

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

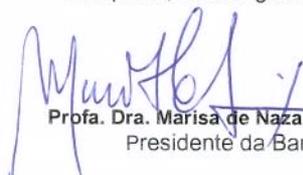
**ESTUDO COMPARATIVO DAS TRANSFORMAÇÕES ESTRUTURAIS E
FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE
AMÊNDOAS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) E CUPUAÇU
(*Theobroma grandiflorum* Schum)**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Rafaella de Andrade Mattietto** aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de agosto de 2001.

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas, 10 de agosto de 2001

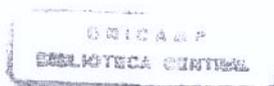

Profa. Dra. Marisa de Nazaré H. Jackix
Presidente da Banca

RAFAELLA DE ANDRADE MATTIETTO
Engenheira Química

Prof^a Dr^a MARISA DE NAZARÉ H. JACKIX
Orientadora

CAMPINAS -SP
2001

i



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BE
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
M434e
V. 46254
TOMBO BC/ 16-39210-1
PROC. 16-39210-1
C D
PREC. R\$ 11,00
DATA 13/09/01
N.º CPD

CM00159624-1

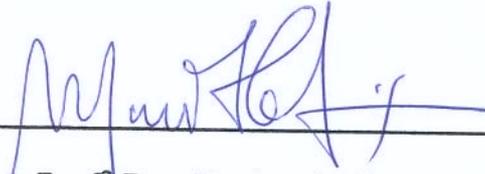
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA - UNICAMP

M434e Mattietto, Rafaella de Andrade
Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) / Rafaella de Andrade Mattietto. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Marisa de Nazaré Hoelz Jackix
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cacau. 2. Cupuaçu*. 3. Fermentação. I. Jackix, Marisa de Nazaré Hoelz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

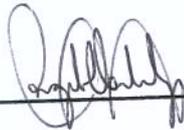
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dra. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix
(Orientadora)



Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García
(Membro)



Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo
(Membro)

Prof^a Dra. Hilary Castle de Menezes
(Membro)

SECRETARIA

À minha avó Léa, com muito amor e saudade, por ter sido para mim um exemplo de luta.

E aos meus pais, Yone e Pier, por serem o que tenho de mais importante.

DEDICO

"Não são os frutos da pesquisa científica que elevam um homem e enriquecem sua natureza, mas sim a ânsia de compreender, o trabalho intelectual criativo e receptivo"

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Yone e Pier, pelo amor incondicional, incentivo, enorme carinho e por sempre, sempre me apoiarem em todos os caminhos que decidi seguir.

À Prof^ª Dr^ª Marisa de Nazaré Hoelz Jackix, pela confiança, apoio e valiosa orientação no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade ao longo desses 2 anos.

Ao Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa Garcia, por acompanhar de perto o projeto com valiosas sugestões, pela amizade, atenção e disponibilidade de sempre.

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, por ter disponibilizado o laboratório para as análises de microestrutura, por toda atenção dispensada, pela participação direta nos resultados, pela amizade e valiosa contribuição.

À Prof^ª Dr^ª Cristiana Noronha, por ter acreditado no projeto, por ter dividido comigo sua experiência em biologia celular, por toda sua atenção, ajuda, incentivo e amizade.

À Priscila Ferraz e Isabel Gallão, por terem iniciado o preparo das amêndoas para posterior continuação das técnicas para análise de microestrutura.

A Prof^ª Dr^ª Adilma Scamparini, por ter disponibilizado o laboratório para as análises de cromatografia líquida. Agradecimentos especiais à Janice, pelo apoio e atenção durante as análises e ao Severino, pela grande ajuda nas análises de ácidos.

A Prof^ª Dr^ª Lireny Gonçalves, por ter disponibilizado o laboratório para as análises de cromatografia gasosa. Agradecimentos à Vitória, pela ajuda e parceria nas análises de ácidos graxos.

À toda minha família pelo amor, incentivo e imensa torcida. Em especial, ao meu irmão Leonardo e minha cunhada Andréa, minha avó Anna, meus tios Sergio e Simone e meus queridos primos Larissa, Camila e João Paulo.

À Clau, irmã de coração, por estar sempre presente, mesmo estando longe fisicamente. Obrigada pela força, apoio, carinho e por todos esses anos de amizade.

À Alessandra “mestre Alê”, amiga de todas horas, meus agradecimentos especiais por todos os ensinamentos no decorrer deste trabalho. Muito obrigada pela força, pelo apoio e “mão de obra”, pelas conversas e imenso carinho de sempre.

Ao Marcus, por todo apoio desde o início. Obrigada pelas dicas, palpites, inúmeros favores, “mão de obra” e principalmente pelo carinho, nossas boas risadas e tudo mais que um bom amigo pode proporcionar.

À Su, Leilinha e Marinalda, pela convivência ao longo desses anos. Muito mais que dividir um apartamento eu aprendi muito com cada uma de vocês. Obrigada pela amizade especial, força e apoio de sempre!!

À minhas amigas incondicionais Kátia, Zilminha, Carol e Dani “Dan Dan” pela amizade de tanto tempo e por saberem dividir comigo todos os momentos.

À Cida “Cidoquinha”, pela força, pelas brincadeiras, pelos inúmeros favores, pelas conversas e “puxões de orelha”, enfim pela grande companhia e amizade.

As técnicas do lab. de Frutas, Aninha e Priscila, muito obrigada por todos os ensinamentos, todo carinho e amizade que sempre me demonstraram. A Carla e Kélia, técnicas dos laboratórios de Funcionalidade de Proteínas (FEA) e Biologia celular (IB) respectivamente, por toda ajuda nas análises que precisei desenvolver nessas unidades.

Aos amigos de curso e da Unicamp, por amenizarem as saudades e fazerem desses 2 anos em Campinas, um tempo bom! Em especial à Carlinha e Xela, Kellynha Cohen, Dani “fashion”, “Ms”. Eli, Henrique, “tio” Ed, Laura “Palmer”, Cris Taxi, Enilene, Karina, Valéria, Vanina, Danizinha, Vitor, Amanda, Gabi, Lu, Neivinha, Rodrigo e Silvia.

À todos aqueles que sempre torceram e fazem parte da minha vida mesmo de longe. Meus agradecimentos especiais ao André (“personal power translator” de textos em francês), a Carol e Claudine Sarmanho, Evelyn Farias, Estevinho, Bel, Gilce, Eunice, Evelyn Trindade, Mery, Lena, Su, Paulo Eduardo e Pedro.

Muito obrigada!!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xix
SUMMARY.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 CACAU.....	7
3.1.1 Aspectos gerais.....	7
3.1.2 Características do fruto.....	11
3.2 CUPUAÇU.....	14
3.2.1 Aspectos gerais.....	14
3.2.2 Características do fruto.....	15
3.3 FERMENTAÇÃO.....	20
3.3.1 Técnicas de fermentação.....	24
3.4 TRANSFORMAÇÕES ESPECÍFICAS DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO.....	29
3.4.1 Microbiologia da fermentação.....	30
3.4.2 Transformações estruturais.....	32
3.4.3 Transformações físico-químicas e biológicas.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 MATERIAL.....	45
4.1.1 Matéria prima.....	45
4.1.2 Equipamentos.....	46
4.1.3 Reagentes.....	46
4.2 MÉTODOS.....	47
4.2.1 Fermentação e Secagem.....	47

4.2.2	Classificação das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu.....	48
4.2.3	Análise das características físico-químicas das sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu.....	48
4.2.4	Análise de açúcares e ácidos solúveis em água durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau e cupuaçu.....	49
4.2.5	Análise do perfil de aminoácidos livres durante o processo fermentativo de cacau e cupuaçu.....	50
4.2.6	Análise de fenóis totais durante o processo fermentativo de cacau e cupuaçu.....	51
4.2.7	Composição e percentual de ácidos graxos da gordura de cacau e cupuaçu durante o processo fermentativo.....	52
4.2.8	Análise da microestrutura das sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu.....	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	FERMENTAÇÃO.....	57
5.1.1	Perfil de temperatura durante a fermentação	57
5.1.2	Variação de pH nos cotilédones e testas durante a fermentação.....	61
5.1.3	Variação da acidez total titulável dos cotilédones durante a fermentação.....	67
5.1.4	Classificação das amêndoas fermentadas de cacau e cupuaçu.....	70
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.....	73
5.2.1	Umidade.....	73
5.2.2	Teor de lipídios.....	77
5.2.3	Teor de proteína.....	81
5.2.4	Teor de cinzas.....	85
5.2.5	Teor de fibras.....	87
5.2.6	Composição centesimal das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu.....	90

5.3 ANÁLISE DE AÇÚCARES E ÁCIDOS SOLÚVEIS EM ÁGUA NOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.....	91
5.3.1 Açúcares.....	91
5.3.2 Ácidos solúveis em água.....	100
5.4 ANÁLISE DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES NOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.....	107
5.5 ANÁLISE DO PERFIL DE FENÓIS TOTAIS NOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.....	113
5.6 COMPOSIÇÃO E PERCENTUAL EM ÁCIDOS GRAXOS.....	117
5.7 ANÁLISE DA MICROESTRUTURA DAS SEMENTES E AMÊNDOAS DE CACAU E CUPUAÇU.....	121
5.7.1 Azul de Toluidina (AT).....	121
5.7.2 Xylidine Ponceau.....	127
5.7.3 Método do PAS/Reativo de Schiff.....	133
5.7.4 Amido.....	137
5.7.5 Floroglucina.....	141
6.CONCLUSÕES.....	145
7.REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS.....	147
ANEXOS.....	163

LISTA DE TABELAS

01. Composição centesimal das sementes de cacau segundo alguns autores.....	13
02. Composição centesimal da polpa de cupuaçu segundo alguns autores.....	19
03. Composição centesimal das sementes de cupuaçu segundo alguns autores..	19
04. Caracterização das principais enzimas ativas na semente de cacau.....	29
05. Classificação das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu.....	70
06. Composição centesimal das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu.....	90
07. Açúcares detectados e suas respectivas concentrações ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cacau.....	91
08. Açúcares detectados e suas respectivas concentrações ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cupuaçu.....	95
09. Ácidos detectados e suas respectivas concentrações ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cacau.....	100
10. Ácidos detectados e suas respectivas concentrações ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cupuaçu.....	105
11. Composição em aminoácidos livres (expressos em mg aa/100g de amostra) da semente, quarto e sétimo dia de fermentação e amêndoa fermentada e seca de cacau e cupuaçu.....	109
12. Valores de fenóis totais ao longo da fermentação de cacau e cupuaçu.....	113

LISTA DE FIGURAS

01. Produção mundial de grãos de cacau (em porcentagem) ano 1997/98.....09
02. Fruto do cacau ainda na planta e aberto, com a polpa mucilaginosa à mostra.....11
03. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) ainda na planta e aberto, com a polpa mucilaginosa à mostra.....17
04. Fluxograma resumido do processamento das sementes de cacau para produção de chocolate e a relação das etapas com o desenvolvimento de sabor.....21
05. Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por GRIMALDI (1978).....27
06. Secção de um cotilédono de cacau.....33
07. Fluxograma das etapas ocorridas na fermentação do cacau.....43
08. Perfis de temperatura das sementes de cacau e cupuaçu durante a fermentação.....57
09. Valores de pH dos cotilédones de cacau e cupuaçu durante o processo fermentativo.....61
10. Valores de pH na testa de cacau e cupuaçu durante o processo fermentativo.....63
11. Acidez titulável dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.....67

12. Umidade dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.....	73
13. Teor de lipídios dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.....	77
14. Teor de proteína total dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.....	81
15. Cinzas totais dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.....	85
16. Teor de fibras nos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo da fermentação.....	87
17. Perfil de açúcares encontrados nos cotilédones de cacau e suas transformações ao longo da fermentação.....	93
18. Perfil de açúcares encontrados nos cotilédones de cupuaçu e suas transformações ao longo da fermentação.....	97
19. Perfil dos ácidos encontrados nos cotilédones de cacau e suas transformações ao longo da fermentação.....	103
20. Perfil dos ácidos encontrados nos cotilédones de cupuaçu e suas transformações ao longo da fermentação.....	107
21. Perfil de fenóis totais nos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.....	113

22. Comportamento dos ácidos graxos encontrados na gordura de cacau ao longo do processo fermentativo.....	117
23. Comportamento dos ácidos graxos encontrados na gordura de cupuaçu ao longo do processo fermentativo.....	119
24. Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (200x) em diferentes tempos de fermentação corados com AT.....	123
25. Cortes de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (200x) em diferentes tempos de fermentação corados com XP.....	129
26. Cortes de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu em diferentes tempos de fermentação corados com PAS.....	135
27. Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (400x) em diferentes tempos de fermentação corados em AT e submetidos a polarização.....	139
28. Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (200x) em diferentes tempos de fermentação corados pela reação Floroglucina/HCl.....	143

RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), espécime do mesmo gênero botânico que o cacau, é um dos frutos mais importantes da região Amazônica. A comercialização de sua polpa, com sabor exótico muito apreciado e em plena expansão no Brasil, começa a despertar interesse no mercado exterior. A crescente industrialização da polpa tem disponibilizado um volume significativo de sementes, atualmente um subproduto com incipiente aproveitamento industrial. Correspondendo a 20% do peso do fruto, esta semente de composição química semelhante a do cacau têm sido objeto de pesquisas que comprovam que quando submetidas às mesmas etapas de processo que aquele, resultam num produto semelhante ao chocolate. O processo de industrialização do cupuaçu inicia-se de modo análogo ao cacau, com a fermentação das sementes. A etapa é indispensável, pois ocorrem importantes transformações que estão relacionadas com o desenvolvimento dos precursores de sabor e com a qualidade global do chocolate. Realizar um estudo comparativo das transformações que ocorrem nas sementes de cacau e cupuaçu, submetidas às mesmas condições de processo fermentativo, foi o objetivo deste trabalho. A fermentação foi monitorada através da temperatura, pH e acidez. As avaliações foram feitas diariamente durante os sete dias de fermentação e após secagem. No início do processo as sementes de cacau e cupuaçu apresentaram respectivamente os seguintes resultados: 33,69 e 33,83% de umidade, 15,54 e 9,86% de proteínas, 50,08 e 58,83% de lipídios, 5,2 e 7,33% de fibras e 3,02 e 2,93% de cinzas. O perfil ao longo dos dias de fermentação foi semelhante para ambos, ressaltando que o cupuaçu apresentou uma maior absorção de água e uma queda significativa nos teores de fibras. A prova de corte revelou que as amêndoas de cacau e cupuaçu foram muito bem fermentadas e que eram do Tipo I (superior) de acordo com a classificação oficial (CONCEX, 1968). A composição final para as amêndoas secas de cacau e cupuaçu foi respectivamente: 6,06 e 4,69% de umidade, 10,78 e 9,76% de proteínas, 53,59 e 60,25% de lipídios, 3,80 e 3,44% de fibras e 2,05 e 2,26% de cinzas. Verificou-se que durante a fermentação a redução de sacarose de 94,16%

para o cacau e 95,09% para o cupuaçu foi acompanhada pela formação de açúcares redutores (glicose e frutose), que atingiram valores máximos ao quinto dia (teores de 1,88 e 0,71% para cacau e cupuaçu, respectivamente). Observou-se decréscimo nos valores iniciais de ácido cítrico (queda de 80,55% para cacau e praticamente de 100% para o cupuaçu). A formação de ácido acético, embora menos intensa para o cupuaçu, foi bastante significativa e seus valores máximos foram atingidos ao terceiro dia de fermentação para cacau (teor de 1,41%) e quarto dia para o cupuaçu (teor de 0,97%). Quanto aos aminoácidos livres, observou-se um aumento significativo nos teores, variando de 1050 a 2610 mgaa/100g para o cacau e 700 a 1690 mgaa/100g para o cupuaçu. No estudo dos fenóis totais, um decréscimo significativo foi observado, com quedas de 36,41 e 47,63% para cacau e cupuaçu, respectivamente. A composição de ácidos graxos, não variou durante os sete dias de processo. As transformações subcelulares foram analisadas microscopicamente por meio de métodos citoquímicos (azul de toluidina, xylidine ponceau, PAS e floroglucina) que mostraram-se adequados para a visualização de fenômenos como rompimentos celulares, degradação de proteínas, difusão de compostos fenólicos e identificação de amido.

SUMMARY

Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum), specimen of the same botanical genus that cocoa, is one of the most important fruits of the Amazon area. The commercialization of its pulp, with very appreciated exotic flavor and in full expansion in Brazil, it begins to wake up interest in the external market. The growing industrialization of the pulp has made available a significant volume of seeds, now a by-product with incipient industrial use. Corresponding at 20% of the weight of the fruit, this seed of similar chemical composition of the cocoa has been object of researches that check that when submitted to the same process stages as that, they result in a product similar to the chocolate. The process of industrialization of the cupuassu begins in a similar way to cocoa, with the fermentation of the seeds. The stage is indispensable, because important transformations that are related with the development of the flavor precursors happen and with the global quality of the chocolate. To accomplish a comparative study of the transformations that happen in the cocoa seeds and cupuassu, submitted to the same conditions of fermentation process, it was the objective of this work. The fermentation was monitored through the temperature, pH and titratable acidity. The evaluations were done daily during the seven days of fermentation and after drying. In the beginning of the process the cocoa and cupuassu seeds presented the following results: 33.69 and 33.83% of moisture, 15.54 and 9.86% of proteins, 50.08 and 58.83% of lipids, 5.2 and 7.33% of fibers and 3.02 and 2.93% of ashes, respectively. The profile along the days of fermentation went similar for both, standing out that the cupuassu presented a larger absorption of water and a significant drop in the fiber contents. The cut test showed that the cocoa and cupuassu seeds were very well fermented and they were classified as type I (superior) according to CONCEX (1968). The final composition for the dry seeds of cocoa and cupuassu was respectively: 6.06 and 4.69% of moisture, 10.78 and 9.76% of proteins, 53.59 and 60.25% of lipids, 3.80 and 3.44% of fibers and 2.05 and 2.26% of ashes. It was observed that during fermentation the reducing of sucrose 94.16% for cocoa and 95.09% for cupuassu

originated the reducing sugars (glucose and fructose) reaching a maximum on the fifth day (levels of 1.88 and 0.71% for cocoa and cupuassu, respectively). It was also observed a decrease in the initial values for citric acid (drop of 80.55% for cocoa and of practically 100% for cupuassu). The formation of acetic acid though less intense for cupuassu was very significant and the maximum values being reached on the third day of fermentation for cocoa (level of 1.41%) and fourth day for the cupuassu (level of 0.97%). With respect to the free amino acids, a significant increase was observed in the levels, varying from 1050 to 2610 mgaa/100g for cocoa and 700 to 1690 mgaa/100g for cupuassu. In the study of total phenols, a significant decrease was observed, with drops of 36.41 and 47.63% for cocoa and cupuassu, respectively. In the composition of fatty acids, no variation was observed during the seven days of processing. The subcellular transformations were analyzed microscopically by means of cytochemical methods (toluidine blue, xyloidine ponceau, PAS and floroglucin) that were shown appropriate for the visualization of phenomenons such as cellular breakings, degradation of proteins, diffusion of phenolic compounds and identification of starch.

1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é um fruto que tem uma grande expressão econômica no Brasil e no mundo. É consumido *in natura* ou em forma de refresco, licor, entre outros produtos obtidos de sua polpa. Entretanto, sua maior aplicação está no fato de suas amêndoas, mundialmente conhecidas, serem empregadas na fabricação de chocolate, um alimento de alto valor nutritivo (CAVALCANTE, 1991).

Muito próximo ao cacau, o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) carrega com ele não somente o nome do gênero *Theobroma*. De suas gordurosas amêndoas é possível se extrair uma pasta semelhante àquela com que se produz chocolate.

Fruto proveniente da região Amazônica, o cupuaçu é muito apreciado na região e atualmente vem ganhando mercado em outras regiões do Brasil e até mesmo internacionalmente, devido ao sabor e aroma bastante exótico e agradável.

O cupuaçu tem grande potencial para a industrialização. Entretanto, seu valor econômico atualmente só está baseado na comercialização da polpa (35% do fruto). Apesar das sementes apresentarem um valor nutritivo muito bom, ainda são praticamente descartadas durante o beneficiamento ou então são utilizadas como adubo (VENTURIERI, 1993).

Em recente pesquisa, LOPES *et al* (2000) concluíram que o valor biológico das amêndoas de cupuaçu é significativamente superior ao do cacau sugerindo que produtos à base de suas sementes sejam testados visando o consumidor infantil.

Em decorrência da importância do cupuaçu, tanto economicamente quanto nutricionalmente, alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de obter tecnologias apropriadas ao aproveitamento das sementes, entre os pioneiros pode-se citar COUTINHO (1969), VENTURIERI & AGUIAR (1988) e NAZARÉ (1990). Devido a semelhança botânica e composicional com o cacau, os métodos de aproveitamento utilizados foram praticamente os mesmos. Alguns trabalhos mais recentes buscaram avaliar parâmetros que contribuíssem para o melhoramento das condições de processo, entre os quais pode-se citar ARAGÃO (1997) e VASCONCELOS (1999) no estudo da fermentação; SOUSA *et al* (1999), DOSUALDO *et al* (1999), COHEN *et al* (1999) e SISMOTTO *et al* (1999) no estudo da alcalinização de nibs, conchagem e temperagem, liquor e perfil sensorial do cupulate; QUEIROZ (1999), BRITO (2000) e LOPES *et al* (2000) no estudo de melhoramento de sabor, torração e valor nutricional.

Para cacau, as transformações que ocorrem nas sementes e ao longo de cada etapa de processamento têm sido alvo de inúmeras pesquisas científicas a várias décadas. O desenvolvimento de sabor é um dos pontos mais estudados e devido a complexidade das reações, alguns mecanismos ainda não estão totalmente compreendidos. Sabe-se que o sabor de chocolate depende tanto de fatores agrônômicos como genótipo, plantio, cultivo e colheita como de etapas do próprio processamento como fermentação, secagem, torração e conchagem. Muitas dessas etapas são de difícil controle, assim a compreensão das mudanças que ocorrem podem viabilizar medidas que assegurem uma alta qualidade e uniformidade do produto final.

A etapa de fermentação é muito importante, pois é nela que o sabor do chocolate começa a ser formado, logo após a perda da capacidade germinativa da semente. Nesta etapa ocorrem reações bioquímicas no interior dos cotilédones, iniciando-se o desenvolvimento de compostos característicos, conhecidos como precursores do sabor de chocolate (ROHAN, 1964).

Tem-se verificado que o estudo das alterações histológicas no interior das sementes vem contribuindo bastante para o esclarecimento das complexas transformações que ocorrem durante a fermentação.

As alterações estruturais na semente de cacau já foram bastante estudadas por BIEHL e colaboradores em diversos trabalhos, que em sua maioria enfocam modificações subcelulares em condições que simulam uma fermentação. Entre as importantes observações, pode-se citar: absorção de água, difusão de ácido acético, quebra das organelas citoplasmáticas, fusão de lipídios e destruição dos vacúolos de polifenóis (BIEHL *et al*, 1977; BIEHL, 1982a,b,c). Em estudo mais recente, BRITO (2000) estudou as diferenças estruturais entre as sementes de cacau com 72 horas de fermentação e as amêndoas secas e torradas.

O único trabalho referente as alterações na microestrutura em sementes de cupuaçu durante a fermentação foi realizado por CUNHA *et al* (1997). Os resultados citoquímicos revelaram características já bastante observadas no cacau, como por exemplo a maior parte da reserva ser composta por lipídios e proteínas. Rompimentos celulares e difusão de compostos fenólicos também foram características observadas durante o processo.

ARAGÃO (1997) estudou algumas das transformações físico-químicas que ocorrem nas sementes durante fermentação de cupuaçu e ressaltou a importância de se desenvolver uma fermentação com a despolpa das sementes, tendo em vista que essa é a porção de maior valor econômico do fruto e que a remoção da mesma também proporciona um processo mais rápido e uniforme.

Com sementes despulpadas, VASCONCELOS (1999) desenvolveu um estudo de fermentação utilizando uma caixa específica (T-60), desenvolvida por GRIMALDI (1978) para fermentação de cacau. O autor acompanhou algumas das transformações físico-químicas que ocorrem ao longo do processo e concluiu que a metodologia é adequada para o cupuaçu, mostrando ser uma boa alternativa para produtores rurais, devido a facilidade do método.

Embora trabalhos sobre a fermentação de cacau e cupuaçu venham sendo desenvolvidos paralelamente ao longo dos últimos anos, um estudo comparativo entre as sementes dos frutos, fermentadas sob condições iguais de processo, no qual se relacionam transformações físico-químicas e modificações estruturais é algo ainda desconhecido. Este estudo pode disponibilizar importantes informações para otimização da fermentação e revelar particularidades que estariam diretamente relacionadas ao desenvolvimento de sabor.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Analisar algumas das alterações que ocorrem na estrutura celular das amêndoas de cacau e cupuaçu fermentadas sob iguais condições de processo e estabelecer uma relação dessas modificações estruturais com as alterações físico-químicas que ocorrem durante a fermentação. Com isso, um melhor entendimento das transformações que ocorrem nas sementes dos frutos durante a etapa pode ser alcançado.

2.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar mudanças estruturais que ocorrem nas amêndoas de cacau e cupuaçu durante o processo fermentativo.
- Estabelecer uma relação dessas mudanças com as transformações físico-químicas que ocorrem durante o processo.
- Comparar os resultados obtidos entre cacau e cupuaçu, revelando as diferenças entre os dois frutos e suas particularidades como matérias-primas para obtenção de chocolate e cupulate*.

* produto formulado com pasta da amêndoa de cupuaçu fermentada e torrada segundo NAZARÉ (1990)

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CACAU (*Theobroma cacao* L.)

3.1.1 Aspectos Gerais

O cacauero é uma planta tipicamente tropical, pertencente a família botânica Sterculiaceae, originária do continente americano, provavelmente das bacias do Rio Amazonas e Orenoco (SEA, 1980).

De uma forma geral, cultivam-se as variedades situadas entre os grupos criollo, forastero amazônico e trinitário (LAJUS, 1982):

- *Criollo*: caracteriza-se pela forma alongada, suas sementes são ovais e encontram-se relativamente soltas na polpa. Os seus cotilédones não contém células pigmentadas, portanto, caracterizam-se pela cor branca. Possui sabor e aroma agradáveis.

- *Forastero*: Frutos de forma mais arredondada, com casca dura de superfície quase lisa. As sementes são firmemente alojadas na polpa e são achatadas, de forma quase triangular. Possuem cotilédones de cor violeta. Possui sabor mais ácido e adstringente que as outras variedades. É o tipo mais resistente a pragas e doenças.

- *Trinitário*: Fruto resultante da hibridização entre árvores de cacau tipo criollo e forasteiro, porém bioquimicamente pesquisas sugerem ser o fruto mais próximo ao cacau criollo. Este tipo de híbrido é considerado por muitos como de alta qualidade.

No Brasil, cultiva-se comercialmente o cacau forasteiro, sendo que, ultimamente vêm sendo introduzidos diferentes híbridos, mais resistentes e produtivos (SEA, 1980).

Normalmente, o cacau é cultivado com êxito em regiões quentes e úmidas, com pequenas variações climáticas durante o ano. As temperaturas médias anuais entre 24 e 28°C são as que apresentam melhores condições para seu cultivo. Temperaturas inferiores de 12°C impedem ou reduzem a frutificação da planta. Quanto às suas exigências higrométricas, o cacau requer elevado índice de chuva e umidade atmosférica (SEAGRI, 1999).

O solo também é uma característica importante para o desenvolvimento da espécie. O cacau comporta-se bem em solos de textura argilosa, franco - argilosa ou franco-argilo-arenosa com boa capacidade de retenção de umidade, profundos, no mínimo de 80cm, pH superficial moderadamente ácido e bem drenados (SEA, 1980).

A formação de uma plantação de cacau é um empreendimento complexo e dispendioso. O bom rendimento só é obtido quando a orientação científica substitui técnicas primitivas. Além dos problemas de natureza agrônômica ligados à formação das roças de cacau (principalmente a doença conhecida por vassoura-de-bruxa), existem os de natureza econômica. O cacau só começa a dar rendimento apreciável depois do quinto ano de vida (FERREIRA, 1998).

