

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

**EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA E FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS DE  
SEMENTE DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum)**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

**ANA VÂNIA CARVALHO**

Engenheira Agrônoma

**DR. NELSON HORACIO PEZOA GARCÍA**

Orientador

**CAMPINAS – SP**

**2004**

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García**

(Universidade Estadual de Campinas - orientador)

---

**Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán**

(Universidade Estadual de Campinas - membro)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Hilary Castle de Menezes**

(Universidade Estadual de Campinas- membro)

---

**Dr. Edy Sousa de Brito**

(Embrapa Agroindústria Tropical - membro)

---

**Dra. Maria Luzenira de Souza**

(Universidade Federal do Acre - membro)

---

**Dra. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix**

(Universidade Estadual de Campinas - membro)

---

**Dra. Denise C. P. Jardim**

(Instituto de Tecnologia de Alimentos - membro)



**Aos meus pais Ildeu e Celeste**

**Às minhas irmãs Claudine, Daniele e Taísa**

**Pelo amor e apoio em todas as etapas de minha vida**

**DEDICO!!!**



## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser presença e luz constante em minha vida.

`A FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. Nelson Horacio Pezoa García pela orientação e incentivo durante todo o trabalho.

Ao professor Dr. Jaime Amaya Farfán pelas valiosas sugestões e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões fornecidas na etapa final do projeto.

`A professora Dra. Flavia Maria Netto pelos ensinamentos e sugestões e `a técnica Eliana pela atenção e auxílio nas análises de eletroforese.

Ao Marcus pela ajuda e apoio durante toda a realização deste trabalho.

`A Joyce pela amizade, convivência e ajuda incansável na realização das análises.

`As técnicas e amigas de todas as horas, Aninha Koon e Priscila Ferraz, pelo carinho, convivência e ajuda constante.

Ao Aduino pela ajuda e amizade durante todo o trabalho em planta piloto.

Ao Adilson do CPQBA, pelo auxílio na densitometria dos géis.

`As amigas Dani De Grandi e Elisângela pelos almoços compartilhados tão agradáveis, pelas conversas, conselhos e todo o carinho.

`A Dani Marchese por ser uma grande amiga e companheira de todas as horas.

Aos meus amigos e colegas: Alessandro, Amanda, Fernanda, Priscila, Sílvia, Kathleen, Rafaela, Alessandra, Gabriela, Luzenira, Luciane, Patrícia, Rosane, Flávio, Paulo, Maria Fernanda, Gisele, Marinalda, Simone e Fábio, pelo agradável convívio e cooperação.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## ÍNDICE GERAL

RESUMO .....	xi
SUMMARY .....	xiii
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	5
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
1. ASPECTOS GERAIS .....	7
2. PRÉ-PROCESSAMENTO DO CUPUAÇU .....	10
2.1 Fermentação .....	10
2.2 Secagem .....	13
2.3 Torração .....	14
3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALOR NUTRICIONAL DO CUPUAÇU .....	15
4. CONCENTRADO E ISOLADO PROTÉICO .....	19
5. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS .....	21
5.1 Solubilidade .....	22
5.2 Capacidade de absorção e retenção de água .....	23
5.3 Propriedades espumantes .....	24
5.4 Capacidade de emulsificação .....	26
5.5 Capacidade de geleificação .....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CURVAS DE SOLUBILIDADE PROTÉICA DE SEMENTES <i>IN NATURA</i> , AMÊNDOAS FERMENTADAS E TORRADAS DE CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> Schum) .....	37
RESUMO .....	37
SUMMARY .....	37
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 Preparo das sementes <i>in natura</i> .....	39
2.2 Fermentação .....	40

2.3 Classificação das amêndoas fermentadas de cupuaçu (Teste de corte) .....	40
2.4 Torração das amêndoas .....	40
2.5 Análise sensorial .....	41
2.6 Caracterização física das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu .....	43
2.7 Caracterização físico-química das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu .....	43
2.7.1 pH .....	43
2.7.2 Acidez titulável total .....	44
2.7.3 Teor de umidade .....	44
2.7.4 Teor de proteína .....	44
2.7.5 Teor de lipídios .....	44
2.7.6 Teor de cinzas .....	44
2.7.7 Teor de fibras .....	44
2.8 Determinação das curvas de solubilidade das proteínas de cupuaçu .....	44
2.9 Análises estatísticas .....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
3.1 Classificação das amêndoas fermentadas de cupuaçu .....	45
3.2 Torração das amêndoas de cupuaçu .....	46
3.3 Análise sensorial .....	47
3.4 Caracterização física das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu .....	48
3.5 Caracterização físico-química das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, decorticadas e degerminadas .....	50
3.6 Curvas de solubilidade protéica .....	52
4. CONCLUSÕES .....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
CAPÍTULO 3. PROTEÍNAS DA SEMENTE DE CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> Schum) E ALTERAÇÕES DEVIDAS À FERMENTAÇÃO E TORREFAÇÃO .....	61
RESUMO .....	61

SUMMARY .....	62
1. INTRODUÇÃO .....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	65
2.1 Preparo das sementes <i>in natura</i> .....	65
2.2 Obtenção das amêndoas fermentadas e secas .....	65
2.3 Torração das amêndoas .....	65
2.4 Obtenção do material para análises .....	66
2.5 Obtenção das frações protéicas do cupuaçu .....	66
2.6 Determinação do teor de proteína nas sementes, amêndoas fermentadas, amêndoas torradas e nas frações protéicas .....	67
2.7 Perfil de aminoácidos da semente, amêndoa fermentada e amêndoa torrada .....	67
2.7.1 Composição em aminoácidos totais .....	67
2.7.2 Triptofano .....	67
2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	68
2.9 Eletroforese em sistema SDS-PAGE-tricina .....	68
2.10 Análises estatísticas .....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
3.1 Eletroforese das frações isoladas da semente de cupuaçu .....	69
3.2 Efeito da fermentação e torração no perfil de aminoácidos da semente de cupuaçu .....	72
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE e em gel de poliacrilamida - SDS-tricina, da semente, amêndoa fermentada e amêndoa fermentada e torrada .....	75
4. CONCLUSÕES .....	79
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
CAPÍTULO 4. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CONCENTRADO E ISOLADO PROTÉICO DE SEMENTES DE CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> Schum) .....	85
RESUMO .....	85
SUMMARY .....	86
1. INTRODUÇÃO .....	86
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	88

2.1 Matéria-prima .....	88
2.2 Obtenção do concentrado protéico de cupuaçu .....	89
2.3 Obtenção do isolado protéico de cupuaçu .....	91
2.4 Caracterização física da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu .....	93
2.4.1 Granulometria .....	93
2.4.2 Densidade aparente .....	93
2.5 Análise de cor da farinha, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu .....	93
2.6 Caracterização físico-química da farinha desengordurada de cupuaçu, do concentrado e do isolado protéico .....	94
2.7 Análise estatística .....	94
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	94
3.1 Caracterização física da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu .....	94
3.2 Análise de cor da farinha, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu .....	95
3.3 Caracterização físico-química da farinha desengordurada de cupuaçu, do concentrado e do isolado protéico .....	96
4. CONCLUSÕES .....	98
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
CAPÍTULO 5. OBTENÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS DE CONCENTRADO E ISOLADO PROTÉICO DE SEMENTES DE CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> Schum) .....	103
RESUMO .....	103
SUMMARY .....	104
1. INTRODUÇÃO .....	104
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	105
2.1 Matéria-prima .....	105
2.2 Obtenção do concentrado e isolado protéico .....	106
2.3 Teor de proteína .....	106

2.4 Propriedades funcionais .....	106
2.4.1 Solubilidade .....	106
2.4.2 Capacidade de retenção de água .....	107
2.4.3 Capacidade de retenção de óleo .....	107
2.4.4 Formação e estabilidade de espumas .....	108
2.4.5 Capacidade de geleificação .....	108
2.4.6 Capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão .....	109
2.5 Análise estatística .....	109
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	110
3.1 Obtenção do concentrado e isolado protéico .....	110
3.2 Propriedades funcionais .....	110
3.2.1 Solubilidade .....	110
3.2.2 Capacidade de retenção de água e óleo .....	113
3.2.3 Formação e estabilidade de espumas .....	116
3.2.4 Capacidade de geleificação .....	120
3.2.5 Capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão .....	120
4. CONCLUSÕES .....	122
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	123
CAPÍTULO 6. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE CONCENTRADO E ISOLADO PROTÉICO OBTIDOS A PARTIR DE SEMENTES DE CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> Schum) .....	129
RESUMO .....	129
SUMMARY .....	129
1. INTRODUÇÃO .....	130
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	131
2.1 Matéria-prima .....	131
2.2 Obtenção do concentrado e isolado protéico de semente de cupuaçu .....	132
2.3 Teor de proteína .....	132
2.4 Perfil de aminoácidos .....	132
2.4.1 Composição em aminoácidos totais .....	132
2.4.2 Triptofano .....	132

2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	133
2.6 Análises estatísticas .....	133
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	134
3.1 Perfil de aminoácidos .....	134
3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu .....	137
4. CONCLUSÕES .....	139
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140
CONCLUSÕES GERAIS .....	145
ANEXOS .....	147



## RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é uma fruta típica da região Norte do Brasil, com grande potencial econômico. Atualmente é a polpa que sustenta a produção, industrialização e comercialização desta fruta. A semente, um subproduto da industrialização da polpa, começa a despertar interesse como um produto de alto valor nutricional e com grande potencial de mercado para produtos industrializados. O presente estudo teve como objetivo a produção e caracterização de farinha, concentrado e isolado protéico da semente do cupuaçu, quanto a sua composição protéica e de aminoácidos e características químicas e funcionais. A farinha, obtida das sementes trituradas e desengorduradas, serviu como matéria-prima para a extração da fração protéica em meio aquoso, obtendo-se o concentrado protéico (precipitação em pH 3,5) e o isolado protéico (solubilização em pH 9 e precipitação em pH 3,5). A farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu foram submetidos à análise de composição centesimal, cor, aminoácidos, perfil eletroforético de suas proteínas e propriedades funcionais. O concentrado apresentou um teor protéico de 31,18% e o isolado de 64,33%. Quanto ao perfil eletroforético de suas proteínas, observou-se a presença de três principais bandas protéicas, com pesos moleculares variando de 20,03 a 39,79kDa além de três bandas fracas adicionais. As bandas mais fracas parecem ter sido seletivamente perdidas durante a extração alcalina para produção do isolado protéico, estando presentes apenas na farinha desengordurada e no concentrado protéico. Observou-se que a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu, apresentaram boa composição aminoacídica, com teores superiores aos recomendados para a grande maioria dos aminoácidos. Tanto a farinha como o concentrado apresentaram muito boa capacidade de retenção de água e de óleo. Observou-se também, boa capacidade emulsificante em pH 7,0, para a farinha, o concentrado e o isolado protéico, 987,50, 977,50 e 1380,00mL óleo/g produto, respectivamente. Assim, estes produtos apresentam potencial de utilização, não somente para enriquecer outros alimentos, mas também para melhorar certas propriedades funcionais.



## SUMMARY

Cupuacu (*Theobroma grandiflorum* Schum) is a native fruit from northern Brazil, with great economic potential. Its productive chain is currently sustained by the pulp market. The seed, treated as a by-product of the pulp industrialization, has recently come to public attention as a highly nutritive product with great market potential for industrialized products. The objective of the present study was the production and characterization of flour, protein concentrate and protein isolate obtained from the cupuacu seed, in terms of their chemical and functional properties and their protein and amino acid composition. The flour, obtained from ground and defatted seeds, was used to extract the protein fraction in an aqueous medium, obtaining the protein concentrate (precipitated at pH 3.5) and the protein isolate (solubilized at pH 9.0 and precipitated at pH 3.5). The defatted flour, the protein concentrate and the protein isolate were analyzed in terms of their chemical composition, color, amino acid contents, electrophoretic protein profile and functional properties. The concentrate presented a protein content of 31.18% and the isolate, 64.29%. The electrophoretic profile of their proteins indicated the presence of three main protein bands, with molecular weights ranging from 20.03 to 39.79 kDa, besides three additional weak bands. The weaker bands seem to have been selectively lost during alkaline extraction for production of the protein isolate, as they were detected only in the defatted flour and in the protein concentrate. The defatted flour, the protein concentrate and the protein isolate obtained from cupuacu presented a good amino acid composition, as the contents of most amino acids were higher than the daily recommended amounts. The flour and the concentrate presented both excellent water and oil retention capacity. Good emulsifying ability at pH 7.0 was also observed for all three products: 987.50 mL oil/g for the flour, 977.50 mL oil/g for the protein concentrate and 1380.00 mL oil/g for the protein isolate. So, these products presented good utilization potential, not only to enrich other foods, but also to enhance some functional properties.



## INTRODUÇÃO

O cupuaçu é uma das frutas mais populares da Amazônia, com grande potencial para industrialização, sendo que seu valor econômico está baseado atualmente na industrialização e comercialização da polpa. Apesar das sementes constituírem cerca de 20% do peso do fruto e apresentarem alto valor nutritivo, constituem-se em resíduo, sendo praticamente descartadas durante o beneficiamento do fruto.

Diversos estudos mostram que as sementes são compostas de uma gordura muito semelhante à manteiga de cacau, e que desenvolvem um fino e agradável aroma, similar ao do chocolate, quando fermentadas, secas e torradas (LUCCAS, 2001; MARCHESE, 2002). Por isso, acredita-se que elas sejam uma excelente matéria-prima na fabricação de produtos especiais tipo chocolate, coberturas e bebidas achocolatadas, etc., com vantagem sobre as gorduras de substituição existentes, por apresentarem, além de semelhanças composicionais à manteiga de cacau, características de sabor peculiares, as quais poderiam contribuir na obtenção de produtos achocolatados diferenciados e de alta qualidade.

O valor nutricional das proteínas da semente do cupuaçu não deve ser subestimado, mesmo considerando a possibilidade da redução deste valor em decorrência dos tratamentos de fermentação e/ou tratamentos térmicos aplicados no processamento das sementes. Assim, as etapas de fermentação e torração devem ser realizadas em condições que ocasionem o mínimo de perdas no sabor e valor nutricional do produto final.

Devido às sementes de cupuaçu conterem um teor de proteínas considerável, 9 a 12%, (QUEIROZ, 1999; VASCONCELOS, 1999; LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001), apresentam grande possibilidade de uso não somente para a produção de um produto análogo ao chocolate, mas principalmente como um alimento alternativo com boas qualidades nutricionais, principalmente quando se considera que a farinha desengordurada obtida destas sementes, que possuem cerca de 60% de lipídios, pode alcançar teores de proteína superiores a 26%. Lopes (2000), estudando amêndoas de cupuaçu e cacau, encontrou 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, principalmente, o consumidor infantil.

Durante as últimas três décadas, a indústria de alimentos tem dado especial atenção para a produção de alimentos usando concentrados e isolados de proteínas obtidos de vegetais. Eles podem ser usados adicionados às proteínas de origem animal, na preparação de produtos cárneos,

produtos de panificação, sopas, etc. Tal uso industrial requer grandes quantidades de concentrados e isolados protéicos que devem ser obtidos através de métodos simples e rápidos e devem apresentar propriedades funcionais que tornem seu uso tecnologicamente apropriado (OTEGUI *et al.*, 1997).

Embora pesquisas já tenham sido realizadas com o intuito de se determinar os teores médios de proteínas em sementes de cupuaçu, pouco se sabe em relação às frações protéicas, teores de aminoácidos, propriedades funcionais e modificações nesses atributos após a fermentação e/ou torração das sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento.** 2000. 112p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LUCCAS, W. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate.** 2001. 188p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MARCHESE, D. A. **Estudo do processo de obtenção do pó de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) alcalinizado.** 2002. 139p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).** 2001. 164p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

OTEGUI, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; DE DIEGO, A.; CID, C.; MACARULLA, M. T.; PARTEARROYO, M. A. Properties of spray-dried and freeze-dried faba bean protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 439-443, 1997.

QUEIROZ, M. B. **Estudo dos parâmetros de torração de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**. 1999. 104p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 114p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.



## OBJETIVOS GERAIS

- Caracterizar as sementes de cupuaçu, as amêndoas fermentadas e as amêndoas fermentadas e torradas, quanto a sua composição centesimal, frações protéicas e composição de aminoácidos, a fim de verificar possíveis perdas durante os processos de fermentação e torração;
- Desenvolver metodologia para a obtenção de concentrado e isolado protéico a partir de sementes de cupuaçu.
- Caracterizar o concentrado e o isolado protéico obtido de sementes de cupuaçu *in natura*, quanto a sua composição centesimal, frações protéicas, composição de aminoácidos e propriedades funcionais tecnológicas.



## CAPÍTULO 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1. Cupuaçu: aspectos gerais

O gênero *Theobroma* é o mais importante da família Sterculiaceae e pode ser encontrado em cerca de 22 espécies originárias da América Tropical. Na Amazônia brasileira são encontradas as espécies: *T. cacao*, *T. camargoanum*, *T. bicolor*, *T. grandiflorum*, *T. microcarpum*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. subcanum*, e *T. sylvestre*. Todas produzem frutos comestíveis e pelo menos das cinco primeiras espécies acima citadas, acredita-se poder fazer um produto similar ao chocolate (CALZAVARA *et al.*, 1984; VENTURIERI e AGUIAR, 1988). A maioria dessas espécies são ricas em gordura, proteína e amido, sendo que algumas delas apresentam de 1 a 3% de teobromina e a cafeína também pode estar presente em algumas dessas espécies (MONTEIRO, 1996).

O cacau (*Theobroma cacao* L.) constitui a espécie de maior valor comercial, sendo a base das indústrias de chocolate, seguido pelo cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), cuja polpa é consumida na forma de sucos, néctar, geléias, doces, cremes, tortas, sorvetes, balas, bombons, licores, polpa seca e granulada. Com as sementes é possível a fabricação de um produto semelhante ao cacau em pó, ao chocolate em tabletes meio-amargo, com leite e branco, todos com cor, aroma e sabor similares aos do chocolate, porém com características muito peculiares (QUEIROZ, 1999).

O cupuaçu é uma das mais importantes frutas tipicamente amazônicas, sendo o estado do Pará o principal produtor, seguido pelo Amazonas, Rondônia e Acre (RODRIGUES, 1996 *apud* LOPES, 2000).

O cupuaçuzeiro é uma árvore que atinge cerca de 20m de altura e 45cm de diâmetro de caule, no estado silvestre. Quando cultivada, a altura pode variar de 6 a 8m. Tem períodos de frutificação ocorrendo entre novembro e junho, atingindo o pico, geralmente, em fevereiro e março (VENTURUERI, 1993).

As condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do cupuaçuzeiro são bastante variáveis. Nas áreas de ocorrência natural a temperatura média varia entre 21,6 e 27,5°C e a umidade relativa entre 64 e 93%. As experiências com cultivos racionais indicam que a espécie

tem tido bom desempenho em regiões de clima subúmido ao superúmido, com chuvas anuais superiores a 1800mm, bem distribuídas e temperatura média anual superior a 22°C (VILLACHICA, 1996).

O fruto é do tipo drupáceo, de forma variada, extremidades arredondadas e peso situando-se entre 0,5 a 4,0Kg, sendo em média 1,5Kg. É constituído de casca (epicarpo mais mesocarpo), endocarpo (polpa que envolve as sementes) e sementes. O epicarpo é rígido, lenhoso e com epiderme de coloração verde a qual é recoberta por camada pulverulenta ferrugínea, que se desprende parcialmente com o manuseio. O endocarpo é carnoso, com aroma pronunciado e está fortemente aderido às sementes por fibras. (CALZAVARA *et al.*, 1984; VILLACHICA, 1996).

A Tabela 1 apresenta a composição físico-química aproximada da polpa de cupuaçu.

**Tabela 1** Composição físico-química aproximada da polpa de cupuaçu.

Determinação	Polpa de cupuaçu
pH	3,2 – 3,6
Acidez titulável (%)	2,0 – 2,15
Umidade (%)	84,9 – 89,0
Açúcares redutores (%)	2,8 – 3,0
Açúcares não-redutores (%)	4,0 – 5,8
Amido (%)	0,96
Gordura (%)	0,48 – 2,35
Proteína (%)	0,53 – 1,92

Fonte: Chaar, 1980; Oliveira, 1981.

As sementes possuem tamanho bastante variável, com o maior diâmetro de 2 a 3,5cm e o menor de 0,7 a 1,5cm. A sua forma varia de ovalada ou levemente elíptica, achatada ou não. O número de sementes aumenta de acordo com o tamanho do fruto. Em média são encontradas 36 sementes por fruto, mas os maiores chegam a ter 51 sementes. Estas quando cortadas apresentam um cotilédone sem pigmentação, com cor branca (VENTURIERI, 1993; VILLACHICA, 1996).

O cupuaçu é classificado em grupos, em função de suas características morfológicas (CALZAVARA *et al.*, 1984):

- Cupuaçu redondo: frutos de extremos arredondados com peso de 1,5Kg, casca com 6 a 7mm de espessura, sementes médias, é a variedade mais comum na Amazônia;
- Cupuaçu casca fina: semelhante ao redondo, porém com casca de 4 a 5mm de espessura, formato cilíndrico levemente anguloso nas laterais;
- Cupuaçu mamorana: frutos com casca grossa (7 a 9mm), chegando a pesar até 4Kg, extremidades alongadas, sementes grandes;
- Cupuaçu de colares: apresentam casca com 6 a 7mm de espessura, sem angulações nas laterais, largo na parte próxima ao pedúnculo e estreito na posterior, peso médio levemente superior ao cupuaçu redondo;
- Cupuaçu mamau: formato semelhante ao do cupuaçu redondo, apresentam casca de 6 a 7mm, peso médio de 1,5Kg, porém sem sementes.

A colheita é feita normalmente recolhendo-se os frutos maduros que caem espontaneamente. Após a colheita podem permanecer em torno de uma semana em condições satisfatórias para o consumo ou beneficiamento. Por ser um fruto não climatérico, recomenda-se que a maturação do cupuaçu se complete na planta, pois, uma vez colhido, o fruto geralmente não completa sua maturação e não desenvolve sabor e aroma característicos, tornando-se assim inaproveitável (VASCONCELOS, 1999).

O rendimento dos frutos varia de acordo com o tamanho, a procedência, o período de safra e o método de extração. Os frutos pesam em média 1,275Kg, com 43% de casca, 38,5% de polpa, 17,19% de semente e 2,85% de placenta (VENTURIERI, 1993).

O aproveitamento do fruto inicia-se com a quebra manual da casca. Em seguida faz-se o despolpamento que pode ser realizado manualmente, com o auxílio de tesouras, ou mecanicamente. O despolpamento mecânico deixa a polpa uniforme e menos viscosa e é usado por produtores, revendedores ou indústrias de maior porte (CHAAR, 1980).

A polpa do cupuaçu, obtida por despolpa manual ou mecânica, geralmente é acondicionada em sacos plásticos de 1 a 2Kg e, em seguida, é congelada até sua comercialização ou utilização (ARAGÃO, 1992).

Em estudo químico da amêndoa, realizado por Coutinho (1969), constatou-se a presença de um glicerídeo com características semelhantes ao da manteiga de cacau. Apesar de possuir uma gordura muito semelhante à da manteiga de cacau, as sementes de cupuaçu não têm seu valor reconhecido, sendo na maioria das vezes usadas como adubo ou simplesmente encaradas como resíduos (VENTURIERI e AGUIAR, 1988).

Além da semelhança entre o cacau e o cupuaçu, com relação à composição qualitativa dos ácidos graxos livres da gordura de suas sementes, apresentam também semelhanças com relação à composição química dos cotilédones (QUEIROZ, 1999). O mesmo autor aborda que, embora as sementes constituam uma fração significativa do fruto e apresentem alto valor nutritivo, não têm sido muito aproveitadas com fins mais nobres. No entanto, alguns estudos estão surgindo para o aproveitamento das sementes na produção de análogos do chocolate, e pela semelhança botânica e composicional, esses baseiam-se nos métodos utilizados para o cacau .

## **2. Pré-processamento das sementes de cupuaçu**

O processo de aproveitamento das sementes de cupuaçu, para a produção de um produto análogo ao chocolate, conhecido popularmente na região Amazônica como “cupulate”, envolve as etapas de fermentação, secagem, torração, quebra, decorticação e moagem (NAZARÉ; BARBOSA e VIÉGAS, 1990).

### **2.1 Fermentação**

A maioria dos trabalhos relacionados à fermentação se refere a sementes de cacau, sendo que apenas recentemente iniciaram-se os trabalhos com sementes de cupuaçu. De modo geral, a fermentação das sementes de cacau e cupuaçu seguem os mesmos procedimentos, sendo ela uma etapa essencial do processamento, sem a qual não se desenvolvem os precursores do sabor de chocolate ou seu análogo de cupuaçu. Nesta etapa a polpa e as sementes já retiradas do fruto sofrem a ação de microrganismos do meio ambiente. O alto conteúdo de açúcares da polpa fresca que recobre as sementes, seu baixo valor de pH e seu baixo teor de oxigênio constituem um excelente meio para o desenvolvimento de leveduras (SORIA, 1999).

