradas, foi possível observar que grande parte destas foram classificadas também na Seção A (Necessidades Humanas), embora a maioria dos depósitos de patentes sobre enzimas se encontra na Seção C (Química e Metalurgia). A Figura 1 mostra o número de patentes relacionadas às enzimas peptidases resultantes desta pesquisa por códigos e suas respectivas definições.

No código A23J encontram-se patentes relacionadas com formulações de proteínas para gêneros alimentícios, o que pode explicar a ocorrência dos depósitos de patentes na Seção A, visto que as enzimas são proteínas e, dessa forma, as patentes também se encontrarão nessa classificação. Encontraram-se 23 patentes depositadas (3,65%) no código A23J3/34, e em 24% dos códigos analisados existe apenas uma patente depositada.

Em relação aos inventores, a maioria (84,4%) destes consta em apenas um depósito de patente. Na Figura 2, podem ser observados os doze inventores que mais se destacaram nos documentos de depósito de patentes aqui analisados. Dentre estes doze, três constam como inventores em três depósitos de patentes e nove são citados como inventores em dois documentos de depósitos de patentes.

Alguns destes inventores participam da invenção em parceria, como pode ser observado no caso de Jenkins e Wild, cujo direito de propriedade da patente foi apresentado pela empresa depositante RHONE POULENC INC (denominada hoje como Safoni, uma empresa farmacêutica multinacional com sede na França). Os inventores Krause, Maeder, Roick e Schirner também constam juntos de duas dois pedidos de depósitos de patentes apresentados pela empresa depositante CERESAN GMBH MARKRANSTAEDT, assim como Heilscher e Lorber por meio do depositante HEILSCHER KARL PROF DR SC que é um inventor independente; e Beck, Wagner e

Leuenberger, pela empresa DSM IP ASSETS BV. Estas empresas também podem ser visualizados na Figura 3, pois as mesmas se encontram entre aquelas que mais tiveram patentes depositadas.

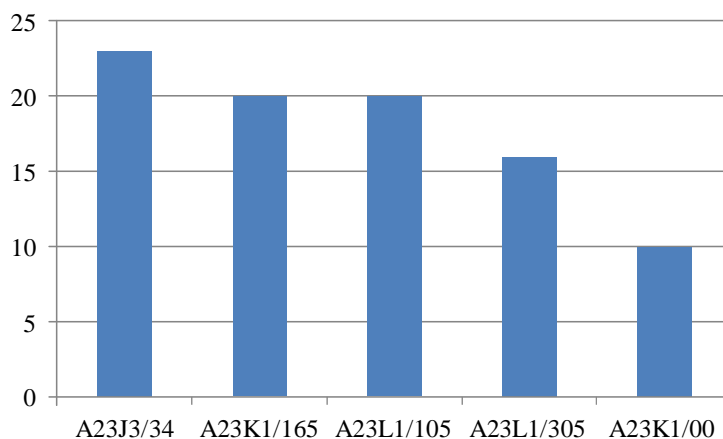


Figura 1: Distribuição das patentes relacionadas às enzimas peptidases por códigos da classificação internacional na Seção A (Necessidades Humanas). Fonte: Autoria própria, 2014.

Legenda:

A23J3/34: Trabalho com proteínas para os gêneros alimentícios usando enzimas. A23K1/165: Alimentos para animais (detoxificação ou remoção de gosto amargo de sementes, por exemplo, sementes de tremço para forragem) com esteróides, hormônios ou enzimas. A23L1/105: Os alimentos ou produtos alimentares, sua preparação ou tratamento da fermentação de cereais farináceos ou material cereal; A adição de enzimas ou microrganismos. A23L1/305: Os alimentos ou produtos alimentares, sua preparação ou tratamento com aminoácidos, peptídeos ou proteínas. A23K1/00: Alimentos para animais (detoxificação ou remoção de gosto amargo de sementes, por exemplo, sementes de tremço para forragem).

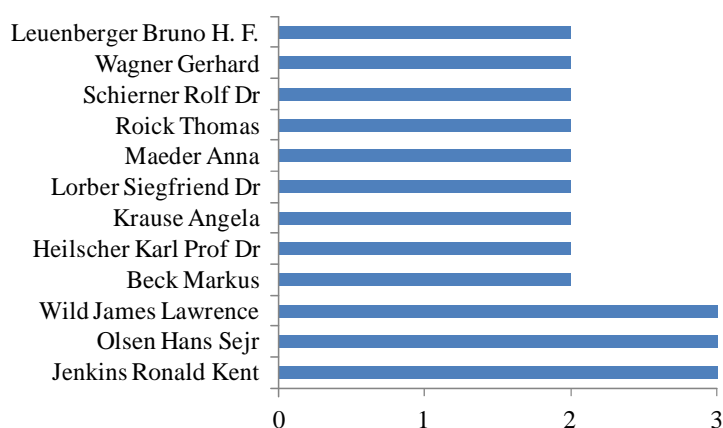


Figura 2: Inventores com maiores números de patentes relacionadas às enzimas peptidases depositadas. Fonte: Autoria própria, 2014.