Embora muitas regiões do mundo o cultivem, a maior parte da produção de cacau procede atualmente da África. Costa do Marfim é o maior produtor mundial. O Brasil já ocupou esse posto, porém nos últimos 15 anos houve uma decadência da produção, principalmente no sul da Bahia. Alguns dos fatores que influenciaram o declínio foram: a "vassoura de bruxa" que atacou de forma impiedosa as plantações baianas, a falta de investimentos em técnicas modernas de plantio e cultivo e também o baixo preço do cacau brasileiro no mercado mundial (FIEB, 1998 *apud* FERREIRA, 1998; ICCO, 1999).

No Sul da Bahia, situa-se a conhecida “Região Cacaueira” que abrange 89 municípios (cerca de 90.000 km²) e tem como centro as cidades de Ilhéus e Itabuna. Essa região é responsável por nada menos que 94% da produção de cacau brasileiro; os 6% restantes são oriundos dos Estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Pernambuco, Minas Gerais e Espírito Santo e do Território do Amapá. (SEAGRI, 1999)

Na Figura 01, pode-se observar a situação dos principais países produtores quanto a produção de cacau.

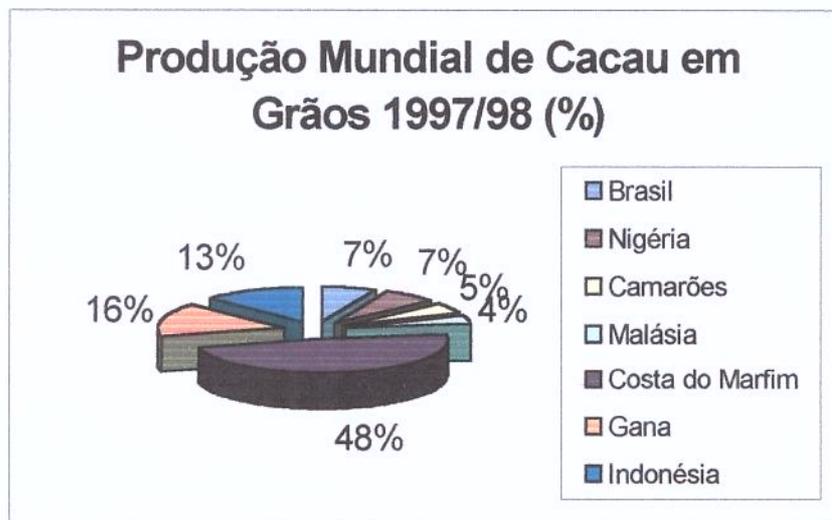


Figura 01. Produção mundial de grãos de cacau (em porcentagem) ano 1997/98. FONTE: ICCO (1999)

Segundo referências do IBGE (2001), a produção brasileira no ano de 2000 foi de 191.078 toneladas e a estimativa para safra de 2001 seria de 191.133 toneladas, esperando-se assim a pequena variação de 0,03%.

3.1.2 Características do fruto

O fruto (Figura 02) é alongado com sulcos longitudinais, de casca dura e coloração desde amarelo - esbranquiçada até vermelho - escura, atingindo cerca de 20 cm de comprimento. Contém polpa mucilaginosa, branca ou rósea, envolvendo cinco fileiras de sementes. No Brasil, a safra principal ocorre de outubro a janeiro e a secundária (cacau "temporão"), de maio a agosto (LAJUS, 1982; CAVALCANTE, 1991).



Figura 02. Fruto do cacau ainda na planta e aberto, com a polpa mucilaginosa à mostra. FONTE: <http://www.ceplac.gov.br>

O fruto do cacau apresenta aproximadamente de 35 a 50 sementes, que constituem cerca de 13,5 a 29% da massa total do fruto. O comprimento das sementes varia entre 21 e 29 mm, a largura entre 10 a 17 mm e sua espessura entre 8 a 12 mm. As sementes são constituídas por um embrião e dois cotilédones recobertos por um envoltório denominado testa ou tegumento, que é coberto pela polpa mucilaginosa (ZAMALLOA, 1994; LOPES, 2000).

A composição física da semente de cacau mostra que os cotilédones constituem a maior parte com 82,16%. A testa e o embrião representam 16,75% e 1,09% da semente, respectivamente (LOPES, 2000).

A Tabela 01 mostra a composição centesimal das sementes de cacau utilizadas como matéria-prima no processamento de chocolate.

Tabela 01. Composição centesimal das sementes de cacau segundo alguns autores.

	GILBERT ESCRIVÁ (1997)	FADINI (1998)	FERNÁNDEZ BARBERY (1999)
DETERMINAÇÕES*			
Umidade (%)	6,69	---	7,20
Proteínas (%)	17,78	19,05	13,60
Cinzas (%)	2,63	2,81	2,82
Fibras (%)	5,18	5,56	5,54
Lipídeos (%)	50,18	53,78	53,65
Carboidratos (%)	17,54	18,80	15,96

* Em base seca

Apesar de sua maior aplicação girar em torno de suas amêndoas, a polpa de cacau também é consumida *in natura* ou na forma de produtos como refrescos, licores, etc. (CAVALCANTE, 1991).

A polpa exerce um papel muito importante no processo fermentativo das sementes. Uma parte da mesma é necessária para a produção de álcool e ácidos que vão penetrar na semente ocasionando as transformações. Estima-se que entre 5 a 7% dessa polpa é perdida na forma de exsudado durante a fermentação. A polpa de cacau, na sua composição, apresenta 82-87% de umidade, 10-15% de açúcares, 1-1,5% de pectina, 1-3% de ácido cítrico com valores de pH variando entre 3,6 a 3,8 (ZAMALLOA, 1994; SCHWAN, 1996; DIAS, 1998; ADAMS *et al*, 1982 *apud* VASCONCELOS, 1999).

O cacau brasileiro tende a ser extremamente ácido, característica pouco desejada, pois dificulta muito a sua aceitação no mercado internacional. Uma possível solução para este problema é uma remoção de parte da polpa, cerca de 20% a menos de polpa de cacau acelera o processo fermentativo (SCHWAN, 1996).

3.2 CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum)

3.2.1 Aspectos gerais

O cupuaçuzeiro é uma cultura emergente, com potencial para conquistar novos mercados. Originária da região Amazônica, disseminada por toda a região Norte é encontrada em estado silvestre ou cultivada. Produz um dos frutos mais atrativos da região, sendo o maior entre os do gênero, pesando em média 1.500 gramas (SOUZA, 1996; GTA, 1999).

O cupuaçu é cultivado com êxito em regiões de clima quente e úmido. Aceita solo de baixa fertilidade e o plantio deve ocorrer na estação chuvosa (CALZAVARA, 1987).

O maior produtor é o estado do Pará, seguido do Amazonas, Rondônia e Acre. Além de maior produtor, o Pará tem significativa produção oriunda de ocorrências nativas da espécie, concentradas nas suas regiões sul e sudeste, com destaque para o município de Marabá. A espécie também ocorre espontaneamente na pré-Amazônia maranhense (GTA, 1999).

A cultura do cupuaçu não se limita a região Norte-Nordeste, a cidade de Registro, no estado de São Paulo já possui pequenas plantações. Fora do Brasil, é cultivado também em alguns países tropicais, tais como Venezuela, Equador, Costa Rica e Colômbia (CAVALCANTE, 1991; VENTURIERI, 1993).

A demanda pelo cupuaçu é cada vez maior, em função do sabor agradável da polpa do fruto e da sua rentabilidade como cultura perene. A facilidade de industrialização dos frutos e sementes vem despertando acentuado interesse, não só do mercado regional, como também do nacional e internacional (GTA, 1999).

Com a polpa do fruto, pode-se fazer uma variedade enorme de produtos, tais como: sucos, refrescos, sorvetes, licores, compotas, geleias, bombons, etc. (CAVALCANTE, 1991).

Apesar de já se conhecer um processo similar ao utilizado para sementes de cacau para obtenção de uma pasta semelhante àquela com que se produz o chocolate e manteiga, as sementes não têm seu potencial de utilização amplamente reconhecido, sendo na maioria das vezes usadas como adubo ou simplesmente descartadas como resíduos (VENTURIERI, 1993).

Dados recentes da produção de cupuaçu são escassos. Há um crescente plantio, em sua maioria de pequeno e médio portes, o que muitas vezes dificulta o registro de dados. Há quatro anos, a produção girava em torno de 6453 toneladas de frutos, no estado do Pará (RODRIGUES & SANTANA, 1997).

3.2.2. Características do fruto

O fruto (Figura 03) é uma baga capsulácea, de casca lisa e grossa, revestida por um indumento ferrugíneo, que quando raspado expõe uma camada clorofilada. No seu interior, assim como no cacau, as sementes estão solidamente presas à polpa. O cupuaçu frutifica de dezembro a maio (VENTURIERI, 1993; MULLER *et al*, 1995, CAMTA, 2000).

A polpa é comestível e de coloração amarelo - esbranquiçada, tem sabor ácido com valores de pH variando de 3,20 a 3,60, aroma bastante acentuado e representa cerca de 35% do fruto (CALZAVARA *et al*, 1984; VENTURIERI, 1993). Contém cerca de 8 a 10% de açúcares, 0,39% de pectina e 2,15-2,45% de acidez total (VILLACHICA, 1996; SOUZA, 1996).

Os 65% restantes são compostos pela casca (45%) e sementes (20%). Estas últimas por sua vez, têm tamanho bastante variável, com largura entre 2 a 3,5cm e espessura entre 0,7 a 1 cm. A forma varia de ovaladas a levemente elípticas, podendo ser achatadas ou não. O número de sementes aumenta de acordo com o tamanho do fruto e em média são encontradas 36, mas em frutos maiores esse número pode chegar a 51 (CARVALHO *et al*, 1981; CALZAVARA *et al*, 1984; VENTURIERI, 1993).

Assim como no cacau, as sementes de cupuaçu são constituídas pelos cotilédones, testa e embrião. A composição física da semente mostra que os cotilédones constituem cerca de 71,54% do total. A testa e o embrião representam 27,8 e 0,65%, respectivamente (LOPES, 2000). A testa é composta de três camadas, sendo a mais espessa (2 a 2,5 cm) a camada mais externa da semente, de cor branco amarelada. Em seguida, vem uma camada coureácea (0,4mm), esponjosa e fosca que fica aderida ao embrião, podendo ser facilmente retirada com uma incisão. Mais adentro, há outra camada bem mais fina (0,1mm), branca brilhante que permite notar as impressões do enrugamento dos cotilédones. O eixo embrionário mede 6 a 7 mm (VENTURIERI, 1993).

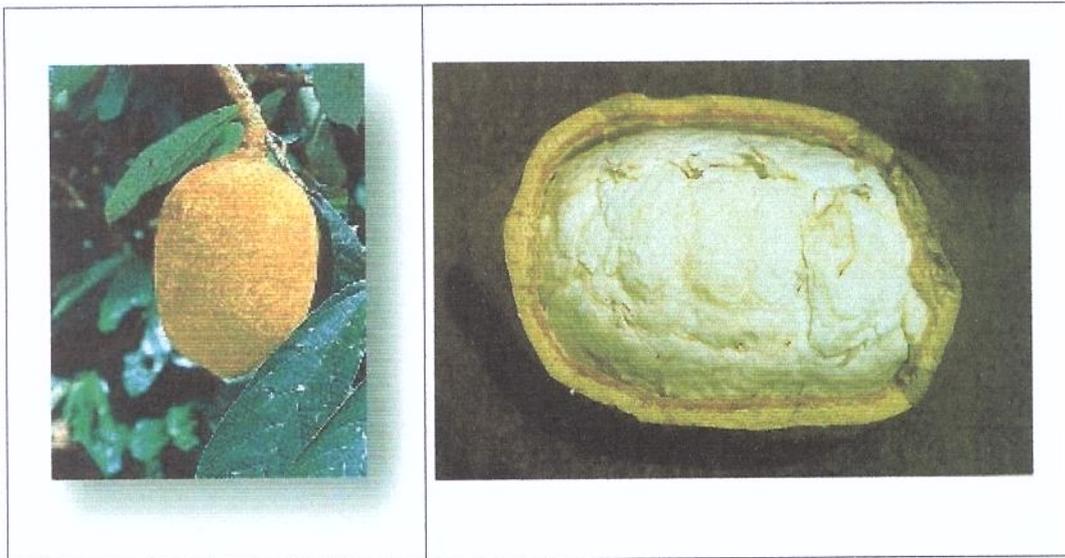


Figura 03. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) ainda na planta e aberto, com a polpa mucilaginosa à mostra.

FONTE: <http://www.amazon.com.br/~camta/cupuacu.htm>

Segundo CALZAVARA (1987), com relação às variedades, pode-se encontrar três tipos distintos de frutos:

- *Cupuaçu-redondo*: com extremidades arredondadas, casca com 6 a 7mm de espessura e peso médio de 1,5kg. É o tipo mais comum na região Norte.
- *Cupuaçu-mamona*: com extremidades alongadas, casca variando de 7 a 9 mm de espessura, sendo a que produz os maiores frutos, em média 2,5 kg, chegando muitas vezes a atingir 4kg.
- *Cupuaçu-mamaú*: com extremidades arredondadas, semelhante ao *cupuaçu redondo*, sua casca varia de 6 a 7 mm de espessura e peso médio de 1,5kg. Caracterizado por não apresentar sementes na polpa.

Segundo MÜLLER *et al* (1995), tem-se mais uma variedade:

Cupuaçu de Colares: parte próxima ao pedúnculo mais larga e a posterior mais estreita, peso médio levemente superior ao cupuaçu redondo, com casca de 6 a 7 mm de espessura..

A Tabela 02 e Tabela 03 mostram a composição química da polpa e das sementes de cupuaçu, respectivamente, segundo alguns autores.

Tabela 02. Composição centesimal da polpa de cupuaçu segundo alguns autores.

<i>DETERMINAÇÕES*</i>	<i>CHAAR (1980)</i>	<i>OLIVEIRA (1981)</i>	<i>CAVALCANTE & ROSÁRIO (1998)</i>
Umidade (%)	86,84	87,80	86,01
Proteína (%)	1,9	1,55	1,9
Lipídios (%)	0,48	0,65	0,57
Fibras (%)	1,79	1,89	----
Cinzas (%)	0,73	0,81	0,76
Carboidratos e outros compostos (ácidos, taninos, etc.)	8,26	7,3	10,76

*Em base seca

Tabela 03. Composição centesimal das sementes de cupuaçu segundo alguns autores.

<i>DETERMINAÇÕES*</i>	<i>PHILOCREON (1962)</i>	<i>QUEIROZ (1999)</i>	<i>LOPES (2000)</i>
Umidade (%)	8,88	5,30	5,87
Proteína (%)	10,87	7,81	9,82
Lipídios (%)	52,52	61,50	60,25
Fibras (%)	1,78	5,56	4,12
Cinzas (%)	3,73	2,3	2,35
Carboidratos e outros compostos (ácidos, taninos, etc.)	22,22	23,09	17,59

* Em base seca

3.3 FERMENTAÇÃO

O aproveitamento da semente do cupuaçu vem sendo estudado devido a semelhança com o cacau em termos botânicos e composicionais. Sendo assim, o processo de aproveitamento das sementes, na obtenção de *cupulate*, envolve as mesmas etapas convencionais para obtenção de chocolate.

Apesar do complexo processo que envolve a produção de chocolate, conforme ilustra fluxograma da Figura 04, o processo de fermentação controlado é fundamental para o desenvolvimento de precursores de chocolate. Nem as células de pigmentos, nem as células de reserva dos cotilédones frescos contém alguma das substâncias que darão sabor de chocolate. As sementes não fermentadas são incapazes de produzir tal sabor inclusive após o aquecimento, o que confirma que as substâncias aromáticas se originam durante o processo de fermentação do cacau (BRAUDEAU, 1970).

Estudos para cacau mostram que a maturidade do fruto é muito importante para uma boa fermentação, pois amêndoas oriundas de frutos sobremaduros podem apresentar germinação, havendo conseqüentemente risco de contaminação interna devido ruptura da casca fina. Já no caso de frutos colhidos antes da maturidade plena, a polpa vai conter reduzido teor de açúcares e portanto, a fermentação pode ser retardada e apresentará baixo rendimento (BRAUDEAU, 1969 *apud* LAJUS, 1982).

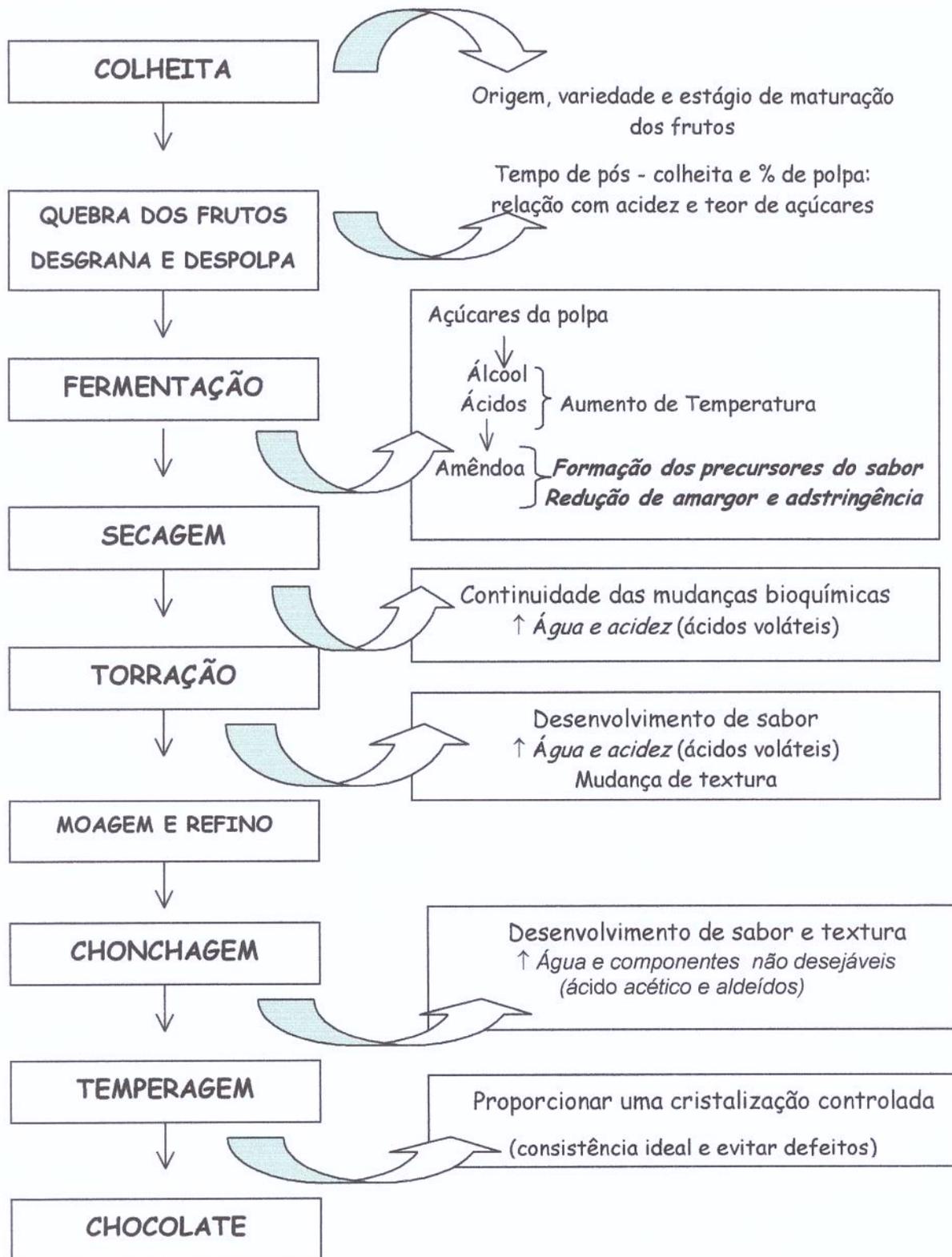


Figura 04. Fluxograma resumido do processamento das sementes de cacau para produção de chocolate e a relação das etapas com o desenvolvimento de sabor.

Os frutos colhidos podem ficar no campo por um período de três a quatro dias (ROHAN, 1964; CEPLAC, 1980). Este intervalo é aconselhável para que o fruto passe pelo período pós-colheita, que tem por finalidade liberar os açúcares contidos na polpa que envolve as sementes, os quais são indispensáveis na fermentação (SOBRAL, 1982 *apud* ARAGÃO, 1992).

BAREL (1987) desenvolveu uma pesquisa em que testou o período de pós-colheita. Fermentou frutos colhidos após 1, 3, 6 e 9 dias. Concluiu que um tempo maior de espera melhora a hidrólise da polpa e favorece uma diminuição da acidez do cacau. De uma maneira geral, o melhor resultado foi o tempo de espera de 6 dias.

Segundo a CEPLAC (1980), períodos de espera muito superiores tendem a secar excessivamente a polpa e reduzir o seu teor de açúcar, além do perigo de germinação. Sementes colhidas até quatro dias antes da quebra podem ser fermentadas conjuntamente, sem afetar a qualidade do produto. Um tempo maior de pós-colheita tem uma influência insignificante com respeito a porcentagem de amêndoas germinadas (BAREL, 1987).

O período entre a quebra do fruto e início da fermentação propriamente dita também é de extrema importância, pois não deve ultrapassar 24 horas. Também recomenda-se não fermentar conjuntamente sementes provenientes de quebras de dias diferentes, pois isso conduz a uma fermentação desigual. Quando o prazo de 24 horas for excedido, os dias entre a quebra e o início da fermentação contam como dias de fermentação (CEPLAC, 1980).

3.3.1 Técnicas de fermentação

Seja através do emprego de técnicas simples ou através de outras mais elaboradas, a fermentação das sementes de cacau deve ser controlada para se obter um produto de qualidade uniforme.

Para o processo, consideram-se fatores importantes o sistema o qual a fermentação foi realizada, a temperatura ambiente e da massa, pH, acidez da polpa e do cotilédone, tempo do processo, revolvimento da massa, microflora, entre outros (ROHAN, 1964).

A duração do processo varia de acordo com o tipo de cacau, as condições climáticas da região e a técnica de fermentação utilizada. Em geral, o cacau Criollo necessita de apenas 2 a 3 dias de fermentação, enquanto que o cacau do tipo Forastero, necessita de 5 a 7 dias. Na prática, o final da fermentação pode ser observado pelos parâmetros: entumescimento das amêndoas, cor dos cotilédones, odor da massa e queda de temperatura (BRAUDEAU, 1969 *apud* LAJUS, 1982). O tempo de fermentação não deve exceder 8 dias (LEVANON&ROSSETINI, 1975).

A fermentação de cacau pode ser realizada de quatro maneiras: em montes, cestas, bandejas ou caixas. A fermentação em montes é usada principalmente em Gana, Nigéria e Costa do Marfim. As sementes são amontoadas no chão sobre folhas de bananeira e recobertas com o mesmo material. Para facilitar a drenagem do líquido exudado (mel), formam-se montes sobre estrados de fibras vegetais, bambú ou madeira. O revolvimento da massa geralmente é feito no segundo e no quarto dia (ROHAN, 1964).

A fermentação em cestos é comum na Nigéria. Os cestos são cobertos e forrados internamente por folhas de bananeira e drenagem do mel é feita através dos interstícios. O revolvimento é feito pela transferência da massa de um cesto para outro (FORSYTH & QUESNEL, 1957).

ROHAN (1964) desenvolveu um estudo de fermentação em bandejas de madeira. No total de 12 bandejas empilhadas, a superior é coberta por folhas de bananeira, sendo cada bandeja dividida ao meio por uma tábua removível. Após 24 horas de fermentação, a pilha é coberta com sacos bem ajustados. Não há necessidade de manipulação ao longo da fermentação.

O método mais difundido nas Américas é a fermentação em caixas. Estas, conhecidas pelo nome de “cochos de fermentação” são construídas de madeira, contendo paredes divisórias removíveis e drenos nos lastros, para permitir a saída do mel e também a ventilação. De uma maneira geral, no Brasil, a CEPLAC recomenda este tipo de técnica (MARAVALHAS, 1971; CEPLAC, 1980).

A temperatura alcançada pela massa é um indicador muito bom de acompanhamento da fermentação. Se o aumento for muito lento ou não for alcançada uma temperatura suficientemente alta, o produto obtido será constituído de sementes germinadas e mal fermentadas. A temperatura se eleva mais rapidamente na parte superior da massa do que no seu centro, essa diferença é proporcional ao volume da massa (ROHAN, 1958 *apud* ZAMALLOA, 1994).

Vários pesquisadores informam que as sementes morrem entre o segundo e o terceiro dia de fermentação, em consequência da ação do etanol e dos ácidos (principalmente o acético) absorvidos pelos cotilédones, além da temperatura alcançada pela massa naquele período (MACRAE *et al*, 1993; QUESNEL, 1965 *apud* ZAMALLOA, 1994).

A massa de sementes deve sofrer revolvimentos ao longo do processo e o primeiro deve ser realizado obrigatoriamente após 24 horas do início da fermentação. O momento em que deverão ser realizados os revolvimentos seguintes dependerá da magnitude do lote (FORSYTH & QUESNEL, 1957). Além disso, não há um consenso a esse respeito, a CEPLAC (1980) e LAJUS (1982) indicam períodos de 24, 48, 96 e 120 horas após o início, porém de acordo com DIAS (1987), os tempos seriam 48, 72, 96, 120 e 144 horas após o início do processo.

O revolvimento é muito importante no decorrer da fermentação, pois a aeração controla o nível de acidez e os acréscimos de temperatura, influenciando na atividade enzimática necessária ao desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate (SCHWAN *et al*, 1990).

Em pesquisa visando o estudo da influência da frequência e intervalos de revolvimentos na fermentação de cacau, SCHWAN *et al* (1990) concluiu que revolvimentos frequentes tornam a fermentação mais rápida e resultam em um produto para chocolate com boas características organolépticas. Os períodos de revolvimentos de 24, 48, 96 e 144 horas após o início do processo fermentativo seriam ideais.

Em 1978, GRIMALDI propôs a utilização de uma caixa de fermentação contínua, a qual denominou T-60. A caixa é composta por três compartimentos, cada um adequado a uma fase da fermentação. O esquema da caixa pode ser visto na Figura 05. O pesquisador recomenda que após 48 horas as amêndoas sejam transferidas do compartimento 1 para o compartimento 2 e após 96 horas do compartimento 2 para o 3.

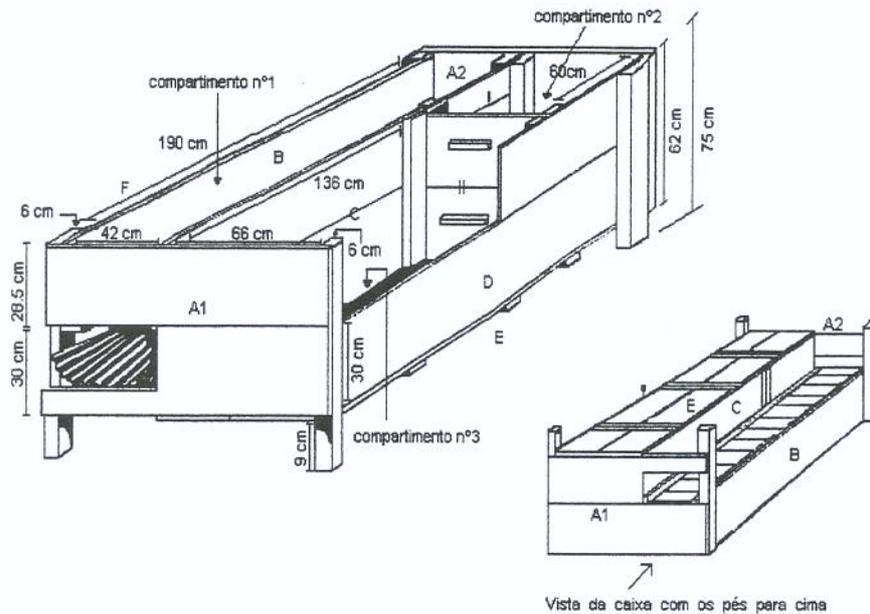


Figura 05. Esquema da caixa de fermentação T-60 proposta por GRIMALDI (1978).

Esse tipo de caixa constitui um excelente método, pois permite um bom controle da fermentação e proporciona a cada fase as condições ideais para o melhor andamento do processo.