Existem três principais métodos de fermentação do cacau, usados em várias partes do mundo: em montes, em caixas de madeira e em bandejas (CHARR, 1980). De modo geral, o tipo de fermentação predominante no Brasil é o que utiliza caixas de madeira com drenos na sua base.

No primeiro dia de fermentação do cacau as leveduras iniciam a conversão anaeróbica dos açúcares da polpa em etanol, caracterizando a primeira grande atividade microbiológica da fermentação, a fermentação alcoólica, que pode ser facilmente detectada pelo aroma de etanol (MINIFIE, 1989).

Após a fermentação alcoólica, rapidamente inicia-se a fermentação láctica e acética. O substrato etanol habilita as bactérias acéticas a transformarem-no em ácido acético e água, na presença de oxigênio. Esta reação é exotérmica causando a elevação da temperatura para 45 a 48°C, podendo atingir até 50°C (CHARR, 1980). Além de induzir a acidez e a alta temperatura da massa, as bactérias acéticas são responsáveis pela difusão e hidrólise das proteínas do cotilédone, dando origem aos aminoácidos livres, importantes precursores do aroma característico de chocolate (FORSYTH e QUESNEL, 1957).

Os ácidos acético, láctico e outros presentes, difundem-se através da testa para o interior da semente e em conjunto com o aumento de temperatura (45-50°C) e com a difusão anterior do etanol, provocam a morte do gérmen, ou seja, eliminam o poder de germinação da semente (CHARR, 1980). A partir deste momento, as sementes passam a ser chamadas de amêndoas.

Durante a fermentação ocorre difusão do conteúdo celular, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor da semente. Esta fase tem como característica fundamental a redução da adstringência e amargor, devido à oxidação de polifenóis que formam complexos com proteínas e peptídeos. As proteínas tornam-se insolúveis devido à formação de complexos proteínas-polifenóis, imediatamente após a morte da semente (FORSYTH e QUESNEL, 1957).

A duração da fermentação deve ser de cinco a sete dias. Menos de cinco e mais de sete dias não são recomendáveis (MARAVALHAS, 1971).

Aragão (1992) estudou as mudanças físicas e químicas da semente de cupuaçu durante o processo fermentativo. As sementes foram fermentadas em caixas de madeira com dimensões de 40x40x60cm e com aberturas de 0,5cm de largura em seu fundo, sendo realizados revolvimentos a cada 24 horas. Mudanças na coloração interna e externa da testa e cotilédones, perda da rigidez dos cotilédones e redução do resíduo de polpa foram as principais alterações visíveis durante a

fermentação. Segundo o autor, a fermentação foi efetiva uma vez que, após o processamento, foi obtido um produto com características similares ao cacau.

Em trabalho realizado por Vasconcelos (1999), as sementes do cupuaçu com uma pequena quantidade de polpa (4 - 5%), foram colocadas em caixas de fermentação T-60, em madeira com dimensões de 190x120x60cm de altura, e capacidade para 153kg de sementes, a qual possuía três compartimentos distintos. O material foi colocado no primeiro compartimento da caixa, sendo adicionado de folhas de bananeira e coberto com as mesmas folhas para ajudar na retenção do calor gerado durante a fermentação, permanecendo aí por 48 horas. Após este período, as sementes foram revolvidas e transferidas para outro compartimento da caixa de fermentação, permanecendo neste por mais 48 horas. As sementes foram finalmente removidas para o último compartimento da caixa, ficando em fermentação por mais 72 horas. O processo total de fermentação durou 7 dias. A maior temperatura na massa de sementes foi de 48°C, sendo observada 72 horas após o início do processo. As temperaturas sofreram, então, uma suave redução e mantiveram-se constantes e estabilizadas entre 43 e 45°C até o final do processo. Quanto ao pH, os resultados obtidos neste trabalho, situaram-se na faixa de 4,39 a 6,30, considerada ideal para o cacau, sendo que os menores valores foram alcançados ao final do processo fermentativo. Após o estudo das transformações físicas e químicas durante a fermentação das amêndoas, o autor concluiu que esta metodologia mostrou-se adequada para a obtenção de um produto a partir de sementes de cupuaçu, com características similares a um produto obtido de sementes de cacau.

## 2.2 Secagem

Após o processo fermentativo, as amêndoas de cacau ou cupuaçu livres da polpa são submetidas à secagem. Durante esta etapa, o material deve ser submetido a constantes revolvimentos, com o objetivo de incorporação de oxigênio. A secagem estabiliza a atividade microbiológica nas amêndoas e previne o crescimento de mofos. Além disso, é muito importante para completarem-se as reações enzimáticas e químicas, que ocorrem dentro da semente durante a fase de fermentação das amêndoas (VASCONCELOS, 1999).

O processo de secagem pode ser realizado através de duas técnicas básicas: a secagem natural e a secagem artificial. No primeiro caso, as amêndoas são espalhadas em camadas finas, em uma plataforma de secagem e revolvidas freqüentemente com o objetivo de proporcionar a remoção uniforme de umidade. Na secagem artificial utilizam-se secadores, tendo como fonte de calor a queima de lenha, gás, diesel e, mais recentemente, a energia solar. A secagem artificial, realizada utilizando-se temperatura de cerca de 40°C, é uma alternativa em épocas de chuva ou quando o espaço disponível em barcaças não é suficiente para atender o volume da produção (LAJUS, 1982).

O retardamento ou má condução da secagem acarretará no risco de desenvolvimento de fungos. A contaminação com esses microrganismos conduz a um sabor desagradável no produto final (ZAMALLOA, 1994).

A secagem deve ser conduzida de tal maneira a se obter um teor de umidade em torno de 6 a 7%. Uma secagem excessiva torna a casca quebradiça, enquanto que excesso de umidade facilita o desenvolvimento de mofo (MARAVALHAS, 1971).

Um sabor final agradável do cacau ou cupuaçu está relacionado com a realização de uma fermentação adequada, mas, se a secagem for mal conduzida, poderá ocorrer aparecimento de bolores que também originam sabores indesejáveis. Essa situação negativa poderá ser evitada se as operações de fermentação e secagem forem conduzidas corretamente (MINIFIE, 1989).

## 2.3 Torração

A torração é um tratamento térmico em que as amêndoas são submetidas a uma temperatura do equipamento de aproximadamente 150°C, durante um tempo estabelecido de acordo com a origem, tipo de amêndoa, os períodos de colheita, os tratamentos anteriores à torração, a umidade e as características de sabor desejadas (BAUERMEISTER, 1981, *apud* PEZOA-GARCÍA, 1989), lembrando que a temperatura dos cotilédones não deve ultrapassar os 120°C.

Para que sejam submetidas à torração, as amêndoas devem passar por um processo de limpeza, com a finalidade de separá-las de materiais estranhos, através da utilização de peneiras, corrente de ar e separadores magnéticos (PEZOA-GARCÍA, 1989).

De acordo com Queiroz (1999), esta operação térmica caracteriza-se pelos seguintes fenômenos:

- Desenvolvimento do aroma típico de chocolate, principalmente pela reação de Maillard, a partir dos precursores formados durante a fermentação, como os açúcares redutores e os aminoácidos livres;
- Desenvolvimento da cor típica do chocolate;
- Diminuição dos teores dos ácidos voláteis, como o ácido acético;
- Inativação das enzimas capazes de degradar a manteiga de cacau;
- Redução do teor de água das amêndoas, de cerca de 8% para 2% aproximadamente;
- Mudança da textura dos cotilédones (mais quebradiça).

A torração pode ser feita nas amêndoas inteiras, nos *nibs* ou na massa de cacau ou cupuaçu, sendo que a transferência de calor nas amêndoas quebradas em *nibs* ocorre de maneira mais uniforme que nas amêndoas inteiras, podendo melhorar o desenvolvimento de sabor, aroma e cor (STAUFFER, 1994).

Segundo Queiroz (1999), a torração em forno elétrico rotativo escala piloto, para as amêndoas de cupuaçu inteiras, mais indicada nas condições do seu estudo foi de 42 minutos a uma temperatura de 150°C na camisa do torrador, observando-se nestas condições um bom sabor. Já em estudo realizado por Lopes (2000), a torração foi realizada em torrador elétrico rotativo a 150°C por 40, 45, 50 e 55 minutos, e, de acordo com a análise sensorial, no tempo de 55 minutos observou-se a maior média para o atributo sabor global.

Soria (1999) relata que, para o cacau, o tempo mais adequado de torração foi de 38 minutos a 150°C, pois nessas condições desenvolveu-se o melhor sabor no cacau e a perda do valor nutricional da proteína de cacau torrado durante 30 a 38 minutos não foi estatisticamente significativa em relação ao produto não torrado. Segundo o autor, a maioria dos aminoácidos provenientes de cacau torrado até os 38 minutos, sofreu perdas pequenas na sua concentração, excetuando-se a lisina, a valina e a treonina, as quais tiveram perdas acentuadas já a partir dos primeiros 30 minutos de torração.

### 3. Composição química e valor nutricional do cupuaçu

O valor nutricional dos alimentos está relacionado com a quantidade e tipo das suas proteínas, carboidratos, gorduras, minerais, vitaminas, alcalóides, taninos e outros constituintes importantes (SORIA, 1999).

As sementes do cupuaçu são muito ricas em gordura (cerca de 60% do peso seco), com uma digestibilidade de 91,1% em humanos (CORRÊA, 1926/1969 *apud* VENTURIERI, 1993). Esta gordura, apesar de possuir constantes físico-químicas similares a da gordura de cacau, não possui o mesmo comportamento durante a sua fusão, devido às diferenças encontradas na proporção de ácidos graxos (Tabela 2).

**Tabela 2** Composição em ácidos graxos de sementes de cupuaçu e cacau.

Ácidos Graxos	Cupuaçu (%)	Cacau (%)
Palmítico (C16:0)	5,8	32,8
Esteárico (C18:0)	38,3	35,5
Oléico (C18:1)	42,8	29,6
Araquídico (C20:0)	4,8	1,0
Linoléico (C18:2)	8,3	1,1

Fonte: Venturieri e Aguiar (1988).

Berbet (1981) *apud* VENTURIERI (1993), comparando a gordura de cupuaçu com a de cacau, determinou que a primeira é bem mais macia. Esta característica coloca a gordura de cupuaçu com potencial para ser usada na indústria de margarinas e de cosméticos.

Além da semelhança entre o cacau e o cupuaçu, com relação à composição qualitativa dos ácidos graxos livres da gordura de suas sementes, apresentam também semelhanças com relação à composição química dos cotilédones (Tabela 3).

**Tabela 3** Composição centesimal de amêndoas de cupuaçu em base úmida.

Compostos	Autores	
	Philocreon (1962) (%)	Queiroz (1999) (%)
Umidade	8,38	5,3
Proteínas	11,87	7,81
Gordura	57,73	61,50
Fibras	1,94	5,56
Cinzas	4,00	2,30
Carboidratos	24,25	23,09

Fonte: Philocreon (1962); Queiroz (1999).

Hammerstone *et al.* (1994), estudando os alcalóides no gênero *Theobroma*, não detectou teobromina e cafeína em cupuaçu, somente conseguindo detectar um composto denominado tetrametilúrico.

Segundo Vasconcelos *et al.* (1975) *apud* Venturieri (1993); Schultes (1978) e Baumann e Wanner (1980); analisando a semente do cupuaçu, encontraram o ácido 1,3,7,9-tetrametilúrico, sugerido por estes autores como precursor da cafeína, não detectando outros compostos.

Em relação às proteínas, seu valor nutricional como formadoras dos tecidos do corpo é bem conhecido, contudo o valor calórico da proteína assume realmente uma importância secundária, sendo mais importante a quantidade e o tipo de aminoácidos presentes nas proteínas (RUSSEL, 1972).

As substâncias nitrogenadas do cacau e do cupuaçu são constituídas em boa parte por proteínas, as quais, sob o efeito da torração, têm a sua digestibilidade incrementada. Na digestão artificial de cacau, cerca de 19 a 23% das substâncias nitrogenadas das sementes cruas são dissolvidas, ao passo que, depois da torração, este teor sobe para até 39-40%. Esta situação é modificada não somente pela divisão das partículas do cacau, na obtenção do cacau em pó e do chocolate, mas também pelo tratamento das partículas com substâncias alcalinas. Após esses

processos, a digestibilidade pode atingir até 80% das substâncias nitrogenadas (DUARTE e NUÑEZ, 1980 *apud* VASCONCELOS, 1999).

Num estudo das frações protéicas do cacau antes e após a torração, Barel *et al.* (1983) estudaram métodos de fermentação de cacau em diferentes tempos (até 6 dias) e cacaos não fermentados, submetidos à torração, à temperatura de 140°C por uma hora. As frações protéicas dos lotes de cacau torrado foram avaliadas e comparadas com aquelas obtidas antes da torração. Segundo os autores, entre o segundo e o quinto dia de fermentação, a quantidade de proteínas das amêndoas decresceu regularmente. Os autores sugeriram que esta diminuição poderia ser explicada pela formação de complexos insolúveis das proteínas com polifenóis do cacau e pela ocorrência de reações de hidrólise, liberando aminoácidos e peptídeos durante esses dias da fermentação. A torração degradou a quase totalidade das proteínas do cacau de todos os lotes, após 60 minutos de torração. Esta degradação foi atribuída a três tipos de reações:

- a) Desnaturação protéica: a princípio, a desnaturação não afeta a seqüência de aminoácidos das proteínas, porém certos autores admitem a liberação de peptídeos;
- b) Reação de Maillard: Zak (1988) afirma que os aminoácidos participam das reações de Maillard;
- c) Formação de complexos com os polifenóis: as reações de oxidação dos polifenóis durante a torração dão origem a quinonas, as quais interagem com as proteínas, formando complexos insolúveis.

Como relatado por Osborne (1924), as proteínas podem ser classificadas, quanto à solubilidade, em 4 classes principais: albumina (solúvel em água e em soluções salinas diluídas), globulina (solúvel em soluções diluídas de sais), prolamina (solúvel em soluções alcoólicas a 70-80%) e glutelina (solúvel em solução ácida ou alcalina muito diluída).

Segundo Voigt e Biehl (1993), a albumina é a fração protéica predominante em cacau (52% do total da proteína da semente), com peso molecular aparente de 19kDa. Quantidades consideráveis de globulina (47, 31 e 14,5kDa) também foram encontradas (43% do total da proteína da semente), as quais são parcialmente perdidas após a fermentação. Esta perda é

aparentemente devida a uma digestão proteolítica seletiva durante a fermentação. Porém não foi detectada pelos autores, a fração prolamina e nem confirmada a existência de glutelina em sementes de cacau.

Ao contrário das sementes de outras plantas, na semente de cacau a fração globulina contém somente globulina do tipo vicilina, não apresentando o tipo legumina (VOIGT e BIEHL, 1993).

Em trabalho realizado com cacau por Lerceteau *et al.* (1999), os autores observaram que a degradação de proteínas foi detectada após 2 dias de fermentação e foi mais pronunciada durante o terceiro dia. A partir do terceiro dia até o final da fermentação, muito pouca degradação da proteína foi observada, possivelmente devido ao surgimento de compostos polifenólicos e sua subsequente complexação com as proteínas remanescentes. O teor de proteína total estimado pelo método de Kjeldahl diminuiu para 57% do valor inicial, durante o período de fermentação. O processo de degradação é seletivo, com alguns polipeptídeos resistindo mais do que outros, podendo três categorias serem identificadas. A primeira categoria é representada pelos peptídeos que resistem à degradação ou onde a degradação é pequena (16,5 e 21kDa), mantendo-se praticamente constantes durante os primeiros sete dias da fermentação. A segunda categoria representa os peptídeos que estão ausentes no final da fermentação. A proteólise é normalmente breve e ocorre entre o primeiro e o terceiro dia da fermentação, incluindo as subunidades de 47, 31 e 14,5kDa. A terceira categoria é representada pelos polipeptídeos em que um aumento na concentração pode ser notada (17 e 11kDa).

O aumento da concentração de aminoácidos livres durante a fermentação é rápido, pois a quebra das proteínas ocorre a uma velocidade maior do que a difusão dos produtos para o meio externo, atingindo o valor máximo em 4 dias, após o que, pode ou não ocorrer decréscimo, permanecendo sem grandes alterações após esse período que coincide com a morte da semente e com a diminuição da atividade proteolítica. As proteínas totais extraíveis decrescem linearmente ao longo da fermentação. A diminuição do teor de proteína durante a fermentação é atribuída em menor parte à proteólise e à difusão através do tegumento e em maior parte a insolubilização das proteínas causada por reações de oxidação e de complexação com polifenóis. Proporcionalmente, as proteínas isoladas mostraram um aumento da fração albumina, presente em maior quantidade, com decréscimo das globulinas, prolamina e glutelinas. Apesar dessas intensas modificações, deve-se salientar que o teor de aminoácidos totais permanece praticamente inalterado durante a fermentação (BRITO, 2000).

#### 4. Concentrado e isolado protéico

A indústria de alimentos tem dado, nos últimos tempos, grande importância para a produção de alimentos cujos ingredientes contenham concentrados ou isolados protéicos obtidos de vegetais. Eles podem ser adicionados às proteínas de origem animal, na preparação de produtos cárneos, produtos de panificação, sopas, etc. Tal uso industrial requer grandes quantidades de concentrados e isolados de proteínas os quais devem ser obtidos através de métodos simples e rápidos, além de apresentarem propriedades funcionais que tornem seu uso tecnologicamente apropriado (OTEGUI *et al.*, 1997). Assim, tais produtos podem ser usados não só como um suplemento nutricional, através do fornecimento de aminoácidos essenciais, mas também como um ingrediente com propriedades funcionais desejáveis, como capacidade de emulsificação, capacidade de formação de espuma, solubilidade, etc., das quais depende o sucesso de sua incorporação em alimentos na suplementação ou substituição de proteínas tradicionais (CHAU, CHEUNG e WONG, 1997; KHALIL, 2001).

Várias preparações de sementes de vegetais são grandemente usadas como ingredientes na indústria de alimentos. A soja tem sido o principal material usado para produção industrial de concentrados e isolados de proteínas, devido, principalmente, a seu alto teor de proteínas e bom desenvolvimento tecnológico da cultura. Porém, durante os últimos anos, outras sementes têm sido introduzidas com grande potencial para produção de isolados protéicos (TOMOSKOZI *et al.*, 2001).

O concentrado protéico de soja é definido como o produto preparado a partir de grãos de alta qualidade, limpos e descascados, dos quais é removido o óleo e os componentes não protéicos solúveis em água, obtendo-se um elevado teor de proteína, que no caso do concentrado protéico de soja, deve apresentar um teor mínimo de 70%. O processo de obtenção baseia-se na precipitação da maior quantidade das proteínas e solubilização dos carboidratos, sais minerais e outros componentes solúveis contidos na farinha (SMITH e CIRCLE, 1972).

Na obtenção de isolado protéico de soja, primeiramente é efetuada uma extração em meio aquoso alcalino em determinadas condições de tempo, temperatura, tamanho de partículas, relação sólido-líquido, pH e agitação. A seguir o extrato aquoso alcalino é separado do resíduo insolúvel por filtração, centrifugação ou uma combinação de ambos. Posteriormente é efetuada a precipitação ácida a pH entre 4 e 5 no qual a solubilidade das

proteínas, principalmente globulinas, é mínima. O coágulo protéico é separado por centrifugação ou filtração e lavado com água acidificada a pH 4 – 5, sendo em seguida submetido à secagem. No caso de isolado protéico da soja, o produto deve conter no mínimo 90% de proteína na base seca (SMITH e CIRCLE, 1972; PEZOA-GARCÍA, 1985).

O pI para a soja encontra-se em pH 4,5, o que é observado também para outras espécies vegetais como ervilha, algodão, etc. (SMITH e CIRCLE, 1972; BÉROT, DESHAYES e GUEGUEN, 1995; TOMOSKOZI *et al.*, 2001).

Em trabalho realizado com castanha do Pará, Glória e Regitano d'Arce (2000) relatam um ponto isoelétrico em torno do pH 3. Concluem ainda que é possível a obtenção de concentrado e isolado protéico a partir de torta de castanha do Pará desengordurada, com 59,3% e 81,6% de proteína em base seca, respectivamente.

Chau, Cheung e Wong (1997), estudando concentrados protéicos obtidos de três espécies de leguminosas, *Phaseolus angularis*, *Phaseolus calcaratus* e *Dolichos lablab*, concluíram que para as duas primeiras espécies citadas, a mínima solubilidade de nitrogênio observada foi em pH 4. Já para a *Dolichos lablab*, o pI encontra-se ao redor do pH 5. Os concentrados protéicos apresentaram teores de proteínas de 79,6%, 78% e 85%, para as espécies *Phaseolus angularis*, *Phaseolus calcaratus* e *Dolichos lablab*, respectivamente.

Em estudo realizado com isolado protéico obtido de sementes de algaroba, Silva *et al.*, (1997) observaram a menor solubilidade protéica em pH igual a 5, sendo portanto, este o pH utilizado para a precipitação das proteínas. Após o processamento, obteve-se um isolado com 94,3% de proteína em base seca.

Bagnis (1984), estudando a obtenção de isolado protéico de sementes de girassol, observou, através da curva de solubilidade protéica, que a farinha de girassol apresentou uma solubilidade mínima em uma ampla faixa de pH (3,0 – 6,5), aumentando apreciavelmente a sua solubilidade em pH acima de 8. O teor de proteína no isolado protéico obtido foi em média 96,6%.

## 5. Propriedades Funcionais das Proteínas

Propriedade funcional é uma propriedade físico-química que pode ser afetada pelo processamento e o comportamento de proteínas em um sistema alimentar, julgada pelos atributos de qualidade do produto final. As propriedades funcionais são as várias características que a proteína hidratada propicia ou com a qual contribui em um produto alimentício possibilitando: solubilidade, hidrofobicidade, capacidade de absorção e retenção de água e óleo, viscosidade, capacidade emulsificante, e formação de géis e espumas (CÂNDIDO, 1998).

A funcionalidade de uma proteína reflete as complexas interações entre a composição de aminoácidos, a conformação estrutural e propriedades da proteína em si, bem como sua interação com outros componentes alimentares e com a natureza do meio no qual ela está inserida (KILARA e SHARKASI, 1986).

Diversos fatores como concentração protéica, pH, temperatura, tempo, força iônica e presença de outros componentes, afetam as forças que intervêm entre as interações proteína-proteína e proteína-água. A maioria das propriedades funcionais é determinada pelo equilíbrio entre essas forças (DUARTE, 1997).

As propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas em três grupos principais (CÂNDIDO, 1998):

- a) Propriedades de hidratação (dependentes das interações proteína-água): absorção e retenção de água, suculência, adesividade, dispersibilidade, solubilidade e viscosidade;
- b) Propriedades dependentes da interação proteína-proteína: precipitação, geleificação, associação, agregação, coesão e adesividade;
- c) propriedades de superfície (interfacial): hidrofobicidade, tensão superficial, emulsificação e capacidade de formação de espuma.

As propriedades funcionais dos alimentos não dependem somente das proteínas, mas também de outros componentes que entrem em sua composição. Daí a dificuldade em se medir a contribuição exata das proteínas de um alimento em relação a determinadas propriedades funcionais. Normalmente a medida de uma propriedade funcional em uma proteína purificada ou isolado protéico não representa a mesma contribuição desta proteína para a propriedade funcional em questão, quando medida no próprio alimento (SGARBIERI, 1996).

O mesmo autor enfoca que os métodos para a medida de várias propriedades funcionais são ainda muito empíricos, não existindo uma padronização dos procedimentos, o que dificulta

muito a comparação de dados obtidos pelos inúmeros pesquisadores que se dedicam ao estudo dessas propriedades.

## **5.1 Solubilidade**

A solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas, também classificada como uma propriedade funcional, pela importância que essa propriedade exerce sobre a funcionalidade das proteínas nos alimentos (SGARBIERI, 1996).

Muitas das propriedades funcionais das proteínas, incluindo a habilidade de formar géis, estabilizar emulsões e espumas, dependem de sua solubilidade. A solubilidade da proteína em um sistema de multicomponentes é de grande importância na escolha de métodos para a produção de isolados protéicos, fracionamento de proteínas e purificação (CÂNDIDO, 1998).

A solubilidade de uma proteína depende de vários fatores incluindo peso molecular e conformação das moléculas; densidade e distribuição das cargas elétricas, que por sua vez é influenciada pelo pH; natureza e concentração de íons ou força iônica; temperatura e interações com outros componentes do alimento (LIU, 1999). Pode-se dizer, de um modo geral, que a solubilidade de uma proteína é influenciada pela maior ou menor afinidade das moléculas de proteínas pelo solvente, que no caso dos alimentos é a água. Daí o fato de ser a solubilidade classificada como uma propriedade hidrofílica. A composição em aminoácidos de uma proteína, particularmente o número de resíduos ácidos (asparagil e glutamil) e básicos (histidil, arginil e lisil) também influenciam na sua solubilidade. Esses aminoácidos, por apresentarem carga, aumentam o número de interações eletrostáticas com a água, contribuindo para uma maior solubilidade das proteínas. Mudanças, particularmente na diminuição da solubilidade das proteínas, afetam de maneira desfavorável a sua funcionalidade. A solubilidade das proteínas é particularmente importante em alimentos líquidos como refrescos, sucos, leite e substitutos do leite (SGARBIERI, 1996).