Quanto aos depositantes, verificou-se que 78,2% dos depositantes realizaram apenas um depósito com esse tema. Dentre os mais expressivos, a empresa DSM IP ASSETS BV se destaca com 4 patentes depositadas para proteção de tecnologias relacionadas com enzimas. A RHONE POULENC INC, dos Estados Unidos, possui 3 patentes depositadas, assim como a empresa NOVOZYMES AS que é uma empresa dinamarquesa.

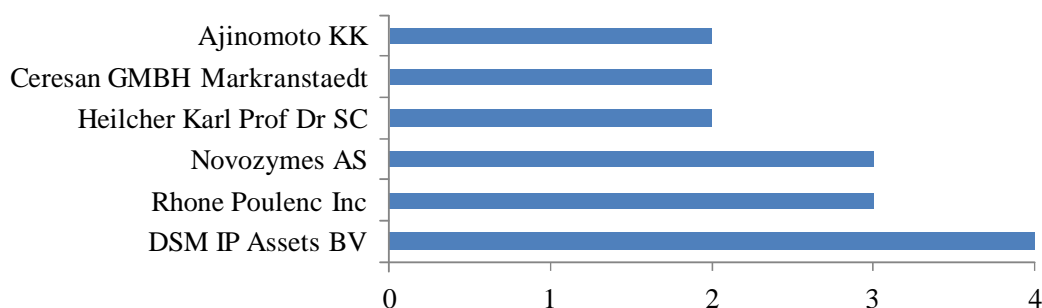


Figura 3: Depositantes com maior número de patentes depositadas relacionadas às enzimas peptidases. Fonte: Autoria própria, 2014.

A pesquisa sobre os países nos quais foram originadas as tecnologias patenteadas foi realizada através da identificação do país de origem do depositante. Por meio desta, verificou-se que os Estados Unidos é responsável pelo maior número de depósitos de patentes. A Figura 4 relaciona o número de patentes depositadas por país de origem que não estavam em sigilo até o momento da pesquisa.

O Japão é o país que se encontra em 2º lugar, com 15,9% de patentes depositadas. O Brasil não apresentou depósito de patente com esse tema.

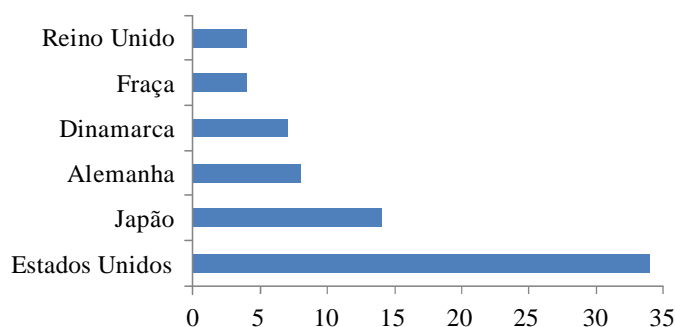


Figura 4: Número de Patentes relacionadas às enzimas peptidases depositadas por País. Fonte: Autoria própria, 2014.

O primeiro depósito de patente sobre peptidase ocorreu em 1936, por Alfred Klotz no Escritório de Patentes dos Estados Unidos, e a invenção foi intitulada Produção de papaína e método semelhante de preparação. A segunda patente na área só foi depositada 47 anos depois, e foi sobre a produção de substância com sabor de queijo e método de produção da mesma, também depositada nos Estados Unidos.

Na Figura 5 é possível observar uma ocorrência maior no número de depósitos de patentes no ano de 1994, apresentando 14 patentes depositadas. Segundo Mayor (1992) algumas novidades seriam previsíveis diante da reação do consumidor ao setor alimentício, onde entre 1990-1995 seriam comercializados novos alimentos para necessidades nutricionais específicas, corantes e ingredientes alimentícios e a partir de 1995 poderiam ser comercializados outros produtos, como bactérias alimentares modificadas geneticamente para dar aroma e qualidade e enzimas alimentares modificadas, dessa forma estudos ocorreram acerca do tema.

Nos anos subsequentes houve redução até o ano de 2013, no qual foi encontrado apenas um pedido de depósito, porém no último ano da análise prospectiva sempre há uma redução do número de pedidos de direitos de propriedade intelectual, devido ao período de sigilo de 18 meses dos documentos de patentes antes de se tornarem públicas.