A primeira fase, aeróbia, ocorre no compartimento nº 1, que possui grande área de contato com o ar e o fundo dotado de aberturas, possibilitando o escoamento do exudado, característico desta etapa. Embaixo deste compartimento, existe um plano inclinado, que permite recolher o exudado em um recipiente. Na segunda fase, as amêndoas são transferidas para o compartimento nº 2. Nesta etapa, as leveduras, em número suficiente, irão converter o açúcar da polpa em álcool, em condições anaeróbias. Assim sendo, o novo compartimento tem a forma mais compacta possível, de modo a evitar contato com o ar. Por fim, na terceira e última fase, o álcool é convertido em ácido acético por oxidação, reação que só ocorre em presença de ar. O terceiro compartimento, então, é projetado de modo a propiciar uma grande superfície de contato com o ar e uma massa de cacau de menor profundidade (GRIMALDI, 1978).

Alguns pesquisadores estudaram diferentes métodos de fermentação para as sementes de cupuaçu, porém alguns problemas foram observados e artifícios tiveram que ser usados para conduzir uma fermentação adequada. Entre eles, pode-se citar: a necessidade de neutralização da polpa que reveste as sementes (COUTINHO, 1969), concentração ideal de carbonato de cálcio a ser utilizada para obtenção da neutralização adequada (NAZARÉ *et al*, 1983 *apud* ARAGÃO, 1992) e adição de sacarose na massa (NAZARÉ *et al*, 1990).

Com o decorrer das pesquisas no assunto, vários trabalhos foram desenvolvidos com a despulpa das sementes e obtiveram bons resultados, entre os quais pode-se citar os de VENTUTIERI & AGUIAR (1988), NAZARÉ *et al* (1990), ARAGÃO (1992) e VASCONCELOS (1999).

VASCONCELOS (1999) adaptando metodologia proposta por GRIMALDI (1978), utilizou as caixas T-60 em sementes de cupuaçu despulpadas, resíduo da produção industrial de uma cooperativa. Após realizar o estudo das transformações físicas e químicas durante a fermentação, o autor observou que as amêndoas fermentadas possuíam características de qualidade superior e assim concluiu que a metodologia é adequada para obtenção de um produto similar ao obtido de sementes de cacau.

Após o processo fermentativo, as sementes completamente livres da polpa são secas, até um conteúdo de umidade de 6-7%. A secagem estabiliza a atividade microbiológica nas sementes e previne o crescimento de mofo. Além disso, é muito importante para se completarem as reações enzimáticas e químicas, que ocorrem dentro da semente durante a fase de fermentação das amêndoas (LAJUS, 1982).

3.4 TRANSFORMAÇÕES ESPECÍFICAS DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

O processo de fermentação das sementes inicia-se naturalmente pela ação da atividade microbiana na polpa mucilaginosa que envolve a semente. Os produtos do metabolismo dos microrganismos, principalmente álcool, ácidos e calor gerado nos primeiros dias de fermentação provocam a morte da semente e desencadeiam importantes transformações físicas, físico-químicas e estruturais que afetam significativamente a qualidade do produto final principalmente os aspectos que envolvem a formação de sabor (SCHWAN, 1996).

Durante a fermentação, uma atividade enzimática se desenvolve e exerce um papel fundamental durante a fermentação. A presença e concentração de muitos precursores do sabor que são sintetizados durante o processo, dependem de mecanismos enzimáticos. Não se produzem somente os precursores de sabor, mas também se produzem mudanças na coloração. Na Tabela 04 se resumem as reações catalisadas enzimaticamente e seus produtos (BECKETT, 1994).

TABELA 04. Caracterização das principais enzimas ativas na semente de cacau.

Enzima	Localização	Substrato	Produtos	pH	Temperatura (°C)
Invertase	Semente, testa	Sacarose	Glucose,	4- 5,25	52
			frutose		37
Glicosidase (β -galactosidas)	Semente, cotilédone	Glicosídeos	Cianidina, açúcares	3,8-4,5	45
Proteases	Semente Cotilédone Fragmentos	Proteínas	Péptidos aminoácidos	4,7	55
Polifenoxidase	Semente	Polifenóis (epicatequina)	o-quinonas	6	31,5
	Cotilédone		o-diquinonas		34,5

FONTE: BECKETT (1994).

A coloração dos cotilédones das amêndoas fermentadas é um ponto muito importante. A glicosidase é responsável pela mudança mais óbvia que se observa nas sementes de cacau Forastero, pois hidrolisa as antocianinas. Os cotilédones perdem a cor violeta, adquirindo uma coloração mais clara, pois a cianidina liberada adquire a forma pseudo - base incolor nas condições existentes. Posteriormente, durante a operação de secagem, essas cianidinas serão oxidadas sob ação da polifenoloxidase, desenvolvendo-se a coloração marrom típica do cacau. A presença de amêndoas de cacau de cor violeta ao final da fermentação é característica de um produto mal fermentado e está relacionada com um fraco sabor de chocolate (FORSYTH & QUESNEL, 1957; ROHAN, 1964).

3.4.1 Microbiologia da fermentação

Após a quebra do fruto, a polpa mucilaginosa contamina-se imediatamente pelo ambiente e inicia-se então a sua fermentação. Os grupos de microrganismos presentes na fermentação de cacau apresentam-se numa sucessão que é determinada pelas alterações do próprio substrato (SCHWAN *et al*, 1990).

No início da fermentação várias espécies de leveduras proliferam (acidez inicial da polpa favorável, com pH aproximadamente 3,6) e iniciam a conversão anaeróbica dos açúcares da polpa em etanol, caracterizando a primeira maior atividade microbiológica da fermentação de cacau: a fermentação alcoólica. Como resultado da ação dos microrganismos, a temperatura da massa de sementes aumenta para 30-35^oC e as células de polpa começam a se romper nas primeiras 24 a 36 horas, causando o aparecimento de uma exudação aquosa que se dirige aos orifícios localizados no fundo das caixas de fermentação. Esta exudação é chamada de mel (LOPEZ & QUESNEL, 1973; MINIFIE, 1989).

Entre as espécies de leveduras encontradas no processo fermentativo do cacau brasileiro (proveniente da Bahia) estão as do gênero *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Torulospora* e *Kluyveromyces* (SCHWAN, 1996).

A atividade primária das leveduras está na conversão de sacarose, glucose e frutose a etanol e CO₂. Medidas no teor de etanol mostram de forma clara que o aumento da concentração deste, na polpa, faz com que ocorra uma penetração do mesmo na amêndoa. Várias leveduras isoladas, produzem ácidos orgânicos incluindo o acético, oxálico, fosfórico, succínico e málico (SCHWAN, 1996).

As leveduras metabolizam ácido cítrico causando um aumento do pH. Os valores de pH elevam-se gradualmente, favorecendo assim o desenvolvimento de bactérias lácticas (ROELOFSON, 1958 *apud* DRUMMOND, 1998).

Entre as principais bactérias lácticas que atuam na fermentação do cacau brasileiro estão *Lactobacillus ssp.*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis*. Em geral, a ocorrência de *Lactococcus ssp.* só é observada nos estágios finais desta fase da fermentação (SCHWAN, 1996).

A maior parte das bactérias lácticas pode fermentar uma extensa gama de açúcares, inclusive as pentoses e pode atacar os ácidos málico e cítrico, produzindo ácido láctico, acético e dióxido de carbono acarretando uma queda global na acidez e elevação do pH (CARR, 1982 *apud* DRUMMOND, 1998).

A interrupção do crescimento das bactérias lácticas na fermentação de cacau se dá principalmente devido ao término do substrato (açúcar). Após os dois primeiros dias de fermentação, com uma aeração da massa, os açúcares reduzidos a cerca de 2%, presença de álcool etílico e ácido láctico, alta temperatura (entre 35-40^oC) e pH acima de 4, as condições ficam propícias ao desenvolvimento das bactérias acéticas, capazes de crescer em etanol. O substrato etanol é transformado pelas bactérias acéticas em ácido acético e água, na presença de oxigênio. Esta reação é exotérmica e produz uma quantidade considerável de energia, causando uma elevação da temperatura do meio a cerca de 50^oC ou mais (CARR, 1982 *apud* DRUMMOND, 1998).

Além de induzir a acidez e a alta temperatura da massa, as bactérias acéticas são responsáveis pela difusão e hidrólise das proteínas do cotilédone. À partir de 72 horas de fermentação que o número de bactérias acéticas provavelmente começa a diminuir (DIMICK & HOSKIN, 1981) .

Entre as principais bactérias acéticas que atuam na fermentação do cacau brasileiro estão as *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter aceti* e *Gluconobacter oxydans* (SCHWAN, 1996).

3.4.2 Transformações estruturais

O uso da microscopia na análise de alimentos, tem sido útil no estudo de sua microestrutura, seja por objetivos de pesquisa seja para localizar substâncias estranhas ao alimento em questão. Estes tipos de análise compõem a Microscopia de Alimentos (FLINT, 1994).

O estudo da estrutura celular das sementes de cacau e cupuaçu é muito importante para se compreender melhor as transformações que acontecem no interior das mesmas durante a fermentação.

A semente de cacau é formada pelo mesocarpo, pelo endocarpo, pelo espermoderma, pelo endosperma e pelos cotilédones. Essas quatro primeiras camadas constituem a testa ou tegumento da semente. Os cotilédones ficam envolvidos na testa e representam a parte útil da semente na fabricação de chocolate e de manteiga de cacau (BEUX, 1997).

Segundo BELITZ & GROSCH (1988); BOCA (1977) *apud* LAJUS (1982) na estrutura histológica dos cotilédones, distinguem-se três tipos de células:

- Células de epiderme: possuem forma alongada e cor marrom;
- Células de pigmentos ou células de depósito de polifenóis: células grandes que constituem cerca de 10% das células dos cotilédones. Contém os pigmentos antocianínicos, os polifenóis (catequinas e leucocianidinas) e as purinas (teobromina e cafeína). Esses componentes participam das reações químicas e enzimáticas que ocorrem no interior das sementes durante a fermentação, as quais serão responsáveis pelo desenvolvimento das características de cor e aroma;
- Células parenquimatosas ou células de reserva: células menores, incolores e constituem cerca de 90% das células dos cotilédones. Contém proteína sob a forma de grãos de aleurona, amido, açúcares e muitas gotículas pequenas de gordura.

A Figura 06 mostra um esquema dos tipos de células citados.

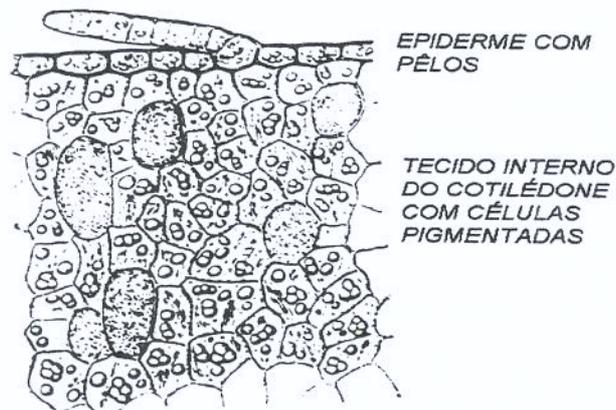


Figura 06. Secção de um cotilédone de cacau.
FONTE: BELITZ&GROSCH (1988)

A principal reserva das sementes de cacau é lipídica (mais de 50% da matéria seca), seguida de proteínas (cerca de 12%). O teor de amido varia de 4,5 a 7%, sendo que a amilose corresponde a cerca de 30% do total (URBANSKI, 1992).

Durante a fermentação, ocorre um aumento na concentração do teor de amido nas sementes de cacau, provavelmente devido a perda de sólidos solúveis por exsudação (SCHMIEDER & KEENEY, 1980).

BRITO (2000) ao analisar os teores de amido em sementes de cacau durante 72 horas de fermentação, observou uma queda de 9,28% em relação a semente não fermentada, estando assim em desacordo com os autores acima citados.

Entre os carboidratos encontrados no cacau, além do amido como principal carboidrato de reserva, pode-se citar açúcares solúveis, oligossacarídeos e polissacarídeos das paredes celulares. Os polissacarídeos da parede celular estão distribuídos da seguinte forma no cacau: pectina (arabinose) 52%, celulose 28%, pectina (galactose) 9%, xiloglucano 8% e galactomanano 3% (REDGWELL & HANSEN, 2000).

Na semente madura a maioria das células do cotilédone possui vacúolos de lipídios bem compactados, cobertos pelo citoplasma restante, que contém vacúolos de proteínas comprimidos entre vacúolos de lipídios. Durante a fermentação, logo após a morte das sementes, os vacúolos de lipídios se fundem e formam uma fase lipídica contínua que envolve as inclusões citoplasmáticas remanescentes como uma fase dispersa. A compartimentação (vacúolos de proteína, núcleo, mitocôndrias, etc.) é perdida. Portanto, reações entre compostos solúveis em água de diferentes compartimentos da célula viva podem ser reduzidas pela fusão dos vacúolos de lipídios, o que irá depender das condições durante a fermentação (BIEHL *et al*, 1977).

DIAS (1987) avaliou a perda da capacidade germinativa em sementes de cacau durante a fermentação e verificou que todas as sementes continuavam germinando após o primeiro dia de processo. Entretanto, no segundo e terceiro dia, o autor observou perdas de 15 e 96% na germinação, respectivamente.

As sementes morrem em função da ação do etanol e do ácido acético absorvidos pelos cotilédones (difusão da testa para o interior da semente) e da elevação da temperatura na massa. Em nível macroscópico reconhece-se a morte das sementes pela perda da capacidade germinativa e difusão dos pigmentos antocianínicos para fora das células de depósito, colorindo o líquido intersticial. Ocorre também um entumescimento das sementes devido a diferença na pressão osmótica dentro e fora da testa, que lhes confere o poder de absorver água. À partir da perda do poder germinativo, a semente passa a ser chamada de amêndoa (CHATT, 1953; ROHAN, 1964).

A absorção de água pela semente durante as primeiras horas de fermentação é influenciada pela temperatura e presença de substâncias osmoticamente ativas. Foi observado que os vacúolos intactos do cotilédone, que contém proteínas, são responsáveis por este fenômeno (BIEHL, 1982a).

Durante o seu desenvolvimento, as sementes de plantas, armazenam grandes quantidades de proteínas, que servem como fonte de compostos orgânicos necessários à germinação (VOIGT & BIEHL, 1993).

Os vacúolos de proteínas, permitem a absorção de água, até que as condições de fermentação proporcionem um aumento de temperatura até 45^oC. Acima disso, a fusão de lipídios no meio reduz as trocas de difusão nas células e a absorção de água (BIEHL *et al*, 1982a).

Convém mencionar que em materiais biologicamente ativos como as cascas de sementes, por exemplo, a permeabilidade à água, depende da sua estrutura e das impregnações presentes nas membranas celulares tais como lignina, gordura e tanino (POPINIGIS, 1985 *apud* DIAS, 1987).

DIAS (1987) estudou a permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação e concluiu que a mesma é afetada pela morte das sementes. Há uma queda acentuada na permeabilidade no momento em que a porcentagem de sementes mortas aumenta.

As alterações estruturais na semente de cacau já foram bastante estudadas por BIEHL e colaboradores em diversos trabalhos, que na sua maioria enfocam as modificações subcelulares em condições que simulam uma fermentação. Pode-se ver a importância da quebra das organelas citoplasmáticas, absorção de água, inchamento dos corpos protéicos, difusão de ácido acético, fusão dos lipídios e destruição dos vacúolos de polifenóis (BIEHL *et al*, 1977;1982a,b).

BRITO (2000) estudou por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, as 72 primeiras horas de fermentação, a amêndoa seca e torrada de cacau. O trabalho permitiu observação da degradação de corpos protéicos e esvaziamento das células que continham polifenóis. Na secagem e torração, destacou-se a ruptura celular e destruição da rede citoplasmática.

O primeiro e até o presente, único trabalho referente a microestrutura de cupuaçu e modificações subcelulares durante a fermentação foi realizado por CUNHA *et al* (1997). Utilizando sementes congeladas, os autores analisaram por microscopia de luz algumas das alterações que ocorrem nas amêndoas durante o processo fermentativo. Concluiu-se que o cupuaçu, assim como o cacau, tem como principais reservas, lipídios e proteínas. Também segundo a pesquisa, ficou visível o rompimento de células e difusão de fenólicos durante a fermentação.

3.4.3 Transformações físico-químicas e biológicas

Entre o segundo e terceiro dia de fermentação as sementes de cacau perdem a capacidade de germinação, em consequência da ação do etanol e do ácido acético absorvidos pelos cotilédones e da alta temperatura alcançada pela massa (45 a 50°C). Com isso, ocorre uma difusão do conteúdo celular, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor da semente, ocorrendo hidrólise das proteínas, originando aminoácidos livres (FORSYTH & QUESNEL, 1957; SCHWAN *et al*, 1990).

A difusão do conteúdo celular depende das propriedades físico-químicas das substâncias, tamanho das moléculas, solubilidade, temperatura e permeabilidade seletiva das membranas celulares (VILLENEUVE, 1989). A difusão dos ácidos para o interior do cotilédone contribui para que ocorram as reações enzimáticas, propicia uma proteção contra as bactérias putrefativas e com isso evita prejuízos ao sabor devido à produção dos ácidos voláteis C₃ a C₅ (QUESNEL, 1968 *apud* ZAMALLOA, 1994).

Alguns aminoácidos originados da hidrólise proteolítica durante a fermentação, complexam-se com constituintes fenólicos (quinonas). Essa combinação diminui o amargor e adstringência, características de alguns aminoácidos e polifenóis responsáveis pelo sabor no chocolate (FORSYTH *et al*, 1958; CROS, 1999).

Estudando a produção de aminoácidos livres durante a fermentação de cacau (Gana e Nigéria), ROHAN & STEWART (1967a) observaram um aumento da concentração ao longo do processo e o valor máximo foi atingido ao quarto dia de fermentação.

A fração protéica das sementes de cacau é formada por albuminas, globulinas, prolaminas e glutelina, sendo as albuminas encontradas em maior quantidade (ZAK & KEENEY, 1976). Entretanto, VOIGT e BIEHL (1993) em pesquisa sobre proteínas em sementes de cacau não detectaram a existência de prolaminas, nem frações de glutelina.

Durante a fermentação, uma degradação seletiva das proteínas de reserva é observada (BIEHL *et al*, 1982b).

Nas amêndoas bem fermentadas, a globulina é a única proteína atacada pelas proteases quando em pH moderado (pH>5,0). No entanto, após forte acidificação das sementes todas as proteínas são degradadas. Os peptídeos e aminoácidos liberados não parecem ser metabolizados, a menos que as sementes absorvam oxigênio, entretanto seus teores são alterados durante a secagem (MACRAE *et al*, 1993).

Segundo BIEHL & VOIGT (1996), duas das muitas proteínas das sementes são acumuladas e armazenadas em células do cotilédone: a globulina-7S (vicilina) (43% do total de proteína, extraído de sementes não fermentadas) e a albumina (52%). Sementes de cacau não contém globulina-11S. Os precursores de aroma são gerados partir da globulina-7S e não da albumina.

Durante o aumento da produção de aminoácidos livres durante a fermentação de cacau, MARAVALHAS (1971) confirma um suave aumento nos teores de arginina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina e valina durante o processo.

BRITO (2000), no estudo do cacau, observou após 72 horas de fermentação um aumento em quase todos os aminoácidos livres, com exceção da tirosina e lisina.

LOPES (2000) observou que tanto para cacau quanto para cupuaçu ocorrem elevações significativas nos teores de aminoácidos livres durante a fermentação. Para cacau são significativos: metionina, fenilalanina, leucina, valina, treonina, histidina, tirosina, isoleucina, alanina, ácido aspártico, serina e ácido glutâmico. Para cupuaçu: prolina, arginina, leucina, alanina, serina, valina, fenilalanina, ácido glutâmico, ácido aspártico e isoleucina. No mesmo trabalho, observou-se o consumo relevante durante a torração, evidenciando a importante participação destes na formação do sabor.

Junto com a formação de aminoácidos livres, tem-se a formação dos açúcares redutores, sendo essas duas classes de compostos então caracterizadas como os principais precursores de formação de sabor. Os açúcares redutores são produzidos em parte a partir da sacarose presente na semente não fermentada.

Esse açúcar é hidrolisado durante a fermentação, originando glucose e frutose. A concentração ótima dos açúcares redutores na semente é atingida ao mesmo tempo que o desenvolvimento máximo do sabor e coincide aproximadamente com a concentração máxima dos aminoácidos (ROHAN & STEWART, 1967b).

O conteúdo de sacarose diminui rapidamente no curso dos primeiros dias de fermentação e o teor máximo em açúcares redutores é produzido a partir do quarto dia (PEZOA, 1989 *apud* ZAMALLOA, 1994).

As amêndoas frescas de cacau possuem um teor de sacarose entre 1,5 e 2%. Os valores finais de glicose e frutose formadas durante a fermentação estariam em torno de 0,05-0,2% e 0,3-0,5%, respectivamente (CROS & JEANJEAN, 1995).

VASCONCELOS (1999) estudando o processo fermentativo de cupuaçu observou que as transformações que ocorrem nos açúcares se assemelham às descritas na literatura para cacau. O teor de sacarose inicial encontrado foi de 1,84%, sendo rapidamente consumido. Os valores finais de glicose e frutose encontrados após 7 dias de fermentação estariam em torno de 0,46% e 0,6%, respectivamente.

ROHAN & STEWART (1966) mostra que a importância da formação dos precursores está no fato de que, quando as amêndoas são submetidas ao processo de torração, os aminoácidos livres e açúcares redutores participam da síntese das pirazinas, componentes esses de grande importância no sabor do chocolate.

A fase que se sobrepõe à fase anaeróbica é conhecida como "Fase de Condensação Oxidativa". A oxidação continua na fase de secagem até que o teor de umidade atinja um ponto mínimo, onde cessa a atividade da polifenoloxidase. A redução da adstringência e amargor devido à oxidação de polifenóis que formam complexos com proteínas e peptídeos é o fato mais importante que ocorre nesta fase (FORSYTH & QUESNEL, 1963 *apud* ZAMALLOA, 1994).

Durante a fermentação das sementes, os polifenóis sofrem intensas modificações. Com essas modificações, substâncias fenólicas e enzimas são liberadas de seus respectivos locais de armazenamento na célula e com isso os polifenóis se combinam com as proteínas por complexação reversível por meio de pontes de hidrogênio e da oxidação irreversível dos polifenóis a quinonas, que sofrem condensação covalente com os grupos reativos de aminoácidos, peptídios, proteínas e fibras. Essas reações levam a um baixo valor biológico das amêndoas, mas são alterações desejáveis para o desenvolvimento do sabor característico (FORSYTH & QUESNEL, 1958; MACRAE *et al*, 1993).

Os principais constituintes fenólicos em sementes de cacau são as leucocianidinas (58%), catequinas (37%) e antocianinas (4%). Durante a fermentação há um decréscimo de 70% no nível de fenólicos totais após oito dias de processo (CROS *et al*, 1982).

A identificação de compostos polifenólicos presentes no cacau já foi assunto de pesquisas que mostram que estas substâncias possuem ação antioxidante, além de tocoferóis (vitamina E), antioxidantes presentes na manteiga de cacau (HARVER, 1999).

FERNÁNDEZ BARBERY (1999) sugere em seu trabalho que uma redução significativa dos compostos fenólicos presentes no cacau insuficientemente fermentado, pode ser obtida com o uso da enzima polifenoxidase. O processo de autoclavagem também influencia na diminuição de fenóis totais, perdas de até 24% nos teores foram observadas.

BRITO (2000) analisando fenóis totais em amêndoas de cacau observou um valor de 231mg/g para a semente e após 72 horas de fermentação, este valor sofreu uma redução, ficando em torno de 213mg/g. A queda nos valores continuou sendo observada nas análises da amêndoa seca (157mg/g) e torrada (131mg/g).

No estudo das características físicas e químicas das sementes de cupuaçu, ARAGÃO (1992) e VASCONCELOS (1999) concluíram que as mesmas sofreram modificações ao longo do processo fermentativo. Nos cotilédones, os autores observaram uma absorção de água ao longo dos primeiros dias de fermentação, um decréscimo inicial nos teores de proteínas e fibras, aumento da acidez e teores praticamente constantes no decorrer dos dias para gordura e cinzas.

A Figura 07 mostra um fluxograma que resume e descreve de maneira bem simplificada as reações e transformações que ocorrem durante a fermentação.

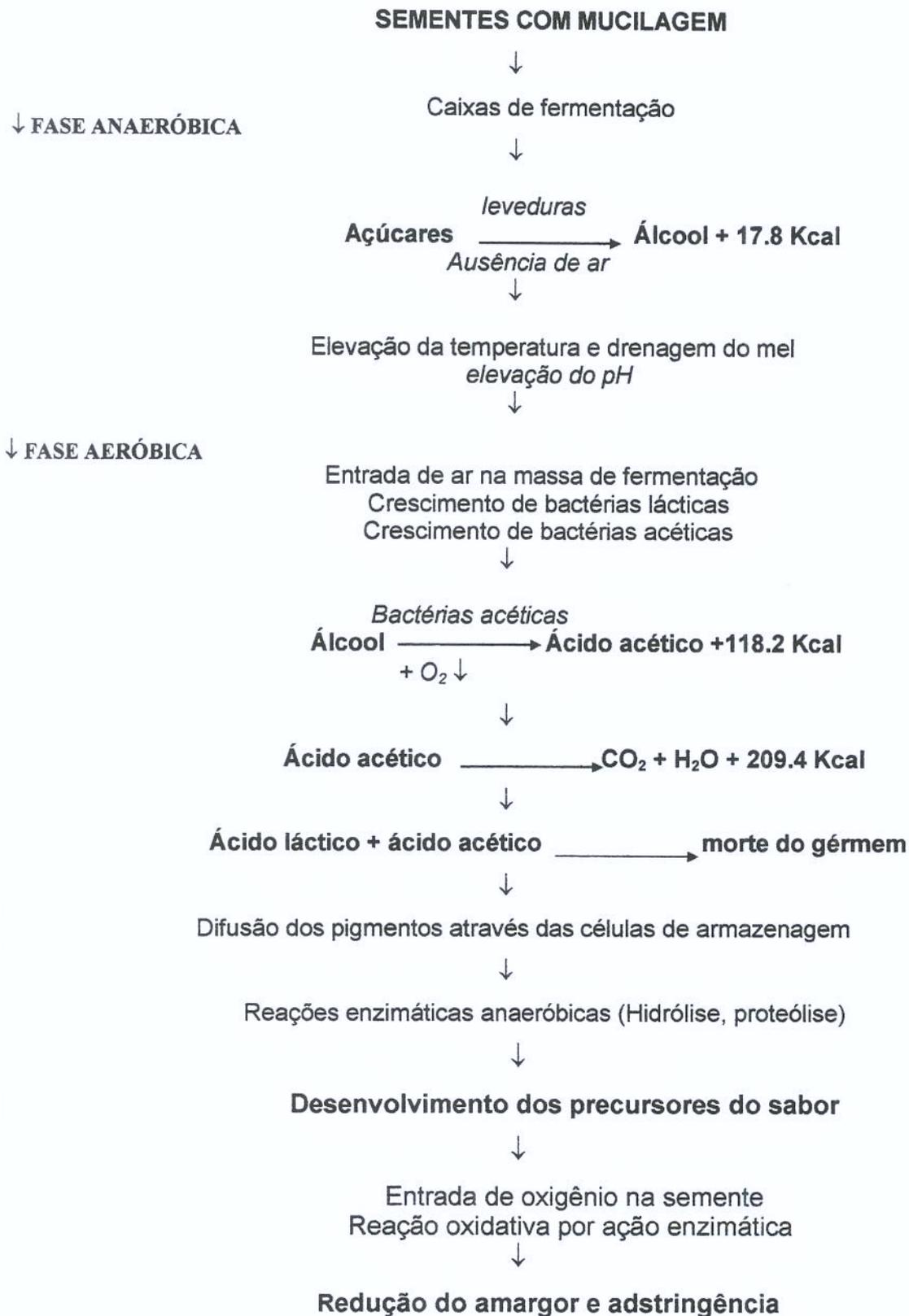


Figura 07. Fluxograma das etapas ocorridas na fermentação do cacau (LOPEZ, 1974).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Matéria prima

Sementes de cacau *Forastero* e cupuaçu *Redondo* (safra 1999) foram fermentadas por especialistas na Cooperativa Agrícola Mista de Tomé-Açu (CAMTA), em Quatro Bocas Tomé-Açu, estado do Pará.

Os frutos de cacau foram colhidos maduros e tiveram um tempo de pós-colheita de 3 dias. As sementes de cacau não foram despulpadas para o início da fermentação. As sementes de cupuaçu, resíduo da industrialização da Cooperativa, foram despulpadas mecanicamente, com um residual de polpa ao redor de 5%.