As variações de pH modificam a carga líquida da molécula de proteína, alterando as forças atrativas e repulsivas entre as proteínas e sua capacidade de interagir com a água. No ponto isoelétrico, onde a carga líquida da proteína é quase nula, as interações água-proteína são mínimas e as interações proteína-proteína são máximas, levando à formação de agregados e precipitados protéicos (BORDERÍAS e MONTERO, 1988).

A temperatura aumenta a solubilidade das proteínas até o ponto em que começa a ocorrer desnaturação térmica. A desnaturação da molécula da proteína coloca grupos hidrofóbicos em contato com o solvente, ocasionando diminuição de solubilidade, podendo haver coagulação e precipitação. Temperaturas acima de 50°C podem provocar desnaturação e diminuição de solubilidade nas proteínas (KARLESKIND *et al*, 1996). Conseqüentemente, muitas propriedades funcionais são destruídas ou prejudicadas pelo uso do calor (KINSELLA, 1976).

A medida da solubilidade pode ser efetuada por diferentes métodos entre eles o que determina o teor de nitrogênio solúvel em água; teor de proteína solúvel em água; o índice de solubilidade da proteína; o índice de solubilidade de nitrogênio; o índice de dispersibilidade da proteína; etc. (CÂNDIDO, 1998).

## **5.2 Capacidade de absorção e retenção de água**

A absorção de água por ingredientes protéicos tem um papel fundamental na textura de diversos alimentos, especialmente carnes trituradas e massas de pão. A água absorvida sem dissolução da proteína, conduz a uma expansão e lhe confere propriedades tais como consistência, espessamento, viscosidade e aderência (CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989). A absorção de água pela proteína é afetada por diversos fatores como a composição de aminoácidos, estrutura e conformação das proteínas, polaridade, ligação iônica, pH e temperatura (LIU, 1999; KINSELLA, 1976).

A atração hidrofílica poderá ser medida como grau de hidratação (conteúdo de água/g de proteína), e como habilidade do produto para captar água espontaneamente (esponjamento). Relaciona-se também com a quantidade de água que permanece na proteína ou alimento protéico após exposição a um excesso de água e aplicação de uma força de centrifugação ou pressão (capacidade de retenção de água) (SGARBIERI, 1996).

A absorção de água por um ingrediente protéico pode, algumas vezes, melhorar com uma desnaturação parcial, principalmente em proteínas com estrutura muito compacta, onde um desdobramento parcial da estrutura, expõe à superfície ligações peptídicas e grupos polares não

ionizados, que podem formar pontes de hidrogênio com a água, facilitando sua absorção (CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989)

A presença de sais, levando à alteração da força iônica e propriedades do solvente, afeta a capacidade de absorção de água. Mudanças nas interações proteína-água, devido à presença de sais, podem ser causadas pela competição entre grupos laterais de aminoácidos e sais pela água (CHOU e MORR, 1979).

A técnica de determinação da retenção de água por uma proteína ou alimento protéico consta de etapas de exposição da amostra a um meio aquoso (água ou salmoura), aplicação de uma força de separação da água (pressão, centrifugação, calor) e finalmente, a medição da água retida na proteína ou alimento protéico. A severidade nos processos de separação poderá influir significativamente nos resultados (SGARBIERI, 1996).

### **5.3 Propriedades espumantes**

Espumas são sistemas dispersos de duas fases distintas, onde uma delas líquida, circunda uma fase dispersa constituída de bolhas de ar. Proteínas podem agir como estabilizantes desse sistema, acumulando-se na interface ar-água, alterando as propriedades de superfície. As bolhas de ar são separadas por uma fina camada de líquido, denominada lamela, formando uma interface gás-líquido de elevada proporção, resultando num filme adsorvido nesta região que previne a coalescência das bolhas de ar (HALLING, 1981). Para ser um bom agente formador de espuma, a proteína deve (CÂNDIDO, 1998): a) absorver rapidamente na interface ar-água durante o batimento; b) sofrer rápido arranjo e rearranjo na interface; c) formar um filme coesivo viscoelástico.

A capacidade de formar espuma estável em presença de ar é uma propriedade funcional importante das proteínas em muitos produtos alimentícios do tipo bolos, suspiros, suflês, vários tipos de coberturas de bolos e sobremesas, além de bebidas como as cervejas. Várias substâncias tensoativas como detergentes e saponinas são formadoras de espumas, mas em alimentos as proteínas são as mais importantes (SATHE e SALUNKHE, 1981).

O que se procura medir, normalmente, é a expansão de volume da suspensão de proteína, imediatamente após batimento ou aeração, representada pelo volume de espuma formada (SGARBIERI, 1996). Excesso de batimento, como por exemplo, com a clara de ovo, causa coagulação-agregação das proteínas na interface ar-água, insolubilizando a proteína que não

adsorve apropriadamente, sendo ineficiente para uma expansão e estabilidade de espuma-ar (HALLING, 1981). A estabilidade de espuma diz respeito à retenção do volume máximo de espuma formada em função do tempo de repouso, sendo geralmente medida pela liberação de fluido da espuma (SGARBIERI, 1996).

A formação de espuma requer a difusão das proteínas solúveis até a interface ar-água, onde deverá se desenovelar, concentrar-se e estender-se rapidamente para baixar a tensão superficial. Para estabilizar a espuma, as propriedades requeridas das proteínas são diferentes das necessárias à sua formação. Para isto, é necessária a formação de uma película protéica impermeável ao ar, espessa, elástica, coesa e contínua em torno de cada bolha. Proteínas globulares de peso molecular elevado produzem espumas mais estáveis e com boas propriedades reológicas de superfície. As interações moleculares presentes incluem: pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas (KINSELLA, 1976; BORDERÍAS e MONTERO, 1988).

Durante o processo de formação de espuma, a proteína na interface ar-água, sofre algumas mudanças conformacionais que resultam em desnaturação. Este fenômeno poderá contribuir para o aumento de viscosidade observado com a formação de espuma. Portanto, a proteína como surfactante, deve desempenhar duas funções fundamentais na formação de espuma: reduzir a tensão superficial e interfacial do líquido e formar um filme de estrutura contínua e coesa envolvendo as bolhas de gás (SGARBIERI, 1996).

Numerosos fatores influenciam as propriedades espumantes das proteínas. Entre eles devem ser lembrados: natureza da proteína, método de preparo, solubilidade, concentração, pH, temperatura e duração do aquecimento, além da presença de sais, açúcares, lipídios e método de medida. Os mecanismos de desestabilização de espuma têm sido descritos como drenagem, quebra ou escoamento do líquido da lamela com o decorrer do tempo após formação da espuma, devido à gravidade, diferenças de pressão e mesmo evaporação (KINSELLA, 1976).

Segundo Cheftel, Cuq e Lorient, (1989), embora muitos estudos ressaltem a importância de uma alta solubilidade de proteínas para que se manifeste uma boa capacidade espumante e estabilidade, é aceito que as partículas protéicas insolúveis podem ter um papel benéfico na estabilidade da espuma. O pH, intrinsecamente relacionado à solubilidade de dispersões protéicas, afeta as propriedades espumantes da mesma maneira que em outras propriedades funcionais, pela alteração na carga elétrica das moléculas de proteína. A alta estabilidade da espuma de muitas proteínas no pH isoelétrico pode ser explicada pelo fato de que as atrações eletrostáticas

intermoleculares, que se produzem no ponto isoelétrico, aumentam a espessura e a rigidez das proteínas adsorvidas na interface ar-água.

#### **5.4 Capacidade de emulsificação**

Uma emulsão pode ser definida como uma mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais é disperso na forma de glóbulos no outro líquido. O que torna uma emulsão estável é a presença de um agente emulsificante, o qual diminui a tensão superficial existente entre as duas fases e permite formação de emulsão com um nível mais baixo de energia. A principal característica de um agente emulsificante é a de possuir, na mesma molécula, partes hidrofílicas e hidrofóbicas, o que permite a formação de uma camada entre as duas fases, separando-as e impedindo que os glóbulos da fase interna coalem, o que resultaria em quebra de emulsão (SGARBIERI, 1996).

As proteínas são capazes de se difundir na interface e funcionar como emulsificante. Uma barreira energética para a associação e separação de fase de ambas as partículas faz com que se forme uma camada de proteína na interface água/lipídio. A proteína estabiliza a emulsão através da estruturação ordenada de moléculas de água resultando num contato mínimo de grupos hidrofóbicos com a água. A adsorção das proteínas na interface ocorre em três estágios: a proteína nativa se difunde às regiões de contato, onde penetra, sofrendo desnaturação de superfície. A proteína adsorvida se rearranja para originar um estágio de mínima energia livre por inserir seus resíduos hidrofóbicos na fase oleosa. Isto resulta na formação de um filme de proteína ao redor do glóbulo de gordura. A formação de um gel pseudoplástico composto de proteína ou de proteína com carboidrato estabiliza a emulsão. Emulsões estudadas com proteínas alimentares são geralmente de óleo em água (KINSELLA, 1976; BORDERÍAS e MONTERO, 1988; CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989).

A solubilidade e a hidrofobicidade das proteínas são os principais determinantes das propriedades de emulsificação. A habilidade das proteínas de ajudar na formação e estabilização de emulsões é essencial para várias aplicações em alimentos como maioneses, molhos para saladas, sobremesas geladas, margarinas, carnes cominuídas, dentre outras (LIU, 1999).

Dentre os fatores que influenciam as características das emulsões estão a temperatura, pH, força iônica, presença de açúcares, presença de surfactantes de baixo peso molecular, tipo de óleo, exposição ao oxigênio, concentração de proteínas, propriedades emulsificantes da proteína e

condições de formação da emulsão (tipo e desenho do equipamento, intensidade do aporte energético, velocidade de adição de óleo, etc). O pH, uma vez que altera a solubilidade das proteínas, é um fator primário no desempenho das mesmas quanto às propriedades de emulsificação, já que estas devem se dissolver e migrar à interface a fim de alterar as propriedades de superfície. Algumas proteínas, em seu ponto isoelétrico, são pouco solúveis e isto já é suficiente para diminuir seu favorecimento na formação de emulsões (KINSELLA, 1976; CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989).

No ponto isoelétrico, ou submetidas a certas forças iônicas, a maioria das proteínas apresentam mínima capacidade emulsificante uma vez que adotam estruturas compactas dotadas de elevada viscoelasticidade, o que impede o desenovelamento e extensão necessárias à emulsificação. Este efeito favorece a estabilidade da emulsão, pois a desestabilização da emulsão é precedida de deformação ou desorção da película interfacial (CÂNDIDO, 1998). Entretanto, alguns pesquisadores têm encontrado proteínas com ótimas propriedades de emulsificação na região do ponto isoelétrico, atribuindo o fato à própria rigidez da molécula, que pode auxiliar na estabilização da emulsão contra a coalescência do glóbulo e, também, devido às interações hidrofóbicas entre lipídios e proteínas serem máximas no ponto isoelétrico (HALLING, 1981).

O método mais utilizado para medir a capacidade emulsificante consiste na medida da capacidade que tem uma solução de proteína ou uma suspensão de alimento protéico de formar uma mistura homogênea e estável com óleo ou gordura líquida. A solução ou suspensão é mantida em agitação permanente enquanto se adiciona lentamente a matéria graxa. A capacidade máxima de emulsificação da proteína é determinada no ponto em que se verifica o colapso ou quebra da emulsão. A quebra da emulsão poderá ser percebida visualmente pela separação de fases, por um som diferente produzido como consequência da separação das fases ou pela queda de condutividade lida em um amperímetro (SGARBIERI, 1996).

## **5.5 Capacidade de geleificação**

Macromoléculas ou biopolímeros quando em presença de água formam colóides de maior ou menor fluidez dependendo da concentração das macromoléculas bem como da natureza das mesmas. Esses colóides, tanto nas células vivas (animais e vegetais) como nos alimentos, poderão se transformar em géis de maior ou menor rigidez e de grande importância para as propriedades funcionais desses alimentos (SGARBIERI, 1998). Os géis de proteína são

constituídos por uma matriz tridimensional de polipeptídios entrelaçados, na qual a água permanece presa (KINSELLA, 1976).

O fenômeno de formação de gel é muito complexo e normalmente ocorre com o resfriamento da solução coloidal, após aquecimento prévio. Com o resfriamento, verifica-se um aumento de viscosidade, até o ponto em que a rigidez se manifesta. Este é o chamado “ponto de gel”. Muitos géis, quando submetidos a um repouso prolongado, manifestam perda de solvente e contração em um processo chamado sinerese (CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989; SGARBIERI, 1998). A formação de gel é governada por um balanço entre as forças atrativas e repulsivas entre cadeias próximas. O balanço é muito dependente do pH e as forças atrativas podem envolver associações hidrofóbicas, atrações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e pontes dissulfídicas (KINSELLA, 1976).

Uma concentração mínima de proteína é necessária para a geleificação e o aumento nessas concentrações acima deste valor mínimo, diminui o tempo requerido para formar o gel. A determinação da concentração de proteína mínima requerida para formar o gel é baseada no teste da “concentração mínima formadora de gel”. O teste é feito, geralmente, a partir do aquecimento de uma série de concentrações de proteínas a 80°C por 30 minutos. A menor concentração de proteína que conseguir formar gel é tida como a “concentração mínima formadora de gel” (MORR e HA, 1993).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, C. G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o processo fermentativo.** 1992. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1992.

BAGNIS, C. G. **Isolado protéico de girasol – obtenção e propriedades.** 1984. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia Agrícola e de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.

BAREL, M.; GUYOT, B.; VICENT, J. C. Les fractions protéiques du cacao avant et après torréfaction. Influence de la fermentation. **Café, Cacao, Thé.** n. 27, p. 127-144, 1983.

BÉROT, S.; DESHAYES, G.; GUEGUEN, J. Cottonseed protein-rich products from glandless African varieties. 2-Pilot-plant scale production of protein isolates. **Sciences des Aliments**, v. 15, p. 335-346, 1995.

BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 28, n. 2, p. 159-169, 1988.

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**. 2001. 134p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

CÂNDIDO, L. M. B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais**. 1998. 207p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

CALZAVARA, B. B. G.; MILLER, C. H.; KAHNAGE, O. N. C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro**. Belém: EMBRAPA/CPATU, 99p. 1984.

CHAAR, M. J. **A composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e conservação de seu néctar por meios físicos e químicos**. 1980. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1980.

CHAU, C. F.; CHEUNG, C. K.; WONG, Y. S. Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2500-2503, 1997.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.

CHOU, D. H.; MORR, C. V. Protein-water interations and functional properties. **Journal of American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 56, n. 1, p. 53A-63A, 1979.

COUTINHO, R. B. S. Industrialização das sementes de cupuaçu (*Theobroma bicolor* Humboldt). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Amazônia**, Belém, v. 2, n. 4, p. 7-10, 1969.

DUARTE, R. M. T. **Obtenção de frações protéicas de sangue bovino: composição, valor nutritivo e propriedades funcionais**. 1997. 91p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C. Cocoa glicosidase and colour changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, p. 505-509, 1957.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 1-13, 2000.

HALLING, P. J. Protein-stabilized foams and emulsions. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton: CRC Press, v. 157, n. 2, p. 155-203, 1981.

HAMMERSTONE, J. F. Jr.; ROMANCZYK, L. J. Jr.; AITKEN, W. M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. **Phytochemistry**, London, v. 35, n. 5, p. 1237-1240, 1994.

KARLESKIND, D.; LAYE, I.; MORR, C. V.; SCHENZ, T. W. Emulsifying properties of lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 54-58, 1996.

KHALIL, M. M. Biochemical and technological studies on the production of isolated guar protein. **Nahrung**, v. 45, n. 1, p. 21-24, 2001.

KILARA, A.; SHARKASI, T. Y. Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 323-395, 1986.

KINSELLA, J. E. Functional properties in foods: a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

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

LERCETEAU, E.; ROGERS, J.; PÉTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 4, p. 619-625, 1999.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. Maryland. Aspen Publishers, 1999. 532p.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. 2000. 112p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MARAVALHAS, N. Armazenagem intermediária do cacau comercial. **Cacau Atualidades**, v. 13, p. 3-11, 1971.

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

MONTEIRO, W. R. Gênero Theobroma: distribuição e importância econômica. I Workshop sobre as culturas de cupuaçu e pupunha, 1996, Manaus. **Anais**. Manaus: EMBRAPA - CPAA, 1996. 170p.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGESTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. M.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, Nov./Dec. 1985.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

NAZARÉ, R. F. R. de; BARBOSA, W. C. e VIÉGAS, R.M.F. **Processamento da sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate**. Belém: EMBRAPA – CPATU, 1990. 38p.

OLIVEIRA, L. M. S. **Contribuição ao aproveitamento industrial do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 72p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

OSBORNE, T. B. **The vegetable Proteins**. London. Green &Co., 1924.

OTEGUI, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; DE DIEGO, A.; CID, C.; MACARULLA, M. T.; PARTEARROYO, M. A. Properties of spray-dried and freeze-dried faba bean protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 439-443, 1997.

PEZOA-GARCÍA, N. H. **Estudo sobre a utilização de hidrociclones para a separação de partículas no processamento de concentrado e isolado protéico de soja**. 1985. 109p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

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

PHILOCREON, N. C. Frutos comestíveis do Brasil. **Anais de Farmácia e Química**. São Paulo. 13 (11/12): 92-7, 1962.

QUEIROZ, M. B. **Estudo dos parâmetros de torração de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**. 1999. 104p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

RUSSEL, C. **Chocolate Production and Use**, Books for Industry, 1972.

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of great northern bean (*Ph. vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. **Journal Food Science**, v .46, n. 1, p. 71-74, 1981.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações – modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.

SILVA, J. B.; BORA, P. S.; NETO, V. Q. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) modificado por acetilação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 263-269, 1997.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: chemistry and technology**. Vol. I. Avi: Publishing Company Inc., 1972. 294p.

SORIA, L. A. A. **Estudos do valor nutritivo e da fração albumina dos extratos de proteína solúvel de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) em função do grau de torração**. 1999. 127p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

STAUFFER, M. B. Chocolate manufacturing: critical process controls – an overview. **Manufacture Confectioner**. 92-94, jun. 1994.

TOMOSKOZI, S.; LÁSZTITY, R.; HARASZI, R. BATICZ, O. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. **Nahrung**, v. 45, n. 6, p. 399-401, 2001.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 1999. 114p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

VENTURIERI, G. A.; AGUIAR, J. P. L. Composição do chocolate caseiro de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum* Schum). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, n. 1/2, p. 3-8, 1988.

VENTURIERI, G. A. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento**. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108p.

VILLACHICA, H. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazônia. **Tratado de Cooperación Amazônica**, Lima – Peru, 1996. 367p.

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

ZAK, D. L. The development of chocolate flavor. **The Manufact. Confect**, v. 68, n. 11, p. 69-74, 1988.

ZAMALLOA, C. W. A. **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**. 1994. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

## **CAPÍTULO 2**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CURVAS DE SOLUBILIDADE PROTÉICA DE SEMENTES *IN NATURA*, AMÊNDOAS FERMENTADAS E TORRADAS DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum).**

**Ana Vânia Carvalho; Nelson Horacio Pezoa García; Joyce Kazue Alves Wada**

Departamento de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP - C.P. 6121 - CEP 13083-970 -  
Campinas - SP - Brasil.

**RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi caracterizar físico-quimicamente as sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, além de verificar o efeito da fermentação e torração sobre a solubilidade de suas proteínas. Verificou-se, através da curva de solubilidade protéica em diferentes pHs, que o ponto isoelétrico das proteínas de sementes de cupuaçu *in natura* situou-se na faixa de pH 3,5, sendo que nestas condições apresentaram ainda uma solubilidade protéica de 16,90%. Já para as amêndoas fermentadas de cupuaçu, verificou-se que o pI em torno 3,0, um pouco abaixo do pH verificado para as sementes. Observou-se também, uma ligeira redução na solubilidade, em todos os pHs estudados, quando comparada à curva obtida das sementes de cupuaçu, indicando uma possível influência do processo fermentativo sobre o estado de ionização e solubilidade das proteínas. Notou-se, para as amêndoas fermentadas e torradas, uma menor solubilização de proteínas quando comparada às sementes e às amêndoas somente fermentadas. Isso indica, provavelmente, que o processo térmico de torração tenha causado uma desnaturação de proteínas, a qual foi observada através da redução em sua solubilidade.

**Palavras-chave:** cupuaçu, composição físico-química, solubilidade protéica.

**SUMMARY**

The objective of the present work was the physico-chemical characterization of raw, fermented and roasted cupuacu seeds, as well as the evaluation of the effects of fermentation and roasting on protein solubility. The protein solubility curve at different pH values indicated that

the isoelectric point (pI) of the proteins from raw cupuacu seeds was about pH 3.5; at such a pH, the protein solubility was 16.9%. The pI of the proteins from fermented beans was slightly lower than that of the seed. A slight reduction in solubility was observed at all pH values studied, when compared to the curve obtained from raw seeds, indicating that the fermentative process possibly influenced the protein's ionization state and solubility. The fermented and roasted beans presented still lower protein solubility than those submitted only to fermentation, indicating that the thermal treatment in roasting may cause protein denaturation.

**Key-words:** cupuacu, physico-chemical properties, chemical composition, protein solubility.

## 1. INTRODUÇÃO

O cupuaçu é uma fruta muito popular na Amazônia, apresentando grande potencial para industrialização. Apesar das sementes constituírem cerca de 20% do peso do fruto e apresentarem alto valor nutritivo, constituem-se em resíduo, sendo praticamente descartadas durante o beneficiamento do fruto para obtenção da polpa.

As sementes de cupuaçu possuem um teor de proteínas entre 9 e 12% em base seca (VASCONCELOS, 1999; LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001), apresentando grande possibilidade de uso como alimento alternativo, com boas qualidades nutricionais quando se considera que a farinha desengordurada obtida destas sementes, que possuem, em geral, mais de 60% de lipídios, pode alcançar teores de proteína maiores que 26%.

A solubilidade das proteínas é uma propriedade física e funcional muito importante. O pH afeta a densidade e a distribuição de cargas elétricas na molécula da proteína de tal forma que em determinado pH (ponto isoelétrico = pI) a proteína apresentará um mínimo de solubilidade. No pI, o número de cargas positivas e negativas é igual, portanto, elas se neutralizam intramolecularmente. Nestas condições, as moléculas de proteínas apresentam a menor afinidade pelo solvente (água) e atraem-se mutuamente formando uma massa insolúvel que se precipita. O pI varia de produto para produto, mas para um grande número de proteínas está entre pHs 3,5 e 6,5 (SGARBIERI, 1996).

A medida da solubilidade pode ser efetuada por diferentes métodos: nitrogênio solúvel em água; proteína solúvel em água; índice de solubilidade da proteína; índice de solubilidade de nitrogênio; ou índice de dispersibilidade da proteína. Normalmente esta determinação envolve a

dispersão da proteína em água, agitação sob condições controladas de pH, temperatura, força iônica e centrifugação, determinando-se o nitrogênio na fração solúvel através do método de Kjeldahl, ou mediante a determinação de proteínas através de métodos espectrofotométricos. O método de Morr *et al.* (1985), é o resultado de um estudo colaborativo para determinação desta propriedade, e considera a solubilidade e não a dispersibilidade da proteína, uma vez que a centrifugação é realizada a alta velocidade (CÂNDIDO, 1998).

O conhecimento das características de solubilidade protéica é muito útil na seleção das condições ótimas para extração das proteínas de fontes naturais. Uma boa solubilidade pode aumentar marcadamente o potencial de aplicação das proteínas, e a solubilidade talvez seja o índice mais prático de se determinar a extensão da desnaturação de uma proteína. A curva de solubilidade, em diferentes valores de pH, de uma “nova proteína”, é freqüentemente a primeira propriedade funcional medida (KINSELLA, 1976).

O objetivo deste estudo foi caracterizar físico-quimicamente as sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, além de verificar os efeitos da fermentação e torração sobre a solubilidade de suas proteínas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Preparo das sementes *in natura***

As sementes foram preparadas na Cooperativa Agrícola Mista de Tomé-Açú. Foi extraída o máximo possível da polpa aderida às sementes, as quais foram secas ao sol em barcaças de madeira, até atingir umidade de 7 a 8%. Posteriormente, na planta piloto da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, foi complementada a secagem até 3,94% em média, em estufa com circulação de ar a 40°C.

### **2.2 Fermentação**

As sementes de cupuaçu recém despulpadas e contendo aproximadamente entre 4 e 5% de polpa aderida, foram colocadas em caixa de fermentação T-60, construída de acordo com Grimaldi (1978), com dimensões de 190x120x60cm de altura e espaço entre as tábuas de fundo de 0,2 cm, para escoamento de líquido durante o processo fermentativo, seguindo metodologia

proposta por Vasconcelos (1999). Após a fermentação, as amêndoas foram secas ao sol em barcaças de madeira, até atingir uma umidade final de 7 a 8%. A secagem foi complementada em estufa com circulação de ar a 40°C, até 3,27% de umidade.