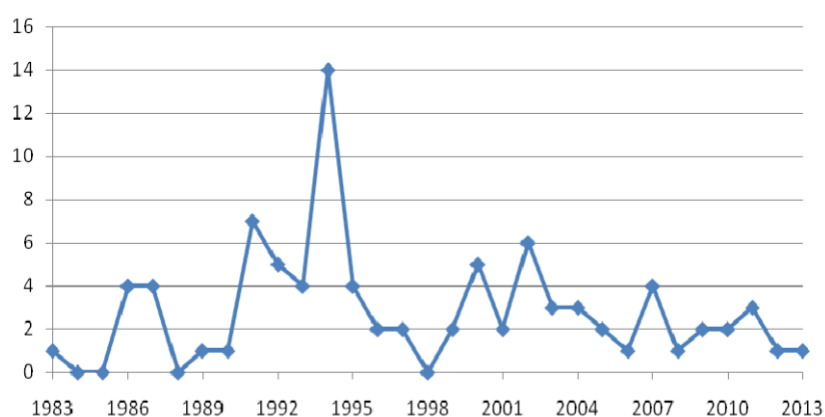


Figura 5: Evolução anual de depósitos de patentes sobre enzimas peptidases entre 1983 e 2013. Fonte: Autoria própria, 2014.

Na Figura 6 pode ser observada a quantidade de patentes sobre enzimas relacionadas com processo, produto ou ambos. De acordo com o visualizado na Figura 6 existe uma maior ocorrência no depósito de patentes de processo (48,3%).

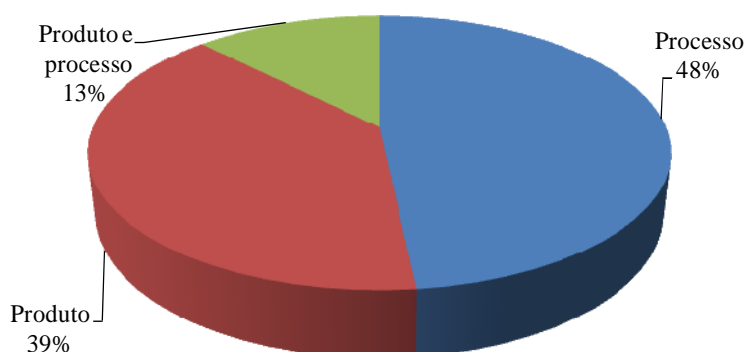


Figura 6: Distribuição dos tipos de patentes depositadas sobre enzimas peptidases. Fonte: Autoria própria, 2014.

CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível obter o mapeamento de pesquisas desenvolvidas com enzimas peptidases cujos resultados foram patenteados. De acordo com a prospecção tecnológica realizada, pôde-se verificar que a maior quantidade de patentes depositadas receberam classificação internacional de patentes relativa ao código A23J3/34, que engloba patentes sobre trabalho com proteínas para os gêneros alimentícios usando enzimas.

Houve uma quantidade considerável de depósitos de patentes no ano de 1994, sendo os Estados Unidos o país que se destaca como aquele com maior número de patentes, e o Brasil, por sua vez, não apresentou patente depositada na área pesquisada.

A empresa DSM IP ASSETS BV foi a que se destacou. Em relação aos inventores, notou-se que os que mais se destacaram depositaram patentes pela mesma empresa.

PERSPECTIVAS

Apesar do decréscimo do número de depósitos de patentes envolvam o uso de enzimas em alimentos, pesquisas desenvolvidas e patenteadas com enzimas peptidases apresentam potencial exploratório devido a sua importância em vias metabólicas, sendo interessante na área de alimentos. Sendo assim existe a necessidade de investimentos no Brasil, de forma a avançar no estudo e consequentemente avançar tecnologicamente no conhecimento e utilização dessa enzima.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, J. E. e OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Second edition. New York, 1986.
- BARRETT, A. J. Classification of Peptidases. In: Meth. Enzymol. Academic Press, Inc., California, Ed. 244. p. 1-15, 1994.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a peptidase information system. **J. Struct Biol**, Ed. 134. p. 95-102, 2001.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. D. S. **Biochemical Engineering**. Estados Unidos. New York: Marcel Dekker. 1997.
- DEUTCH, C. Degradative Enzymes from the Pharmacy or Health Food Store: Interesting Examples for Introductory Biology Laboratories. **American Biology Teacher**, v. 69, n. 6, p. 64-70. 2007.
- 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.
- GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes**. 191f. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Química). São Carlos, SP. 2004.
- KOBILITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- MacDONALD, M. L.; WEISS, P. J.; DELOACH, L. J.; CORNER, S. W. Primary cutaneous mucormycosis with a *Mucor* species: is iron overload a factor. **Cutis**. Ed. 54. p. 275-278. 1994.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; FIGUEIREDO, T. V. B.; DRUZIAN, J. I. Mapeamento tecnológico da goma xantana sob o enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1970 a 2009. **Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 2, p. 154-165, 2012.

MAYOR, F. **As biotecnologias no início dos anos noventa: êxitos, perspectivas e desafios**. Estudos avançados. v. 6, n. 16, 1992.

ROOSE J. P.; VAN NOORDEN C. J. F. Synthetic protease inhibitors: promising compounds to arrest pathologic processes. **J. Lab. Clin. Med.** Ed. 125, p. 433-441, 1995.

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

VIEIRA, H. S. F. **Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha**. 54f. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa. 2013.