Além de amostras retiradas imediatamente após a despolpa, retirou-se amostras em períodos de 24 horas de intervalo do processo fermentativo. Essas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, seladas, congeladas e mantidas a -20°C . O material foi transportado em caixas de isopor, via aérea para Campinas-SP, sendo acondicionado na câmara frigorífica da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA-UNICAMP) a -20°C .

Após o término do processo fermentativo as amêndoas foram submetidas a uma secagem natural. Ao atingirem a umidade de 6%, as amêndoas também foram acondicionadas em sacos plásticos, lacradas, colocadas em caixas e transportadas para Campinas - SP.

4.1.2. Equipamentos

- Balança analítica SAUTEP - mod.414;
- Balança semi-analítica METTLER - mod. P1210;
- Moinho IKA – UNIVERSAL MUHLE M20 Janke & Sunsel GmbH. Cokg.;
- Destilador para análise de proteína - TECNAL - mod. TE-036;
- Bloco digestor de proteína - TECHNICON - mod. BD-40;
- Estufa de circulação forçada de ar - FANEN - mod.320/sc 300;
- Extrator e digestor de fibras - FANEN;
- Extrator de gordura - Tipo SOXHLET FANEM - mod. 170-1;
- Mufla - ENGRO - mod.355 - L;
- Potenciômetro – MICRONAL - mod. B -374;
- Micrótomo R. Jung Heidelberg;
- Emblocadora Reichert-Jung;
- Microscópio Óptico - Olympus IX 50;
- Exposure Control Unit - Olympus PM-20;
- Espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu Co., modelo LC-10, equipado com forno, injetor automático de amostras, processador de dados, monitor e impressora;
- Detectores de índice de refração, modelo RID 6 A e ultravioleta, modelo SPD-10AV, ambos da marca Shimadzu Co;
- Cromatógrafo de troca iônica com derivatização pós-coluna com ninidrina-P4000, com reator PCx3100;
- Outros aparelhos e materiais comuns de laboratório.

4.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados em todas as análises apresentaram grau de pureza exigido conforme cada método de análise, na sua maioria puros (p.a) e foram de diferentes procedências: Merck, Sigma, Grupo Química e outros.

4.2. MÉTODOS

4.2.1 Fermentação e Secagem

Utilizou-se uma caixa de fermentação contínua, T-60, conforme sugerida por GRIMALDI (1978) e adaptada por VASCONCELOS (1999). A caixa possui dimensões de 190 x 120 x 60 cm de altura e espaço entre as tábuas de fundo de 0,2 cm de largura, para liberação do exsudado.

As sementes foram colocadas na caixa juntamente com cortes de folhas de bananeira para propiciar uma inoculação, uma vez que os microrganismos existentes na superfície da folha podem servir como agentes ativadores do processo fermentativo. As sementes também foram cobertas com sacos de aniagem, como forma de auxiliar a retenção do calor gerado na fermentação.

O processo durou 7 dias e os revolvimentos da massa foram realizados após 48, 96 e 144 horas.

Durante a fermentação foram registradas temperaturas diárias da massa, em diferentes níveis: na superfície, meio e fundo. A temperatura considerada foi a média entre as três leituras. Análises de pH (AOAC, 1997 método 31.1.07) e acidez (AOAC, 1997 método 11.14.3) foram realizadas como acompanhamento do processo indicando assim a adequação da fermentação.

Após o processo fermentativo, as amêndoas de cacau e cupuaçu sofreram um processo de secagem natural. Foram colocadas em barcaças de madeira e submetidas ao sol até atingirem umidade residual de 6%. Os teores de umidade ao longo dos dias de secagem foram determinados com auxílio de um medidor de umidade de cacau, modelo HYGRON fabricado por GEHAKA LTDA.

A secagem das amêndoas de cacau e cupuaçu teve duração de 14 e 20 dias, respectivamente. Segundo LOPES (2000), os dias a mais de secagem para o cupuaçu podem ser justificados pelo tamanho das amêndoas e pela maior espessura de sua testa.

4.2.2 Classificação das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu

Avaliou-se o lote de amêndoas fermentadas e secas, quanto à sua qualidade de fermentação, através da prova de corte. Retirou-se 100 amêndoas aleatoriamente (em triplicata), as quais foram seccionadas de forma longitudinal e observadas uma a uma de acordo com o método proposto na Resolução nº 42 do Conselho Nacional de Comércio Exterior (CONCEX, 1968).

4.2.3 Análise das características físico-químicas das sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu

Para amostras de cada dia da fermentação foram realizadas as análises abaixo relacionadas, com exceção da análise de *fibras* e *cinzas* que somente foram aplicadas nas amostras da semente fresca e último dia da fermentação.

- *Teor de Umidade* - Método 31.1.02 da AOAC (1997).
- *Teor de Gordura* - Método 31.4.02 da AOAC (1997).
- *Teor de Proteínas* - Método 31.1.08 da AOAC (1997).
- *Teor de Cinzas* - Método 31.1.04 da AOAC (1997).
- *Teor de Fibras* - Método ácido-detergente, segundo GOERING & VANSOEST (1970).
- *pH* - Método 31.1.07 da AOAC (1997).
- *Acidez Titulável* - Método 11.14.3 da AOAC (1997).

Para as análises, sementes e amêndoas foram descongeladas e separadas manualmente a testa, embrião e cotilédones.

4.2.4 Análise de açúcares e ácidos solúveis em água durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau e cupuaçu.

A extração das amostras para as análises de cromatografia líquida seguiram método proposto por VASCONCELOS (1999), com algumas modificações. As amostras congeladas foram submetidas a temperatura ambiente, trituradas e cerca de 10g foram diluídas em 100 mL de água nanopure®.

Uma homogeneização foi realizada por 3 minutos em TUREX T25basic marca IKA Labortechnik a 9500 min^{-1} e em seguida a mistura foi submetida a centrifugação (3200xg) por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana da marca Sartorius AG, com porosidade de $0,45\mu\text{m}$ até se obter um extrato límpido.

Cerca de $20\mu\text{L}$ foram injetados no equipamento e as análises seguiram as seguintes condições cromatográficas:

- Análise de açúcares: determinação de sacarose, frutose e glicose.

Fase Móvel: Acetonitrila : Água (80:20).

Fluxo: $0,6\text{mL}/\text{min}$

Temperatura: 30°C

Pressão: $58\text{kgf}/\text{cm}^2$

Detector: índice de refração

Tempo de corrida: 25 minutos.

Foi utilizada coluna da marca Shimadzu Shim-Pack CLC-NH₂ (M) e pré-colunas, vials.

- Análise de ácidos: determinação de ácido cítrico, láctico e acético.

Fase Móvel: Solução de ácido perclórico a pH 2,1.

Fluxo: 1,0mL/min

Temperatura: 50°C

Pressão: 50kgf/cm²

Detector: UV, regulado para leituras a 210nm.

Tempo de corrida: 15 minutos.

Foi utilizada coluna da marca Shimadzu Shim-Pack LC Column SCR-1014 e pré-colunas, vials.

As condições de análise e quantificação dos resultados seguiram metodologia de DRUZIAN *et al* (1997) e DRUZIAN *et al* (1999) para ácidos e açúcares, respectivamente.

4.2.5 Análise do perfil de aminoácidos livres durante o processo fermentativo de cacau e cupuaçu.

Os aminoácidos livres foram extraídos segundo metodologia proposta por BECKMAN (1977) revista por LOPES (2000). 500mg do pó desengordurado de cacau e cupuaçu foi adicionado a 5 mL de ácido sulfossalisílico 3,5% e centrifugados a 8200xg por 15 minutos. Alíquotas de 0,5mL foram retiradas e diluídas em 0,5mL de solução tampão de citrato de sódio (20g/L pH=2,2), em seguida realizou-se uma filtração em membrana Millipore (0,22 µm). O filtrado foi congelado e estocado até o momento da análise.

Tanto para cacau, quanto para cupuaçu, as amostras extraídas e submetidas à análise foram: semente, primeiro dia de fermentação, quarto dia de fermentação, último dia de fermentação e amêndoa seca.

As determinações foram feitas utilizando CLAE TSP - Thermo Separation Products, com bomba degaseificadora, acoplada a um módulo de pré-reação Pickering Laboratories PCX 3100 post column reaction module, operando com detector de UV, nas faixas de 440 a 570 λ , modelo Spectro System UV2000. Foi utilizada coluna analítica Pickering Laboratories 1193250 (Na⁺ 8 μ m, 3mm ID X 250mm) acoplada a uma pré coluna Pickering Laboratories 1192020 (Na⁺ 8 μ m, 2mm ID X 20mm). Soluções de Na (3,15;7,4 e 0,2 N) foram utilizadas com fluxo de 0,3 mL/min a 55°C na coluna e 130°C no reator. Para ambas análises o volume de injeção foi de 20 μ l (VASCONCELOS, 1999; LOPES, 2000).

4.2.6 Análise de fenóis totais durante o processo fermentativo de cacau e cupuaçu.

A extração dos fenóis totais foi realizada segundo metodologia de PRICE & BUTLER (1977) adaptada por FERNANDEZ BARBERY (1999). Cerca de 50mg da amostra triturada, seca e desengordurada foi misturada a 15 ml da solução extratora, acetona 70%.

A extração foi realizada a 4°C com agitação durante 20 minutos, centrifugadas a 3200xg por 10 minutos. Alíquotas de 0,5mL do sobrenadante foram completadas com 0,5mL de água e submetidas à determinação.

Para a determinação, seguiu-se o método de AMERINE & OUGH (sd). 60 mL de água destilada foram acrescentados às alíquotas, então 5 mL de Folin-Ciocalteu e 15 mL de carbonato de sódio anidro a 20% foram adicionados a solução.

As amostras foram mantidas em repouso, a 20°C, durante 2 horas.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro à absorvância de 765nm. Para a quantificação dos fenóis totais, foi construída uma curva de calibração com concentrações 0, 50, 100, 150, 250 e 500mg/L, expressas em equivalente de ácido tânico.

4.2.7 Composição e percentual de ácidos graxos da gordura de cacau e cupuaçu durante o processo fermentativo.

Realizou-se por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos, seguindo método oficial AOCS Ce 1-62 (1993). Utilizou-se coluna empacotada Silar 10C (10% cianopropilsiloxano em chromosorb W) de 4 m de comprimento por 1/8" de diâmetro.

A temperatura da coluna foi de 175°C e a temperatura do detector (ionização de chama) e do injetor de 225°C. O fluxo do gás de arraste (N₂) foi de 25 mL/min.

Os ésteres metílicos foram preparados segundo HARTMAN & LAGO (1973) e em seguida, uma amostra de 1µL foi injetada no cromatógrafo. Realizou-se a identificação por comparação dos tempos de retenção dos padrões adequados (Standard Nu-Chek, MN-USA) e a quantificação pela normalização das áreas calculadas pelo integrador LCI-100, Perkin-Elmer e com a ajuda do pacote informático Peaksimple Chromatography data system (SRI).

4.2.8 Análise da microestrutura das sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu

As amêndoas de cacau e cupuaçu correspondentes a cada dia da fermentação foram colhidas ao acaso, seguindo metodologia estatística de KENDALL *et al* (1987) *apud* NETO *et al* (1996). As amêndoas foram cortadas ao meio, divididas em quatro partes e um quarto de fração do cotilédone de diferentes amêndoas (formando então um todo) foram armazenadas em solução fixadora de ácido crômico-formol (1:1) e enviadas a Campinas - SP.

Após a fixação, as amêndoas foram cortadas em pedaços menores e submetidas a diversas lavagens com água destilada. O material, em seguida, foi submetido a uma desidratação em etanol com concentrações crescentes (70, 80, 95, 100%), permanecendo 1 hora em cada solução. Uma diafanização em xilol durante 15-30 minutos foi realizada posteriormente.

As amêndoas foram então incluídas em parafina. O material embebido em parafina foi colocado em estufa a 58°C, por aproximadamente 12 horas, com duas trocas. A seguir, os pedaços de amêndoas foram emblocados com parafina e resfriados imediatamente.

Feito isso, os materiais foram seccionados em micrótomo, com cortes de 7µm de espessura, colocados em lâminas e desparafinizados. O processo de desparafinização seguiu a técnica:

- Xilol I - 30 minutos, Xilol II - 30 minutos, Álcool-Xilol - 15 minutos, Metanol-clorofórmio - 2 horas

O material foi reidratado, permanecendo 5 minutos em soluções de etanol com concentrações crescentes (100,95,80,70%) e por fim foi lavado em água destilada.

Os métodos citoquímicos de análise usados na detecção dos diferentes componentes estruturais estão abaixo relacionados. O material, depois de corado, foi analisado por técnicas de microscopia de luz.

- Azul de Toluidina (AT) 0.025% a pH 4,0

A coloração pelo AT em tampão McIlvaine a pH 4, ocorreu durante 15 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se três banhos rápidos em água destilada. As lâminas foram secas ao ar, diafanizadas em xilol por 10 minutos e montadas em Entellan (VIDAL, 1977 *apud* BEGNAMI, 1998).

Algumas lâminas coradas em AT pH 4,0 foram submetidas a microscopia de polarização com o objetivo de identificar grãos de amido.

- Xylidine Ponceau (XP) a pH 2,5

Uma solução aquosa de Xylidine Ponceau 0,1% a pH 2,5 foi aplicada durante 15 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em ácido acético 3% durante 15 minutos, dois banhos em água destilada, desidratação em etanol 95% e 100% por 2 minutos cada, diafanização em xilol por 10 minutos e montagem em Entellan (CORTELAZZO & VIDAL, 1991).

- Método do PAS/Reativo de Schiff

Os cortes foram previamente tratados com glicina 50mM durante 15 minutos com o objetivo de bloquear os grupamentos aldeídicos do fixador.

Em seguida, os cortes foram oxidados com ácido periódico 0,5% durante 9 minutos, lavados em água destilada, secos ao ar e cobertos, a temperatura ambiente e no escuro, com reativo de Schiff durante 30 minutos.

Após este período, foram aplicados três banhos consecutivos de água sulfurosa (HCl 1 N, metabissulfito de sódio 10% e H₂O) de 3 minutos cada. Os cortes foram desidratados em etanol 95 e 100% por 2 minutos cada, diafanizados em xilol por 10 minutos e montados em Entellan (CORTELAZZO, 1992 *apud* BEGNAMI, 1998).

Como controle do método, as lâminas contendo os materiais analisados foram imersas em Reativo de Schiff, sem terem sido oxidadas pelo ácido periódico, procedendo-se às demais etapas do método, já citadas acima.

- Floroglucina/HCl

Em meio umedecido, aplicou-se aos cortes uma solução de 5% de floroglucina em etanol 92% (p/v) durante 40 minutos. Em seguida, aplicou-se uma solução de HCl 2,5% durante 10 minutos. As lâminas foram montadas em água, vedadas com esmalte e submetidas imediatamente à análise microscópica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTAÇÃO

5.1.1 Perfil de temperatura durante a fermentação

Como acompanhamento da fermentação, o perfil de temperatura das sementes de cupuaçu e cacau durante os dias de fermentação foi traçado e pode ser visualizado na Figura 08.

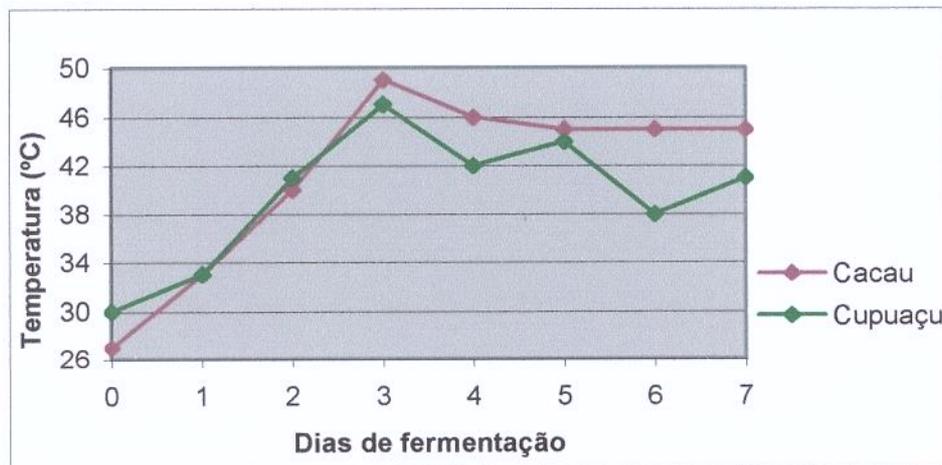


Figura 08. Perfis de temperatura das sementes de cacau e cupuaçu durante a fermentação.

Pode-se observar que a partir do primeiro dia de fermentação há uma elevação significativa da temperatura, atingindo um máximo ao terceiro dia de processo (49°C e 47°C para cacau e cupuaçu, respectivamente). Após esse máximo, as sementes sofreram uma queda de temperatura e no caso do cacau uma estabilização foi observada até o final do processo, com temperatura em torno de 45°C.

As sementes de cupuaçu por sua vez apresentaram oscilações de temperatura, subindo (44°C) e novamente decrescendo bruscamente no sexto dia de fermentação (38°C). Com um ligeiro aumento, a temperatura final para sementes de cupuaçu foi de 41°C.

As temperaturas máximas obtidas ao terceiro dia são satisfatórias, pois segundo ZAMALLOA (1994), boas fermentações de cacau devem atingir 45 a 48°C em aproximadamente 72 horas após iniciado o processo fermentativo.

O comportamento das sementes de cacau está de acordo com a literatura consultada, que indica um incremento de temperatura nos primeiros dias e uma tendência de estabilização nos dias seguintes (LAJUS, 1982; DIAS, 1987; ZAMALLOA, 1994; LOPES, 2000).

As oscilações de temperatura encontradas nos últimos dias de fermentação para as sementes de cupuaçu diferem dos resultados obtidos por NAZARÉ (1990), ARAGÃO (1992) e VASCONCELOS (1999). Os trabalhos indicam, assim como para o cacau, uma estabilização nos últimos dias do processo.

Apesar da diferença no comportamento, as temperaturas alcançadas pela massa de sementes de cupuaçu foram suficientes para garantir uma boa fermentação. As oscilações podem ser explicadas pelo fato de que, o aumento e/ou decréscimo de temperatura é função da atividade metabólica de microrganismos.

5.1.2. Variação de pH nos cotilédones e testas durante a fermentação

Os valores de pH nos cotilédones de cacau e cupuaçu observados ao longo da fermentação podem ser visualizados na Figura 09.

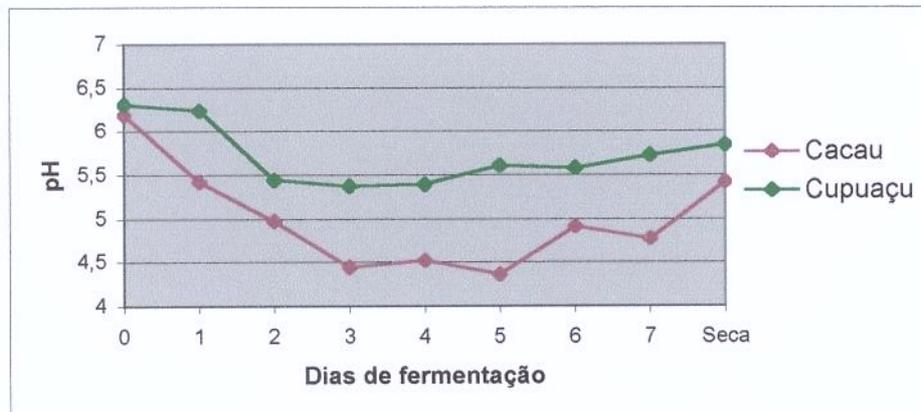


Figura 09. Valores de pH dos cotilédones de cacau e cupuaçu durante o processo fermentativo.

Os cotilédones de cacau apresentaram pH de 6,19 antes do processo ser iniciado. O primeiro dia de fermentação causou uma redução significativa no valor inicial (queda para pH 5,42) e essa tendência de declínio foi observada até o quinto dia, onde obteve-se o menor valor de pH (4,36) em todo o processo. Após esse mínimo, observou-se uma elevação devido a queda na formação de ácidos, principalmente o acético e sintetização do ácido cítrico durante os dias finais de fermentação. O pH final ficou em torno de 4,78.

O pH da amêndoa de cacau fermentada e seca (5,42) mais elevado era esperado devido a perdas por volatilização do ácido acético no processo de secagem.

As características encontradas para os cotilédones de cacau estão de acordo com a literatura consultada e o valor final de pH acima de 4,5 mostra que os mesmos possuem um bom potencial para formação de sabor de chocolate (SHEPERD, 1976; BIEHL *et al*, 1977; DIAS, 1998; LOPES, 2000).

Os cotilédones de cupuaçu apresentaram antes do início da fermentação um valor de pH de 6,30, ocorrendo um decréscimo durante o processo. O valor mínimo encontrado foi de 5,36 no terceiro dia de fermentação. Após esse mínimo uma certa estabilização foi encontrada, com pequenas oscilações. O pH final de processo ficou em torno de 5,72.

O pH da amêndoa de cupuaçu seca e fermentada (5,85) também se mostrou mais elevado, evidenciando novamente perdas de evaporação de ácido acético no processo de secagem. O comportamento observado ao longo dos dias de fermentação é compatível com a literatura e também se enquadra na faixa de pH ideal para formação de sabor (ARAGÃO, 1992; VASCONCELOS, 1999; LOPES, 2000).

Na Figura 10, pode-se observar o comportamento do pH ao longo da fermentação na testa de cacau e cupuaçu.

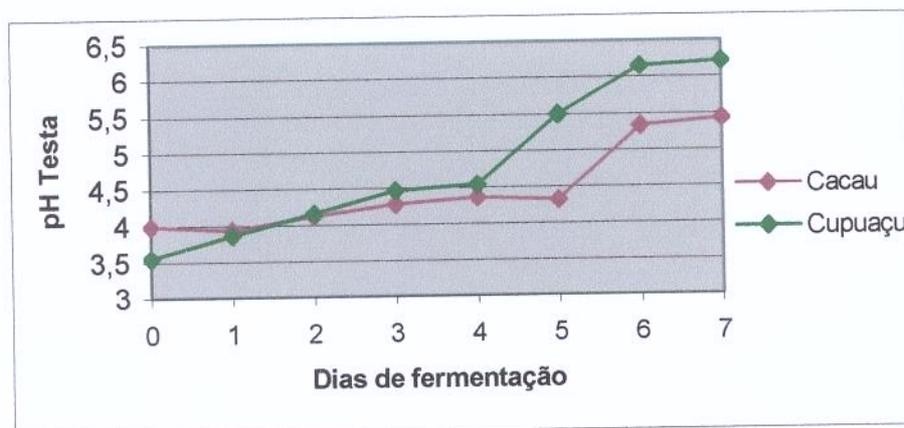


Figura 10. Valores de pH na testa de cacau e cupuaçu durante o processo fermentativo.

Observa-se para as testas de cupuaçu um aumento até o final do processo, com o valor de pH inicial de 3,55 chegando em torno de 6,22. A constante elevação do pH nas testas durante a fermentação é atribuída a assimilação do ácido cítrico, principal ácido encontrado na polpa do fruto, pelas leveduras e bactérias lácticas (ROHAN, 1964).

ARAGÃO (1992) e VASCONCELOS (1999) estudando o comportamento das testas de cupuaçu durante a fermentação, observaram um aumento linear, seguido de uma estabilização dos valores nos dias finais.

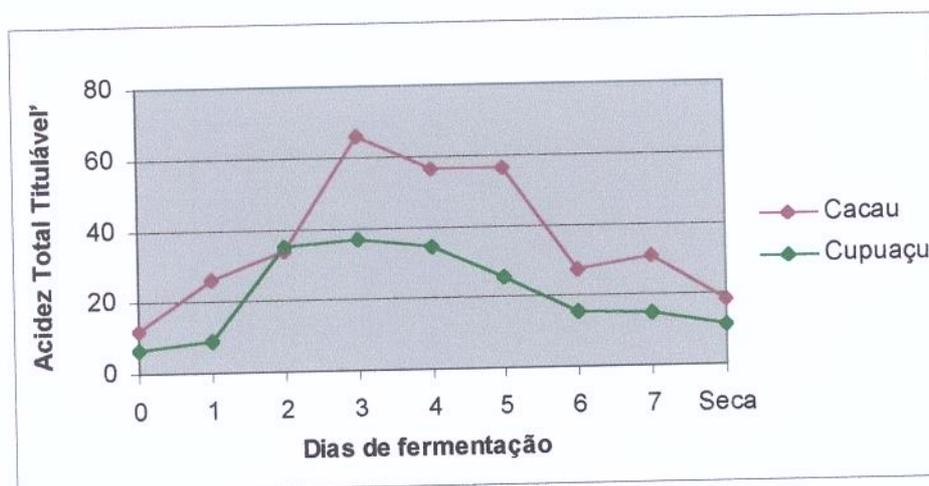
Os valores de pH obtidos para as testas de cacau durante o processo mostraram um leve aumento (pH inicial de 3,99), mostrando-se sem grandes diferenças até o quinto dia de fermentação, onde nota-se uma elevação dos valores até pH final de 5,43.

O aumento de pH nas testas de cupuaçu foi superior ao observado no cacau. Esse comportamento está de acordo com dados obtidos por LOPEZ (1979) e ARAGÃO (1992).

Os perfis obtidos para os valores de pH da testa e dos cotilédones demonstraram claramente a influência dos vários ácidos que são formados ao longo do processo fermentativo.

5.1.3 Variação da acidez total titulável dos cotilédones durante a fermentação

Os valores de acidez titulável observados durante o processo fermentativo são apresentados na Figura 11.



*meq NaOH/100g de cotilédone

Figura 11. Acidez titulável dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.

Observa-se que na fermentação de cacau, o valor máximo (65,67 meq NaOH/100g) foi alcançado no terceiro dia de processo, permanecendo com valores elevados até o quinto dia. Um decréscimo significativo ocorreu nos dois últimos dias, encontrando-se um valor de 30,55 meq NaOH/100g ao sétimo dia de fermentação.

A fermentação de cupuaçu mostrou um valor máximo de 36,49 meq NaOH/100g também ao terceiro dia de processo. A partir do quarto dia, observou-se um suave decréscimo, apresentando um valor final de 14,54 meq NaOH/100g.

Nota-se que na secagem, as amêndoas sofreram uma queda do valor de acidez total, o que era esperado devido a provável evaporação de ácido acético no processo. Os valores finais de 18,5 meq NaOH/100g e 11,0 meq NaOH/100g para cacau e cupuaçu, respectivamente, mostram uma faixa de acidez alta para o cacau, uma vez que a indústria considera uma faixa ótima entre os valores de 12 a 15 meq NaOH/100g.

O teor de acidez das amêndoas de cacau varia bastante de acordo com o país produtor. As amêndoas de cacau produzidas no Brasil e na Malásia, por exemplo, apresentam teores excessivos de acidez comparados com amêndoas provenientes do leste africano. Por este motivo, o cacau produzido no Brasil sofre restrições de alguns mercados importadores (LOPEZ & McDONALD, 1982).

DIAS (1998) encontrou valores de acidez que variam de 19,27 a 25,65 meq NaOH/100g, de acordo com os meses do ano, utilizando cacau da Amazônia. ZAMALLOA (1994) utilizando cacau de diferentes procedências encontrou valores na faixa média de 15 meq NaOH/100g.

Diversos fatores como variedade, maturidade do fruto, época de colheita, região de plantio e principalmente a técnica de fermentação provocam variações na acidez (JINAP & DIMICK, 1990).

Para ambos os frutos, o comportamento observado no presente trabalho está de acordo com a literatura consultada, onde observa-se que após a obtenção de um valor máximo, há o decréscimo e estabilização dos teores até o final do processo. O valor máximo de acidez atingido no processo de fermentação, segundo os autores consultados, situou-se entre o terceiro e quarto dia de fermentação, com exceção dos dados obtidos por ARAGÃO (1992) que observou o maior valor após 24 horas de processo (VASCONCELOS, 1999; LOPES, 2000).

5.1.4 Classificação das amêndoas fermentadas de cacau e cupuaçu

A Tabela 05 apresenta os resultados da prova de corte realizada nas amêndoas de cacau e cupuaçu, respectivamente.