### **2.3 Classificação das amêndoas fermentadas de cupuaçu (Teste de corte)**

As amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas foram classificadas através da prova de corte, conforme método para cacau, proposto na Resolução nº 42 do Conselho Nacional de Comércio Exterior (CONCEX, 1968), que admite a tolerância dos seguintes defeitos para amêndoas de cacau (amêndoas contadas e não pesadas), adaptado neste caso para o cupuaçu:

- amêndoas mofadas , máximo de 2%;
- amêndoas danificadas por insetos, máximo de 2%;
- amêndoas ardósias, máximo de 2%;
- amêndoas germinadas, achatadas e/ou outros defeitos, não ultrapassando a tolerância máxima de 2%.

Foram utilizados 3 lotes de 100 amêndoas retiradas aleatoriamente, as quais foram seccionadas longitudinalmente e observadas uma a uma de acordo com o método proposto acima.

### **2.4 Torração das amêndoas**

O processo de torração foi realizado em torrador elétrico rotativo com capacidade de 250g de amêndoas fermentadas, munido de controle de precisão de temperatura de, em três repetições. Foram testados os tempos de permanência de 45, 50 e 55 minutos a uma temperatura de 150° C na camisa do torrador, no início do processo. Após a realização do teste sensorial, optou-se por analisar físico-quimicamente somente as amêndoas torradas por 50 minutos.

O processo de torração foi realizado acoplado-se um termômetro digital no interior do torrador, sendo a variação de temperatura medida em intervalos de tempo constantes de 2 minutos, até o término do processo.

### **2.5 Análise sensorial**

Estudos sensoriais foram realizados para determinar os atributos de aroma e sabor globais de amêndoas de cupuaçu fermentadas e torradas durante os tempos de 45, 50 e 55 minutos, à temperatura de 150°C na camisa do torrador. As amêndoas de cupuaçu provenientes da torração foram descascadas manualmente sendo os *nibs* separados das frações testa e gérmen e em seguida refinados até a obtenção de granulometria inferior a 40µm (liquor) para a formulação de mistura à base de cupuaçu, para a realização dos testes sensoriais.

A formulação empregada foi a sugerida por Lopes (2000), ou seja, 16g de *liquor* de cupuaçu, 12g de leite em pó desnatado e 12g de açúcar refinado. Foram adicionados 100mL de água a 80°C, misturando-se em homogeneizador durante 2 minutos e em seguida mais 100mL de água a 80°C, homogeneizando-se por mais 2 minutos. As amostras foram codificadas com 3 dígitos, servidas em copos plásticos descartáveis de 30mL, a uma temperatura de 50°C, com 35 provadores para cada análise.

Empregou-se o teste de aceitação com escala hedônica estruturada de 9 pontos, utilizando-se a ficha apresentada conforme Figura 1.

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Por favor, avalie cada uma das amostras codificadas de uma mistura à base de amêndoas de cupuaçu em relação ao aroma global segundo a escala abaixo:

9. Gostei muitíssimo
8. Gostei muito
7. Gostei moderadamente
6. Gostei ligeiramente
5. Nem gostei, nem desgostei
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei moderadamente
2. Desgostei muito
1. Desgostei muitíssimo

Amostra	Valor
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Por favor, avalie cada uma das amostras codificadas de uma mistura à base de amêndoas de cupuaçu em relação ao sabor global segundo a escala abaixo:

9. Gostei muitíssimo
8. Gostei muito
7. Gostei moderadamente
6. Gostei ligeiramente
5. Nem gostei, nem desgostei
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei moderadamente
2. Desgostei muito
1. Desgostei muitíssimo

Amostra	Valor
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários: \_\_\_\_\_

Figura 1 Ficha utilizada nas análises sensoriais das formulações à base de amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu.

## **2.6 Caracterização física das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu.**

As sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas a 150°C por 50 minutos, foram quebradas e descascadas manualmente para a remoção da testa (casca) e gérmen, sendo os cotilédones finamente moídos para a realização das análises físico-químicas.

Os materiais foram caracterizados fisicamente de acordo com as seguintes determinações:

- Composição física (% de cotilédone, testa e gérmen): pesou-se 100g de material íntegro o qual foi separado nas diferentes frações e estas foram pesadas separadamente. O teste foi realizado em triplicata;

- Densidade aparente: pesou-se 500g de amostra em proveta de 1000mL e esta foi colocada num vibrador marca Produtest durante 5 minutos, com uma intensidade de vibração correspondente à posição nº 8 do reostato do aparelho. Após esta operação o volume ocupado foi lido e a relação entre a massa por unidade de volume foi considerada como densidade aparente (MEURSING, 1983);

- Dimensões (comprimento, largura e espessura): utilizou-se um paquímetro, sendo as medições realizadas em 100 sementes e em triplicata;

- Massa média por amêndoa: pesou-se 100 sementes em triplicata, encontrando-se a seguir o peso médio por amêndoa.

## **2.7 Caracterização físico-química das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu.**

As características físico-químicas dos materiais descascados e degerminados foram determinadas utilizando-se os métodos a seguir:

### **2.7.1 pH**

O pH foi determinado utilizando-se o método 31.1.07 da AOAC (1997).

### **2.7.2 Acidez titulável total**

Medida por titulação segundo o método 11.14.3 da AOAC (1997).

### **2.7.3 Teor de umidade**

O teor de umidade das sementes e amêndoas foi determinado de acordo com a metodologia 31.1.02 da AOAC (1997).

### **2.7.4 Teor de proteína**

O teor de proteína foi determinado pelo método semi micro Kjeldahl, baseado na hidrólise e posterior destilação da amostra, de acordo com o método 31.1.08 da AOAC (1997).

### **2.7.5 Teor de lipídios**

Foi obtido por extração em Soxhlet diretamente na amostra, segundo o método 31.4.02 da AOAC (1997).

### **2.7.6 Teor de cinzas**

Determinado por carbonização das amostras até cessar a liberação de fumaça, seguido de calcinação em mufla a 540° C até peso constante, segundo o método 31.1.04 da AOAC (1997).

### **2.7.7 Teor de fibras**

O teor de fibras foi determinado utilizando-se o método Acid Detergent Fibre (ADF), segundo Goering e Van Soest (1970).

## **2.8 Determinação das curvas de solubilidade das proteínas de cupuaçu**

Foram obtidas curvas de solubilidade das proteínas da semente de cupuaçu cru, da amêndoa fermentada e da amêndoa fermentada e torrada. O procedimento adotado foi o proposto por Morr *et al.* (1985), com algumas modificações: 1g de amostras desengorduradas de semente de cupuaçu cru, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas foram solubilizadas em água destilada (50 mL) e o pH da solução foi ajustado com ácido clorídrico (0,1N), ou hidróxido de sódio (0,1N) numa faixa que variou de 2,0 a 9,0. Em seguida estas soluções foram submetidas à agitação por 40 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 3000xg durante 15 minutos. Alíquotas de 15mL do sobrenadante foram tomadas e a solubilidade das proteínas

determinada através do método semi micro Kjeldahl, com fator de conversão de nitrogênio de 6,25. Para calcular a porcentagem de solubilidade protéica de cada amostra foi utilizada a equação a seguir:

$$\% \text{ solubilidade} = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso amostra (mg)} \times \frac{\text{conteúdo de proteína amostra (\%)}}{100}} \times 100$$

## **2.9 Análises estatísticas**

Os resultados das várias características avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas, comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SAS 8.0 (Statistical Analysis System).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Classificação das amêndoas fermentadas de cupuaçu**

Visando relacionar a qualidade em função do grau de fermentação, as amêndoas secas foram classificadas pela prova de corte, conforme o método recomendado na Resolução 42 do CONCEX, para cacau. Embora esta norma seja utilizada para amêndoas de cacau, foram realizadas as adaptações necessárias, considerando principalmente que as sementes de cupuaçu não possuem pigmentos antocianínicos.

Foram consideradas como amêndoas bem fermentadas aquelas que apresentavam coloração marrom mais escura e a presença de sulcos profundos e numerosos; parcialmente fermentadas aquelas com coloração marrom um pouco menos intensa e presença de sulcos, porém bem menos numerosos e profundos e mal fermentadas aquelas com coloração marrom bem clara e presença de pouco ou nenhum sulco na superfície analisada. É importante ressaltar que as amêndoas parcialmente fermentadas sofreram o processo de fermentação e estavam aptas a desenvolver boas características de sabor no produto final.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que as amêndoas não ficaram suficientemente fermentadas. Observou-se que 15,44% das amêndoas foram bem fermentadas, 71,47% parcialmente fermentadas e 13,09% mal fermentadas. Comumente para cacau, espera-se

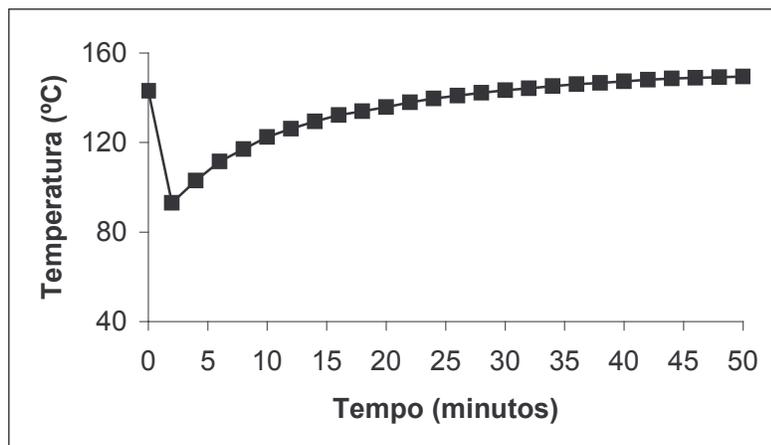
que 70 a 80% das amêndoas estejam bem fermentadas e 20 a 30% parcialmente fermentadas, embora na atualidade e por causa da falta de matéria prima no mercado nacional, esteja-se utilizando matérias-primas com percentuais de amêndoas bem fermentadas, consideravelmente menores.

**Tabela 1** Classificação das amêndoas de cupuaçu: Teste de Corte.

Tipo de amêndoa	%
Amêndoas bem fermentadas	15,44
Amêndoas parcialmente fermentadas	71,47
Amêndoas mal fermentadas	12,42
Amêndoas mofadas	0,67
Amêndoas ardósias	-
Amêndoas germinadas, achatadas e outros defeitos	-

### 3.2 Torração das amêndoas de cupuaçu

O perfil da temperatura de torração realizada a 150°C na camisa do torrador, por um tempo de 50 minutos, é mostrado na Figura 2. Após a colocação das amêndoas na câmara de torração, observou-se uma queda brusca da temperatura, até aproximadamente 82°C. A seguir, verifica-se uma tendência de elevação gradual da temperatura na câmara de torração, até atingir 149,3°C (média de três repetições), no final da torração.



**Figura 2** Perfil da temperatura do processo de torração de amêndoas de cupuaçu.

Queiroz (1999) e Lopes (2000), realizaram o processo de torração de amêndoas de cupuaçu utilizando temperaturas de 150°C por 38, 40, 42 e 44 minutos e 40, 45, 50 e 55 minutos respectivamente, observando-se uma tendência semelhante entre os perfis de temperatura obtidos pelos autores e o relatado neste trabalho.

### 3.3 Análise sensorial

Na Tabela 2 encontra-se as médias dos atributos aroma e sabor global para a formulação à base de amêndoas de cupuaçu. De acordo com a análise estatística, observa-se que não houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos diferentes tempos de torração sobre o sabor e aroma global do liquor de amêndoa de cupuaçu.

**Tabela 2** Médias das amostras de amêndoa de cupuaçu por atributo avaliado.

Tempo de torração (minutos)	Atributo	
	Aroma	Sabor
45	6,89 ± 1,50 a	6,40 ± 1,70 a
50	6,91 ± 1,27 a	6,54 ± 1,42 a
55	6,60 ± 1,46 a	6,74 ± 1,54 a

Médias com letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tanto para o atributo sabor global quanto para o aroma global, as notas correspondem a valores entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.

Em trabalho realizado por Lopes (2000), também não foi observada diferença estatística entre os tempos de torração de 45, 50 e 55 minutos, quanto ao atributo de aroma global, sendo que somente para o sabor global foi verificado diferença estatística entre as amostras torradas a 40 e 55 minutos.

Queiroz (1999) observou através de análise sensorial (ADQ) que as amêndoas de cupuaçu torradas por 38, 40, 42 e 44 minutos não diferiram significativamente entre si, no entanto, a intensidade do sabor de chocolate foi acentuado com o aumento de temperatura.

Pode-se concluir, portanto, que embora 71,47% das amêndoas tenham sido classificadas, de acordo com o teste de corte, como amêndoas parcialmente fermentadas, através da análise

sensorial percebe-se que elas foram capazes de desenvolver razoavelmente o sabor e aroma global.

### 3.4 Caracterização física das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu

Os resultados das dimensões das amêndoas de cupuaçu, bem como a densidade aparente e a massa média por amêndoa, são mostrados na Tabela 3.

Tanto para os valores de dimensões quanto para a massa média das sementes e amêndoas, estes estão concordantes com Lopes (2000). Porém, para a densidade aparente, os valores encontrados neste trabalho estão ligeiramente superiores aos relatados por aquele autor, que observou uma densidade aparente média por amêndoas de cupuaçu de 0,46.

**Tabela 3** Características físicas das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas torradas de cupuaçu .

Amostra	Características físicas				
	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Massa média por amêndoa (g)	Densidade aparente (g/cm <sup>3</sup> )
Semente seca	25,46 ± 0,32 a	20,24 ± 0,21 a	10,19 ± 0,11a	2,58 ± 0,05 a	0,56 ± 0,00 a
Amêndoa fermentada	25,80 ± 0,23 a	19,76 ± 0,23 a	12,46 ± 0,11 b	2,75 ± 0,04 b	0,57 ± 0,01a
Amêndoa torrada	23,30 ± 0,24 a	18,29 ± 0,25 a	11,60 ± 0,08 c	2,36 ± 0,05 c	0,58 ± 0,01a

\* Os resultados foram obtidos avaliando-se lotes de 100 amêndoas em triplicata

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios de cotilédones, testa e gérmen de sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu. Para a amêndoa fermentada, os valores estão próximos aos dados encontrados por Lopes (2000) e Queiroz (1999), de 71,54, 27,81 e 0,65% e de 72,6, 26,1 e 1,3%, respectivamente.

**Tabela 4** Composição física das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas torradas de cupuaçu.

Amostra	Componentes		
	Cotilédone (%)	Testa (%)	Gérmen (%)
Semente seca	65,99 ± 1,80 b	33,38 ± 1,76 a	0,66 ± 0,02 a
Amêndoa fermentada	71,90 ± 0,94 a	27,46 ± 1,07 b	0,64 ± 0,13 a
Amêndoa torrada	73,11 ± 1,34 a	26,09 ± 1,27 b	0,80 ± 0,07 a

\* Os resultados foram obtidos avaliando-se lotes de 100g de amêndoas em triplicata

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

### 3.5 Caracterização físico-química das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, decorticadas e degerminadas.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios da caracterização físico-química dos cotilédones moídos, isentos da testa e gérmen, das sementes não fermentadas, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, em base seca.

**Tabela 5** Caracterização físico-química de sementes não fermentadas, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, em base seca.

Determinação	Semente	Amêndoa fermentada	Amêndoa torrada
pH	6,35 ± 0,01 a	5,41 ± 0,03 b	5,27 ± 0,03 c
Acidez total titulável*	7,70 ± 0,50 b	11,69 ± 0,75 a	11,74 ± 0,75 a
Proteína (%)	9,43 ± 0,12 a	8,89 ± 0,36 ab	8,63 ± 0,22 b
Lipídios (%)	64,85 ± 0,61 a	53,60 ± 1,04 b	53,73 ± 0,30 b
Cinzas (%)	2,94 ± 0,02 a	2,02 ± 0,01 c	2,15 ± 0,04 b
Fibra (%)	3,28 ± 0,05 b	6,51 ± 0,98 a	7,63 ± 0,44 a
Outros compostos **	19,50	28,98	27,86

\* meq de NaOH/100g de MS

\*\* Calculado por diferença, representa compostos como carboidratos, ácidos, alcalóides, etc.

Médias com letras iguais, em uma mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A análise estatística detectou diferença significativa entre as sementes não fermentadas e as amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas, com relação ao pH, conforme Tabela 5. Os valores de pH encontrados para a semente não fermentada e seca são significativamente superiores aos valores encontrados para as amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas. Isso provavelmente seja devido ao ácido acético e láctico absorvidos pelos cotilédones durante o processo fermentativo, o que resulta em decréscimos nos valores de pH, para as amêndoas fermentadas. Os valores encontrados neste trabalho estão ligeiramente inferiores aos encontrados por Lopes (2000), que observou um pH médio de 5,74 nas amêndoas fermentadas e secas.

Vasconcelos (1999) mostrou a influência do processo fermentativo na redução do pH nos cotilédones de amêndoas de cupuaçu. Os valores do pH para a amostra recém despulpada foi de 6,30, reduzindo para 6,14 após 24 horas de processo. Após 48 horas, o pH atingiu o valor de 4,99 e ao final do processo, este valor foi de 4,71. Porém, após a secagem, o pH subiu para 5,34, provavelmente devido às perdas do ácido acético por evaporação durante essa etapa.

Para a acidez titulável total, os valores encontrados para a semente são significativamente inferiores àqueles observados para a amêndoa fermentada e para a amêndoa fermentada e torrada. Isso provavelmente seja devido, novamente, ao ácido acético e láctico absorvidos pelos cotilédones durante o processo fermentativo, o que acarreta em um aumento na acidez titulável total das amêndoas fermentadas. Os valores encontrados neste trabalho estão próximos àqueles encontrados por Lopes (2000), que observou uma acidez total de 11,2 meq NaOH/100g MS nas amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas.

Zamalloa (1994) relata que os teores de acidez total em cacau podem ser afetados por diversos fatores como variedade, maturação do fruto, época de colheita, condições climáticas e, principalmente, a condução do processo de fermentação.

Os valores encontrados para o teor de proteína total, apresentados na Tabela 5, estão próximos àqueles relatados por Aragão (1992), Queiroz (1999) e Lopes (2000). Nas sementes não fermentadas, esses teores encontram-se superiores quando comparado ao material submetido à torração, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Vasconcelos (1999) verificou que o teor de proteína total nas sementes de cupuaçu varia ligeiramente durante a fermentação, sendo observado um pequeno decréscimo.

De acordo com a análise estatística, a Tabela 5 mostra que as sementes não fermentadas apresentaram teores de cinza significativamente superiores quando comparados aos teores nas amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas. Isto poderia ser devido às perdas de minerais por exudação durante a fermentação e ao consumo destes nos mecanismos bioquímicos desta etapa. Nas sementes, estes teores encontram-se ligeiramente superiores ao relatado por Lopes (2000), que foi de 2,35%. Para as amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas torradas, os valores encontrados estão um pouco menores do que aqueles relatados pelo mesmo autor.

Quanto ao teor de gordura exposto na Tabela 5, os valores encontrados nas sementes de cupuaçu estão próximos ao relatado por Lopes (2000), cerca de 60,25%. Nas amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas, esses valores foram inferiores em relação às sementes, sendo esta diferença estatisticamente significativa, e estão próximos aos valores relatados por Aragão (1992). Tal diferença encontrada neste trabalho provavelmente seja devido ao fato das sementes obtidas serem de lotes diferentes daquelas que foram submetidas à fermentação.

A Tabela 5 indica o teor de fibras nas sementes o qual encontra-se inferior aos resultados obtidos para o material fermentado e para o torrado. Nas sementes esse valor apresenta-se inferior aos teores encontrados por Lopes (2000), 4,12% e por Vasconcelos (1999), 7,43%. Este autor realizou a análise no material recém despulpado, o que pode ter contribuído para esta diferença. Para o material submetido à fermentação, o teor de fibras é superior ao relatado para as sementes, ao contrário do que foi observado em trabalho realizado por Vasconcelos (1999), que encontrou valores médios de 5,46%, próximo ao teor relatado por Queiroz (1999), de 5,87%. Porém, Mattietto (2001) relata teores de fibras de 3,44% para as amêndoas fermentadas de cupuaçu, que estão próximos aos valores encontrados por Lopes (2000) que são em média 3,31%. Já para o material submetido à fermentação e posteriormente à torração, foram observados teores de 7,63%, um pouco inferior ao encontrado em trabalho realizado por Marchese (2002) que foi de 8,12%.

Essas diferenças encontradas sugerem que variações no teor de fibras podem ocorrer segundo alguns fatores como variedade do fruto, condições climáticas, solo, época de colheita, estágio de maturação, entre outras. Como já relatado anteriormente, as sementes e as amêndoas submetidas à fermentação pertenciam a lotes distintos, o que provavelmente explica as diferenças aqui encontradas.

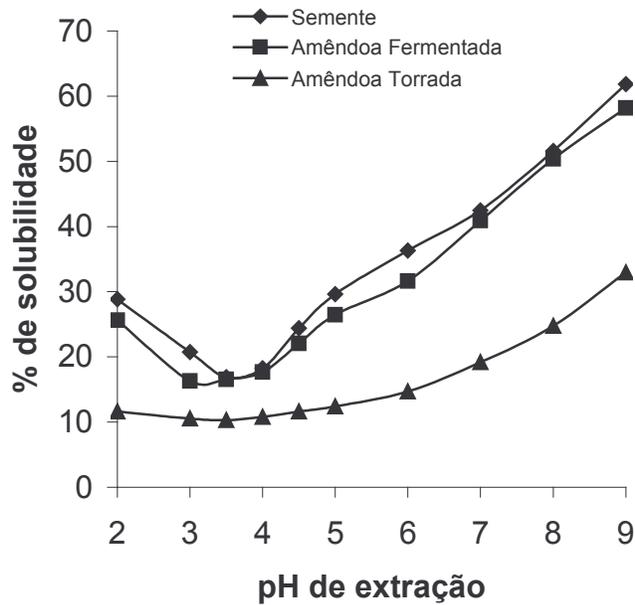
### **3.6 Curvas de solubilidade protéica**

A solubilidade de produtos protéicos é dependente do estado físico-químico de suas moléculas de proteína, a qual é favorável ou adversamente afetada pelo calor, secagem ou outros tratamentos de processamento durante sua produção e armazenamento (MORR *et al.*, 1985).

No presente estudo, observa-se na Figura 3 que, para a farinha desengordurada obtida das sementes de cupuaçu, a menor solubilidade protéica, 16,9%, ocorreu no pH 3,5, sendo este portanto, considerado o ponto isoelétrico das proteínas deste produto. A partir deste ponto, observa-se um aumento progressivo na solubilidade protéica até o pH 9 (máximo pH estudado), onde esta solubilidade atingiu 61,88. Abecia Soria (1999), estudando as proteínas da amêndoa de cacau, reportou, para o pH 4,5, a menor solubilidade protéica, 7,2%. Smith e Circle (1972) reportam um ponto isoelétrico para a soja entre pH 4 e 4,8. Já para as proteínas de girassol, Bagnis (1984) obteve uma região de mínima solubilidade em uma ampla faixa de pH, entre 3 e 6,5. Auler (2002), estudando farinhas de amaranto, observou que os intervalos de pHs entre 4,00 e 4,75 foram os que apresentaram a menor solubilidade das proteínas, confirmando o pH 4,6 como sendo o ponto isoelétrico das proteínas do amaranto. Em trabalho realizado por Glória e Regitano d'Arce (2000), os autores relatam, para a castanha do Pará, um ponto isoelétrico em torno do pH 3.

Chau, Cheung e Wong (1997), estudando concentrados protéicos obtidos de três espécies de leguminosas, *Phaseolus angularis*, *Phaseolus calcaratus* e *Dolichos lablab*, concluíram que para as duas primeiras espécies citadas, a mínima solubilidade de nitrogênio observada foi em pH 4. Já para a *Dolichos lablab*, o pI encontra-se ao redor do pH 5.

Em estudo realizado com isolado protéico obtido de sementes de algaroba, observou-se a menor solubilidade protéica em pH igual a 5, sendo portanto, este o pH utilizado para a precipitação das proteínas (SILVA *et al.*, 1997).



**Figura 3** Solubilidade protéica da semente *in natura*, amêndoa fermentada e amêndoa fermentada torrada de cupuaçu em função do pH de extração.

Através da curva de solubilidade das proteínas da soja, observa-se que no ponto isoelétrico, cerca de 10% das proteínas permanecem solúveis, sendo perdidas durante o processamento para obtenção de concentrados e isolados protéicos (SMITH E CIRCLE, 1972; SGARBIERI, 1996). Para sementes de cupuaçu, verificou-se que no ponto isoelétrico, 16,91% das proteínas permaneceram solúveis. Já Auler (2002), observou uma solubilidade protéica em pH isoelétrico de cerca de 22% para a farinha de amaranto desengordurada e de 37,2% para a farinha-base (não desengordurada).

Já em pHs superiores a este de insolubilização protéica, observa-se uma predominância de cargas negativas na molécula de proteína, ocorrendo grande formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e de proteína, observando-se assim, uma maior solubilização protéica. Esse fenômeno intensifica-se com o aumento crescente do pH, como pode ser verificado na Figura 3. Em pH 9, a solubilidade para as sementes *in natura* foi em média 61,88%. Para sementes de soja, observa-se, geralmente, uma solubilidade protéica superior a 90%, neste mesmo pH (SMITH E CIRCLE, 1972; SGARBIERI, 1996). Porém, para farinha desengordurada de amaranto, em pH 9 verificou-se 55,30% das proteínas solúveis (AULER, 2002). Estas menores solubilidades protéicas em pH 9, observadas tanto para sementes de cupuaçu quanto

para o amaranto, implicam em uma maior perda de proteínas na fase de solubilização das mesmas, por ocasião do processamento para obtenção de isolados protéicos.

A Figura 3 mostra que na farinha desengordurada obtida das amêndoas fermentadas de cupuaçu, o pI ficou um pouco abaixo do pH verificado para as sementes, em torno do pH 3. Observou-se também, uma ligeira redução na solubilidade, em todos os pHs estudados, quando comparada à curva obtida das sementes de cupuaçu, indicando uma possível influência do processo fermentativo sobre a solubilidade das proteínas.

Verificou-se, para as amêndoas fermentadas e torradas, uma menor solubilização de proteínas quando comparada às sementes e às amêndoas somente fermentadas. Isso indica, provavelmente, que o processo térmico de torração tenha causado uma desnaturação de proteínas, a qual foi observada através da redução em sua solubilidade, que foi em média de 32,96% em pH 9, pouco mais da metade daquela observada para o produto obtido das sementes, 61,88%.

Embora tenha-se observado no presente estudo, uma maior insolubilização protéica nas amêndoas de cupuaçu torradas, em trabalho realizado por Lopes (2000), relata-se um aumento significativo do valor biológico da proteína do cupuaçu quando este foi submetido à torração.

#### 4. CONCLUSÕES

- O ponto isoelétrico das proteínas de sementes de cupuaçu situou-se na faixa de pH 3,5, sendo que nestas condições apresentaram ainda uma solubilidade protéica de 16,90%.

- Em pH 9, máximo estudado, a solubilidade das proteínas da sementes foi de 61,88%, considerada baixa .

- As proteínas de semente de cupuaçu apresentaram menor solubilidade que outras proteínas vegetais nas faixas de pH de obtenção de isolados protéicos (pH 9) e maior solubilidade nas faixas do ponto isoelétrico, sugerindo um menor rendimento na obtenção de concentrados e isolados protéicos de sementes de cupuaçu.

- No respectivo ponto isoelétrico, as amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas torradas, apresentaram uma solubilidade protéica de 16,28 e 10,28%, respectivamente.

- Em pH 9 observou-se uma solubilidade de 58,22% para as amêndoas fermentadas e 32,96% para as amêndoas fermentadas torradas, verificando-se que o tratamento térmico provocou uma desnaturação de proteínas, com conseqüente redução da solubilidade protéica.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA SORIA, L. A. **Estudos do valor nutritivo e da fração albumina dos extratos de proteína solúvel de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) em função do grau de torração.** 1999. 127p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 16 ed. Washington: Worwitz, W., 1997.

ARAGÃO, C. G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o processo fermentativo.** 1992. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1992.

AULER, F. **Produção e caracterização de farinhas e concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus cruentus*).** 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BAGNIS, C. G. **Isolado protéico de girasol – obtenção e propriedades.** 1984. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.

BIEHL, B.; BRUNNER, E.; PASSERN, D.; QUESNEL, V. C.; ADOMAKO, D. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, n. 7, p. 583-598, 1985.

CÂNDIDO, L. M. B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais.** 1998. 207p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

CHAU, C. F.; CHEUNG, C. K.; WONG, Y. S. Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2500-2503, 1997.

CONCEX – Conselho Nacional do Comércio Exterior (Brasil). Resolução nº42, Rio de Janeiro. 1968. 9p.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 1-13, 2000.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fibre analysis. **Agri-handbook**: Agriculture Reserch 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 la preparation du cacao. **Café Cacao Thé**, v. 22, p. 303-316, 1978.

KINSELLA, J. E. Functional properties in foods: a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton: CRC Press, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento.** 2000. 112p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MARCHESE, D. A. **Estudo do processo de obtenção do pó de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) alcalinizado.** 2002. 139p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu**

**(*Theobroma grandiflorum* Schum).** 2001. 164p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MEURSING, E. H. **Cocoa powders for industrial processing.** 3.ed. Koogaam de Zaam: Cacaofabriek De Zaan B. V., 1983. 126p.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGESTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. M.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, Nov/Dec. 1985.

QUEIROZ, M. B. **Estudo dos parâmetros de torração de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).** 1999. 104p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações – modificações.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.

SILVA, J. B.; BORA, P. S.; NETO, V. Q. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) modificado por acetilação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 263-269, 1997.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. Soybeans: chemistry and technology. Vol. I. Avi Publishing Company Inc., 1972. 294p.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).** 1999. 114p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

ZAMALLOA, C. W. A. **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.** 1994. 121p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.



## CAPÍTULO 3

### PROTEÍNAS DA SEMENTE DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum) E ALTERAÇÕES DEVIDAS À FERMENTAÇÃO E TORREFAÇÃO.

Ana Vânia Carvalho<sup>1</sup>; Nelson Horacio Pezoa García<sup>1</sup>; Jaime Amaya Farfán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP - C.P. 6121 – CEP: 13083-70

<sup>2</sup>Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição - UNICAMP - Campinas - SP- Brasil.

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações da proteína da semente, amêndoa fermentada e amêndoa torrada de cupuaçu, mediante a análise dos perfis eletroforéticos, os aminogramas característicos e fracionamento da proteína em diferentes solubilidades. A fermentação e a torração provocaram uma ligeira redução nos teores de proteína total e aminoácidos totais, quando comparadas às sementes não submetidas a essas etapas do processamento. Observou-se para a semente e a amêndoa fermentada, a presença de quatro bandas protéicas principais de 15,5, 20,4, 27,1 e 33,6kDa. Para as amêndoas que foram submetidas ao processo de fermentação e em seguida à torração, observou-se a presença de uma única banda protéica forte, com peso molecular aparente de 21,0kDa. As extrações para fracionamento das proteínas em diferentes solubilidades não resultaram em frações protéicas puras. Observou-se a presença de quatro bandas principais em todas as frações protéicas isoladas, sendo a banda de peso molecular próximo a 21,1kDa a mais abundante em todos os casos. Esta banda é aparentemente muito semelhante à fração albumina do cacau, que apresenta peso molecular aparente de 21,3kDa.

**Palavras-chave:** *Theobroma grandiflorum*, frações protéicas, eletroforese.

## SUMMARY

The objective of this study was to characterize the protein changes in cupuacu seeds, fermented beans and roasted beans, by means of analysis of the electrophoresis profiles, aminograms and protein fractionations based on solubility. Fermentation and roasting promoted a slight reduction in the total protein and amino acid contents. The seeds and fermented beans presented four main protein bands with 15.5, 20.4, 27.1 and 33.6kDa. The beans which had been submitted to fermentation followed by roasting presented only one strong protein band, with an apparent molecular weight of 21.0kDa. The extractions for protein fractionation based on solubility did not result in pure protein fractions. Four main bands were observed in all isolated protein fractions, the 21.1 kDa band being the predominant one in all cases. This band is apparently very similar to the albumin fraction of cocoa, whose apparent molecular weight is 21.3kDa.

**Key-words:** *Theobroma grandiflorum*, protein fractions, electrophoresis.

## 1. INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro é uma árvore típica da região amazônica, cultivada nos Estados do Pará, Rondônia, Amazonas, Acre e Maranhão, sendo considerada uma das melhores e mais promissoras fruteiras da Amazônia. O cupuaçu vem se destacando como um dos frutos regionais amazônicos de intensa divulgação no território brasileiro e grande potencial para a industrialização. O seu valor econômico está baseado, principalmente, na industrialização e comercialização da polpa, aceita sob a forma de suco, creme, doces e outros. Apesar de constituírem cerca de 20% do peso do fruto e possuírem alto valor nutritivo, as sementes são praticamente descartadas no beneficiamento do fruto. Entretanto a semente é considerada valiosa, pois possui semelhança botânica e química com a semente de cacau, permitindo a sua utilização na fabricação de produtos similares ao chocolate (MARCHESE, 2002). O processo de industrialização das sementes de cupuaçu ocorre de modo semelhante ao das amêndoas de cacau, que inclui as etapas de fermentação, secagem e torração.

A etapa de fermentação das sementes é essencial ao processamento, pois é a responsável pelo desenvolvimento dos precursores e inúmeros compostos de sabor. 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 orgânicos e o calor gerado nos primeiros dias de fermentação, provocam a morte da semente e desencadeiam importantes transformações 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 observa-se aumento do conteúdo de aminoácidos livres, peptídeos e formação de açúcares redutores, sendo essas classes de compostos, conhecidas como os principais precursores do sabor. Brito (2000), estudando amêndoas de cacau, observou que, após 72 horas de fermentação, há aumento significativo de quase todos os aminoácidos livres, com exceção da tirosina e lisina.

O processo de torração das amêndoas possui como principal objetivo o desenvolvimento do sabor característico de chocolate, principalmente pela reação de Maillard, através dos precursores formados durante a fermentação. Lopes (2000) observou que, tanto para o cacau quanto para o cupuaçu, ocorreram elevações significativas nos teores de aminoácidos livres durante a fermentação, verificando-se, também, um consumo relevante durante a torração, evidenciando a importante participação destes na formação do sabor.

Conforme descrito por Osborne (1924), as proteínas podem ser classificadas, quanto à solubilidade, em 4 classes principais: albumina - solúvel em água e em soluções salinas diluídas; globulina - solúvel em soluções diluídas de sais; prolamina - solúvel em soluções alcoólicas; e glutelina - solúvel em solução ácida ou alcalina muito diluída. Para a maioria das monocotiledôneas estudadas, as prolaminas são as principais proteínas da semente, já para as dicotiledôneas, em geral predominam as globulinas (VOIGT, BIEHL e WAZIR, 1993).

Biehl, Wewetzer e Passern (1982) encontraram quatro principais peptídeos no cacau, com pesos moleculares de 12,6, 19, 26 e 44kDa, sendo os peptídeos de 26 e 44kDa originados de proteínas de reserva das sementes. Os autores relatam ainda que os peptídeos das proteínas de reserva são preferencialmente perdidos durante a fermentação

do cacau, sendo estes, possivelmente, a fonte dos precursores para a formação do sabor característico do cacau.

Em estudo realizado por MacDonald, Masters e Pettipher (1994) dois principais peptídeos (20kDa e 44kDa) foram observados em cacau utilizando SDS-PAGE. O polipeptídeo de peso molecular 20kDa corresponde àquele de 19kDa encontrado em estudo anterior realizado por Biehl, Wewetzer e Passern (1982). Embora esta fração represente cerca de 25-39% do total da proteína, ela não é considerada uma proteína de reserva. Outro peptídeo de 13kDa também foi encontrado pelos mesmos pesquisadores e é, provavelmente, idêntico aquele de 12,6kDa. Os autores concluíram que proteinases específicas do cacau são requeridas para causar a hidrólise parcial das proteínas de reserva e assim produzir os precursores do sabor do cacau.

Em cacau, segundo Voigt, Biehl e Wazir (1993) a albumina é a fração protéica predominante, representando 52% do total da proteína da semente e com peso molecular aparente de 19 kDa. Também foram detectadas pelos mesmos autores, quantidades consideráveis de globulina, com pesos moleculares aparentes próximos a 14,5, 31 e 47kDa, perfazendo 43% do total da proteína da semente, as quais são parcialmente perdidas após a fermentação. Esta perda é aparentemente devida à digestão proteolítica seletiva ocorrida durante a fermentação. Não foi detectada pelos autores, porém, a fração prolamina e nem confirmada a existência de glutelina em sementes de cacau.

Em trabalho realizado com cacau por Lerceteau *et al.* (1999), foi observado que a degradação de proteínas ocorre após 2 dias de fermentação e é mais pronunciada durante o terceiro dia, a partir do qual muito pouca degradação da proteína é observada, possivelmente devido ao surgimento de compostos polifenólicos e sua subsequente complexação com as proteínas remanescentes. O teor de proteína total estimado pelo método de Kjeldahl diminuiu para 57% do valor inicial, durante o período de fermentação. O processo de degradação das proteínas, durante a fermentação, é seletivo, sendo que alguns polipeptídeos resistem mais do que outros. Segundo os autores, através da fermentação ocorre o surgimento de peptídeos que são precursores essenciais do aroma do cacau.

O objetivo deste estudo foi caracterizar os principais polipeptídeos da semente de cupuaçu antes e após os processos de fermentação e torração, em função de sua solubilidade e peso molecular, além do perfil aminoacídico destes materiais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Preparo das sementes *in natura***

As sementes foram preparadas na Cooperativa Agrícola Mista de Tomé-Açú. Foi extraída o máximo possível da polpa aderida às sementes, as quais foram secas ao sol em barcaças de madeira, até atingir umidade de 7 a 8%. Posteriormente, na planta piloto da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, foi complementada a secagem até 3,94% em média, em estufa com circulação de ar a 40°C.

### **2.2 Obtenção das amêndoas fermentadas e secas**

As sementes de cupuaçu recém despulpadas e contendo aproximadamente entre 4 e 5% de polpa aderida, foram colocadas em caixa de fermentação T-60, construída de acordo com Grimaldi (1978), com dimensões de 190x120x60cm de altura e espaço entre as tábuas de fundo de 0,2cm, para escoamento de líquido durante o processo fermentativo, seguindo metodologia proposta por Vasconcelos (1999). Após a fermentação, as amêndoas foram secas ao sol em barcaças de madeira, até atingir uma umidade final de 7 a 8%. A secagem foi complementada em estufa com circulação de ar a 40°C, até 3,27% de umidade.

### **2.3 Torração das amêndoas**

O processo de torração foi realizado em torrador elétrico rotativo com capacidade de 250g de amêndoas fermentadas, munido de controle de precisão de temperatura. Em base a estudos anteriores (QUEIROZ, 1999; LOPES, 2000), o tempo de torração estipulado foi de 50 minutos a uma temperatura de 150° C na camisa do torrador, no início do processo.

O processo de torração foi realizado acoplado-se um termômetro digital no interior do torrador, sendo a variação de temperatura medida em intervalos de tempo constantes de 2 minutos, até o término do processo.

## **2.4 Obtenção do material para análises**

As sementes e amêndoas fermentadas secas e amêndoas fermentadas torradas foram quebradas e descascadas manualmente para a remoção da testa (casca) e gérmen, sendo os cotilédones finamente moídos e submetidos à extração da gordura em aparelho de Soxhlet, por 20 horas.

## **2.5 Obtenção das frações protéicas do cupuaçu**

A extração seqüencial das proteínas foi realizada como descrito para aveia por Pedó (1996). Porções de 20g de semente desengordurada de cupuaçu foram submetidas à extração por 1 hora em solução de NaCl 1M (1:10, p/v), sob agitação contínua e temperatura de 5°C. A seguir, a suspensão foi centrifugada a 15000xg por 30 minutos a 5°C, obtendo-se o sobrenadante I e o resíduo I.

O sobrenadante I, contendo albuminas e globulinas solúveis em soluções levemente salinas, foi dialisado contra água destilada por 48 horas, onde a redução da força iônica do meio induziu à precipitação das globulinas. Após centrifugação do dialisado, o sedimento (fração globulina) e sobrenadante (fração albumina) foram liofilizados.

O resíduo I foi ressuspensionado em etanol a 70%, agitado por uma hora na temperatura ambiente e centrifugado a 15000xg por 30 minutos à temperatura de 5°C. Após a centrifugação foram obtidos o sobrenadante II e o resíduo II. O sobrenadante, após ser liofilizado, constituiu a fração prolamina.

O resíduo II foi ressuspensionado em solução de dodecil sulfato de sódio 0,5%, mais 2-mercaptoetanol 0,6% em pH 7,6 e agitado por uma hora na temperatura ambiente. Após centrifugação a 15000xg por 30 minutos a 5°C, obteve-se o sobrenadante III e o resíduo III. O sobrenadante, após ser liofilizado, constituiu-se na fração glutelina.

O resíduo III, contendo basicamente amido, proteínas insolúveis e substâncias da fração fibra alimentar foi liofilizado e posteriormente analisado juntamente com as demais frações.

## **2.6 Determinação do teor de proteína nas sementes, amêndoas fermentadas, amêndoas torradas e nas frações protéicas**

O teor de proteína foi determinado pelo método semi micro Kjeldahl, baseado na hidrólise e posterior destilação da amostra, de acordo com o método 31.1.08 da AOAC (1997).

## **2.7 Perfil de aminoácidos da semente, amêndoa fermentada e amêndoa torrada**

### **2.7.1 Composição em aminoácidos totais**

Foi determinada por hidrólise ácida da amostra desengordurada, com HCl 6 N a 110°C, à vácuo, por 22 horas. A amostra foi recuperada em diluente de citrato de sódio pH 2,2, marca Pickering (SPACKMAN *et al.*, 1958).

As determinações foram feitas utilizando CLAE TSP – Thermo Separation Products (Riviera Beach, Estados Unidos), com bomba degaseificadora, acoplada a um módulo de pré-reação Pickering Laboratories PCX 3100 post column reaction module (Mountain View, Canadá), operando com detector de UV, nas faixas de 440 a 570 nm, modelo Spectro System UV2000. Foi utilizada coluna analítica Pickering Laboratories 1193250 (Na<sup>+</sup> 8µm, 3mm ID x 250mm) acoplada a uma pré-coluna Pickering Laboratories 1192020 (Na<sup>+</sup> 8µm, 2mm ID x 20mm). Soluções de Na (3,15; 7,4 e 0,2N) foram utilizadas com um fluxo de 0,3mL/min a 55°C na coluna e 130°C no reator.

### **2.7.2 Triptofano**

O aminoácido triptofano foi determinado após hidrólise enzimática com pronase, a 40°C, por 24 horas, seguida de reação colorimétrica, na ausência de luz, com dimetilamino benzaldeído (DAB) e nitrito de sódio, e posterior leitura em espectrofotômetro, a 540nm (SPIES, 1967).

## 2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A determinação do perfil eletroforético das proteínas da semente, amêndoa fermentada, amêndoa torrada e frações protéicas foi realizada de acordo com Laemmli (1970), com algumas modificações, utilizando-se o Sistema Mini- Protean II com fonte Bio Rad (Oregon, Estados Unidos). As amostras (0,4% de proteína) foram dispersas em 1 mL de tampão contendo 42,5% de água destilada, 12,5% de Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), 20% de glicerol, 20% de SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,1% de bromofenol, aquecidas à 95°C por 5 minutos e após resfriamento, alíquotas de 5 $\mu$ L de cada amostra foram aplicadas no gel. Utilizou-se o gel de separação a 12% e o gel de empilhamento a 4%. Após a corrida, os géis foram mantidos em solução corante de Brilliant Blue G a 0,1% em ácido fosfórico por 24 horas e a seguir descorados em água destilada.

Os pesos moleculares da proteína foram determinados utilizando-se o padrão Pharmacia (17-0446-01): fosforilase b (97kDa), albumina sérica bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4kDa).

A densitometria dos géis foi realizada em densitômetro Sharp JX 330, empregando o *software* Image Master (Pharmacia) (Upsala, Suécia), para calcular os pesos moleculares aparentes de cada banda comparando-os à proteína-padrão.

## 2.9 Eletroforese em sistema SDS-PAGE-tricina

Proteínas e oligopeptídeos com massa molecular abaixo de 14kDa não apresentam boa resolução em sistema SDS-PAGE, como descrito por Laemmli (1970) e também em sistema de gradiente de gel.

O procedimento descrito por Schagger e Jagow (1987), no qual o íon carregador, a glicina, do sistema de Laemmli é substituído por tricina, apresenta boa resolução para peptídeos na faixa de 1 a 100kDa. Além disso, são empregados três géis: gel de separação, gel espaçador e gel de empilhamento.

Assim, o perfil eletroforético dos peptídeos de peso molecular inferior a 14kDa foi realizado de acordo com Schagger e Jagow (1987), utilizando-se o gel de separação a 16,5% de acrilamida e 3% de bis-acrilamida, o gel espaçador a 10% de acrilamida e 3% de bis-acrilamida e o gel de empilhamento a 4% de acrilamida e 3% de bis-acrilamida. Após a corrida, os géis foram

mantidos em solução corante de Brillhante Blue G a 0,1% em ácido fosfórico por 24 horas e a seguir descorados em água destilada.

Os pesos moleculares da proteína foram determinados utilizando-se o padrão Pharmacia (80-1129-83): globulina I+II (14404Da), globulina I+III (10700Da), globulina I (8159Da), globulina II (6214Da), globulina III (2512Da). A densitometria dos géis foi efetuada em densitômetro Sharp JX 330, empregando o *software* Image Master (Pharmacia) (Upsula, Suécia) para calcular os pesos moleculares aparentes de cada banda, em relação à proteína-padrão.

### **2.10 Análises estatísticas**

Os resultados das várias características avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas, comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SAS 8.0 (Statistical Analysis System).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Eletroforese das frações isoladas da semente de cupuaçu**

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios da quantidade de proteína extraída e teor protéico de cada uma das frações obtidas da tentativa de fracionamento da proteína de cupuaçu, a partir de 20g de farinha desengordurada. É pertinente ressaltar que as extrações não resultaram em frações protéicas puras, sendo cada uma das frações corrigida pelo fator de pureza correspondente (teor de proteína da amostra ou resíduo); ou seja 54,15 para a fração albumina, 42,81 para a fração globulina, 11,87 para a fração prolamina, 17,92 para a fração glutelina e 20,51 para o resíduo III.

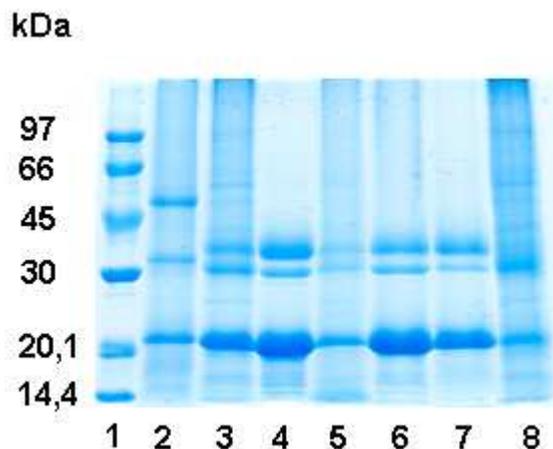
**Tabela 1** Quantidade de proteína extraída (PE) e teor protéico (TP) de cada uma das frações isoladas no fracionamento da proteína de semente de cupuaçu, a partir de 20g de farinha desengordurada.

	Frações protéicas				
	Albumina	Globulina	Prolamina	Glutelina	Resíduo III
Teor de proteína na amostra (%)	54,15 ± 0,22	42,81 ± 0,17	11,87 ± 0,13	17,92 ± 0,17	20,51 ± 0,23
Proteína extraída (%)	3,5 ± 0,11	0,65 ± 0,10	2,75 ± 0,83	1,50 ± 0,19	11,70 ± 0,44

O perfil eletroforético e a descrição dos pesos moleculares de cada uma das frações isoladas no fracionamento da proteína de semente de cupuaçu estão apresentados na Figura 1 e Tabela 2, respectivamente.

Foi realizado a eletroforese de semente de cacau, juntamente com a semente de cupuaçu e as frações protéicas obtidas a partir da semente de cupuaçu (Figura 1 e Tabela 2), a fim de que se pudesse fazer melhores comparações entre as duas espécies.

Observou-se a presença de quatro bandas principais em todas as frações protéicas isoladas, com pesos moleculares próximos a 16,1, 21,2, 34,8 e 40,5kDa, sendo a banda de peso molecular próximo dos 21,1kDa a mais abundante em todos os casos. Esta banda é aparentemente muito semelhante à da fração albumina do cacau, que apresenta peso molecular aparente de 21,3kDa. Notou-se ainda, na fração tida como globulina, a presença de duas bandas fracas com pesos moleculares aparentes de 28,3 e 63,6kDa. Para o resíduo III, verificou-se, além das bandas presentes nas demais frações, a presença de quatro bandas com pesos moleculares maiores, as quais estão presentes também na farinha desengordurada.



**Figura 1** Perfil eletroforético das frações protéicas de cupuaçu, em gel de poliacrilamida - SDS. Coluna 1: padrão Pharmacia (17-0446-01); coluna 2: semente de cacau; coluna 3: semente de cupuaçu; coluna 4: albumina; coluna 5: globulina; coluna 6: prolamina; coluna 7: glutelina; coluna 8: resíduo III.

**Tabela 2** Pesos moleculares aparentes (kDa) das proteínas da semente de cacau, semente de cupuaçu e das frações isoladas de semente de cupuaçu, calculados por densitometria.

Espécime						
Cacau	cupuaçu	Albumina S-I	Globulina R-I	Prolamina S-II	Glutelina S-III	Resíduo R-III
17,7	16,2	16,1	16,4	16,2	17,1	17,3
21,3	21,7	21,1	21,5	21,5	22,2	22,3
*	27,8	*	28,3	*	*	29,2
37,3	35,3	34,8	35,6	35,6	36,5	35,8
55,3	40,5	39,5	41,4	41,7	42,3	*
*	45,9	*	*	*	*	47,9
*	54,9	*	*	*	*	56,9
*	61,8	*	63,6	*	*	64,6
*	88,9	*	*	*	*	90,9

\* bandas não detectadas

Como pode ser observado do perfil eletroforético das proteínas (Figura 1), o fracionamento realizado neste estudo resultou em frações protéicas bastante impuras, razão pela qual poucas conclusões podem ser feitas com relação às frações protéicas do cupuaçu.