Tabela 05. Classificação das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu

Amêndoas	MBF*(%)	BF*(%)	MF*(%)	Defeitos (%)
Cacau	----	74,3	23,3	2,0
Cupuaçu	70	27,67	2,33	----

*MBF→ muito bem fermentadas, BF→ bem fermentadas, MF→ mal fermentadas.

De acordo com a Resolução nº 42 do CONCEX (1968), a característica de uma amêndoa de cacau *bem fermentada* é a coloração marrom, mesmo com variações de tonalidade em toda a superfície exposta. Amêndoas de coloração marrom, em mistura com as cores violeta, roxo ou púrpura, em pontos ou difusas na superfície exposta é característica de amêndoas classificadas como *parcialmente fermentadas*. Amêndoas de coloração violeta a púrpura, em grande parte de sua extensão, são indicadoras do grau insuficiente de fermentação, sendo assim classificadas como *mal fermentadas*.

Os defeitos em amêndoas de cacau são definidos pela ordem decrescente de gravidade. Para amêndoas fermentadas apresentarem classificação do Tipo I (superior), deve-se admitir a tolerância dos seguintes defeitos:

- amêndoas mofadas e danificadas por insetos, total máximo de 4% e não mais de 2% de cada defeito isoladamente;
- amêndoas ardósias, máximo de 2%;
- amêndoas germinadas, achatadas e/ou outros defeitos, máximo de 2%.

Seguindo essas orientações, as amêndoas de cacau fermentadas e secas utilizadas neste trabalho foram classificadas como do Tipo I (superior). As normas são aplicadas somente para amêndoas de cacau; no entanto, amêndoas de cupuaçu também foram classificadas segundo esta resolução, que avalia o padrão das amêndoas fermentadas. Assim, as amêndoas de cupuaçu receberam também a classificação de Tipo I (superior), evidenciando que a fermentação realizada foi muito bem conduzida. Comparando-a com o cacau, nota-se a ausência de defeitos e que 97,67% das amêndoas receberam notas muito satisfatórias. Ambas espécies apresentaram aspecto externo bom e aroma típico, livres de odores estranhos que podem ser incorporados na etapa de secagem.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.

5.2.1 Umidade

Os teores de umidade encontrados para as sementes e amêndoas, antes, durante e após a fermentação podem ser visualizados na Figura 12.

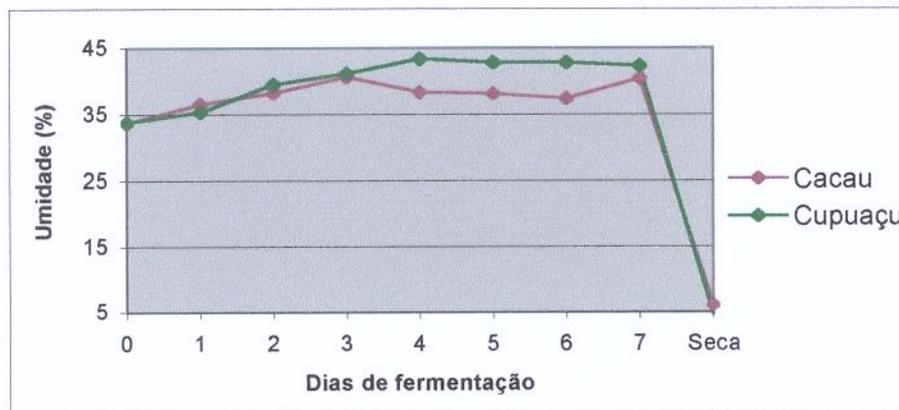


Figura 12. Umidade dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.

Os cotilédones de cacau apresentaram um teor inicial de 33,69% de umidade e ao longo da fermentação pode-se observar uma absorção de água nos mesmos, obtendo-se um teor de 40,64% no terceiro dia de processo. Comportamento semelhante foi observado nos cotilédones de cupuaçu, com um teor inicial de 33,83%, elevando-se para 43,3% de umidade ao quarto dia de processo.

O fenômeno de absorção de água pelos cotilédones dos frutos foi relatado em trabalhos anteriores que mostram que a absorção é bem elevada nos primeiros dias de processo, antes de ocorrer a morte da semente. A absorção está relacionada a elevação de temperatura e a capacidade de proteínas vacuolares reterem água antes da temperatura atingir 50°C (BIEHL *et al*, 1982a).

Os teores de umidade no último dia de fermentação para cacau e cupuaçu foram 40,44 e 42,3%, respectivamente e após o processo de secagem, os valores caíram para 6,06 e 4,69%.

Os valores encontrados após secagem estão dentro da faixa recomendada pela BCCCA (1996) e são bastante próximos dos valores obtidos por GILBERT ESCRIVÁ (1997), VASCONCELOS (1999) e LOPES (2000).

As curvas apresentadas na Figura 12 estão de acordo com o comportamento esperado e são bastante similares as obtidas por ARAGÃO (1992) e VASCONCELOS (1999) no estudo do cupuaçu.

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$), aplicado para as amêndoas de cupuaçu mostrou haver diferença significativa entre os valores observados para a semente quiescente, terceiro, quarto e quinto dias de fermentação e para a amêndoa seca.

Para o cacau, observou-se diferenças significativas (Tukey $p \leq 0,05$) entre a semente quiescente, primeiro, terceiro e quarto dias de fermentação e para a amêndoa seca.

5.2.2 Teor de lipídios

A Figura 13 mostra a variação do teor de lipídios em função dos dias de fermentação para as sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu, em base seca.

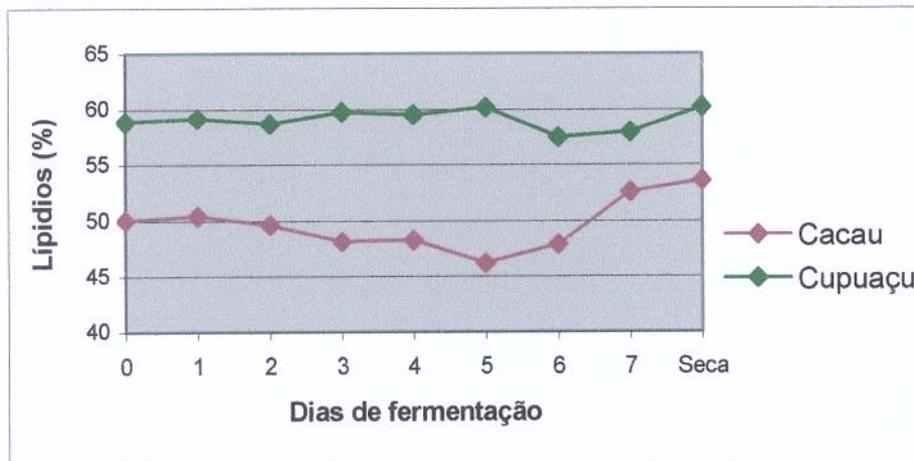


Figura 13. Teor de lipídios dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.

Pode-se observar que os cotilédones de cupuaçu possuem teores de lipídios maiores do que o cacau, indicando assim sua riqueza em gordura. A semente de cupuaçu apresenta cerca de 58,83% de gordura em sua composição em peso seco, o que supera em 8,75% o valor encontrado para semente de cacau (50,08%).

No decorrer do processo fermentativo, os cotilédones de cupuaçu apresentaram valores que não variaram de forma significativa segundo teste estatístico de Tukey ($p \leq 0,05$), exceto o quinto dia de processo e a amêndoa seca diferiram dos dois últimos dias de fermentação.

ARAGÃO (1992) estudou o teor de lipídios nos cotilédones de cupuaçu e também não observou variações ao longo da fermentação.

VASCONCELOS (1999), no acompanhamento do teor de lipídios durante sete dias de fermentação de cupuaçu, verificou valores bem similares aos obtidos. Porém, o autor encontrou diferença significativa entre o primeiro, terceiro e quarto dia de fermentação.

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$), aplicado para as amêndoas de cacau mostrou diferença significativa referente ao sétimo dia e amêndoa seca em relação aos demais dias de fermentação, estes não diferiram entre si.

5.2.3. Teor de proteína

A Figura 14 mostra o comportamento do teor de proteínas em função dos dias de fermentação para os cotilédones das sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu, em base seca.

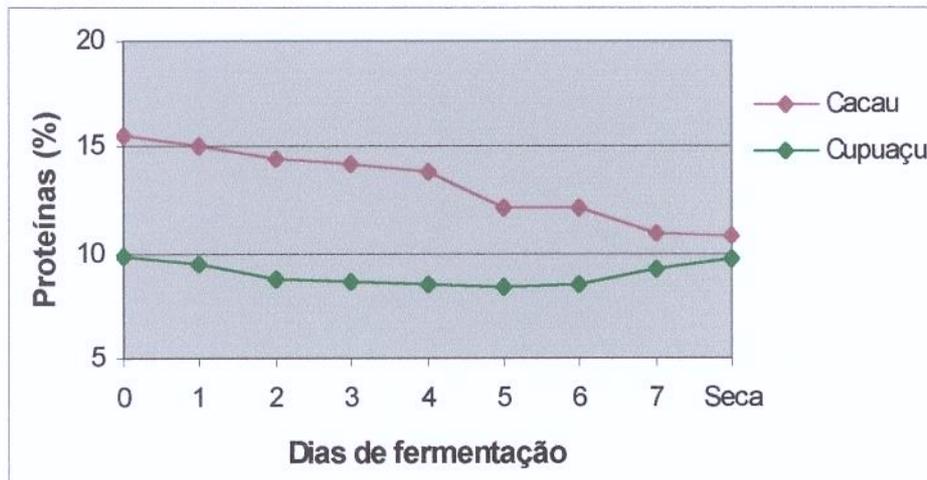


Figura 14. Teor de proteína total dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.

As sementes de cacau e cupuaçu apresentaram valores iniciais de 15,54 e 9,86% de proteínas em seus cotilédones. Observou-se que o teor de proteína total no cacau varia levemente no decorrer da fermentação, estando de acordo com LAJUS (1982). Nota-se que nos cotilédones de cupuaçu essa variação é mais suave.

Estatisticamente para o cacau, somente as amostras do último dia de fermentação e amêndoa seca diferem significativamente das demais, segundo Tukey a $p \leq 0,05$.

Estatisticamente, para o cupuaçu, somente os valores obtidos para as amostras do primeiro, segundo dia e amêndoa seca diferem significativamente das demais segundo Tukey a $p \leq 0,05$.

ARAGÃO (1992) estudou o teor de proteínas em amêndoas de cupuaçu durante o processo fermentativo e mostrou que o teores decrescem até o quinto dia e em seguida se elevam ligeiramente. Segundo VASCONCELOS (1999), existe um decréscimo inicial e em seguida, observa-se um perfil não linear até o final do processo.

AREMU (1995) no estudo do teor de proteínas em amêndoas de cacau, mostrou que as mesmas sofrem variação durante a fermentação. Após três dias de processo se mantiveram constantes, porém um suave aumento foi observado até o sexto dia e um decréscimo significativo foi estabelecido até o final de processo.

LERCETEAU *et al* (1999) estudaram a variação do teor de proteínas de cacau durante a fermentação e obtiveram um gráfico decrescente quanto a porcentagem de nitrogênio total. Nos dias finais de fermentação, os teores tenderam a uma estabilização, sendo pouco significativo o decréscimo observado.

Como pode-se observar, diferentes comportamentos foram obtidos por diferentes autores. Isso pode ser explicado pelo fato de que as reações bioquímicas às quais estão sujeitas as proteínas durante a fermentação são muito complexas. ARAGÃO (1992) sugere que métodos eletroforéticos sejam utilizados no lugar de métodos de medida do teor de nitrogênio total, pois este último método não permite avaliar de maneira precisa as modificações que acontecem durante a fermentação.

Os valores encontrados para as amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu foram de 10,98 e 9,76%, respectivamente e estão de acordo com os valores encontrados por LOPES (2000).

5.2.4 Teor de Cinzas

A Figura 15 mostra o comportamento do teor de cinzas, em base, nas sementes e amêndoas (primeiro, último dia de fermentação e seca) de cacau e cupuaçu.

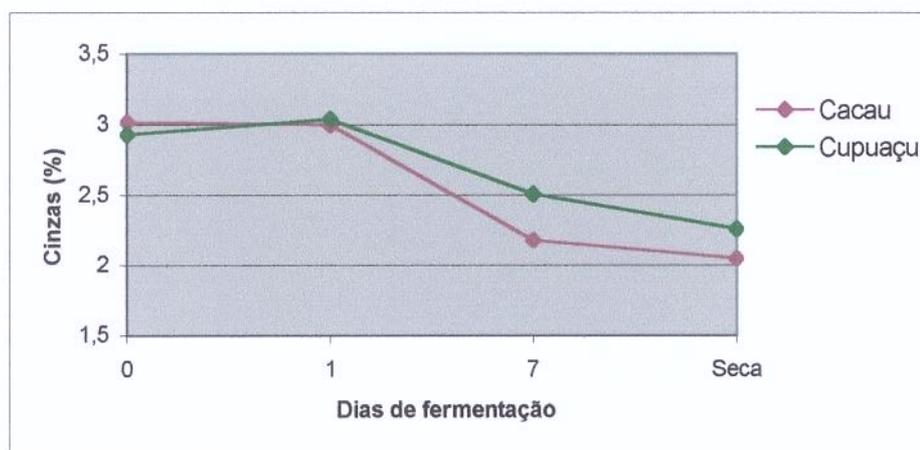


Figura 15. Cinzas totais dos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.

Observa-se que os cotilédones de cupuaçu apresentam teores de cinzas superiores que os de cacau e os valores encontrados para as amostras estudadas estão de acordo com VASCONCELOS (1999) e LOPES (2000).

VASCONCELOS (1999) sugeriu em seu trabalho não haver diferença significativa entre as amostras quanto ao teor de cinzas durante o processo fermentativo, o que fez o presente trabalho reduzir o número de análises.

Os valores iniciais de cinzas foram de 3,02 e 2,93% para cacau e cupuaçu, respectivamente. No último dia de fermentação, observou-se uma queda destes valores para 2,18 e 2,51%.

Para ambos os frutos, aplicando o teste de Tukey, com significância de 5%, obteve-se diferença significativa entre as amostras do último dia de fermentação e amêndoa fermentada e seca em relação às demais.

5.2.5 Teor de Fibras

A Figura 16 mostra o comportamento do teor de fibras nas sementes e amêndoas (primeiro, último dia de fermentação e seca) de cacau e cupuaçu, em base seca.

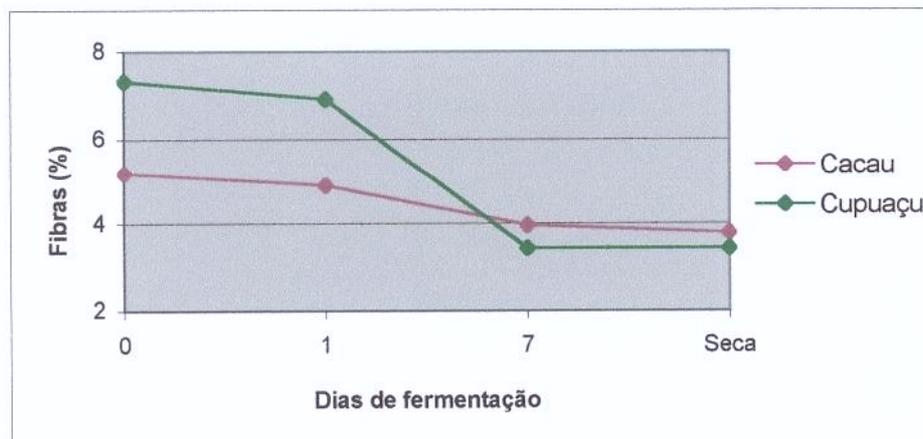


Figura 16. Teor de fibras nos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo da fermentação.

Observa-se inicialmente que o cupuaçu apresenta teores de fibras maiores que o cacau e que há, para ambos, uma queda em seus valores. Para o cupuaçu, essa queda é significativa (Tukey $p \leq 0,05$) e bem mais acentuada do que no cacau, o que resultou em teores finais menores. Segundo Tukey ($p \leq 0,05$), as amostras estudadas para o cacau ao longo da fermentação não diferem significativamente entre si.

O decréscimo no teor de fibras durante a fermentação foi observado por VASCONCELOS (1999) no estudo dos cotilédones de cupuaçu, onde o autor mostra valores de 7,43% para a semente e 5,46% para a amêndoa fermentada e seca. LOPES (2000) observou o mesmo comportamento, porém obtendo valores inferiores, 4,12 e 3,31%, para a semente e amêndoa seca, respectivamente.

O decréscimo está relacionado à ação dos ácidos e enzimas específicas, como ação de celulasas no processo fermentativo (RIBEIRO, 1990).

Os valores obtidos para os cotilédones de cupuaçu no presente trabalho, 7,33 e 3,44% para semente e amêndoa seca, respectivamente, estão na faixa dos valores encontrados pelos autores acima citados.

ARAGÃO (1992) analisando as fibras dos cotilédones de cupuaçu, não observou decréscimo, mostrou que os teores permaneceram praticamente constantes, estando assim em desacordo com os resultados acima mostrados.

Os valores obtidos para os cotilédones de cacau no presente trabalho, 5,20 e 3,80% para semente e amêndoa seca, respectivamente, são inferiores aos obtidos por LOPES (2000). Entretanto, segundo o próprio autor, o teor de fibras pode variar de acordo com diversos fatores como variedade, condições climáticas, estágio de maturação, entre outros fatores.

5.2.6 Composição centesimal das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu

Em resumo, os resultados da composição centesimal para as amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu são apresentados na Tabela 06.

Tabela 06. Composição centesimal das amêndoas fermentadas e secas de cacau e cupuaçu.

Determinações*	Cacau (%)	Cupuaçu (%)
Umidade	6,06	4,69
Proteína	10,78	9,76
Lipídios	53,59	60,25
Fibras	3,80	3,44
Cinzas	2,05	2,26
Carboidratos e outros compostos (ácidos, taninos, etc.)	23,72	19,60

* Valores expressos em base seca

5.3 ANÁLISE DE AÇÚCARES E ÁCIDOS SOLÚVEIS EM ÁGUA NOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.

5.3.1 Açúcares

Os resultados das análises de açúcares (sacarose, frutose, glicose) para os cotilédones de cacau podem ser visualizados na Tabela 07.

Tabela 07. Açúcares detectados e suas respectivas concentrações* ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cacau.

<i>Dias de fermentação</i>	<i>Sacarose (%)</i>	<i>Glicose (%)</i>	<i>Frutose (%)</i>
0	1,54	0,59	0,56
1	1,06	0,76	0,91
2	0,28	0,85	1,00
3	0,24	0,39	0,91
4	<0,05	0,45	0,71
5	<0,05	0,68	1,20
6	<0,07	0,35	0,50
7	0,09	<0,02	0,18
Seca	0,05	<0,02	0,29

*Valores expressos em base seca

A sacarose foi o açúcar predominante nos cotilédones da semente e no primeiro dia de fermentação. Como o esperado, observou-se uma queda de concentração de sacarose, sendo esta convertida aos açúcares redutores, glicose e frutose.

A partir do segundo dia de fermentação (48 horas), o açúcar predominante passa a ser a frutose e assim se mantém até o final do processo. Seu valor máximo é atingido ao quinto dia (120 horas) e após secagem os cotilédones apresentam um teor final de 0,29%.

A glicose aparece com concentrações inferiores a frutose, atingindo seu maior valor ao segundo dia de fermentação (48 horas). Valores menores de 0,02% foram encontrados no último dia de fermentação e na amostra seca, mostrando que este tipo de açúcar pode ser considerado insignificante ao final do processo.

A Figura 17 mostra o perfil de açúcares acima descritos e seus respectivos cromatogramas estão no Anexo 1.

Os cromatogramas mostram para a análise do cacau uma série de interferentes, possivelmente outros tipos de açúcares ou álcoois. Isto sugere a fermentação de cacau como um vasto campo de pesquisa na área cromatográfica.

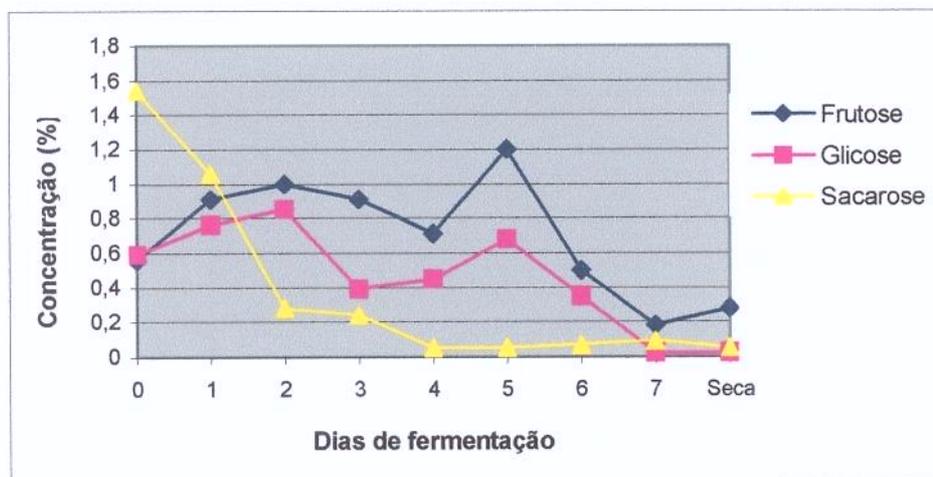


Figura 17. Perfil dos açúcares encontrados nos cotilédones de cacau e suas transformações ao longo da fermentação.

BRITO (2000) comparou os teores de açúcares redutores em sementes de cacau e após 72 horas de fermentação. O autor observou o mesmo comportamento deste trabalho, com um decréscimo da sacarose e um aumento dos teores de glicose e frutose, sendo esta última encontrada em maior quantidade.

Os resultados das análises de açúcares (sacarose, frutose, glicose) para os cotilédones de cupuaçu podem ser visualizados na Tabela 08.

Tabela 08. Açúcares detectados e suas respectivas concentrações* ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cupuaçu.

<i>Dias de fermentação</i>	<i>Sacarose (%)</i>	<i>Glicose (%)</i>	<i>Frutose (%)</i>
0	1,02	<i>Não detectado</i>	0,13
1	0,90	0,05	0,20
2	0,31	0,03	0,19
3	0,10	0,22	0,36
4	0,09	0,21	0,48
5	<0,05	0,12	0,59
6	<0,05	0,11	0,26
7	<0,05	<i>não detectado</i>	0,26
Seca	<0,03	0,02	0,33

* Valores expressos em base seca

A sacarose se manteve como açúcar predominante até o segundo dia de fermentação. Ao contrário do cacau, as concentrações dos açúcares redutores formados nos primeiros dias são bem tímidas. Porém, o comportamento observado foi o mesmo.

Observa-se um desaparecimento quase que completo da sacarose, com o aparecimento de glicose no seu valor máximo ao terceiro dia de fermentação (72 horas) e a frutose como açúcar predominante até o final do processo tendo seu máximo ao quinto dia de fermentação (120 horas). Assim como para o cacau, os valores finais de glicose são pouco significativos e o teor final de frutose no cupuaçu seco mostrou-se um pouco superior que no cacau, em torno de 0,33%.

A Figura 18 mostra o perfil de açúcares acima descritos e seus respectivos cromatogramas estão no Anexo 2.

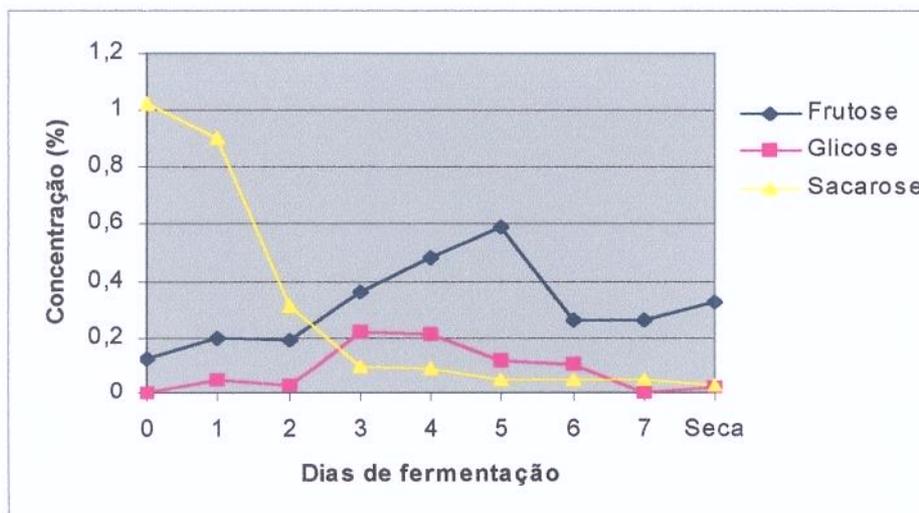


Figura 18. Perfil dos açúcares encontrados nos cotilédones de cupuaçu e suas transformações ao longo da fermentação.

VASCONCELOS (1999) em trabalho com cupuaçu, mostrou para os três açúcares estudados um comportamento bem similar ao obtido, com a ressalva de que os teores encontrados pelo autor foram superiores, principalmente para a glicose final (0,24%).

Embora as amêndoas contenham apenas pequenas quantidades de açúcares, os mesmos são essenciais ao desenvolvimento do sabor típico de chocolate, através de reações de escurecimento não-enzimático durante a etapa de torração (REINECCIUS *et al*, 1972).

Segundo CROS & JEANJEAN (1995), as amêndoas frescas de cacau possuem um teor de sacarose entre 1,5 a 2% e que esta vai rapidamente sendo consumida ao longo da fermentação, proporcionando a formação dos açúcares redutores até um valor máximo, seguido de uma queda desses valores. Valores finais de glicose estariam em torno de 0,05-0,2% e frutose de 0,3-0,5% nas amêndoas secas comerciais.

A concentração máxima de açúcares redutores é atingida geralmente ao quarto ou quinto dia de fermentação, dependendo da origem das sementes (ROHAN & STEWART, 1967b). No presente trabalho, tanto para as sementes de cacau quanto para as de cupuaçu, os valores máximos foram atingidos ao quinto dia de processo, estando de acordo com a literatura.

A hidrólise da sacarose pode ocorrer até o quinto dia de fermentação. Entretanto, a atividade da invertase decresce bastante após dois dias de processo, o que mostra o intenso consumo da sacarose durante os primeiros dias de fermentação (ROHAN & STEWART, 1967b; REINECCIUS *et al*, 1972). O mesmo comportamento foi observado neste trabalho.

5.3.2 Ácidos solúveis em água

Os resultados das análises de ácidos solúveis em água (cítrico, láctico e acético) para o cacau podem ser visualizados na Tabela 09 e os respectivos cromatogramas estão apresentados no Anexo 3.

Tabela 09. Ácidos detectados e suas respectivas concentrações* ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cacau.

<i>Dias de fermentação</i>	<i>Ácido cítrico (%)</i>	<i>Ácido Láctico (%)</i>	<i>Ácido acético (%)</i>
0	<i>traços</i>	<i>não detectado</i>	<0,05
1	0,36	<i>não detectado</i>	0,16
2	0,26	0,06	0,68
3	0,13	0,06	1,41
4	0,11	0,08	0,96
5	0,08	0,09	0,79
6	0,08	0,05	0,45
7	0,07	0,07	0,48
Seca	<i>não detectado</i>	0,05	0,14

*Valores expressos em base seca

Como pode-se observar, o ácido cítrico só foi detectado com valor expressivo no primeiro dia de fermentação. Embora esperava-se encontrar teores deste ácido a partir dos cotilédones da semente, o método utilizado detectou sua presença, mas em quantidade tão pequena que foi impossível permitir a quantificação.

Sabe-se que os ácidos presentes nas sementes de cacau são produzidos através do metabolismo microbiano da polpa e a partir daí são absorvidos pelos cotilédones (JINAP, 1994).

No primeiro dia de fermentação, o ácido predominante foi o cítrico com um teor de 0,36%. Conforme esperado, os teores de ácido cítrico decrescem ao longo da fermentação, em função da metabolização dos mesmos pelas leveduras.

Com o decorrer do processo, observa-se o aparecimento do ácido láctico, caracterizando o surgimento das bactérias lácticas. Seus teores mantiveram-se relativamente constantes até o final de processo.

O ácido acético é, sem dúvida nenhuma, o ácido mais importante formado durante a fermentação estando diretamente ligado a qualidade sensorial do chocolate. A partir do segundo dia de processo ele passa a ser predominante e atinge seu valor máximo ao terceiro dia (1,41%). Após esse período, nota-se um decréscimo nos teores.