Voigt, Biehl e Wazir (1993), estudando as principais proteínas do cacau, encontraram que as frações albumina e globulina se encontravam presentes em proporções de 52 e 43% do total das proteínas da semente, respectivamente. A mais importante albumina é um polipeptídeo com peso molecular aparente de 19kDa, presumivelmente idêntica àquela de 21kDa já relatada por outros autores estudando o cacau e cuja seqüência de aminoácidos já foi reportada (SPENCER e HODGE, 1991).

Já a fração globulina contém polipeptídeos com pesos moleculares aparentes de 47, 31 e 14,5kDa e possui globulinas somente do tipo vicilina. Porém não foi detectada a fração prolamina e nem confirmada a existência de glutelina. Entretanto, em trabalhos realizados anteriormente (ZAK e KEENEY, 1976a,b), a fração prolamina foi identificada em sementes de cacau e a proporção da fração glutelina foi consideravelmente maior ao valor encontrado por Voigt, Biehl e Wazir (1993), que foi cerca de 5% do total das proteínas.

### **3.2 Efeito da fermentação e torração no perfil de aminoácidos da semente de cupuaçu**

Os perfis de aminoácidos totais encontrados na semente, amêndoa fermentada e amêndoa torrada, bem como o teor de proteína total, estão apresentados na Tabela 3.

Os valores encontrados para o teor de proteína total (Tabela 3) estão próximos àqueles relatados por Aragão (1992), Queiroz (1999) e Lopes (2000). Nas sementes não fermentadas, esses teores encontram-se superiores quando comparado ao material submetido à fermentação e àquele submetido à fermentação e torração. Vasconcelos (1999) verificou que o teor de proteína total nas sementes de cupuaçu varia ligeiramente durante a fermentação, sendo observado um pequeno decréscimo. Já Lerceteau *et al.* (1999), estudando as proteínas do cacau durante o processo de fermentação, observaram que o teor total de proteína diminuiu para 57% do valor inicial durante o período de fermentação.

**Tabela 3** Composição em aminoácidos totais (mg/100mg de farinha desengordurada seca) das sementes, amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, comparadas com sementes de cacau.

Aminoácidos	Amostras			
	Semente de cacau (Lopes, 2000)	Semente de cupuaçu	Amêndoa fermentada de cupuaçu	Amêndoa torrada de cupuaçu
Ac. aspártico	2,74	3,24 ± 0,07	3,05 ± 0,09	3,05 ± 0,04
Treonina	1,03	1,55 ± 0,01	1,21 ± 0,04	1,14 ± 0,03
Serina	1,23	1,39 ± 0,09	1,26 ± 0,06	1,17 ± 0,06
Ac. glutâmico	4,33	3,88 ± 0,03	2,99 ± 0,08	2,96 ± 0,09
Prolina	0,95	1,16 ± 0,06	1,10 ± 0,04	1,03 ± 0,18
Glicina	1,06	1,51 ± 0,01	1,29 ± 0,13	1,25 ± 0,02
Alanina	1,20	1,25 ± 0,01	0,97 ± 0,06	0,95 ± 0,02
Cistina	0,25	0,61 ± 0,01	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,05
Valina	1,42	1,90 ± 0,04	1,34 ± 0,08	1,22 ± 0,01
Metionina	0,31	0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,05 ± 0,06
Isoleucina	0,92	1,20 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,85 ± 0,02
Leucina	1,63	2,21 ± 0,04	1,63 ± 0,04	1,60 ± 0,04
Tirosina	0,61	0,97 ± 0,02	0,92 ± 0,04	0,86 ± 0,03
Fenilalanina	0,95	1,19 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,81 ± 0,01
Lisina	3,96	1,39 ± 0,04	0,96 ± 0,10	0,88 ± 0,01
Amônia	-	0,40 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,29 ± 0,02
Histidina	0,50	0,38 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,23 ± 0,03
Arginina	1,87	1,48 ± 0,04	1,20 ± 0,08	1,06 ± 0,01
Triptofano	-	0,34 ± 0,00	0,33 ± 0,02	0,26 ± 0,01
Total	24,96	26,17 ± 0,12a	21,15 ± 0,36 ab	20,12 ± 0,22 b

Médias com letras iguais, em uma mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As etapas de fermentação e torração provocaram uma ligeira redução nos teores de aminoácidos totais, quando comparado às sementes que não foram submetidas a essas etapas de processamento. Vasconcelos (1999), estudando as transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu, observou uma pequena redução no teor da maioria dos aminoácidos durante o processo fermentativo, à exceção dos aminoácidos serina, glicina, metionina, fenilalanina e arginina que apresentaram uma suave elevação. Já Brito (2000), estudando amêndoas de cacau encontrou que, apesar das intensas modificações ocorridas durante a fermentação, o teor de aminoácidos totais permaneceu praticamente inalterado ao longo do processo fermentativo.

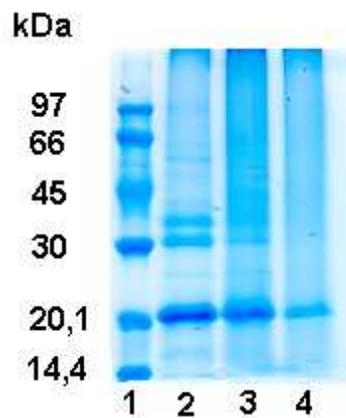
Lopes (2000) relata que as etapas de fermentação e torração não provocaram tantas alterações nos perfis de aminoácidos totais em relação à semente não fermentada, tanto para o cupuaçu como para o cacau. Porém, em relação aos teores de aminoácidos livres, o autor observou elevações significativas quando as sementes de cupuaçu foram submetidas à etapa de fermentação, assim como consumo relevante durante o processo de torração, evidenciando a importante participação destes na formação do sabor.

É interessante ressaltar que a destruição de alguns aminoácidos durante a hidrólise ácida limita sua quantificação para a avaliação do ponto de vista nutricional, pois alguns aminoácidos (triptofano, cistina, treonina, asparagina, glutamina) podem ser parcial ou totalmente destruídos durante essa etapa.

Lopes (2000), estudando amêndoas de cacau e cupuaçu, observou que as proteínas do cupuaçu possuem composição aminoacídica que supera a composição do cacau no que diz respeito aos aminoácidos leucina, isoleucina e tirosina, que são limitantes no cacau. A autora ainda relata um maior valor biológico para as proteínas do cupuaçu em comparação às proteínas do cacau, as quais promoveram menor crescimento em ratos. Assim, o maior valor nutritivo da proteína do cupuaçu pode ser explicado pela não limitância de alguns aminoácidos (leucina, isoleucina e tirosina), porém não deve ser descartada a possibilidade da presença ou ausência de outras substâncias, ou mesmo de características físico-químicas peculiares nas proteínas do cupuaçu.

### 3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE e em gel de poliacrilamida -SDS-tricina, da semente, amêndoa fermentada e amêndoa fermentada e torrada

O perfil eletroforético das proteínas, a descrição de seus pesos moleculares e a área de cada banda protéica, da semente, da amêndoa fermentada e da amêndoa torrada de cupuaçu estão apresentados na Figura 2, Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente.



**Figura 2** Perfil eletroforético da proteína da semente, da amêndoa fermentada e da amêndoa fermentada e torrada de cupuaçu, em gel de poliacrilamida-SDS. Coluna 1: padrão Pharmacia (17-0446-01); Coluna 2: semente de cupuaçu; coluna 3: amêndoa fermentada de cupuaçu; Coluna 4: amêndoa torrada de cupuaçu.

Observou-se para a semente de cupuaçu, a presença de um total de nove bandas protéicas, sendo quatro bandas principais, com pesos moleculares aparentes próximos a 15,5, 20,4, 27,1 e 33,6kDa (Figura 2). Notou-se também a presença de mais cinco bandas fracas de maior peso molecular (38,7, 44,3, 54,4, 60,8 e 83,4kDa).

Para a amêndoa submetida à fermentação (Figura 2), verificou-se também a presença de quatro principais bandas protéicas, com pesos moleculares aparentes similares ao observado para a semente, 15,5, 20,4, 27,1 e 33,6kDa e apenas uma banda tênue de maior peso molecular, próximo a 39,2kDa.

**Tabela 4** Pesos moleculares aparentes (kDa) das proteínas da semente, amêndoa fermentada e amêndoa fermentada e torrada de cupuaçu, calculados através da densitometria do gel .

Semente	Amêndoa fermentada	Amêndoa torrada
15,5	15,9	*
20,4	20,7	21,1
27,0	27,2	*
33,6	34,0	*
38,7	39,2	*
44,3	*	*
54,4	*	*
60,8	*	*
83,4	*	*

\* abaixo do limite de quantificação

**Tabela 5** Área de cada banda protéica relativa à área total da proteína da semente, da amêndoa fermentada e da amêndoa fermentada e torrada, calculadas a partir da densitometria do gel.

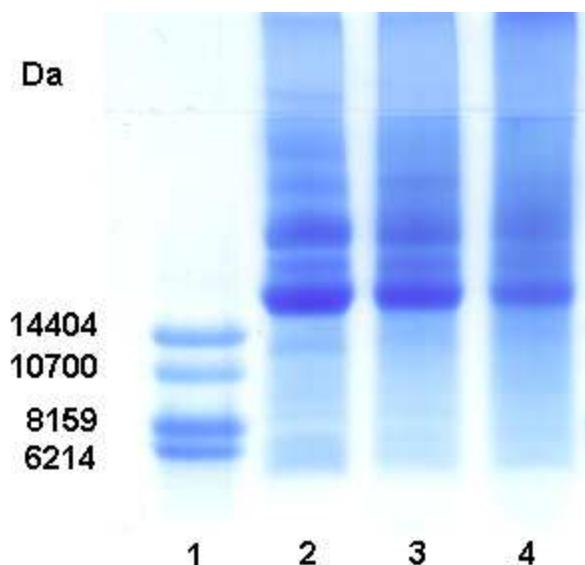
Bandas (PM)	Bandas (%)		
	Semente	Amêndoa fermentada	Amêndoa torrada
15,5 - 15,9	9,79	10,79	*
20,4 - 21,1	40,77	47,99	100,00
27,0 - 27,2	4,92	23,56	*
33,6 - 34,0	14,47	10,02	*
38,7 - 39,2	11,57	7,64	*
44,3	5,43	*	*
54,4	4,09	*	*
60,8	6,61	*	*
83,4	2,34	*	*

\* abaixo do limite de quantificação

Para as amêndoas que foram submetidas ao processo de torração, observou-se, no perfil eletroforético das proteínas (Figura 2), a presença de uma única banda protéica forte com peso molecular aparente de 21,0kDa. Para as demais bandas seu desaparecimento pode ser atribuído provavelmente à ocorrência de reações durante o processo de torração, como a reação de Maillard, complexação de proteínas com compostos polifenólicos, além da possível formação de diversos polímeros. Estas várias reações que ocorrem durante a torração podem produzir insolubilização e menor extratibilidade da proteína, por ocasião do preparo da amostra a ser aplicada no gel. Além disso, não se descarta a possibilidade de que as reações tenham produzido polímeros de grande peso molecular, incapazes de penetrar no gel, sendo excluídos da corrida eletroforética.

Pettipher (1990), estudando a extração e parcial purificação das proteínas de reserva do cacau encontrou, através da SDS-PAGE, a presença de duas proteínas de reserva, S1 e S2, com pesos moleculares aparentes de 48 e 28kDa, respectivamente. Estes pesos moleculares estão próximos aos encontrados por Biehl, Wewetzer e Passern (1982), que foram de 44 e 26kDa. Segundo Pettipher (1990), estas proteínas de reserva estão presentes nas sementes, porém estão ausentes nas folhas e nas sementes germinadas. A densitometria do gel mostrou que as proteínas de reserva S1 e S2 representam aproximadamente 19 e 17% do total da proteína, respectivamente. Segundo o mesmo autor, uma outra importante proteína, a qual assumiu-se não ser uma proteína de reserva, uma vez que ela não foi utilizada durante a germinação, representa cerca de 20% do total de proteína. Como ocorreu na germinação, durante a fermentação do cacau, observou-se uma perda total das proteínas de reserva S1 e S2, indicando que elas são preferencialmente degradadas por ocasião do processo fermentativo.

Já Lerceteau *et al.* (1999), estudando as proteínas da semente de cacau, encontraram cinco grupos predominantes de polipeptídios, com pesos moleculares de 47,0, 31,0, 21,0, 16,5 e 14,5kDa. Os autores relatam que, ao final da fermentação, os polipeptídios com pesos moleculares de 47,0, 31,0 e 14,5kDa estavam ausentes, indicando que estes, provavelmente, sejam polipeptídios de armazenamento e que foram clivados em subunidades menores.



**Figura 3** Perfil eletroforético dos peptídeos da semente, da amêndoa fermentada e da amêndoa fermentada e torrada de cupuaçu, em gel de poliacrilamida-SDS-tricina. Coluna 1: padrão Pharmacia (80-1129-83); Coluna 2: semente de cupuaçu; Coluna 3: amêndoa fermentada de cupuaçu; Coluna 4: amêndoa torrada de cupuaçu.

**Tabela 6** Pesos moleculares aparentes (kDa) dos peptídeos da semente, amêndoa fermentada e amêndoa fermentada e torrada de cupuaçu, calculados da densitometria do gel.

Pesos moleculares (kDa)		
Semente	Amêndoa fermentada	Amêndoa torrada
7,3	7,2	*
8,6	8,6	*
10,0	10,2	*
11,3	12,6	*
13,8	14,4	*

\* abaixo do limite de quantificação

Observou-se no perfil eletroforético dos peptídeos da semente e da amêndoa fermentada (Figura 3), a presença de cinco bandas fracas com pesos moleculares aparentes próximos a 7,2, 8,6, 10,1, 12,0 e 14,0kDa (Tabela 6). Já nas amêndoas submetidas à fermentação e torração, houve diminuição progressiva de todas as bandas, especialmente das de maior peso molecular.

Estas bandas não foram detectadas na densitometria do gel, suspeitando-se que, provavelmente estes peptídeos tenham participado da reação de Maillard, formando polímeros de maior peso molecular, durante o processo de torração.

Voigt, Biehl e Wazir (1993), estudando as principais proteínas do cacau durante o processo fermentativo, observaram uma perda quase total das globulinas, indicando uma digestão proteolítica seletiva, uma vez que a fração albumina praticamente não sofreu alteração quantitativa. Os autores sugerem que as globulinas, possivelmente, sejam a fonte dos precursores para a formação do sabor característico do cacau.

Amin, Jinap e Jamilah (1997), estudando sementes de cacau também observaram a degradação da fração vicilina (47,1 e 39,2kDa) durante a fermentação do cacau, sendo a fração albumina a mais resistente à proteólise. Ao final da fermentação, o polipeptídeo de 39,2kDa foi completamente degradado, porém o de peso molecular de 47,1kDa ainda estava presente em baixa intensidade, indicando que ambos são importantes para a formação de precursores do sabor do cacau. A fração de peso molecular 21kDa tem sido caracterizada como um inibidor de tripsina (SPENCER e HODGE, 1991; TAI *et al.*, 1991; DODÔ, FRITZ e FURTEK, 1992).

#### 4. CONCLUSÕES

- Os processos de fermentação e torração provocaram uma ligeira redução nos teores de proteínas, quando comparado à semente *in natura*.
- As sementes de cupuaçu apresentaram boa composição aminoacídica, com teores em geral superiores aos encontrados para sementes de cacau, por outros autores.
- As etapas de fermentação e torração provocaram uma ligeira redução nos teores de aminoácidos totais, quando comparado às sementes que não foram submetidas a essas etapas de processamento.
- Para as proteínas da semente e amêndoa fermentada de cupuaçu, verificou-se a presença de quatro bandas eletroforéticas principais, com pesos moleculares próximos a 15,5, 20,4, 27,1 e 33,6kDa. Nas amêndoas fermentadas e torradas, observou-se perfil eletroforético das proteínas contendo somente uma banda protéica forte, com peso molecular aparente de 21,0kDa. As demais bandas aparentemente desapareceram durante o processamento. Observou-se também para sementes de cacau, a presença de quatro bandas protéicas principais, com pesos moleculares próximos a 17,7, 21,3, 37,3 e 55,3kDa.

- As extrações para fracionamento das proteínas em diferentes meios de solubilidades resultaram em frações protéicas impuras. A presença de quatro bandas principais em todas as frações protéicas isoladas (16,1, 21,2, 34,8 e 40,5kDa) foi observada, sendo a banda de peso molecular próximo a 21,1kDa a mais abundante em todos os casos. Esta banda é muito semelhante à da fração albumina do cacau, que apresenta peso molecular aparente de 21,3kDa.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Washington: Worwitz, W., 1997.

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

ARAGÃO, C. G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o processo fermentativo**. 1992. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1992.

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

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**. 2000. 134p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

DODO, H. W.; FRITZ, P. J.; FURTEK, D. B. A cocoa 21 kilodalton seed protein has trypsin inhibitory activity. **Café Cacao Thé**, v. 36, p. 279-284, 1992.

GRIMALDI, J. Les possibilités d'amélioration des techniques d'écabossage et de fermentation dans le processus artisanal de la préparation du cacao. **Café Cacao Thé**, v. 22, p. 303-316, 1978.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LERCETEAU, E.; ROGERS, J.; PÉTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 4, p. 619-625, 1999.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. 2000. 112p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MacDONALD, H. M.; MASTERS, K. E.; PETTIPHER, G. L. Partial purification of cocoa seed proteins and studies into the degradation of cocoa storage protein. **Café Cacao Thé**, v. 38, n. 2, p. 119-124, 1994.

MARCHESE, D. A. **Estudo do processo de obtenção do pó de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) alcalinizado**. 2002. 139p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

OSBORNE, T. B. **The vegetable Proteins**. London: Green & Co., 1924.

PEDÓ, I. **Caracterização química e nutricional de novos cultivares de aveia (*Avena sativa*, L.)**. 1996. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

PETTIPHER, G. L. The extraction and partial purification of cocoa storage proteins. **Café Cacao Thé**, v. 34, n. 1, p. 23-26, 1990.

QUEIROZ, M. B. **Estudo dos parâmetros de torração de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**. 1999. 104p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHWAN, R. F. Microbiology of cocoa fermentation: a study to improve quality. In: 12<sup>o</sup> **Conferência Internacional de Pesquisa em Cacau**. Salvador, BA, nov. 1996.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 30, n. 3, p. 1190-1206, June, 1958.

SPENCER, M. E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*. **Planta**, v. 183, p. 528-535, 1991.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 1412-1415, 1967.

TAI, H.; McHENRY, L.; FRITZ, P. J.; FURTEK, D. B. Nucleic acid sequence of a 21kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 16, p. 913-915, 1991.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 1999. 114p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

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

ZAK, D. K.; KEENEY, P. G. Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied to several varieties of cocoa beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 479-482, 1976a.

ZAK, D. K.; KEENEY, P. G. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 483-486, 1976b.





## CAPÍTULO 4

### OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CONCENTRADO E ISOLADO PROTÉICO DE SEMENTES DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum).

Ana Vânia Carvalho; Nelson Horacio Pezoa García; Joyce Kazue Alves Wada

Departamento de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP - C.P. 6121 - CEP 13083-970 -  
Campinas - SP - Brasil.

#### RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é uma fruta típica da região Norte do Brasil, com grande potencial econômico. Atualmente é a polpa que sustenta a produção, industrialização e comercialização desta fruta. A semente, um subproduto da industrialização da polpa, começa a despertar interesse como um produto de alto valor nutricional e com grande potencial de mercado para produtos industrializados. O presente estudo teve como objetivo a produção e caracterização físico-química de farinha, concentrado e isolado protéico de semente de cupuaçu. A farinha, obtida das sementes trituradas e desengorduradas, serviu como matéria-prima para a extração da fração protéica em meio aquoso, obtendo-se o concentrado protéico (precipitação em pH 3,5) e o isolado protéico (solubilização em pH 9 e precipitação em pH 3,5). A farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu foram submetidos às análises de caracterização física, cor e composição centesimal. As sementes de cupuaçu apresentaram a menor solubilidade protéica em pH 3,5, sendo este considerado o ponto isoelétrico das proteínas da semente do cupuaçu. Quanto à coloração, o isolado protéico apresentou-se mais escuro que a farinha e o concentrado, provavelmente devido ao seu processo de obtenção, que pode ter causado reação de Maillard e/ou oxidação de compostos fenólicos. É possível a obtenção de concentrados e isolados protéicos a partir de sementes de cupuaçu, com teores de proteínas de 31,18% e 64,29%, respectivamente.

**Palavras-chave:** semente de cupuaçu, solubilidade de proteínas, concentrado e isolado protéico.

## SUMMARY

Cupuacu (*Theobroma grandiflorum* Schum) is a native fruit from northern Brazil, with great economical potential. Its production chain is currently sustained by the pulp market. The seed, treated as an industrial by-product of pulp, has recently come to public attention as a highly nutritive product with great market potential for industrialized products. The objective of the present work was to study the production and physico-chemical characteristics of the flour, protein concentrate and protein isolate obtained from cupuacu seeds. The flour from ground, defatted seeds, was used to extract the protein fraction in an aqueous medium, obtaining the protein concentrate (precipitated at pH 3.5) and the protein isolate (solubilized at pH 9.0 and precipitated at pH 3.5). The defatted flour, the protein concentrate and the protein isolate were analyzed in terms of their physical characterization, color and chemical composition. The isoelectric point of the cupuacu seeds proteins was pH 3.5. The concentrate presented a protein content of 31.18%, and the isolate, 64.29%. The protein isolate was darker than the flour and the concentrate, probably because of the Maillard reaction and/or enzymatic browning during its production. It was possible to obtain protein concentrates and isolates from cupuacu seeds, with protein contents of 31.18% and 64.29%, respectively.

**Key-words:** cupuacu seeds, protein solubility, protein concentrate, protein isolate.

## 1. INTRODUÇÃO

O cupuaçu é um fruto típico da região Amazônica, sendo muito apreciado devido ao seu sabor bastante exótico e agradável. Apresenta grande potencial para a industrialização, sendo que seu valor econômico atualmente 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 do fruto, ou utilizadas como adubo. Porém, apresentam grande possibilidade de uso não somente para a produção de um produto análogo ao chocolate, mas principalmente como um alimento alternativo com ótimas qualidades nutricionais e funcionais.

Várias preparações de sementes de vegetais são grandemente usadas como ingredientes na indústria de alimentos. A soja tem sido o principal material usado para produção industrial de concentrados e isolados de proteínas, devido, principalmente, a seu alto teor de proteínas e bom

desenvolvimento tecnológico da cultura. Porém, durante os últimos anos, outras sementes têm sido introduzidas com grande potencial para produção de isolados protéicos (TOMOSKOZI *et al.*, 2001).

Além dos concentrados e isolados de proteínas possuem boa qualidade nutricional, estes produtos destacam-se por suas propriedades funcionais como dispersibilidade, emulsificação, ação estabilizante de emulsões, boas características de ligação de água e gordura, geleificação e outras. Estas propriedades são aproveitadas em diversos produtos alimentícios de carne, panificação, etc (LOCKMILLER, 1973).

Segundo Smith e Circle (1972), concentrado protéico é o produto preparado a partir da farinha desengordurada, obtida de grãos de alta qualidade. O processo de obtenção baseia-se na imobilização da maior quantidade das proteínas e solubilização dos carboidratos, sais minerais e outros componentes solúveis contidos na farinha, resultando em um produto com elevado teor de proteína. No caso do concentrado protéico de soja, o teor mínimo de proteína deve ser de 70%.

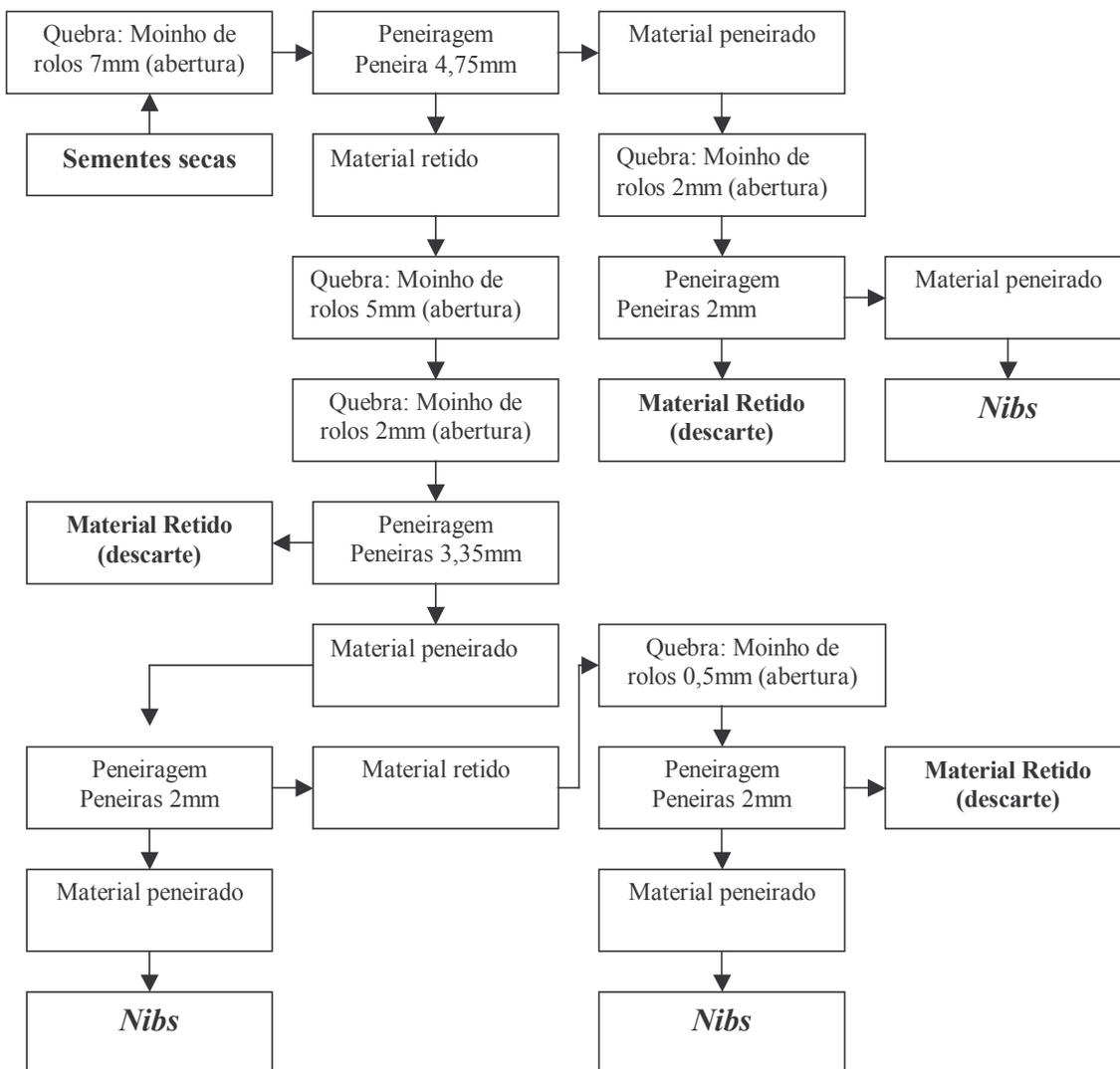
O isolado protéico de grãos é definido como o produto com a maior fração protéica, sendo removidos a maior parte dos componentes não protéicos. No caso de isolado protéico da soja, o produto deve conter no mínimo 90% de proteína na base seca (SMITH e CIRCLE, 1972).

O presente estudo visa o aproveitamento da proteína de sementes de cupuaçu na forma de concentrados e isolados protéicos para formulações alimentares diversas, bem como a sua caracterização físico-química.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima

Foram utilizadas sementes de cupuaçu *in natura* devidamente secas, provenientes da Cooperativa Mista de Tomé-Açu (CAMTA), no Estado do Pará. As sementes foram quebradas em moinho de rolos, segundo metodologia proposta por Vilalba (2003), de acordo com esquema exposto na Figura 1.



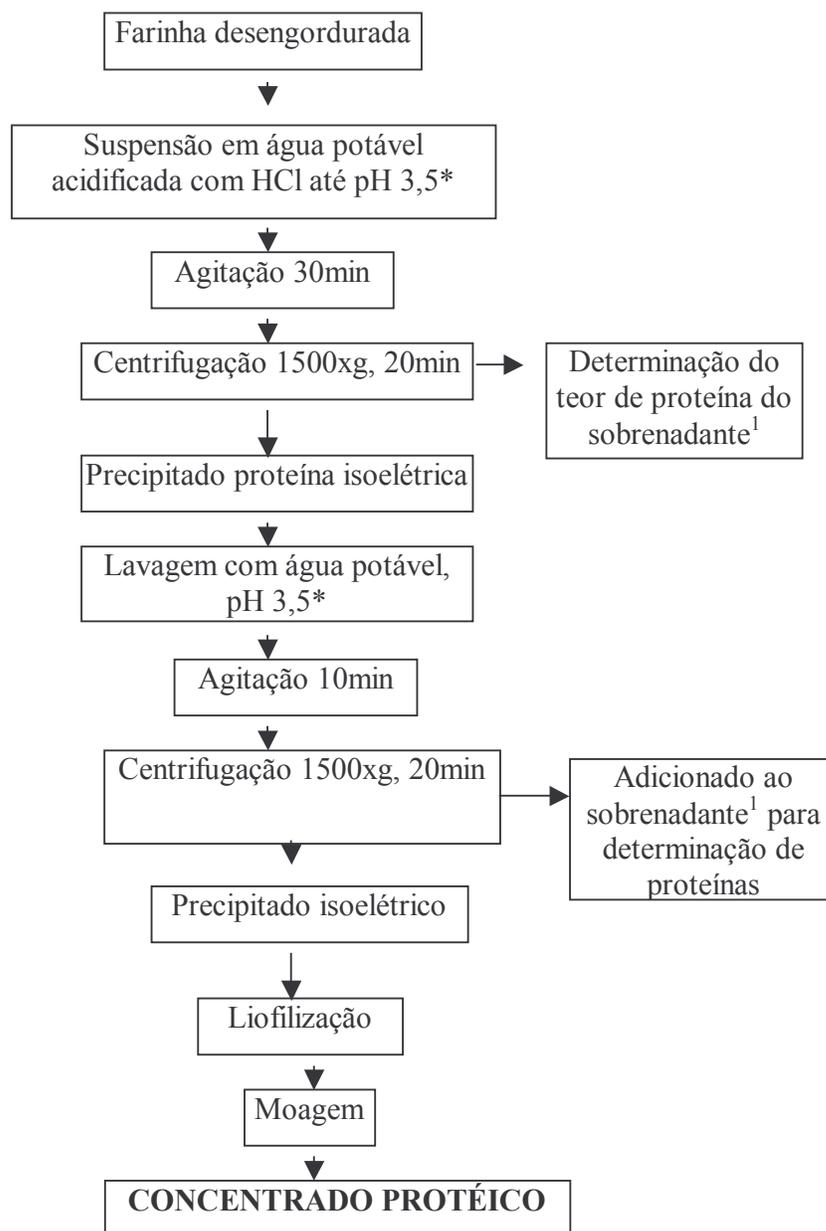
**Figura 1** Fluxograma de quebra das sementes de cupuaçu para obtenção dos *nibs*.

Os *nibs* obtidos foram laminados em um rolo laminador e em seguida submetidos à extração parcial da gordura em prensa hidráulica de discos, utilizando-se pressão gradual até atingir 50 toneladas, em um período de tempo de extração de 50 minutos. Posteriormente foi complementada a extração de gordura utilizando-se o método proposto por Boatright e Hettiarachchy (1995), com algumas modificações. Uma parte do material semi-desengordurado foi misturado com cinco partes de hexano, agitado manualmente por 10 minutos e centrifugado a 1000xg por 10 minutos a 20°C. Após a centrifugação, o hexano contendo a gordura foi separado do precipitado e posteriormente recuperado para ser utilizado em novas extrações. A operação de extração da gordura foi repetida por mais 5 vezes. A seguir, o material desengordurado foi deixado em capela, por 6 horas, e após isso, em estufa com circulação de ar a 30°C, durante 16 horas, para evaporação do hexano. O material desengordurado foi moído até aproximadamente 297µm, obtendo-se a farinha de sementes de cupuaçu, a qual foi utilizada no preparo do concentrado e isolado protéico.

## **2.2 Obtenção do concentrado protéico de semente de cupuaçu**

Durante o procedimento para obtenção do concentrado (Figura 2), realizou-se um monitoramento a fim de se verificar a recuperação de proteínas. Para isso, tomou-se amostras em algumas etapas do processamento, as quais foram analisadas quanto ao teor de proteína.

A farinha desengordurada da semente de cupuaçu foi dispersa em água acidificada com HCl até pH 3,5 (ponto isoelétrico, definido a partir da curva de solubilidade, conforme Capítulo 2), numa relação de 1:15 (m/m). A suspensão foi mantida sob agitação durante 30 minutos e em seguida centrifugada a 1500xg por 20 minutos. O precipitado foi submetido a duas lavagens consecutivas. Após homogeneização dos sobrenadantes obtidos, foram tomadas amostras destes e do precipitado para determinação protéica. O precipitado obtido foi a seguir liofilizado.



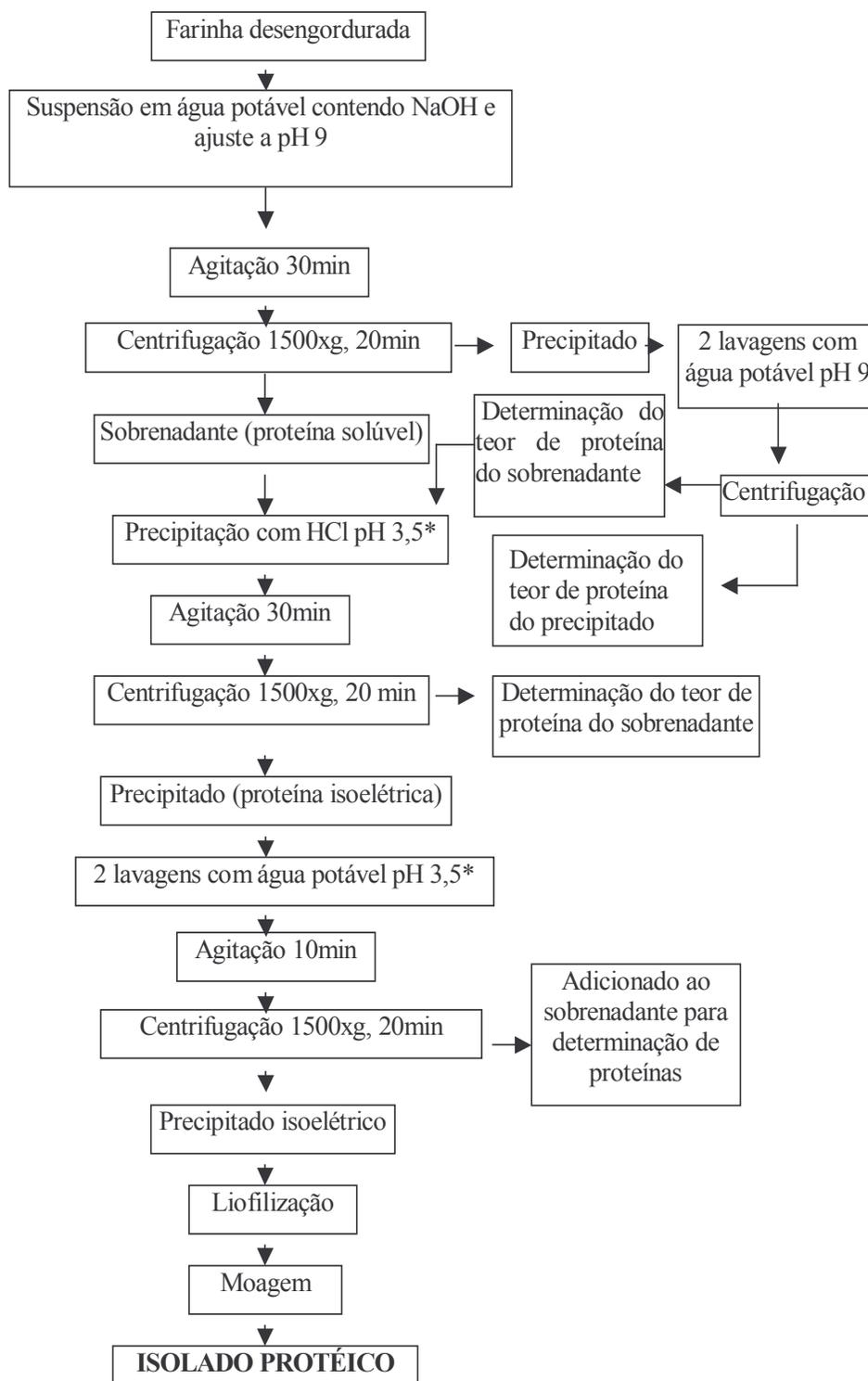
\* pH definido mediante a determinação da curva de solubilidade.

**Figura 2** Esquema do processamento para a obtenção e monitoramento do concentrado protéico de farinha desengordurada de semente de cupuaçu.

### **2.3 Obtenção do isolado protéico de semente de cupuaçu**

Assim como para o concentrado, durante o procedimento para obtenção do isolado (Figura 3), realizou-se também um monitoramento a fim de se verificar a recuperação de proteínas. Para isso, tomou-se amostras em algumas etapas do processamento, as quais foram analisadas quanto ao teor de proteína.

A farinha desengordurada de semente de cupuaçu foi dispersa em água numa relação de 1:15 (m/m) com NaOH suficiente para atingir pH 9,0. A suspensão foi mantida sob agitação durante 1 hora e em seguida centrifugada a 1500xg durante 20 minutos. O precipitado foi submetido a duas lavagens consecutivas em solução alcalina, a fim de se obter a maior recuperação possível de proteínas. Retirou-se amostras do precipitado e dos sobrenadantes para determinação do teor de proteínas. Ao sobrenadante foi acrescentado HCl para obter pH 3,5. Esta suspensão foi mantida sob agitação durante 30 minutos e centrifugada a 1500xg por 20 minutos. O precipitado foi submetido a duas lavagens consecutivas em solução ácida (pH 3,5). Após homogeneização dos sobrenadantes, retirou-se amostras destes e do precipitado para análise do teor de proteínas, sendo o precipitado obtido liofilizado.



\* pH definido mediante a determinação da curva de solubilidade.

**Figura 3** Esquema do processamento para a obtenção e monitoramento do isolado protéico de farinha desengordurada de semente de cupuaçu.

## **2.4 Caracterização física da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu**

### **2.4.1 Granulometria**

Os percentuais das frações com diferentes tamanhos de partículas foram determinados após peneiragem de 100g de farinha num classificador vibratório marca Produtest, utilizando-se peneiras equivalentes a 590, 297, 210, 150 e 105 $\mu$ m. O tempo estabelecido foi de 10 minutos a uma intensidade de vibração correspondente à posição nº 8 do reostato do aparelho.

### **2.4.2 Densidade aparente**

Pesou-se 100g de amostra de cada produto (farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico) em proveta de 500mL e colocadas num vibrador marca Produtest durante 5 minutos, com uma intensidade de vibração correspondente à posição nº 8 do reostato do aparelho. Após esta operação o volume ocupado foi lido e a relação entre a massa por unidade de volume foi considerada como densidade aparente (MEURSING, 1983).

## **2.5 Análise de cor da farinha, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu**

A coloração foi determinada em espectrofotômetro HUNTERLAB/COLORQUEST II. A leitura foi realizada com o aparelho ajustado em reflectância, com especular incluída, utilizando-se o padrão de calibração branco (nº C6299 de 03/96) e cinza (nº C6299 de 03/96). A configuração incluiu iluminante D65 e ângulo 10°. As leituras foram realizadas em sistema CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) a temperatura de 22°C, com uma área de visão de 1 polegada. Utilizou-se cubeta de vidro opticamente limpo de 20mm de caminho óptico.

O parâmetro  $L^*$  está associado à luminosidade das amostras e pode variar de 0 a 100, sendo que valores mais altos de  $L^*$  caracterizam amostras mais claras e valores menores de  $L^*$  (menores que 50) caracterizam amostras mais escuras. A coordenada cromática  $a^*$  está associada à dimensão verde-vermelho; valores positivos de  $a^*$  indicam amostras mais avermelhadas e valores negativos indicam amostras mais esverdeadas. A coordenada cromática  $b^*$  está associada

à dimensão azul-amarelo; valores positivos de  $b^*$  indicam amostras mais amareladas e valores negativos indicam amostras mais azuladas.

## **2.6 Caracterização físico-química da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu.**

A determinação do pH e dos teores de umidade, lipídeos, cinzas, proteínas e acidez titulável total foram realizados de acordo com os métodos da AOAC (1997). O teor de fibras foi determinado utilizando-se o método Acid Detergent Fibre (ADF), segundo Goering e Van Soest (1970).

## **2.7 Análise estatística**

Os resultados das várias características avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas, comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SAS 8.0 (Statistical Analysis System).

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Caracterização física da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu**

A análise estatística detectou diferença significativa entre a densidade aparente dos três materiais, a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico. Para a farinha de cupuaçu desengordurada crua, utilizada como matéria-prima na obtenção do concentrado e isolado protéico, observou-se uma densidade aparente de  $0,29\text{g/cm}^3$ . No concentrado protéico, a densidade aparente encontrada foi de  $0,21\text{g/cm}^3$  e para o isolado este valor foi de  $1,00\text{g/cm}^3$ .

A distribuição do tamanho de partículas, apresentada na Tabela 1, mostra que o isolado protéico apresenta uma granulometria mais fina que os demais produtos, com 79,07% das partículas com tamanhos inferiores a 297 $\mu$ m, seguido pelo concentrado protéico com 56,38% e por último a farinha desengordurada, com 30,21%.

**Tabela 1** Distribuição das partículas e densidade da farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de cupuaçu.

Amostra	Tamanho de partículas ( $\mu$ m)						Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
	> 590	297-590	210-297	150-210	105-150	< 105	
Farinha desengordurada (%)	0	69,57	21,30	8,09	0,41	0,41	0,29
Concentrado protéico (%)	0	44,38	38,64	15,70	1,32	0,72	0,21
Isolado protéico (%)	0	20,93	28,46	46,46	2,38	1,77	1,0

### 3.2 Análise de cor da farinha, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu

Observa-se que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ), entre a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de cupuaçu, quanto ao parâmetro L\* e as coordenadas cromáticas a\* e b\* da análise de cor (Tabela 2). Para a farinha desengordurada de cupuaçu, observou-se que esta apresentou o maior valor do parâmetro L\*, menor valor para a\* e valor intermediário de b\*, indicando que a farinha apresentava-se mais clara, com menor intensidade de coloração avermelhada e com coloração amarelada intermediária, quando comparada às demais amostras. Observa-se também que, para o isolado protéico de cupuaçu, foi encontrado o menor valor de L\*, maior valor para a coordenada a\* e menor valor para a coordenada b\*, indicando que esta foi a amostra mais escura, mais avermelhada e com menor intensidade de coloração amarelada. Isso pode ser atribuído, provavelmente, ao seu processo de obtenção, que pode ter causado reação de Maillard e/ou oxidação de compostos fenólicos, acarretando um maior escurecimento no isolado protéico.

**Tabela 2** Valores obtidos do parâmetro L\* e das coordenadas cromáticas a\* e b\*, da análise de cor das amostras de farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de cupuaçu.

Amostra	L*	a*	b*
Farinha desengordurada	76,59 ± 0,24 a	4,64 ± 0,02 c	16,44 ± 0,06 b
Concentrado protéico	75,64 ± 0,24 b	5,49 ± 0,02 b	17,70 ± 0,08 a
Isolado protéico	51,57 ± 0,12 c	8,19 ± 0,04 a	14,09 ± 0,03 c

Médias com letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### **3.3 Caracterização físico-química da farinha desengordurada de cupuaçu, do concentrado e do isolado protéico**

Através do monitoramento durante o procedimento de obtenção do concentrado, verificou-se que 13,91% das proteínas permaneceram solúveis, sendo perdidas no sobrenadante. Foram recuperadas 86,09% das proteínas, obtendo-se um rendimento de 73,36%. Para o isolado, observou-se perdas de 42,99% de proteínas na fase de solubilização em pH 9,0 e de 19,14% na fase de precipitação em pH 3,5. A recuperação protéica no isolado foi de 37,87%, com um rendimento de 14,84%. Já Auler (2002), estudando concentrados protéicos produzidos a partir de três tipos diferentes de farinhas de amaranto, observou que o concentrado protéico obtido da farinha desengordurada foi o que obteve maior rendimento (47,54%), seguido dos concentrados originados da farinha-base (28,95%) e da farinha hidrolisada (20,48%), demonstrando assim que, a remoção de gordura é capaz de provocar uma maior extratibilidade da proteína. A autora observou também, que o concentrado protéico da farinha desengordurada apresentou as menores perdas de proteína durante o processo de obtenção do concentrado, seguido pelo concentrado produzido a partir da farinha hidrolisada. As maiores perdas protéicas observadas para o concentrado protéico da farinha-base, provavelmente ocorreram pela interação natural das fibras, gordura, amido e proteína presentes nesta farinha.

Os dados sobre a composição físico-química da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de sementes de cupuaçu, estão apresentados na Tabela 3. Pelos dados obtidos verificou-se que o concentrado e o isolado protéico de cupuaçu apresentaram teores protéicos de 31,18 e 64,33%, respectivamente. Estes valores foram menores que aqueles encontrados para concentrado protéico de amaranto, 80,47% (AULER, 2002), para concentrado protéico de ervilha 48,5% (TÖMÖSKÖZI *et al.*, 2001) e para concentrado protéico de castanha-do-Pará, 59,30% (GLÓRIA, 1996). Para o isolado protéico de semente de cupuaçu, os teores de proteína encontraram-se abaixo do observado em isolado protéico de semente de tomate, 71,3% (LIADAKIS *et al.*, 1998), em isolado protéico de grão-de-bico, 78% (SÁNCHEZ-VIOQUE *et al.*, 1999) e em isolado protéico de ervilha, 89,6% (TÖMÖSKÖZI *et al.*, 2001). Em isolados comerciais de soja, Henn e Netto (1998), encontraram valores de proteína na faixa de 87,9 a 94,1%.

Com relação ao teor de lipídios, o valor observado para o concentrado protéico de semente de cupuaçu, 3,83%, encontra-se superior ao observado em concentrado protéico de ervilha, 0,9% (TÖMÖSKÖZI *et al.*, 2001) e em concentrado protéico de castanha-do-Pará, 1,37% (GLÓRIA, 1996). Para o isolado protéico de semente de cupuaçu, o teor de 0,44%, encontra-se inferior ao observado em isolado protéico de ervilha, 1,6% (TÖMÖSKÖZI *et al.*, 2001), porém superior ao observado em isolado protéico de castanha-do-Pará, 0,16% (GLÓRIA, 1996). Henn e Netto (1998), estudando diferentes isolados comerciais de soja, encontraram teores de lipídios variando de 3,0 a 4,7%.

Observou-se uma redução nos teores de cinzas e fibras, para o isolado protéico de semente de cupuaçu, quando comparado aos resultados obtidos para a farinha desengordurada. Este fato era esperado, uma vez que a solubilização das proteínas em pH alcalino, seguida da centrifugação, tem como objetivo a separação dos sólidos insolúveis (fibras e polissacarídeos insolúveis) dos solúveis (açúcares, sais e proteínas). A precipitação das proteínas em ponto isoelétrico, seguida de centrifugação, tem como função separar as proteínas precipitadas dos outros constituintes que continuaram solúveis no pI, como açúcares e sais minerais principalmente.

**Tabela 3** Caracterização físico-química da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu, em base seca.

Determinação	Farinha	Concentrado Protéico	Isolado Protéico
pH	6,31 ± 0,01 a	3,14 ± 0,01 c	3,44 ± 0,01 b
Acidez titulável total *	22,93 ± 0,04 c	66,70 ± 0,66 b	91,52 ± 0,67 a
Proteína (%)	27,65 ± 0,13 c	31,18 ± 0,24 b	64,33 ± 0,35 a
Lipídios (%)	3,25 ± 0,01 b	3,83 ± 0,01 a	0,44 ± 0,01 c
Cinzas (%)	7,88 ± 0,04 a	2,38 ± 0,01 b	1,44 ± 0,05 c
Fibra (%)	10,88 ± 0,19 b	17,33 ± 0,11 a	7,11 ± 0,27 c
Outros compostos**	50,34	45,28	26,68

\* meq de NaOH/100g de MS

\*\* Calculado por diferença, representa compostos como carboidratos, ácidos, alcalóides, etc.

Médias com letras iguais, em uma mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

#### 4. CONCLUSÕES

- Utilizando-se as metodologias propostas neste trabalho, é possível a obtenção de concentrado e isolado protéico a partir de sementes de cupuaçu, com 31,18 e 64,33% de proteína, respectivamente.

- Pelo monitoramento realizado durante a obtenção do concentrado, verificou-se que 13,91% das proteínas permaneceram solúveis, sendo perdidas no sobrenadante. Observou-se também um rendimento de 73,36% durante a obtenção do concentrado protéico de sementes de cupuaçu. Para o isolado, observou-se perdas de 42,99% de proteínas na fase de solubilização em pH 9,0 e de 19,14% na fase de precipitação em pH 3,5. A recuperação protéica no isolado foi de 37,87%, com um rendimento de 14,84%.

- Como no caso de outras fontes de proteína vegetal, as proteínas do cupuaçu parecem estar interagindo com outros componentes da semente que previnem a sua liberação, impedindo a obtenção de concentrados e isolados com teores protéicos mais elevados.

- Através da caracterização física da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu, observou-se que o isolado protéico apresentou a granulometria mais fina e a maior densidade aparente quando comparado aos demais produtos.

- Observou-se, pela análise de cor, diferença entre os três produtos estudados, com o isolado protéico obtido de sementes de cupuaçu apresentando a coloração mais escura, o que

pode ser atribuído, provavelmente, à ocorrência de reação de Maillard e/ou à oxidação de compostos fenólicos, durante o processamento para sua obtenção.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Washington: Worwitz, W., 1997.