Segundo DIAS (1987) o decréscimo pode ser explicado levando em consideração a permeabilidade da casca da semente de cacau. Durante a fermentação, a mesma é afetada pela morte da semente. O autor mostrou que existe uma queda acentuada na permeabilidade no momento em que a percentagem de sementes mortas aumenta, o que acontece geralmente ao terceiro dia de processo. Analisando a Tabela 09 e a Figura 19, pode-se observar exatamente o mesmo comportamento.

Nota-se que a secagem influencia no teor de ácido acético, reduzindo seu valor de 0,48% para 0,14%, o que confirma as perdas por evaporação bastante relatadas na literatura (JINAP *et al*, 1994; VASCONCELOS, 1999; BRITO, 2000).

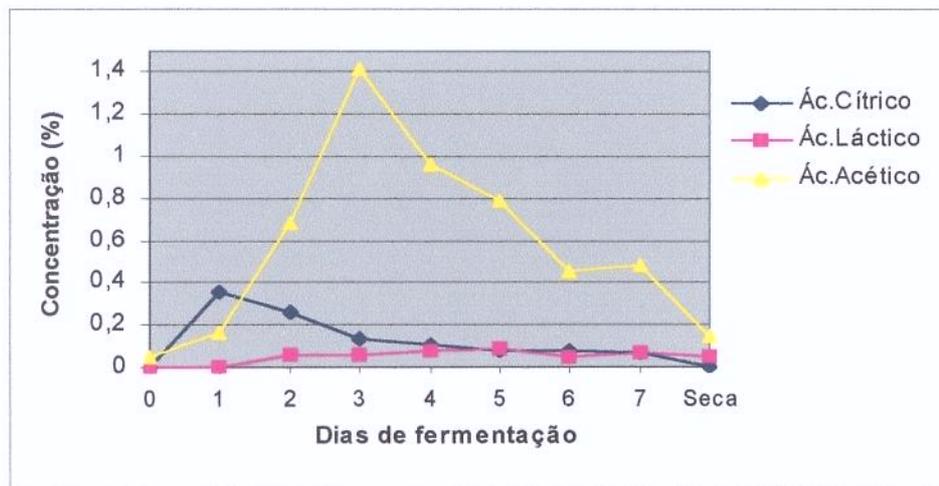


Figura 19. Perfil dos ácidos encontrados nos cotilédones de cacau e suas transformações ao longo da fermentação.

De acordo com BIEHL (1982c), a quantidade de ácido acético acumulada nos cotilédones das sementes de cacau depende da concentração deste ácido na parte externa e do tempo gasto para difundir-se para o seu interior.

Outros fatores interferem na produção de ácido acético, entre os quais pode-se citar o tipo e a origem do cacau, estágio de maturação, tempo de armazenamento do fruto antes da fermentação e a própria técnica de fermentação utilizada (SAMAH *et al*, 1993).

Os resultados das análises de ácidos solúveis em água (cítrico, láctico e acético) para os cotilédones de cupuaçu podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10. Ácidos detectados e suas respectivas concentrações* ao longo dos dias de fermentação nos cotilédones de cupuaçu.

<i>Dias de fermentação</i>	<i>Ácido cítrico (%)</i>	<i>Ácido Láctico (%)</i>	<i>Ácido acético (%)</i>
0	<i>traços</i>	<i>não detectado</i>	<0,1
1	0,28	0,03	0,22
2	0,21	0,16	0,53
3	0,20	0,50	0,90
4	0,16	0,40	0,97
5	0,14	0,21	0,79
6	<i>não detectado</i>	0,23	0,62
7	<i>não detectado</i>	<i>não detectado</i>	0,52
Seca	<i>não detectado</i>	0,07	0,11

* Valores expressos em base seca

Assim como no cacau, o ácido cítrico só foi detectado com valor expressivo ao primeiro dia de fermentação. VASCONCELOS (1999) em seu trabalho com cupuaçu, mostrou um teor de ácido cítrico relativamente alto na semente (0,43%).

Seguindo o mesmo comportamento observado para o cacau, observou-se o decréscimo dos teores de ácido cítrico, aparecimento de ácido láctico (teores maiores que os observados em cacau) e predominância de ácido acético, com queda de seus valores até o final do processo.

O processo de secagem diminuiu o teor de 0,52% encontrado no último dia de fermentação para 0,11%, ratificando assim que ocorrem perdas por evaporação.

De maneira geral, os valores encontrados por VASCONCELOS (1999) para os ácidos estudados são maiores do que os obtidos neste trabalho. A Figura 20 mostra o perfil dos mesmos durante a fermentação e seus respectivos cromatogramas podem ser visualizados no Anexo 4.

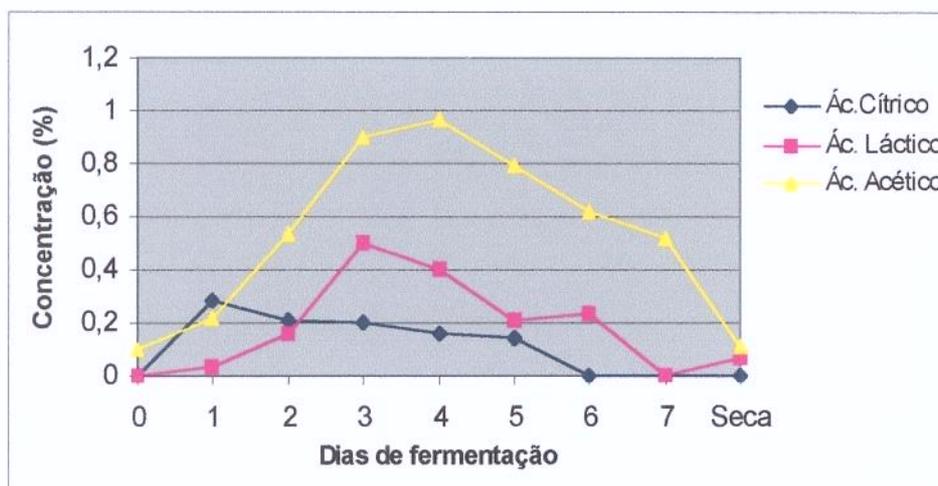


Figura 20. Perfil dos ácidos encontrados nos cotilédones de cupuaçu e suas transformações ao longo da fermentação.

5.5 ANÁLISE DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES NOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.

A Tabela 11 mostra a composição em aminoácidos livres das sementes, amêndoas fermentadas correspondentes ao quarto e sétimo dia, amêndoa fermentada e seca de cacau e cupuaçu.

Tabela 11. Composição em aminoácidos livres (expressos em mg aa/100g de amostra) da semente, quarto e sétimo dia de fermentação e amêndoa fermentada e seca de cacau e cupuaçu.

Aminoácido	Ca_{sem}	Ca₄	Ca₇	Ca_{seco}	Cup_{sem}	Cup₄	Cup₇	Cup_{seco}
<i>Aspártico</i>	50	30	80	61	30	30	90	60
<i>Treonina</i>	30	40	110	76	20	30	100	40
<i>Serina</i>	80	100	230	135	60	60	170	70
<i>Glutâmico</i>	140	60	180	123	80	40	160	120
<i>Prolina</i>	0	30	30	35	10	30	130	30
<i>Glicina</i>	30	20	60	35	20	20	40	30
<i>Alanina</i>	90	90	280	183	80	80	140	80
<i>Cistina</i>	40	10	10	11	20	10	10	0
<i>Valina</i>	70	80	210	139	40	60	130	70
<i>Metionina</i>	50	30	50	36	10	10	10	10
<i>Isoleucina</i>	60	40	90	86	30	30	70	50
<i>Leucina</i>	80	200	480	335	60	90	110	80
<i>Tirosina</i>	60	50	130	102	30	40	130	10
<i>Fenilalanina</i>	100	200	280	224	50	80	300	200
<i>Lisina</i>	30	30	30	225	40	40	40	40
<i>Histidina</i>	50	20	10	33	10	20	20	30
<i>Arginina</i>	50	70	250	300	80	150	110	70
Total	1050	1130	2610	2140	700	850	1690	1030

Cacau: Ca_{sem} = semente, Ca₄ = quarto dia de fermentação, Ca₇ = sétimo dia de fermentação, Ca_{seco} = amêndoa fermentada e seca.

Cupuaçu: Cup_{sem} = semente, Cup₄ = quarto dia de fermentação, Cup₇ = sétimo dia de fermentação, Cup_{seco} = amêndoa fermentada e seca.

Os aminoácidos são produzidos nas sementes durante a fermentação e tem papel muito importante na produção de compostos voláteis característicos do cacau. É durante a torração, através da reação de Maillard, que os aminoácidos livres e peptídeos se complexam com os açúcares redutores resultando em atributos sensoriais bastante peculiares (ROHAN, 1964; ROHAN & STEWART 1966; 1967b).

O aumento da concentração de aminoácidos livres durante a fermentação é rápido, pois a hidrólise das proteínas ocorre logo aos primeiros dias do processo. O valor máximo é geralmente encontrado entre o quarto e quinto dia de fermentação, após seu valor pode ou não decrescer (ROHAN & STEWART, 1967b; ZAK & KEENEY, 1976; CROS, 1999).

Segundo KIRCHHOFF *et al* (1989), os aminoácidos livres que predominam na fermentação de cacau são a leucina, alanina, fenilalanina e tirosina. SEIKI (1973) estudando a formação dos aminoácidos livres em cacau fermentado acrescenta a importância do ácido glutâmico, além dos acima citados.

De acordo com a Tabela 11, para o cacau entre a semente e a amêndoa fermentada ocorreu uma elevação significativa de leucina (600%), arginina (500%), treonina (367%), alanina (312%), valina (300%), serina (287%), fenilalanina (280%), tirosina (217%), ác.glutâmico (128%) e isoleucina (150%).

LOPES (2000) além dos aminoácidos acima citados encontrou aumentos significativos nos teores de metionina (800%) e histidina (312%) durante a fermentação de cacau.

Na secagem do cacau, observa-se os seguintes aminoácidos com teores elevados: serina, ác.glutâmico, alanina, valina, leucina, fenilalanina, lisina e arginina.

Para o cupuaçu, observou-se que os teores totais de aminoácidos livres expressos em mg aa/100g de amostra (Tabela 11) são inferiores aos obtidos para o cacau. Destaca-se na fermentação com aumentos significativos: fenilalanina (600%), treonina (500%), tirosina (433%), valina (325%), serina (284%), ác.glutâmico (200%), leucina (183%), alanina (175%) e arginina (137%).

Na secagem do cupuaçu, o ác.glutâmico e fenilalanina são os aminoácidos encontrados em teores mais elevados.

Observando os valores totais para os aminoácidos livres encontrados nas amostras pode-se notar o crescimento dos teores ao longo da fermentação, comprovando assim a hidrólise que ocorre no interior dos cotilédones. O processo de secagem reduz o teor de aminoácidos livres. A concentração máxima de aminoácidos livres não foi atingida ao quarto dia de processo, tendo em vista que o valor final de fermentação foi superior ao encontrado no mesmo.

5.5 ANÁLISE DO PERFIL DE FENÓIS TOTAIS NOS COTILÉDONES DE CACAU E CUPUAÇU.

A Tabela 12 e a Figura 21 mostram os valores e o comportamento dos fenóis totais em função dos dias de fermentação para as sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu.

Tabela 12. Valores de fenóis totais* ao longo da fermentação de cacau e cupuaçu.

Dias de Fermentação	Cacau (mg/g)	Cupuaçu (mg/g)
0	121,08	109,72
1	118,98	96,57
2	114,74	89,75
3	103,69	81,12
4	101,89	75,27
5	97,32	71,95
6	91,35	71,77
7	76,99	57,46
Seca	73,00	44,52

* Em base seca

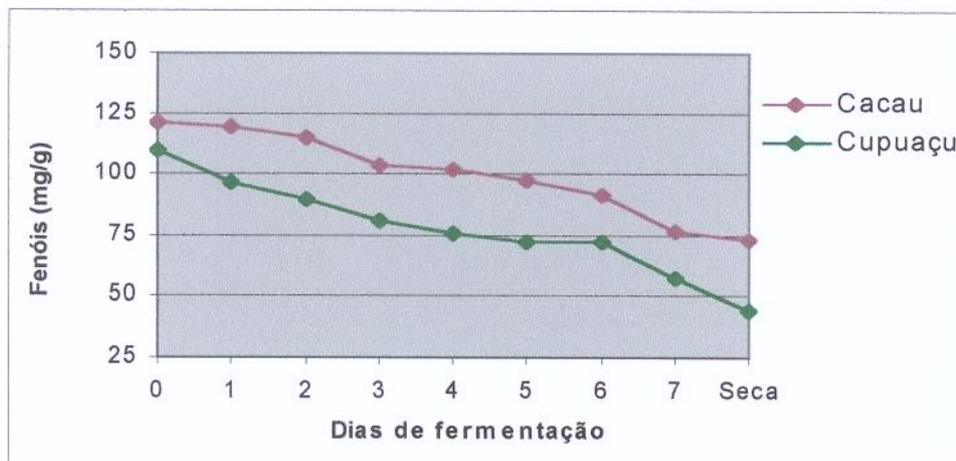


Figura 21. Perfil de fenóis totais nos cotilédones de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo.

Tanto para cacau como para cupuaçu, os perfis obtidos mostram uma queda dos valores de fenóis totais ao longo da fermentação. CROS *et al* (1982) e BONVEHÍ & COLL (1997) observaram o mesmo comportamento em amêndoas de cacau.

Estatisticamente, para o cacau, o Teste de Tukey não mostrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores obtidos para a semente e os dois primeiros dias de fermentação. A partir do terceiro dia, observou-se diferenças entre as amostras e os dias iniciais do processo. O processo de secagem mostrou um decréscimo não significativo em relação ao último dia de fermentação.

Estatisticamente, para o cupuaçu, o Teste de Tukey mostrou que as amostras correspondentes ao primeiro e segundo dia de fermentação não diferiram entre si ($p \leq 0,05$), assim como o intervalo que vai do quarto ao sexto dia. O processo de secagem mostrou um decréscimo significativo em relação ao último dia de fermentação.

Segundo CROS *et al* (1982), há uma redução em 70% no teor de compostos polifenólicos presentes em amêndoas fermentadas durante 8 dias em caixas, em relação ao teor destes compostos em sementes não fermentadas.

Com os valores iniciais obtidos para as sementes de cacau (121,08 mg/g) e cupuaçu (109,72mg/g) e os valores obtidos ao final da fermentação (76,99 e 57,46mg/g, respectivamente) observou-se no presente trabalho uma queda de 36,41% e 47,63% nos fenóis totais para os frutos dessas duas espécies.

A redução de fenóis ao longo da fermentação é interpretada por vários autores como resultado de uma oxidação enzimática e durante a secagem, as reações envolvendo compostos polifenólicos são uma continuação oxidativa da fermentação. Essa redução é atribuída ao escurecimento enzimático causado pela polifenoloxidase. Os polifenóis são oxidados na presença de oxigênio resultando na formação de quinonas que sofrem polimerização para obtenção de produtos de cor marrom. A consequência prática disso é a redução da adstringência no sabor final (FORSYTH & QUESNEL, 1977; JEANJEAN, 1995 *apud* CROS, 1999).

Recentes trabalhos sugerem que a diminuição dos compostos fenólicos até os últimos dias da fermentação não pode ser interpretada somente como resultado de uma oxidação enzimática, pois a atividade da polifenoloxidase é reduzida no quinto dia de processo em 5 a 13% da atividade inicial (VILLENEUVE *et al*, 1985; REEVES *et al*, 1988; HANSEN, 1998; WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

5.6 COMPOSIÇÃO E PERCENTUAL EM ÁCIDOS GRAXOS

Os resultados obtidos no estudo dos ácidos graxos para a gordura de cacau e cupuaçu, podem ser visualizados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

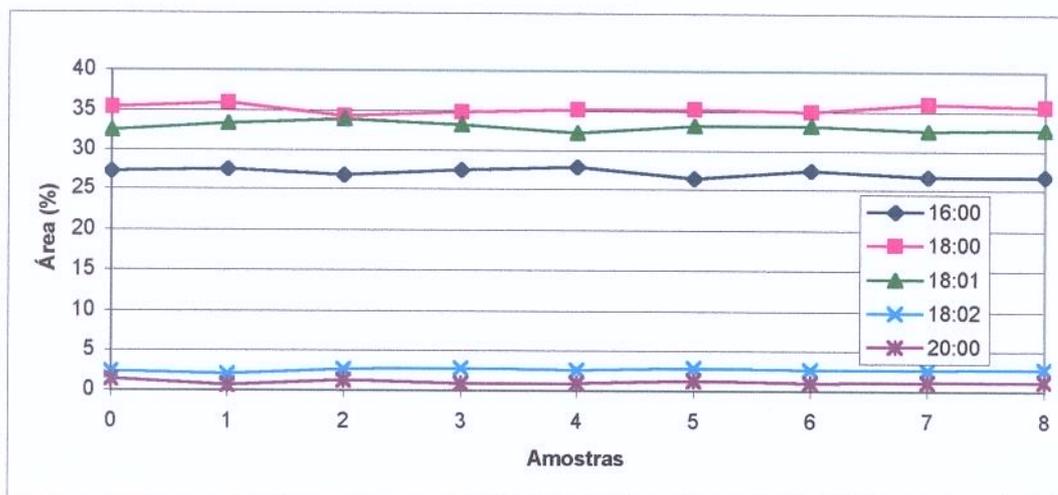


Figura 22. Comportamento dos ácidos graxos encontrados na gordura de cacau, ao longo do processo fermentativo.

A gordura de cacau está composta principalmente por: ácido esteárico (18:0), oléico (18:1) e palmítico (16:0); e por ácido linoléico (18:2) e araquídico (22:0) em baixas quantidades. Durante a fermentação, não houve alterações na porcentagem de ácidos graxos, o que indica que o processo não interfere de modo significativo na composição da gordura das amêndoas.

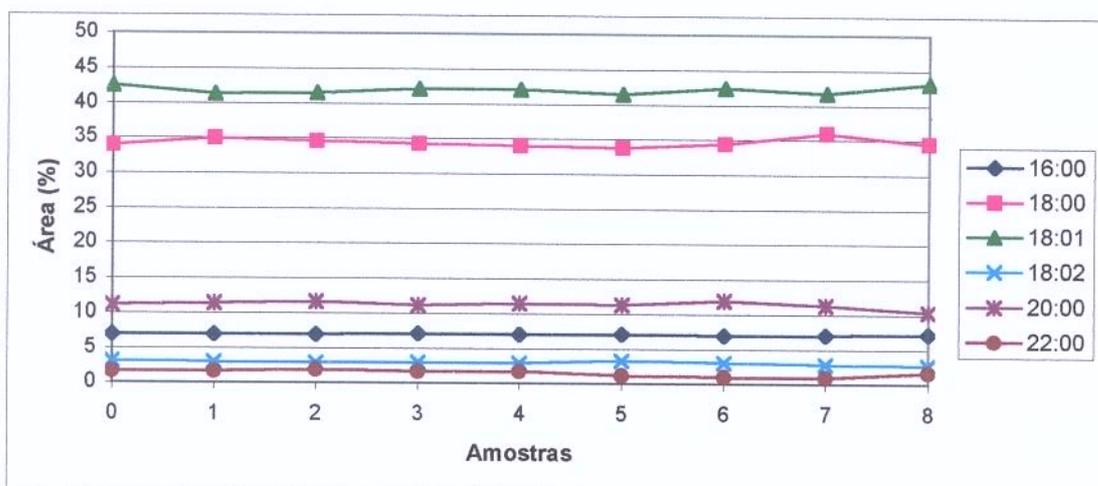


Figura 23. Comportamento dos ácidos graxos encontrados na gordura de cupuaçu, ao longo do processo fermentativo.

A gordura de cupuaçu está composta por: ácido oléico (18:1) e esteárico (18:0) em altas quantidades e concentrações menores de: ácido araquídico (20:0), palmítico (16:0), linoléico (18:2) e behênico (22:0). Assim como no cacau, a fermentação não afeta de forma significativa o comportamento dos ácidos.

A composição triglicéridica das gorduras depende da composição em ácidos graxos, portanto não havendo mudanças na composição da gordura em termos de ácidos graxos, podemos afirmar que a composição triglicéridica e conseqüentemente as propriedades físicas da gordura também não sofrem alterações durante a fermentação.

5.7. ANÁLISE DA MICROESTRUTURA DAS SEMENTES E AMÊNDOAS DE CACAU E CUPUAÇU.

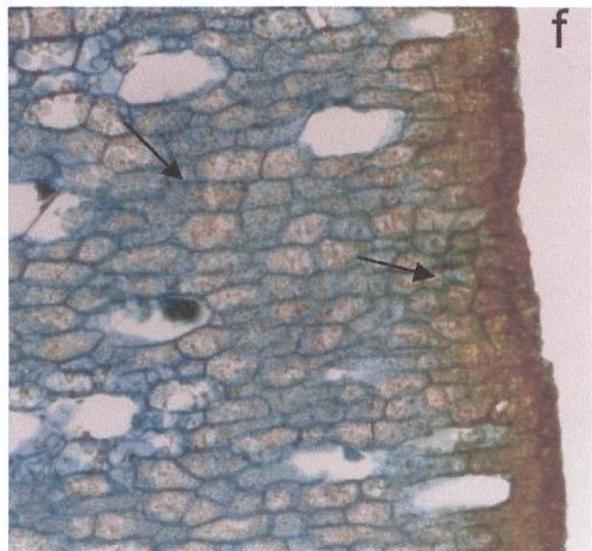
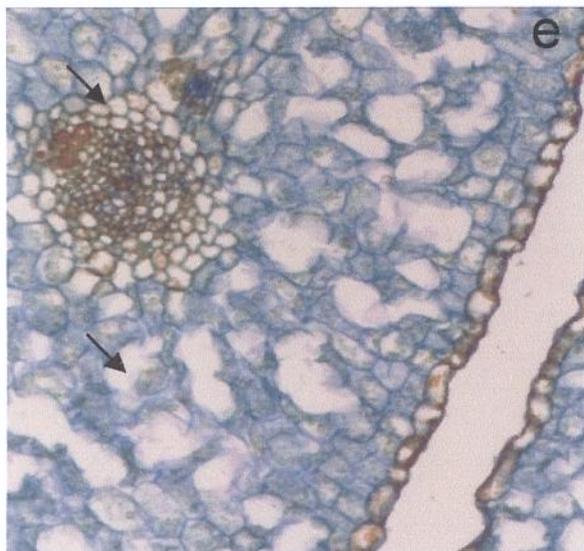
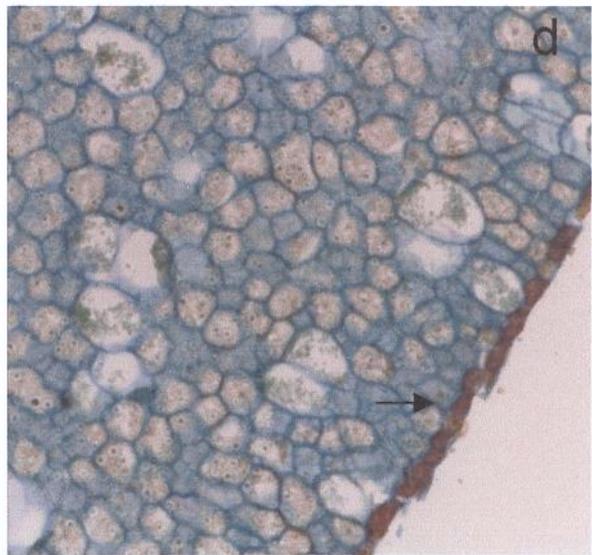
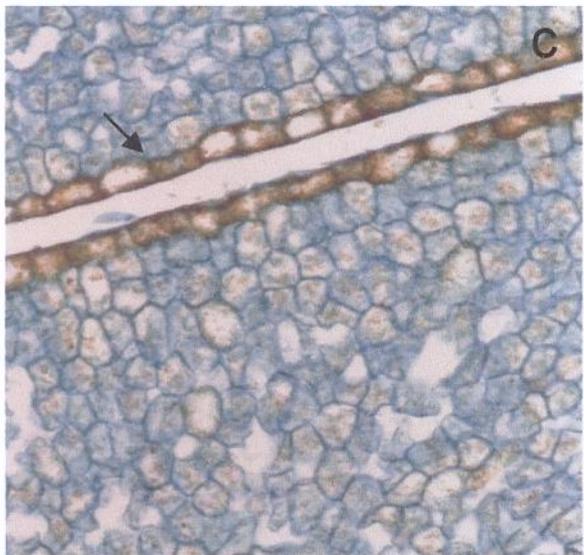
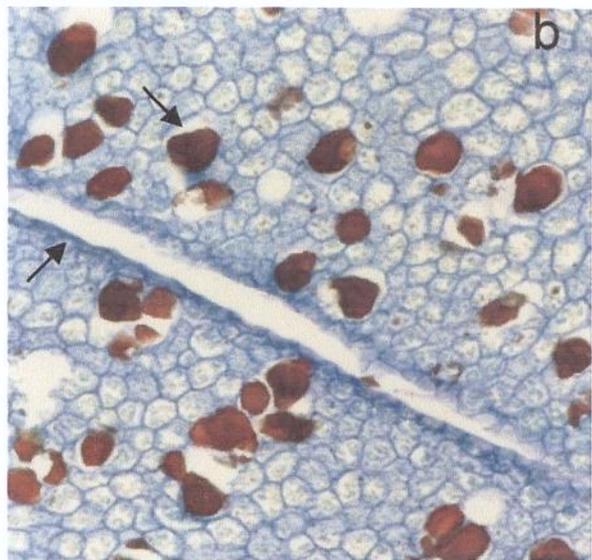
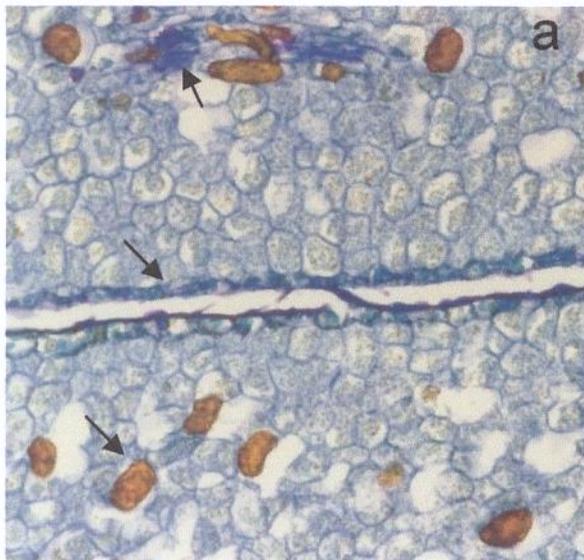
5.7.1. Azul de Toluidina (AT)

O azul de toluidina (AT) é um corante básico, portador do radical NH_3^+ . Em pH 4,0, poucos radicais carboxila presentes em proteínas encontram-se negativados. Por outro lado, os radicais fosfato presentes em ácidos nucleicos e radicais sulfato e carboxila presentes em polissacarídeos ácidos são corados (CORTELAZZO, 1989).

O fenômeno da metacromasia é comum a inúmeros corantes básicos, incluindo o AT. Caracteriza-se por uma diminuição no pico de absorção da solução do corante, a medida que ocorre aumento na sua concentração em solução. Isso faz com que a disponibilidade de radicais aniônicos e proximidade dos mesmos no substrato a ser corado, seja estimada pela visualização da cor obtida, que em função dessas interações passa do verde, para azul, azul arroxeadado e róseo a medida em que mais moléculas do corante se empilham no substrato (MELLO & VIDAL, 1980).

Observa-se na Fig.24a e 24b uma grande disponibilidade de radicais aniônicos, principalmente na camada epidérmica do cotilédono. Provavelmente essas substâncias são pécticas e sofrem degradação ao longo do processo fermentativo. Nota-se também na Fig.24a uma concentração desses radicais nos feixes vasculares.

Figura 24: Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (200x) em diferentes tempos de fermentação corados com AT. **(a)** semente fresca de cupuaçu **(b)** semente fresca de cacau. As setas em (a) e (b) indicam a grande disponibilidade de radicais aniônicos na camada epidérmica do cotilédone e as células de pigmentos. **(c)** cupuaçu ao quarto dia de fermentação. **(d)** cacau ao quarto dia de fermentação. Nota-se, com o decorrer da fermentação, a difusão dos pigmentos e sua concentração na epiderme. **(e)** cupuaçu ao sétimo e último dia de fermentação (200x). As setas evidenciam os rompimentos celulares no cupuaçu e a concentração de fenóis nos feixes vasculares **(f)** cacau ao sétimo e último dia de fermentação (200x). Nota-se um alongamento das células no cacau e a concentração de fenóis na epiderme.



Ainda nas Fig.24a e 24b, pode-se observar um conteúdo heterogêneo para as células cotiledonares e 2 tipos distintos de células: o primeiro é pequeno e contém as substâncias de reserva; o segundo é composto por células maiores, estando espalhadas entre as células do primeiro tipo. É neste tipo de células que os polifénóis, a cafeína e theobromina da semente estão armazenadas.

Com a coloração dessas células variando de castanho claro para cotilédones de cupuaçu a marrom escuro para cotilédones de cacau, pode-se sugerir que a composição em termos de compostos fenólicos e pigmentos entre os frutos é diferente.

Observando a Fig. 24c e 24d, nota-se que uma série de alterações acontecem à medida que o tempo de fermentação aumenta. Os polifénóis são difundidos através de todo o cotilédone. Para o cupuaçu, as figuras 24c e 24e mostram que esses compostos tendem a se concentrar na epiderme e nos feixes vasculares. Para o cacau, as figuras 24d e 24f mostram bem a migração dos fenóis para a epiderme e sua concentração nesta área ao final da fermentação. A partir do terceiro dia de processo, a presença de material fenólico no interior das células do tipo II não foi mais observada.

As Fig.24e e 24f, mostram outra modificação importante: os rompimentos celulares. Essa característica foi observada a partir do terceiro dia de fermentação, aumentando gradativamente conforme o decorrer do processo.

No estudo do cacau, os trabalhos de BIEHL *et al* (1982a e 1982c) e BRITO *et al* (1998) estão de acordo com os fenômenos observados de degradação de fenóis e rompimentos celulares. CUNHA *et al* (1997), no estudo do cupuaçu, observou o mesmo comportamento, porém o trabalho não possibilitou a comparação direta entre os frutos.

Nota-se, pela Fig.24, que em condições iguais de fermentação, o cacau se mostrou bem mais resistente aos rompimentos do que o cupuaçu. A Fig.23e mostra o último dia de fermentação para o cupuaçu e pode-se observar que praticamente há uma destruição das células. Isso significa, de modo prático, que o cupuaçu é menos resistente a fermentação que o cacau e pode-se considerar a hipótese de submeter as sementes do fruto a um tempo menor de processo.

A Fig. 24f refere-se ao último dia de fermentação para o cacau, apesar de não se observar uma destruição drástica das células, diferenças em relação a semente podem ser vistas (Fig.24b). As células, antes arredondadas, tendem a ficar mais alongadas e irregulares.

5.7.2. Xylidine Ponceau (XP)

O Xylidine Ponceau é um corante ácido, que apresenta dois radicais sulfato. A pH 2,5 as proteínas podem ser visualizadas, pois neste pH seus grupo amino estão protonados e ligam-se eletrostaticamente ao XP, que por sua vez, apresenta seus radicais sulfato desprotonados (CORTELAZZO & VIDAL, 1991).

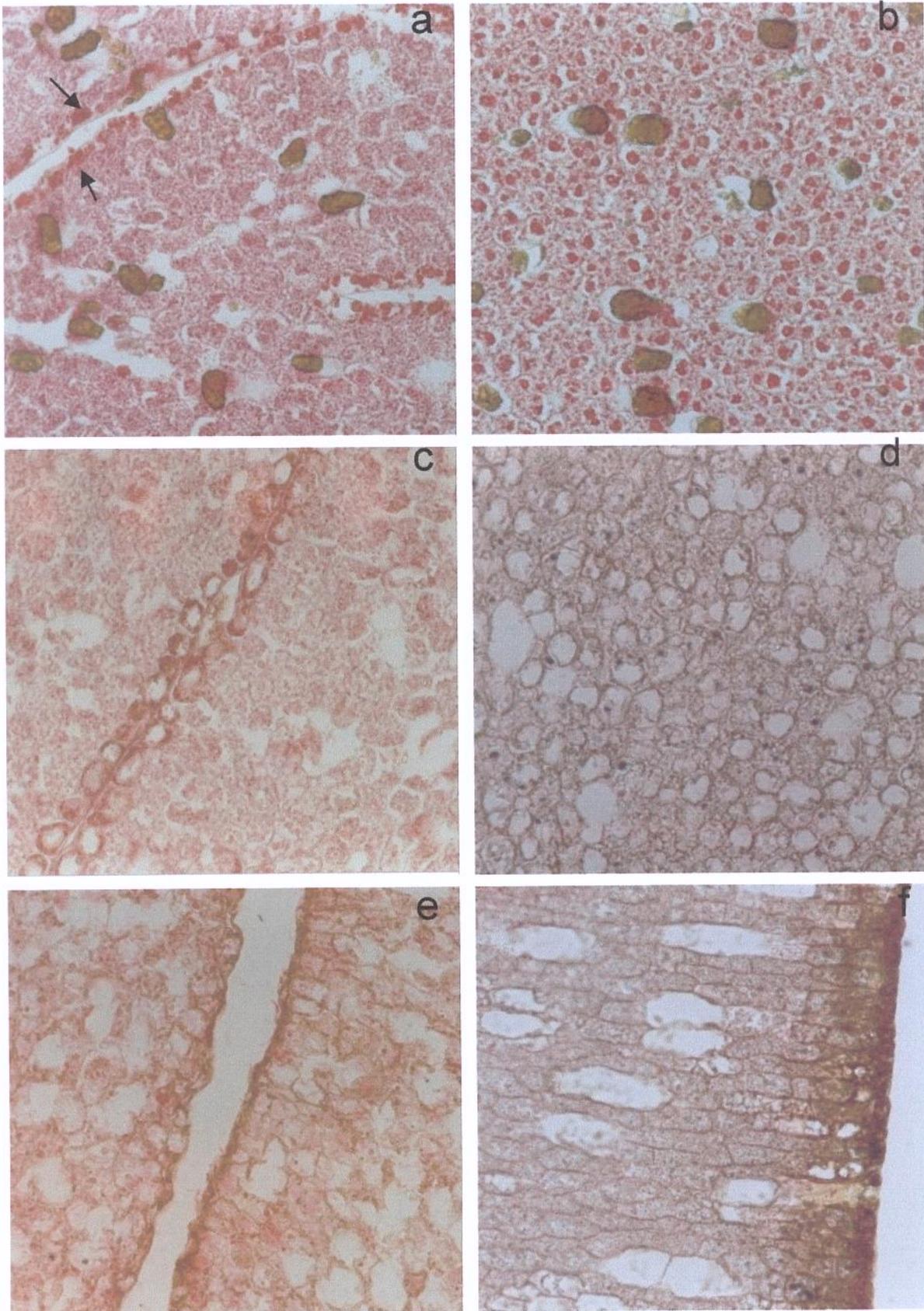
As proteínas são apresentadas como material de reserva em sementes, normalmente na forma de corpos proteicos. Esses corpos podem diferir grandemente na sua morfologia e conteúdo químico, que variam de acordo com a espécie (PATE *et al*, 1985 *apud* BORDIGNON, 2000).

Na Fig.25a e 25b, nota-se o material protéico disperso no citoplasma da semente. As proteínas mostram ser bastante diferentes e no caso do cupuaçu, se concentram na camada epidérmica do cotilédone. Na Fig.25c e 25d, ocorre uma aparente diminuição na intensidade de coloração. Isso indica que com o decorrer da fermentação, o material protéico sofre alterações.

As diferentes colorações obtidas estão relacionadas com a disponibilidade dos grupos amina presentes nas amêndoas e qualquer alteração na estrutura e organização dos corpos proteicos pode causar modificações nas tonalidades. Isso faz do método citoquímico um método muito sensível quando comparado ao bioquímico.

Pela dosagem bioquímica, obteve-se uma queda do teor de proteína ao longo dos dias de fermentação, porém não se observou perdas muito significativas conforme sugerem as micrografias.

Figura 25: Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (200x) em diferentes tempos de fermentação corados com XP. **(a)** semente fresca de cupuaçu. **(b)** semente fresca de cacau. Nota-se o material protéico corado e disperso no citoplasma da semente. O cupuaçu mostra uma coloração mais intensa na epiderme, setas indicativas em (a). **(c)** cupuaçu ao terceiro dia de fermentação. **(d)** cacau ao terceiro dia de fermentação. **(e)** cotilédone de cupuaçu ao sétimo e último dia de fermentação. **(f)** cotilédone de cacau ao sétimo e último dia de fermentação. Nota-se diferenças de colorações entre os tempos estudados, indicando assim uma alteração do material protéico durante o processo fermentativo.



A diminuição do teor de proteína já foi discutida no item 5.2.3, mas vale mencionar novamente que o fenômeno deve ocorrer devido a complexação de polifenóis com aminoácidos, formados pela ação de proteases durante a fermentação. A quebra dessas moléculas em peptídeos menores, originados da ação de enzimas proteolíticas também podem ser responsáveis pelas alterações observadas. Comportamento similar foi observado por BIEHL *et al* (1982b e c) e BRITO (2000).

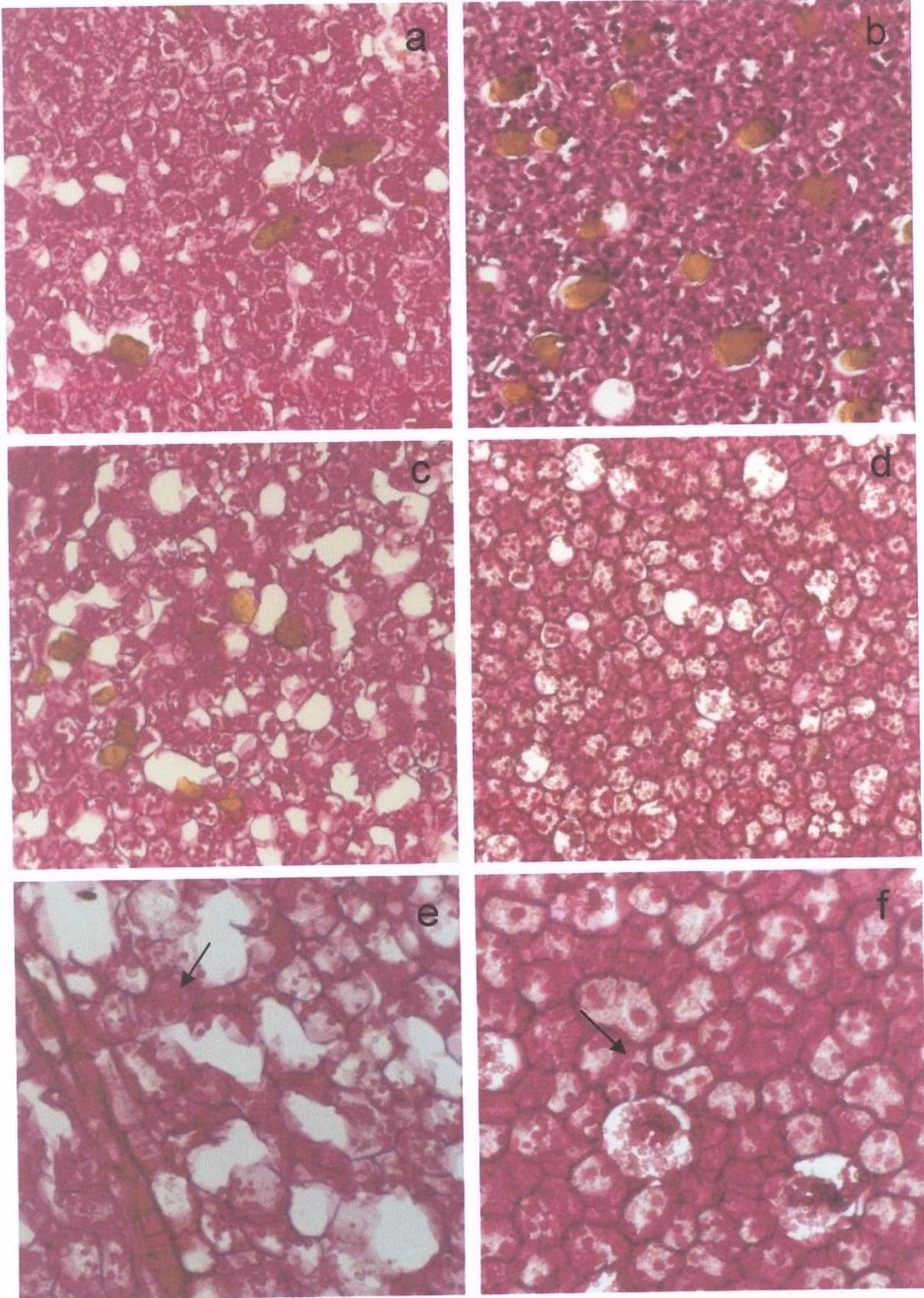
5.7.3. Método do PAS/ Reativo de Schiff

O método do PAS é geralmente utilizado para evidenciar polissacarídeos neutros. Em vegetais, através do PAS, evidenciam-se celulose, hemiceluloses e amido. Essa reação baseia-se na oxidação de grupos hidroxila de carbonos vicinais pelo ácido periódico (HIO_4), formando radicais aldeídicos. Em um segundo momento, esses radicais se ligam ao reativo de Schiff. Esse corante, apresenta cor magenta e, sob ação do anidrido sulfuroso, tem o seu grupo cromofórico alterado, originando uma solução sem cor. Essas moléculas incolores ligam-se aos grupos carbonila (formados pela oxidação das hidroxilas), restabelecendo assim, a região cromofórica do corante (CORTELAZZO *et al*, 1983 *apud* BORDIGNON, 2000).

Na Figura 26, pode-se observar que as células cotiledonares das sementes de cupuaçu e cacau tiveram os polissacarídeos da parede celular evidenciados citoquimicamente pela reação do PAS, caracterizando assim seu material celulósico, hemicelulósico e até mesmo o material péctico, que também possui na sua estrutura hidroxilas vicinais. Nenhuma variação muito brusca de coloração nas micrografias foi observada, com isso pode-se dizer que o processo fermentativo não influenciou de forma significativa nos polissacarídeos neutros.

Na Fig.26e e 26f, observa-se inúmeros grânulos de elevado tamanho, que foram intensamente evidenciados pela reação do PAS. Pela forte reação e sua natureza globular, acredita-se serem grãos de amido. Os mesmos não foram corados pelo AT e XP. Outro modo de se comprovar a natureza química desses grânulos PAS-positivos é através de sua análise ao microscópio de polarização. Nos grãos de amido, as moléculas de amilose e amilopectina dispõem-se de forma circular a partir de um centro de nucleação. Essa disposição faz com que os grãos apresentem-se birrefringentes e com um aspecto característico de “cruz de malta” quando observados em microscópio de polarização com analisador e polarizador cruzados (MELLO & VIDAL, 1980).

Figura 26: Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu em diferentes tempos de fermentação corados com PAS. **(a)** semente fresca de cupuaçu (200x). **(b)** semente fresca de cacau (200x). **(c)** cupuaçu ao segundo dia de fermentação (200x). **(d)** cacau ao terceiro dia de fermentação (200x). **(e)** cupuaçu ao sétimo e último dia de fermentação (400x). **(f)** cacau ao sétimo e último dia de fermentação (400x). As setas indicam grânulos de tamanho elevado, identificados como grãos de amido.



5.7.4. Amido

Alguns cortes corados em AT pH 4,0 foram submetidos a microscopia de polarização com o objetivo de identificar grãos de amido. A análise ao microscópio de polarização veio confirmar a natureza química dos grânulos.

Em termos de conteúdo citoplasmático, o amido se distribui na forma de glóbulos de diferentes tamanhos e é formado por quantidades variáveis de amilose e amilopectina. Essas quantidades, mais ou menos determinadas para cada espécie, interferem em dois níveis de organização: o primeiro, ou nível molecular, se refere à quantidade de estrutura fina, tamanho e forma das moléculas; o segundo, a estrutura supramolecular ou granular (BILLADERIS, 1991 *apud* BORDIGNON, 2000).

Observando a Fig.27a e 27b, nota-se que os cotilédones de cupuaçu apresentam um maior número de grãos de amido em relação aos de cacau. Através de outras micrografias, não documentadas aqui, observou-se que o amido no cupuaçu se concentra em maiores quantidades em volta da epiderme e sua estrutura é bem diferente, apresentando ao mesmo tempo, grãos pequenos e grandes. O cacau, por sua vez, mostra que o amido não está distribuído homoganeamente pelas suas células e se apresenta na forma de grãos menores.

Ao final do processo fermentativo, nota-se uma diminuição da quantidade de grãos nos cotilédones de cupuaçu e uma diminuição no tamanho dos mesmos (Fig.27c). A diminuição pode ser conseqüência da degradação de grãos maiores pela α -amilase em função da temperatura atingida no processo.

Para o cacau (Fig.27d), nota-se também uma aparente redução da quantidade de amido ao longo da fermentação. Entretanto, os grãos mostram um aumento de tamanho. Isso pode ser explicado pelo fato de que com a perda de material protéico e a destruição de células, esses grãos de amido acabam se tornando mais evidentes sem entretanto haver aumento na sua quantidade. BRITO (2000) observou o mesmo fenômeno.

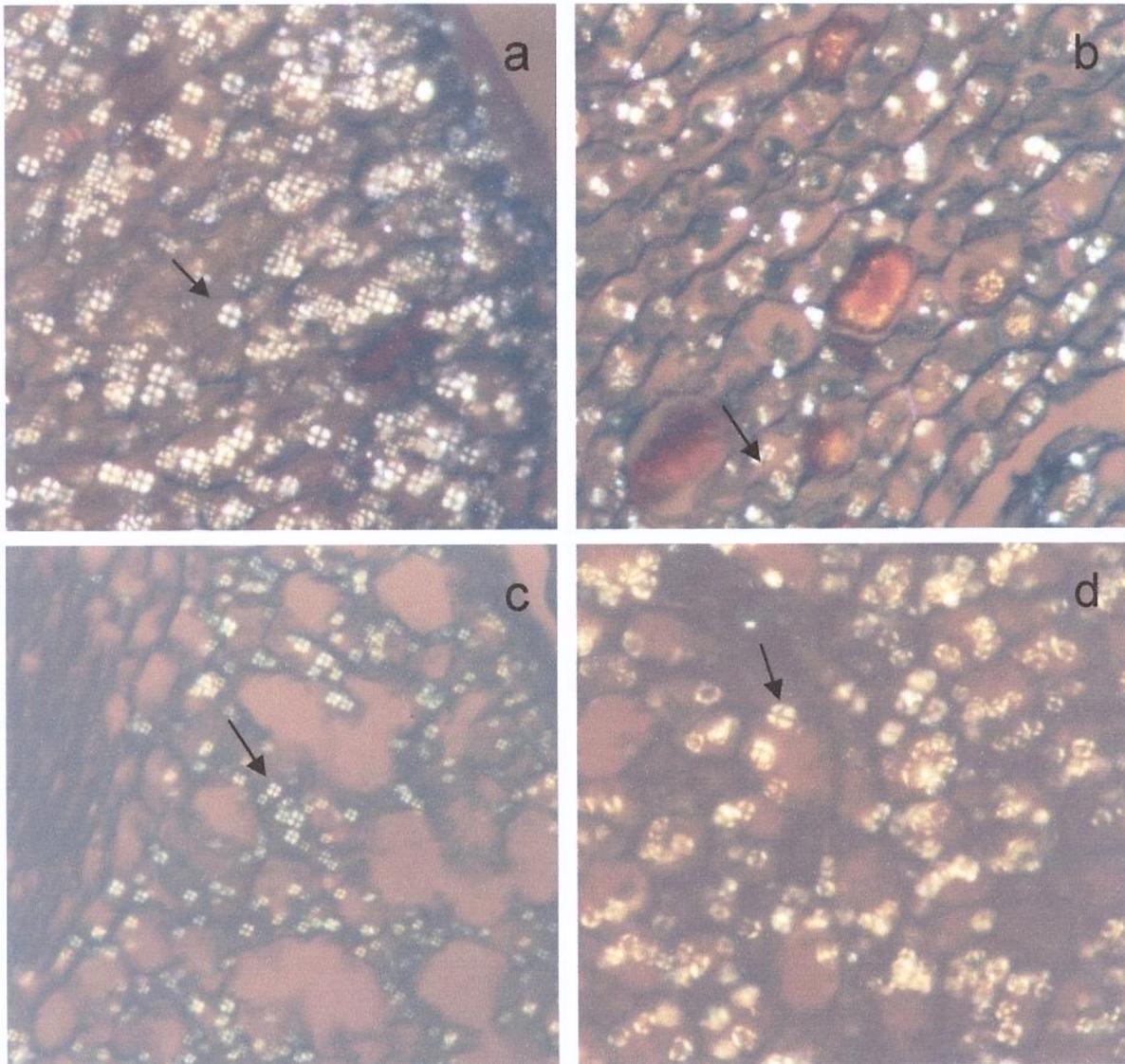


Figura 27: Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (400x) em diferentes tempos de fermentação corados em AT e submetidos a polarização. **(a)** semente fresca de cupuaçu. **(b)** semente fresca de cacau. **(c)** cupuaçu ao sétimo e último dia de fermentação. **(d)** cacau ao sétimo e último dia de fermentação.

5.7.5 Floroglucina/HCl

A reação da floroglucina/HCl é específica para compostos fenólicos, especialmente para detecção de lignina (CLIFFORD, 1974 *apud* BEGNAMI, 1998; VALLET *et al*, 1996 *apud* GALLÃO, 2000).

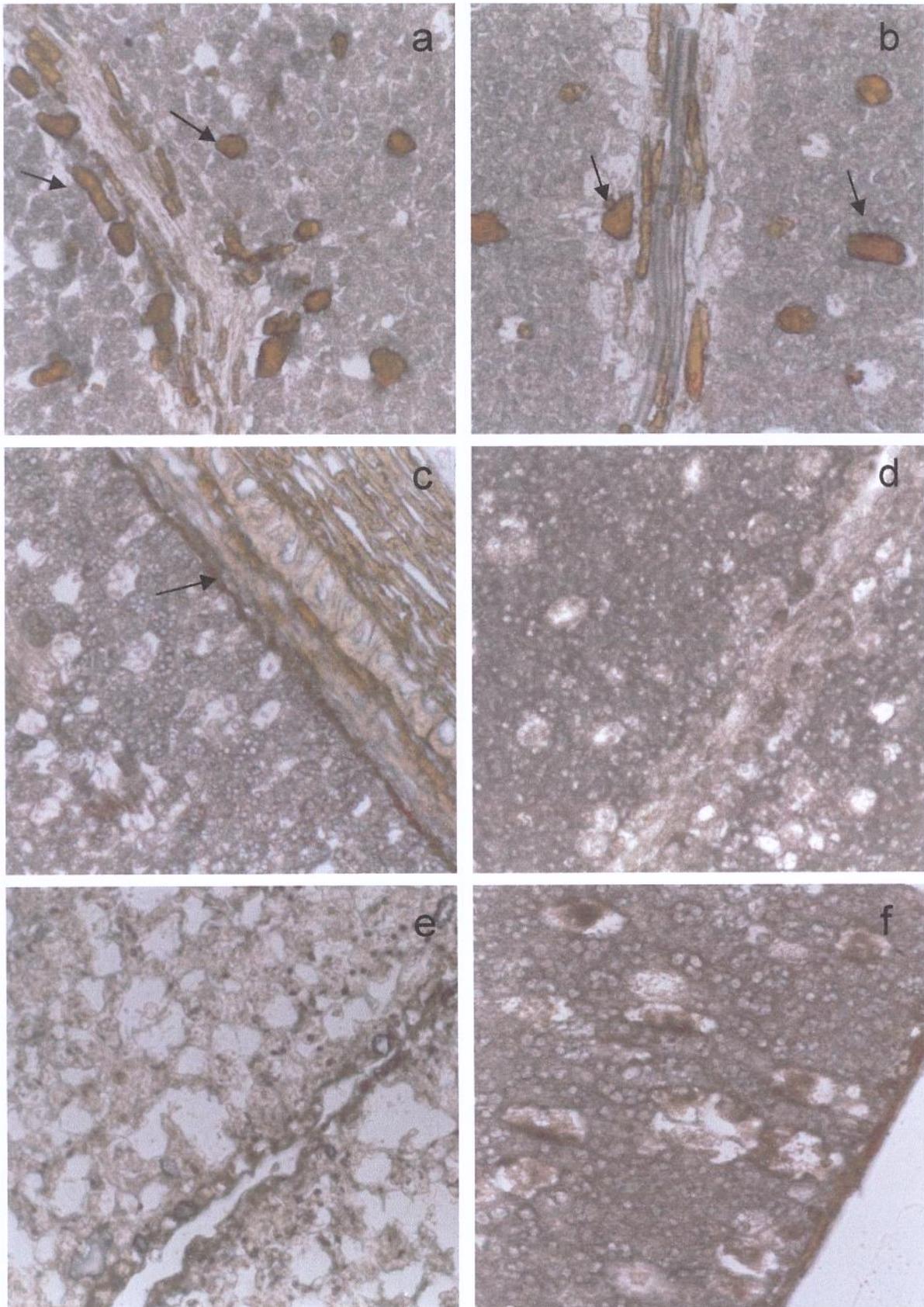
A reação Floroglucina/HCl vem confirmar o fenômeno observado nas colorações de AT e XP. Com o decorrer da fermentação há o rompimento das células de pigmentos e conseqüentemente sua difusão pelo interior dos cotilédones.

Observando a Fig. 28a e 28b, pode-se visualizar a presença de células maiores e ricas em polifenóis. Após 24 horas de fermentação (micrografia não apresentada) poucas alterações foram notadas em relação a semente não fermentada. A difusão dos polifenóis através do cotilédone começa a ser observada a partir de 48 horas de processo e após 72 horas não se observa mais a presença de material fenólico no interior das células.

Na Fig.28c, observa-se o aparecimento da testa no corte. Nota-se os compostos fenólicos espalhados na mesma.

A Fig. 28e e 28f mostra uma grande diferença de coloração em relação aos cotilédones de cacau e cupuaçu. Pelas micrografias, pode-se dizer que o processo fermentativo provoca uma redução maior de fenóis no cupuaçu. Tal fato, foi confirmado bioquimicamente, conforme os resultados apresentados no item 5.5.

Figura 28: Cortes de cotilédones de sementes e amêndoas de cacau e cupuaçu (200x) em diferentes tempos de fermentação corados pela reação Floroglucina/HCl. **(a)** semente fresca de cupuaçu. **(b)** semente fresca de cacau. As setas em (a) e (b) indicam a presença de células maiores e ricas em fenóis. **(c)** cupuaçu ao quarto dia de fermentação. Nota-se o aparecimento da testa e um acúmulo de fenóis na mesma. **(d)** cacau ao quarto dia de fermentação. **(e)** cupuaçu ao sétimo e último dia de fermentação. **(f)** cacau ao sétimo e último dia de fermentação. Nota-se nessas últimas micrografias que o material fenólico praticamente não existe mais no interior das células.



6. CONCLUSÕES

A evolução dos parâmetros controlados durante a fermentação (temperatura, pH e acidez titulável) sugerem que a mesma foi conduzida de forma a proporcionar amêndoas de boa qualidade. De acordo com CONCEX (1968), as amêndoas de ambos os frutos foram classificadas como Tipo I (superior).

Quanto à caracterização físico-química, observou-se que:

- O teor de umidade aumenta ao longo da fermentação e esse aumento é maior para as amêndoas de cupuaçu.
- O teor de lipídios não sofre nenhuma variação brusca ao longo dos dias de fermentação. As amêndoas de cupuaçu são mais ricas em gordura que as de cacau.
- O teor de proteína das sementes, de ambos os frutos, varia levemente no decorrer da fermentação. O cacau apresenta teores mais elevados ao longo do processo.
- O teor de cinzas sofre queda significativa em seus valores iniciais. O cupuaçu apresenta teores mais elevados que o cacau.
- O teor de fibras sofre decréscimo ao longo da fermentação. Esse decréscimo é mais acentuado no cupuaçu, o que faz a amêndoa do fruto ser menos rica em fibras no final do processo em relação ao cacau.

As transformações que ocorrem durante o processo fermentativo nos açúcares e ácidos orgânicos são similares para cacau e cupuaçu. Vale ressaltar a característica das amêndoas de cupuaçu serem menos ácidas, o que proporciona um produto mais suave.

Os perfis de aminoácidos livres mostraram elevações significativas durante a fermentação. Tanto para cacau como para cupuaçu, o aumento ocorreu praticamente nos mesmos aminoácidos (fenilalanina, treonina, tirosina, valina, serina, ác.glutâmico, leucina, alanina e arginina).

Os perfis de fenóis totais mostraram um decréscimo nos teores ao longo dos dias de fermentação. Os cotilédones de cupuaçu apresentaram teores menores que o cacau, o que explica o fato do *cupulate* ter como uma de suas características uma menor adstringência.

Quanto à composição em ácidos graxos, observou-se não haver variação durante os sete dias de processo. Portanto, se for necessária uma diminuição no tempo de fermentação, fato muito comum em fermentações comerciais, a qualidade da manteiga obtida não será afetada em termos de dureza, resistência à fusão e outras propriedades físicas influenciadas pela composição em ácidos graxos e triglicerídios.

A microscopia de luz utilizada para análise das estruturas celulares das sementes mostrou-se adequada para visualização das transformações observadas bioquimicamente, como degradação de proteínas e compostos fenólicos. Rompimentos celulares também foram bem documentados e o cupuaçu mostrou-se mais suscetível a esse fenômeno. Uma quantidade maior de amido foi documentada nos cotilédones de cupuaçu e para ambos os frutos observou-se um decréscimo ao longo dos dias de fermentação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: edited Ig W.Horwitz 16^a ed. Washington, 850p. 1997. v.2.

AOCS. Official Methods and recommended practices of the American Oils Chemist Society. 3 ed. Champaign. v . 1-2. 1993.

AMERINE, M.A; OUGH, C.S. **Methods for Analysis of Musts and Wines**. 2^a ed. New York. Vywiley E Sons. Inc. s.d.337p.

ARAGÃO, C.G. **Mudanças Físicas e Químicas da semente do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o Processo Fermentativo**. Manaus. 115p.1992. Dissertação (Mestrado). Fundação Universidade do Amazonas.

AREMU, C.Y;AGIANG,M.A.;AYATSE,J.O.J. Nutrient and antinutrient profiles of raw and fermented cocoa beans. **Plants Foods for Human Nutrition**. 48:217-223, 1995.

BAREL, M. Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. **Café Cacao Thé**. v.XXXI, n.2, p.141-150.1987.

BCCCA. The biscuit, cake, chocolate and confectionary alliance. Fourth edittion. Bedford Row, London, october, 1996.27p.

BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. Edited by S.T. Beckett, 2ed.Imp.London: Blackie Academic, 1994, 408p.

BECKMAN INATRUMENTS INC. Beckman 118/119 BL, 118/119 CL Amino acid analyser. Instruction Manual. Spinco Division, Palo Alto, 1977.

- BEGNAMI, C.N. **Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda de viabilidade em sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho.** Campinas, 1998. 104pg. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. UNICAMP.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos.** Zaragoza, Editorial Acribia, S.A., 1988. 813p.
- BEUX, M.R. **Atlas de Microscopia Alimentar: Identificação de Elementos Histológicos Vegetais.** São Paulo: Livraria Varela, 1997. 79p.
- BIEHL, B.; PASSERN, U.; PASSERN, D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. **J. Sci. Food Agric.** v.28, p.41-42, 1977.
- BIEHL, B.; PASSERN, D.; SAGEMANN, W. Effect of acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. **J. Sci. Food Agric.** v.33, p.1101-1109, 1982c.
- BIEHL, B.; QUESNEL, V.C.; PASSERN, D.; SAGEMANN, W. Water uptake by cocoa seeds during fermentation like incubation. **J. Sci. Food Agric.** v.33, p.1110-1116, 1982a.
- BIEHL, B.; WEWETZER, C.; PASSERN, D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, v.33, p.1291-1304, 1982b.
- BIEHL, B. & VOIGT, J. Biochemistry of chocolate flavour precursors. In: 12^o CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CACAU, Salvador - BA, novembro, 1996.

BONVEHÍ, J.S.; COLL, F.V. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. **Food Chemistry**.v.60, n.3, p.365-370, 1997.

BORDIGNON, M.V. **Análise morfo-fisiológica em sementes de *Eugenia uniflora* L. e *Campomanesia xanthocarpa* Bere (Myrtaceae)**. Campinas, 2000. 82p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia. UNICAMP.

BRANDEAU, J. **El cacao**. Barcelona, Editorial Blume, 1970.297p.

BRITO, E.S.; PEZOA, N.H.; GALLÃO, M.I.; CORTELAZZO, A. L. Avaliação da estrutura celular de cacau (*Theobroma cacao* L.) por microscopia eletrônica de varredura durante a fermentação, secagem e torração. In: **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro, 1998.

BRITO, E.S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamentos para o melhoramento do sabor**. Campinas, 2000.134p. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.

CALZAVARA, B.B.G. **Cupuaçuzeiro**. Recomendações Básicas I - Embrapa-CPATU. Belém, PA. 1987.

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGW, O.N.C. **Fruticultura Tropical: o cupuaçuzeiro, cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. Embrapa - CPATU. Belém, PA. 1984.

CAMTA. Cooperativa Agrícola Mista de Tomé-Açu. **Cupuaçu**. Disponível na Internet: <http://www.amazon.com.br/~camta/cupuaçu1.htm>, 20.08.2000.

- CARVALHO, J.R.; ROCHA FILHO, G.N.; SERRUYA, H. Análise dos óleos dos três frutos comestíveis da região amazônica - cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Spreng, Schum); mari (*Paraqueiba paraensis*, Icacinaceae) e uxi (*Endopleura uxi*, Umiricaceae). In: ENCONTROS DE PROFISSIONAIS DA QUÍMICA DA AMAZÔNIA, 1., 1980; 2., 1981, São Luiz. **Anais**. Belém: CFQ, 1981.p.187-196.
- CAVALCANTE, M.C.L.; ROSÁRIO, S.F. **Cristalização do cupuaçu**. Belém, 1998.87p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Departamento de Engenharia Química, UFPA.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém, 5ª ed., Museu Paraense Emílio Goeldi, Edições CEJUP: CNPQ. p.90-96, 1991.
- CHAAR, J.M. **Composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e conservação do seu néctar por meios físicos e químicos**. Rio de Janeiro, 1980. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- CHATT, E.M. **Cocoa**. New York, Interscience Publishers. 1953. Vol. III. 302p.
- CEPLAC. Comissão Executiva do Plano de Lavoura cacaueira: **Normas técnicas para o cultivo do cacau no Recôncavo Baiano**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, 1980, 43p.
- COHEN, K.O.; JACKIX, M.N.H. Obtenção e caracterização física e físico-química do *liquor* de cupuaçu. In: **III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas, 1999.
- CONCEX. Conselho Nacional do Comércio Exterior. **Resolução nº 42**. Rio de Janeiro. 1968.9p. Brasil.

- CORTELAZZO, A.L.. **Caracterização topoquímica e bioquímica de sementes de *Canavalis ensiformis* DC e *Canavalis gladiata* DC.** Campinas, 1989.134p. Tese de doutorado. Instituto de Biologia. UNICAMP.
- CORTELAZZO, A.L.;VIDAL, B.C. Soybean seed proteins: detection *in situ* and mobilization during germination. **Revista Brasileira Botânica.** 14: 27-33, 1991.
- COUTINHO, R.B.S. Industrialização das sementes de cupuaçu. **Revista de Farmácia Bioquímica da Amazônia.** Manaus-AM, 2(4):7-10.1969.
- CROS, E. Cocoa Flavor Development – effects of post-harvest processing. **The Manufacturing Confectioner.** Fev, 1999.
- CROS, E.;JEANJEAN, N. Cocoa quality: effect of fermentation and drying. **Plantations, recherche, développement.** Mai, juin, 1995.
- CROS, .E.; VILLENEUVE,F.; VINCENT,J.C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. I. Evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. **Café Cacao Thé.** (26):109-114. 1982.
- CUNHA, C.R.; JACKIX, M.N.H.; CORTELAZZO, A.; VASCONCELOS, M.A.M. Alterações na Microestrutura das Amêndoas durante a Fermentação de Sementes de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). In: **II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 14 de novembro de 1997. Campinas - SP.
- DIAS, J.C. **Permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético: evolução na fermentação e efeito da adição de celulases, antes da secagem, na acidez do produto final.** Lavras, 1987.70p. Dissertação (Mestrado). ESAL.

- DIAS, J.C. Influência do tamanho do fermentador e da época no tempo de fermentação e acidez do cacau. Belém, CEPLAC/SUPOR. **Boletim Técnico** nº 16.18p.1998.
- DIMICK, P.S. & HOSKIN, J.M. Chemico-Physical Aspects of Chocolate Processing - A review. **Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology**. Vol 14(4): 269-282, 1981.
- DOSUALDO, G.L.;JACKIX,M.N.H.;VASCONCELOS, M.A.M. Efeito da formulação, conchagem e temperagem nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do cupulate. In: **III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas, 1999.
- DRUMMOND, M.CM. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Theobroma cacao* L.), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**. Campinas, 1998, 127p. Dissertação (Mestrado). Fac. Eng. Alim. UNICAMP.
- DRUZIAN,J.I.; SCAMPARINI, A. Determinação de açúcares e ácidos urnicos de polissacarídeos produzidos por diferentes espécies de Rhizobios. In: **II Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos – Progresso e Ação para o Ano 2000**, pg.32.out, 1997.
- DRUZIAN,J.I.;SCAMPARINI,A.R.P.;DOKI,C. Determinação simultânea de açúcares e polióis por cromatografia de alta eficiência (HPLC) em sorvetes de baixas calorias (diet/light). In: **III Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos**, 16-19. Novembro, UNICAMP, 1999.
- FADINI, A.L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração do cacau frente ao processo por microondas**. Campinas, 1998, 122p. Dissertação (Mestrado). Fac. Eng. Alim. UNICAMP.

- FERNÁNDEZ BARBERY, S.D. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) utilizando polifenoloxidase extraída da pinha (*Annona squamosa* L.) e tratamento térmico não convencional.** Campinas, 1999, 76p. Dissertação (Mestrado). Fac. Eng. Alim. UNICAMP.
- FERREIRA, H.I.S.; FREIRE, L.B.; MASCARENHAS, G.; LANDIM, A.D.; DIAS, L.H.A. **Custos Efetivos de Produção de Cacau.** Relatório de Projeto, mai/jun 1998. Disponível na Internet: <http://www.jacaranda.vescba.com.br/>, 25.10.1999.
- FORSYTH, W.G.C & QUESNEL, V.C. Cacao glycosidade and colour changes during fermentation. **J. Sci. Food Agric.** 8: 505-509, 1957.
- FORSYTH, W.G.C; QUESNEL, V.C. 1963. *Adv.Enzymol.*25:457,1963. *Apud* BIEHL, B *et al*, Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. **J. Sci. Food Agric.** v.28, p.41-52, 1977.
- FORSYTH, W.G.C; QUESNEL, V.C.; ROBERTS, J.B. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. **J. Sci. Food. Agric.** (9): 181-184, 1958.
- FLINT, O. **Food Microscopy: a manual of practical methods, using optical microscopy.** Oxford, UK: Bios Scientific Publishers Limited, 1994, 125p.
- GALLÃO, M.I. **Alterações morfológicas e bioquímicas induzidas por hidrolisados de quitina em células de *Sccharum officinarum* L. e *Citrus aurantium* L. cultivadas em suspensão.** Campinas, 2000. p.111. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. UNICAMP.

- GILABERT ESCRIVÁ, M.V. **Comparação das propriedades reológicas da massa de cacau torrada convencionalmente e por microondas.** Campinas, 1997, p. Dissertação (Mestrado). Fac. Eng. Alim. UNICAMP.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fibre analysis. **Agri-handbook:** Agriculture Research Service, U.S. Dept. Agriculture, p.375, 1970.
- GRIMALDI, J. Les Possibilités D'amélioration des Techniques D'ecabossage et de Fermentation dans le Processus Artisanal de le Préparation du Cacao. **Café Cacao Thé.** (22): 3030-316.1978.
- GTA. GRUPO DE TRABALHO AMAZÔNICO. **Base de dados do cupuaçu.** Disponível na Internet: <http://www.gta.org.br/cupuacu2.htm>, 25.10.1999.
- HANSEN, C.E.;OLMO,M.;BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **J. Sci. Food Agric.** v.77, p.273-281, 1998.
- HARTMAN and LAGO. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.** London. v.22, n.8, p.475-476. Aug 1973.
- HARVER, G. Nutricional Aspects of Chocolate. **The Manufacturing Confectioner.** Fev,1999. p.60-63.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: DPE-DEAGRO.** Disponível na internet: <http://www.ibge.net/ibge/estatistica/indicadores/>, 28.03.2001.
- ICCO. INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Estimativa da produção mundial para o período de 1998/99.** Disponível na internet: <http://www.icco.org/>, 15/06/1999.

JINAP, S. Organic acids in cocoa beans – A review. **ASEAN Food Journal**. v.9, n.1, 1994.

JINAP, S.; DIMICK, P. Acidic Characteristics of fermented and dried cocoa from different countries of origin. Pennsylvania Agricultural Experiment Station. **J. Food Sci.** 55(2): 547-550, 1990.

JINAP, S.; THIEN, J.; YAP, T. N. Effect of Drying on Acidity and Volatile Fatty Acids Content of Cocoa Beans. **J. Sci. Food Agric.** v.65, p.67-75, 1994.

KIRCHHOFF, P. M.; BIEHL, B.; ZIEGELER-BERHAUSEN, H.; HAMMOOR, M.; LIEBERE, R. Kinetics of the formation of free amino acids in cocoa seeds during fermentation. **Food Chem.** v.34, p.161-179, 1989.

LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. São Paulo, 1982. 81p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

LERCETEAU, E.; ROGERS, J.; PÉTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. **J. Sci. Food Agric.** 79:619-625, 1999.

LEVANON, Y.; ROSSETINI, S. Processamento e microbiologia da fermentação de amêndoas de cacau. In: AQUARONE, E. **Tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo, EDUSP, 1975. v.2, p.174-187.

LOPES, A. S.; PEZOA GARCIA, N. H.; FARFÁN, J. A. Avaliação da qualidade protéica de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento. In: **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Fortaleza, agosto, 2000.

- LOPES, A.S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento.** Campinas, 2000. 112p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.
- LOPEZ, A.S. **The contribution of volatile compounds to the flavour of chocolate and their development during processing.** Trinidad, 1974. 172p. Thesis (Doctor of Philosophy in the faculty of agriculture) - Cacao Research Unit, The University of West Indies.
- LOPEZ, A.S. Fermentation and organoleptic quality of cacao as affected by partial removal of pulps juices from beans prior to curing. **Theobroma**. 9(1):25-37, 1979.
- LOPEZ, A.S & DIMICK, P.S. **Enzymes involved in cocoa curing.** In: edited by FOX, P.F. **Food Enzymology Ireland: Elsevier applied science**, 1991. Vol.2.chapter 25. 211-236.
- LOPEZ. A.S.; MacDONALD, C.R. Preliminary Test of a Simple and Inexpensive System for the Mechanical Aeration of Box-Type Cacao Fermentation. **Revista Theobroma**. 12(2):57-83, 1982.
- LOPEZ, A.S. & QUESNEL, V.C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavor. **J. Sci. Food Agric**. 24(3): 319-324, 1973.
- MACRAE, R.; ROBINSON, R.K. & SADLER, M.J. Cocoa. In: **Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition**. London: Academic Press, 1993. v.2, p.1073-1097.

- MARAVALHAS, N. Considerações sobre o beneficiamento do cacau na Bahia. **Cacau Atualidades**. 8(4):12-15, 1971.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo. Edgar Blucher - Funcamp. 1980.69p.
- MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa and confectionary: science and technology**. 3 ed. New York, Na AVI Book published by Van Nostrand Reinhold, 1989.940p.
- MÜLLER, C.H.; FIGUEIREDO, J.C.; NASCIMENTO, W.M.O.; GALVÃO, E.U.P.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A.B.; RODRIGUES, J.E.F.; CARVALHO, J.E.V.; NUNES, A.M.L.; AZARÉ, R.F.R.; BARBOSA, W.C. **A cultura do cupuaçu**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995.61p. (Embrapa-SPI. Coleção Plantar, 24).
- NAZARÉ, R.F.R. ; BARBOSA, W.C.; VIEGAS, R.M.F. **Processamento das Sementes de Cupuaçu para a Obtenção de Cupulate**. Belém: EMBRAPA-CPATU-Pará, 38p, 1990.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2 ed. Campinas -SP: Editora da UNICAMP, 1996.
- OLIVEIRA, M.L.S. **Contribuição ao aproveitamento industrial do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Fortaleza, 1981. 72p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
- PHILOCREON, N.C. Frutos Comestíveis do Brasil. **An. Farm. Quim.** São Paulo. 13(11/12):92-7, 1962.

- PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **J. Agric. Food. Chem.**, 25(6), 1268-1273, 1977.
- QUEIROZ, M.B. **Estudo dos parâmetros de torração de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**. Campinas, 1999, 109p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.
- REDGWELL, R.J.; HANSEN, C.E. Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. **Planta**. 210: 823-830, 2000.
- REEVES, S.G.; McDOWELL, I.; BEHN, K.; DENCH, J. Biochemical studies of cocoa bean o-diphenol O₂ oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chem.** v.29, n.3, p.209-219, 1988.
- REINECCIUS, G.A.; ANDERSEN, D.A.; KAVANAGH, T.E.; KEENEY, P.G. Identification and quantification of free sugars in cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.**, v.20, n.2, p.199-202, 1972.
- RIBEIRO, N.A. Hidrólise enzimática produzida por fungos isolados do cacau em fermentação. **Agrotrópica**. Ilhéus, 2(2): 75-80, 1990.
- RODRIGUES, D.M.; SANTANA, A.C. Aspectos da produção e da comercialização do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum) no estado do Pará. Seminário Internacional sobre Pimenta-do-Reino e Cupuaçu, 1; 1996, Belém, PA. **Anais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/IICA, 1997. 440p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).
- ROHAN, T.H. **El beneficio del cacao bruto destinado al mercado**. FAO: Estudio Agropecuários. 223p, 1964.

- ROHAN, T.A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: Changes in the free amino acids during the roasting of cocoa beans. **Journal of Food Science**, v.31, n.2, p.202-205, 1966.
- ROHAN, T.A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: Production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. **Journal of Food Science**, v.32, p.395-398, 1967a.
- ROHAN, T.A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: Production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. **Journal of Food Science**, v.32, p.399-402, 1967b.
- SAMAH, O.A.; IBRAHIM, N.; ALIMON, H.; KARIM, A. Comparative studies on fermentation products of cocoa beans. **World J. Microb. Biotech.** v.9, p.381-382, 1993.
- SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Aspectos Gerais: Cacaueiro**. Governo Estado da Bahia: Bahia, sd. Disponível na Internet: <http://www.bahia.ba.gov.br/seagri/cacau1.htm>, 25.10.1999.
- SEA. Secretaria do Estado da Agricultura. Zoneamento agroclimático do estado de Minas Gerais. **Cultura do Cacau**. Governo do Estado de Minas Gerais: Belo Horizonte, 1980. Disponível na internet: <http://www.agridata.mg.gov.br/>, 25.10.1999.
- SCHMIEDER, R.L.; KEENEY, P.G. Characterization and quantification of starch in cocoa beans and chocolate products. **Journal of Food Science**, 45: 555-557, 1980.

- SCHWAN, R.F.; LOPEZ, A.; SILVA, D.O.; VANETTI, M.C.D. Influência da frequência e intervalos de revolvimento sobre a fermentação do cacau e qualidade do chocolate. **AGROTÍPICA**. 2(1): 22-31, 1990.
- SCHWAN, R.F. Microbiology of cocoa fermentation: A study to improve quality. In: 12^o CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CACAU. Salvador, BA, novembro, 1996.
- SHEPERD, R. Large scale processing of cocoa beans temperature and acidity trends. **The Planter**. v.52, n.605, p.311-322, 1976.
- SISMOTTO, M.; JACKIX, M.N.H.; DOSUALDO, J.L. Determinação do perfil sensorial do cupulate. In: **III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas, 1999.
- SOUSA, M.V.; JACKIX, M.N.H.; BISPO, E.S. Alcalinização de "nibs" de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) para utilização em bebidas funcionais em pó. In: **III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas, 1999.
- SOUZA, A.G.C.S. **Recursos Genético e Melhoramento do Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd.Ex Spreng.) Schum)**. I Workshop sobre as culturas de cupuaçu e pupunha na Amazônia, 1996. Manaus, 1996. Anais: Embrapa - CPAA. Documento 6.
- URBANSKI, J.J. Chocolate flavor/origins and description. The effects of process and bean source. **The Manufacturing Confectioner**, november:69-82, 1992.

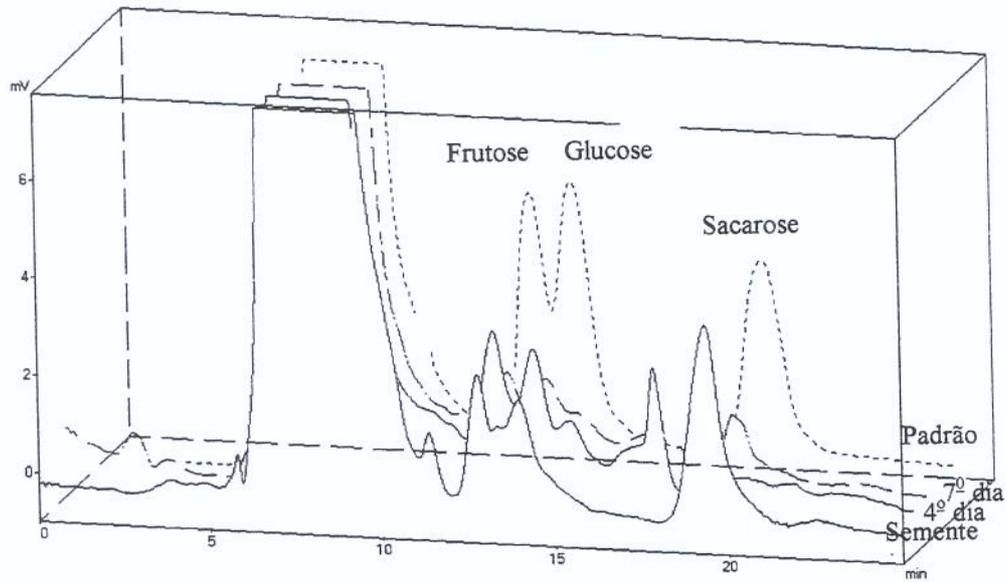
- VASCONCELOS, M.A.M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).** Campinas, 1999. 113p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.
- VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu: A espécie, sua cultura, usos e processamento.** Belém: Clube do Cupu. 1993, 103p.
- VENTURIERI, G.A. & AGUIAR, J.P. Composição do chocolate caseiro de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (WILD EX SPRENG) SCHUM). **ACTA AMAZÔNICA**, 18 (1/2): 3-8, 1988.
- VILLACHICA, H.; CARVALHO, J.E.U.; MULLER, C.H.; DIAZ, C.S.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia.** Lim: FAO/PNUD/ICRAF/PNUMA/PRAPICAIDACAF/IICA, PROCITRÓPICOS/ICCA -GT, 1996.367p.
- VILLENEUVE, F.; CROS, E.; MACHEIX, J.J. Effect de la fermentation sur les activités peroxidasiques et polyphénoloxydasiques de la fève de cacao. **Café, Cacao, Thé.** 29(2):113-20.1985.
- VILLENEUVE, F. Recherche de un indice de fermentation du cacao. **Café Cacao Thé.** 33(3): 166-169, 1989.
- VOIGT, J.; BIEHL, B.; WAZIR, S.K.S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry.** v.47.p.145-151, 1993.
- WOLLGAST, J. ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research Int.** 33:423-447, 2000.

ZAK, D.L.; KEENEY, P.G. Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied to several varieties of cocoa beans. **J. Agric. Food Chem.** v.24, n.3: 479-486, 1976.

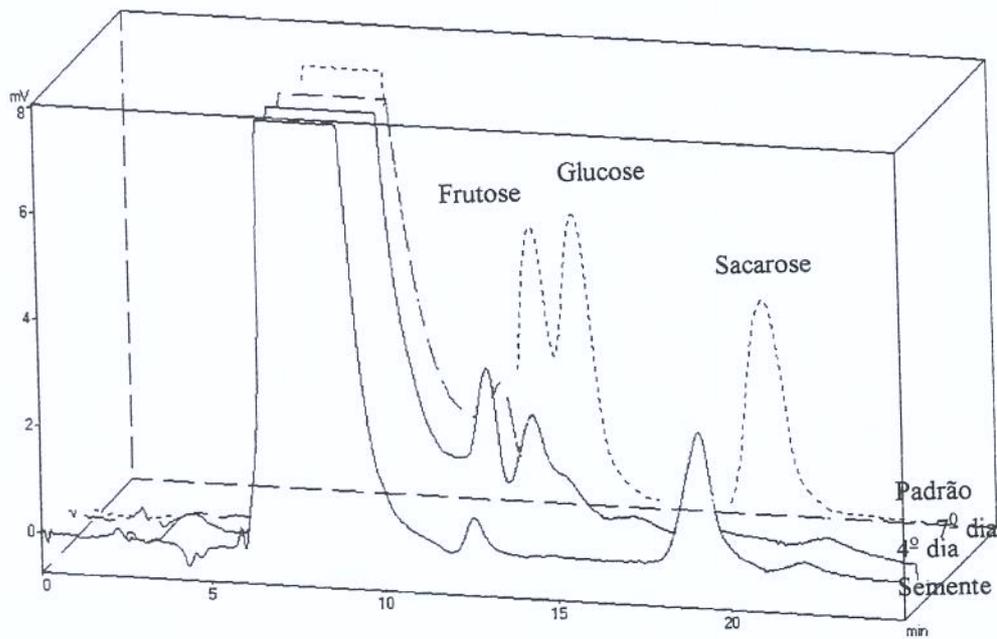
ZAMALLOA, W.A.C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no Estado de São Paulo.** Campinas, 1994, 111p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.

ANEXOS

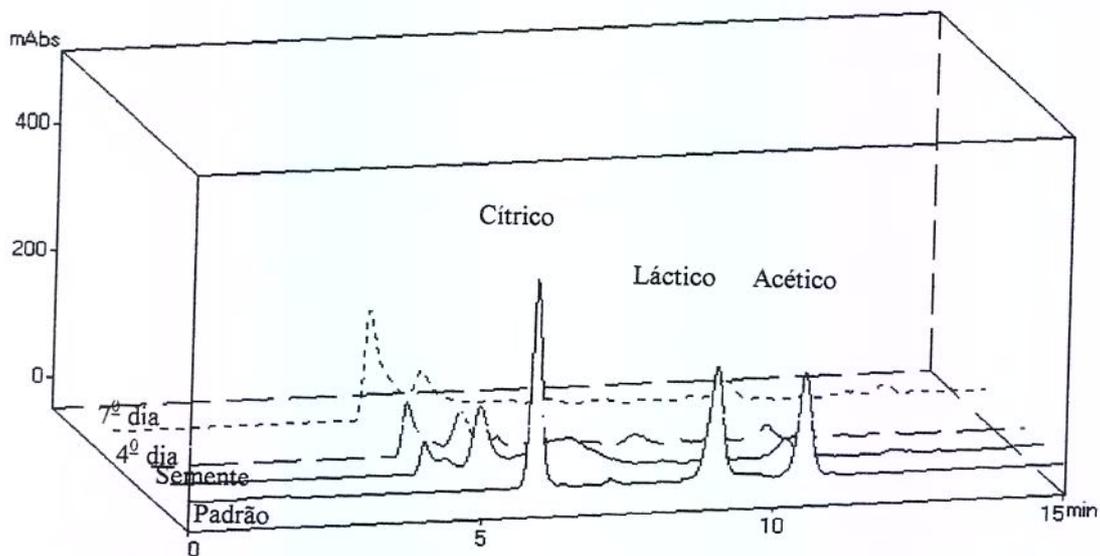
Anexo 1. Cromatogramas da análise de açúcares realizadas para os cotilédones de cacau.



Anexo 2. Cromatogramas da análise de açúcares realizadas para os cotilédones de cupuaçu.



Anexo 3. Cromatogramas da análise de ácidos orgânicos para os cotilédones de cacau.



Anexo 4. Cromatogramas da análise de ácidos orgânicos para os cotilédones de cupuaçu.