ARAGÃO, C. G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o processo fermentativo**. 1992. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1992.

AULER, F. **Produção e caracterização de farinhas e concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus cruentus*)**. 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BOATRIGHT, W. L.; HETTIARACHCHY, N. S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 72, n. 12, p. 1439-1444, 1995.

GLÓRIA, M. M. **Obtenção e caracterização de concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará.** 1996. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fibre analysis. **Agri-handbook:** Agriculture Reserch Service, U. S. Dept. Agriculture, p. 375, 1970.

HENN, R. L.; NETTO, F. M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates (SPI). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3009-3015, 1998.

LIADAKIS, G. N.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Isolation of tomato seed meal proteins with salt solutions. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 450-453, 1998.

LOCKMILLER, N. R. Increased utilization of protein in foods. **Cereal Science Today**, v. 18, p. 77-81, 1973.

MEURSING, E. H. **Cocoa powders for industrial processing.** 3.ed. Koogaam de Zaam, Cacaofabriek De Zaan B. V., 1983. 126p.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, v. 64, p. 237-243, 1999.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: chemistry and technology.** Vol. I. Avi Publishing Company Inc., 1972. 294p.

TOMOSKOZI, S.; LÁSZTITY, R.; HARASZI, R. BATICZ, O. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. **Nahrung**, v. 45, n. 6, p. 399-401, 2001.

VILALBA, F. A. **Fragmentação mecânica de amêndoas de cupuaçu (*Teobroma grandiflorum*) por meio de um beneficiador de cilindros.** 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.



## CAPÍTULO 5

### OBTENÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS DO CONCENTRADO E ISOLADO PROTÉICO DE SEMENTES DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum).

Ana Vânia Carvalho; Nelson Horacio Pezoa García

Departamento de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP - C.P. 6121 - CEP 13083-970 -  
Campinas - SP - Brasil.

#### RESUMO

Foram obtidos farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico a partir de sementes de cupuaçu. Esses três produtos foram caracterizados quanto às suas propriedades de solubilidade, capacidade de retenção de água e óleo, formação e estabilidade de espuma, capacidade de geleificação, capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão. A farinha desengordurada de semente de cupuaçu apresentou um teor de proteína de 27,65%. Para o concentrado e o isolado protéico, foram observados teores de 31,18 e 64,29% de proteína, respectivamente. De maneira geral, o isolado protéico de cupuaçu apresentou maior solubilidade em comparação com o concentrado protéico, atingindo solubilidades superiores a 90% em pH 8,0. Tanto a farinha como o concentrado protéico de cupuaçu apresentaram muito boa capacidade de retenção de água e de óleo. Observou-se também, boa capacidade emulsificante em pH 7,0, para a farinha, o concentrado e o isolado protéico, 987,50, 977,50 e 1380,00mL óleo/g produto, respectivamente. Nenhum dos três produtos apresentou capacidade de formar géis. Tanto a farinha como o concentrado e o isolado protéico apresentam potencial de utilização, não somente para enriquecer outros alimentos, mas também para melhorar certas propriedades funcionais de diversos alimentos.

**Palavras-chave:** semente de cupuaçu, concentrado protéico, isolado protéico, propriedades funcionais.

## SUMMARY

Defatted flour, protein concentrate and protein isolate were obtained from cupuacu seeds. These products were characterized in terms of their solubility properties, water and oil retention capacity, foam formation and stability, gelling properties, emulsifying ability and emulsion stability. The protein contents of the cupuacu defatted flour, the protein concentrate and the isolate were, respectively: 27.65%, 31.18 and 64.29%. In overall terms, the protein isolate presented higher solubility when compared to the protein concentrate, achieving more than 90% solubility at pH 8.0. The flour and the protein concentrate exhibited excellent water and oil retention capacities. Good emulsifying ability at pH 7.0 was also observed for all three products: 987.50 mL oil/g for the flour, 977.50 mL oil/g for the protein concentrate and 1380.00 mL oil/g for the protein isolate. Gelling properties were not exhibited by any of the products, but all of them presented good utilization potential, not only to enrich other foods, but also to enhance some functional properties.

**Key-words:** cupuacu seeds, protein concentrate, protein isolate, functional properties.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas três décadas, a indústria de alimentos tem dado especial atenção para a produção de alimentos usando concentrados e isolados de proteínas obtidos de vegetais. Eles podem ser adicionados a proteínas de origem animal, na preparação de produtos cárneos, produtos de panificação, sopas, etc. Tal uso industrial requer grandes quantidades de concentrados e isolados protéicos que devem ser obtidos mediante métodos simples e rápidos e devem apresentar propriedades funcionais que tornem seu uso tecnologicamente apropriado (OTEGUI *et al.*, 1997). Assim, tais produtos podem ser usados não só como um suplemento nutricional, pelo acréscimo de aminoácidos essenciais, mas também como ingrediente com propriedades funcionais tecnológicas desejáveis, como capacidade de emulsificação, capacidade de formação de espuma, solubilidade, etc., das quais depende o sucesso de sua incorporação em alimentos na suplementação ou substituição de proteínas tradicionais (CHAU, CHEUNG e WONG, 1997; KHALIL, 2001).

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é uma fruta típica da região Norte do Brasil, com grande potencial econômico. Atualmente é a polpa que sustenta a produção,

industrialização e comercialização desta fruta. A semente, um subproduto da industrialização da polpa, começa a despertar interesse como um produto de alto valor nutricional e com grande potencial de mercado para produtos industrializados.

O objetivo do presente estudo foi a obtenção de concentrado e isolado protéico a partir de sementes de cupuaçu bem como a caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima**

Foram utilizadas sementes de cupuaçu *in natura* devidamente secas, provenientes da Cooperativa Mista de Tomé-Açu (CAMTA), no Estado do Pará. As sementes foram quebradas em moinho de cilindros, segundo metodologia proposta por Vilalba (2003), laminadas em um rolo laminador e em seguida submetidas à extração parcial da gordura em prensa hidráulica de discos, utilizando-se pressão gradual até atingir 50 toneladas, em um período de tempo de extração de 50 minutos. Seguidamente foi complementada a extração de gordura utilizando-se o método proposto por Boatright e Hettiarachchy (1995), com algumas modificações. Uma parte do material semi-desengordurado foi misturado com cinco partes de hexano, agitado manualmente por 10 minutos e centrifugado a 1000xg por 10 minutos a 20°C. Após a centrifugação, o hexano contendo a gordura foi separado do precipitado e posteriormente recuperado para ser utilizado em novas extrações. A operação de extração da gordura foi repetida por mais 5 vezes. A seguir, o material desengordurado permaneceu em capela, por 6 horas, e posteriormente, em estufa com circulação de ar a 30°C, durante 16 horas, para evaporação do hexano. O material desengordurado foi moído até aproximadamente 297µm, obtendo-se a farinha de sementes de cupuaçu, a qual foi utilizada no preparo do concentrado e isolado protéico.

## 2.2 Obtenção do concentrado e isolado protéico

O concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu foram obtidos conforme descrito no Capítulo 4.

## 2.3 Teor de proteína

Utilizou-se, na quantificação do teor protéico da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado, o método semi micro Kjeldahl, baseado na hidrólise e posterior destilação da amostra, de acordo com o método 31.1.08 da AOAC (1997).

## 2.4 Propriedades funcionais

### 2.4.1 Solubilidade

A solubilidade das proteínas do concentrado e do isolado protéico foram determinadas de acordo com o método de Morr *et al.* (1985), com algumas modificações. Amostras (1g) foram solubilizadas em água destilada (50mL) e o pH da solução foi ajustado com ácido clorídrico (0,1N), ou hidróxido de sódio (0,1N) na faixa que variou de 2,0 a 10,0, e em seguida submetidas à agitação por 40 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 3000xg durante 15 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram tomadas e a solubilidade das proteínas determinada através do método semi micro Kjeldahl. Para calcular a porcentagem de solubilidade protéica de cada amostra em cada pH, foi utilizada a equação a seguir:

$$\% \text{ solubilidade} = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso amostra (mg)} \times \frac{\text{conteúdo de proteína amostra (\%)}}{100}} \times 100$$

### 2.4.2 Capacidade de retenção de água

Amostras de 0,5g de farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de sementes de cupuaçu foram solubilizadas em 10mL de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 3,5 e 7,0, utilizando-se NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto, após o qual foram deixadas em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente (28°C), sendo em seguida submetidas à centrifugação por 30 minutos a 1300xg. A água retida após a centrifugação foi considerada como água absorvida (SOSULSKI *et al.*, 1976). O sedimento no tubo da centrífuga, após separação do sobrenadante foi pesado e a capacidade de retenção de água (CRA) calculada pela expressão:

$$\%CRA = \frac{\text{Peso do sedimento (g)}}{\text{Peso da amostra seca (g)}} \times 100$$

### 2.4.3 Capacidade de retenção de óleo

Amostras de 0,5g de farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de sementes de cupuaçu foram homogeneizadas com 3g de óleo de milho refinado marca Liza, por 1 minuto e deixadas em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente (28°C) e, em seguida, centrifugadas durante 30 minutos a 1300xg (LIN, HUMBERT e SOSULSKI, 1974). A capacidade de retenção de óleo foi avaliada no pH próprio de cada produto, ou seja, não foi realizado o ajuste de pH das amostras. O sedimento no tubo da centrífuga, após separação do sobrenadante foi pesado e a capacidade de retenção de óleo calculada pela expressão:

$$\%CRO = \frac{\text{Peso do sedimento (g)}}{\text{Peso da amostra seca (g)}} \times 100$$

#### 2.4.4 Formação e estabilidade de espumas

A capacidade de formação de espuma (evidenciada pela expansão de volume) foi determinada do método de Paredes-López, Ordorica-Falomir e Olivares-Vázquez (1991). Suspensões de 150mL de produto a 3% (farinha desengordurada, concentrado ou isolado protéico de sementes de cupuaçu) foram submetidas ao ajuste de pH (3,5 e 7,0) e a seguir agitadas em homogeneizador Ika Labortechnik, modelo T25 basic, a 11500rpm por 1 minuto e após isso transferidas para provetas de 250mL, para avaliação da estabilidade. A expansão de volume foi calculada pela equação:

$$\text{Expansão de volume (\%)} = \frac{(B - A)}{A} \times 100$$

A = volume antes da agitação (mL)

B = volume após agitação (mL)

Para a estabilidade de espuma, avaliou-se a redução do seu volume em relação ao volume inicial, nos tempos 5, 10, 30 e 60 minutos. O percentual de estabilidade do volume de espuma (% EE) foi calculado pela fórmula a seguir:

$$\%EE = \frac{\text{volume residual de espuma após tempo (mL)}}{\text{volume inicial de espuma incluindo volume do líquido (mL)}} \times 100$$

#### 2.4.5 Capacidade de geleificação

Para a determinação da capacidade de geleificação foi empregado o método descrito por Voutsinas *et al.* (1983), com modificações. Para se determinar a concentração mínima de produto onde ocorre geleificação, dispersões de farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico a 10 e 15% (m/m) foram preparadas a pH 3,5 e 7,0 em água destilada, sendo os pHs ajustados com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N.

Para o isolado protéico testou-se também concentrações de 20 e 30% de produto; para a farinha desengordurada e o concentrado protéico de semente de cupuaçu não foram testadas estas concentrações, pois não foi possível a formação de dispersões, mas sim de uma massa nessas concentrações. Transferiu-se 10 mL das dispersões para tubos vazados de 2,0 cm de diâmetro

interno, 2,6cm de diâmetro externo e 6cm de altura que foram aquecidos em banho-maria a temperatura de 80 e 90°C por 30 minutos, e a seguir resfriados em banho de gelo por 10 minutos e mantidos em geladeira (9°C) até o dia seguinte, quando verificou-se a capacidade de geleificação das amostras. A mínima concentração de proteína para a formação de gel é determinada quando os tubos são invertidos e as amostras não caem ou deslizam pelas paredes do tubo.

#### **2.4.6 Capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão**

A capacidade de emulsificação foi determinada pelo método de De Kanterewicz *et al.* (1987), com algumas modificações. Foram preparadas dispersões de farinha desengordurada e concentrado protéico na concentração de 2% de produto. Para o isolado protéico de sementes de cupuaçu a concentração foi de 1% de produto. Tomou-se alíquotas de 10mL das dispersões e iniciou-se a adição de óleo de milho refinado, marca Liza, com bureta, enquanto as dispersões eram misturadas à velocidade de 3500rpm. Interrompeu-se a incorporação de óleo quando se observou a quebra da emulsão, pela mudança das fases. O resultado foi expresso em mL de óleo adicionados até o ponto de inversão, por g de produto.

#### **2.5 Análise estatística**

Os resultados das várias características avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas, comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SAS 8.0 (Statistical Analysis System).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

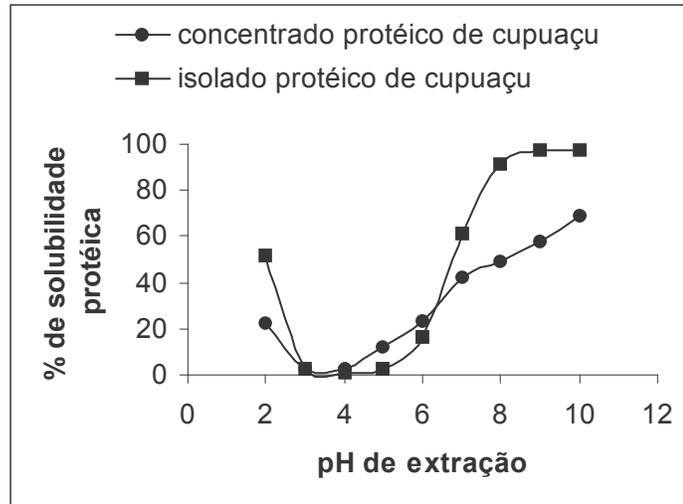
#### **3.1 Obtenção do concentrado e isolado protéico**

Verificou-se que o concentrado e o isolado protéico de cupuaçu apresentaram teores protéicos de 31,18 e 64,33%, respectivamente. Estes valores do concentrado foram menores que aqueles encontrados para amaranto, 80,47% (AULER, 2002), para ervilha, 48,5% (TÖMÖSKÖZI *et al.*, 2001) e para o concentrado de castanha-do-Pará, 59,30% (Glória, 1996). Para o isolado protéico de cupuaçu, os teores de proteína encontram-se abaixo do observado em isolado da semente de tomate, 71,3% (LIADAKIS *et al.*, 1998), em grão-de-bico, 78% (SÁNCHEZ-VIOQUE *et al.*, 1999) e em isolado de ervilha, 89,6% (TÖMÖSKÖZI *et al.*, 2001). Em isolados comerciais de soja, Henn e Netto (1998), encontraram valores de proteína na faixa de 87,9 a 94,1%.

#### **3.2 Propriedades funcionais**

##### **3.2.1 Solubilidade**

Os perfis de solubilidade do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu são similares aos de outras proteínas vegetais (TÖMÖSKÖZI *et al.*, 2001) e são caracterizados por uma alta solubilidade em pH alcalino, mínima solubilidade no ponto isoelétrico e moderada solubilidade em meio ácido.



**Figura 2** Solubilidade proteica do concentrado e do isolado proteico de cupuaçu em função do pH de extração.

Tanto para o concentrado como para o isolado proteico de cupuaçu, observa-se o aumento na solubilidade das proteínas a partir do pH 7 (Figura 2), com o máximo de solubilidade em pH 10 (máximo pH estudado). Isto pode ser explicado pelo predomínio de cargas negativas que ocorrem em pHs alcalinos, provocando maior interação entre as moléculas de proteína e água e a maior repulsão entre as moléculas de proteína, aumentando a solubilidade no referido pH (SGARBIERI, 1996).

Dentre todos os pHs estudados, a mínima solubilidade foi observada na faixa de pH 3 a 5. Esta faixa engloba o ponto isoelétrico das proteínas do cupuaçu (3,5), onde as quantidades de cargas positivas e negativas expressas das proteínas são iguais, ocorrendo a neutralização intramolecular com menor afinidade entre as moléculas de proteína e o solvente, ausência de repulsão eletrostática e, portanto, promovendo a agregação e precipitação de uma massa insolúvel, via interações hidrofóbicas (DAMODARAN, 1996; SGARBIERI, 1996).

Pode-se observar que, de maneira geral, o isolado proteico de cupuaçu apresenta maior solubilidade em comparação com o concentrado proteico. Estes resultados estão de acordo com Glória (1996), que também observou uma maior solubilidade das proteínas no isolado de castanha-do-Pará que no concentrado. Esta diferença pode ser explicada, em parte, pela maior presença de polissacarídeos no concentrado, que podem competir com as proteínas pela água disponível.

Segundo Damodaran (1996), proteínas solúveis no pI (ponto isoelétrico) apresentam alta relação entre os resíduos hidrofílicos e os não polares presentes na superfície. Se as forças de repulsão, devidas aos grupos carregados das cadeias laterais dos resíduos forem maiores que as interações hidrofóbicas proteína-proteína, a proteína permanecerá solúvel no pI.

Takeiti (2002), estudando isolados protéicos de soja, observou que o perfil de solubilidade, em NaCl 0,1M, do isolado de soja com teor protéico de 97%, nos pHs 3, 5 e 7, foi de 14, 1 e 12% de solubilidade da proteína, respectivamente. Observa-se que os valores encontrados por esse autor são bem diferentes aos obtidos no presente estudo, onde, para o isolado de cupuaçu em pH 7, observa-se uma solubilidade de 61,61%.

Em trabalho realizado com concentrados protéicos de amaranto, Auler (2002) relata solubilidades protéicas em pHs 3 e 7, maiores que 50% e em pH 9, a solubilidade foi maior que 90%. Dentre os pHs estudados, o autor relata que o pH 5 foi o que apresentou a menor solubilidade das proteínas, pouco maior que 20%, e explica que este pH está próximo ao ponto isoelétrico das proteínas do amaranto (4,6), ocorrendo, portanto, agregação e precipitação de grande parte das proteínas.

Boatright e Hettiarachchy (1995), relatam, para isolados comerciais de soja, uma solubilidade variando de 11 a 14%, em pH 6,8. Porém, para isolados de soja preparados em laboratório, a solubilidade subiu para 34%. Quando o isolado foi preparado a partir de farinha com 0% de lipídio, a solubilidade protéica subiu para 84%, em pH 6,8. Os autores sugerem que alguma forma de degradação de lipídios ocorreu durante o processamento do isolado protéico, contribuindo para a redução da solubilidade das proteínas.

Para o isolado protéico de sementes de tomate, Liadakis *et al.* (1998), encontrou uma solubilidade protéica de 67,8%, em pH 7. Este valor está próximo ao observado para o isolado protéico de cupuaçu, no presente trabalho.

Sánchez-Vioque *et al.* (1999), estudando isolados protéicos de grão-de-bico, encontrou uma solubilidade de 46,3% para o isolado B e de 26,6% para o isolado A. Os autores explicam que este fato deve ter ocorrido devido, provavelmente, às diferentes condições usadas para a extração das proteínas, que no caso do isolado A foram mais drásticas, acarretando maior desnaturação de proteínas e refletindo em uma pobre solubilidade.

### 3.2.2 Capacidade de retenção de água e óleo

Os resultados de capacidade de retenção de água para a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu, estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que o concentrado protéico de cupuaçu apresentou a maior capacidade de retenção de água e o isolado a menor capacidade, em ambos os pHs estudados. Estas diferenças na capacidade de retenção de água entre a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de cupuaçu, podem ser atribuídas a mudanças na conformação das moléculas de proteína, variações no número e natureza dos locais de ligação da água nas moléculas de proteína e também a diferenças no teor de carboidratos contidos nos diferentes produtos (CHAU, CHENG E WONG, 1997; PAREDES-LÓPEZ, ORDORICA-FALOMIR e OLIVARES-VÁZQUEZ, 1991). Segundo Kinsella *et al.* (1985), componentes não protéicos podem afetar muito a absorção de água de um produto protéico. A capacidade de absorção de água varia com a fonte protéica, composição e presença de carboidratos, lipídios, sais, pH e pode ser influenciada por processamentos sofridos pela proteína, como aquecimento, alcalinização, etc..

Quando a farinha desengordurada de cupuaçu entra em contato com a água, ocorre a solubilização de algumas moléculas, principalmente sais minerais e açúcares, ficando espaços livres os quais poderão ser preenchidos pelas moléculas de água. Isso provavelmente explica a alta capacidade de retenção de água observada para a farinha desengordurada de cupuaçu. De acordo a Tabela 1, o concentrado protéico apresentou maior retenção de água em relação a farinha desengordurada e isolado protéico. Isso possivelmente seja devido às sucessivas lavagens as quais o concentrado foi submetido durante o processamento de obtenção, resultando com isso espaços intersticiais que poderão ser preenchidos por moléculas de água. Além disso, observou-se elevado teor de fibra no concentrado protéico de semente de cupuaçu, os quais também podem contribuir para o aumento na capacidade de reter água. Para o isolado foi observado o menor valor de capacidade de retenção de água. Isso provavelmente seja devido a menor concentração de outros componentes solúveis não protéicos, os quais, como já dito, podem contribuir para uma maior capacidade de reter água.

**Tabela 1** Capacidade de retenção de água da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0.

Amostra	Capacidade de retenção de água (%)	
	pH 3,5	pH 7,0
Farinha desengordurada	482,8 ± 4,2 b	505,2 ± 1,5 b
Concentrado protéico	632,3 ± 1,9 a	655,8 ± 1,5 a
Isolado protéico	202,3 ± 0,1 c	222,0 ± 3,8 c

Médias com letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As variações de pH modificam a ionização e a carga líquida da molécula protéica, alterando as forças atrativas e repulsivas entre as proteínas e a sua capacidade de interagir com a água. O pH da solução de proteína tem influência sobre a solubilidade e a capacidade de retenção de água. Estas propriedades são, em grande parte, dependentes da presença de grupos hidrofílicos na molécula de proteína (CÂNDIDO, 1998). Isto explica as diferenças encontradas nos resultados da capacidade de retenção de água, nos dois pHs estudados (3,5 e 7,0).

Sánchez-Vioque *et al.* (1999), estudando isolados protéicos de grão-de-bico, encontraram valores para a capacidade de retenção de água, de 343,7 e 199,8%, para o isolado A e B, respectivamente. Segundo os autores, o isolado A foi preparado em condições de processamento mais drásticas o que ocasionou maior desnaturação de suas proteínas. Já em estudo realizado por Paredes-López, Ordorica-Falomir e Olivares-Vázquez (1991), com a mesma espécie, foram encontrados valores de 240% para a capacidade de retenção de água.

Segundo Liadakis *et al.* (1998), para isolado protéico de semente de tomate, a capacidade de retenção de água foi de 276,3%. Os mesmos autores analisaram também, isolados protéicos de soja comerciais e encontraram valores variando de 241,2 a 855,5% para capacidade de retenção de água.

Para a capacidade de retenção de óleo (Tabela 2), observou-se a mesma tendência percebida nos resultados para a capacidade de retenção de água, com o concentrado apresentando os maiores valores e o isolado protéico de cupuaçu apresentando os menores valores.

**Tabela 2** Capacidade de retenção de óleo da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu.

<b>Amostra</b>	<b>Capacidade de retenção de óleo (%)</b>
Farinha desengordurada de cupuaçu	346,5 ± 2,0 b
Concentrado protéico de cupuaçu	577,1 ± 2,3 a
Isolado protéico de cupuaçu	172,7 ± 1,7 c

Médias com letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Estas diferenças encontradas podem ser explicadas, provavelmente, de acordo com as mesmas considerações feitas para a retenção de água.

Para a capacidade de retenção de óleo, Sánchez-Vioque *et al.* (1999) encontraram valores de 409,4% para o isolado A e de 125,7% para o isolado B. Já Paredes-López, Ordorica-Falomir e Olivares-Vázquez (1991), observaram teores de 170% de retenção de óleo, para o isolado protéico no ponto isoelétrico.

Para isolado protéico de semente de tomate, a capacidade de retenção de óleo verificada em trabalho realizado por Liadakis *et al.*(1998) foi de 317,5%. Já em isolados protéicos de soja comerciais, os mesmos autores encontraram teores variando de 228,8 a 250,8%.

A capacidade de absorção de óleo é uma importante propriedade funcional, uma vez que melhora a textura e retenção de sabor dos produtos (KINSELLA, 1976; KHALIL, 2001).

De maneira geral, observou-se que os três produtos estudados apresentaram alta capacidade de retenção de água e óleo. Como estas propriedades estão relacionadas às características de textura, tais como consistência, espessamento, viscosidade e aderência, além de contribuir para a retenção de sabor nos alimentos, produtos que venham a utilizar tanto o concentrado como a farinha desengordurada e o isolado protéico de semente de cupuaçu como ingredientes em sua formulação, provavelmente terão estas características de textura e retenção de sabor incrementadas.

### 3.2.3 Formação e estabilidade de espumas

As propriedades espumantes das proteínas incluem: capacidade de formação de espuma, que mede a quantidade de espuma formada num tempo determinado, e a estabilidade que pode ser analisada sob dois aspectos, isto é, a drenagem de líquido da espuma devido a gravidade e baixa tensão superficial, e o colapso da espuma, que depende da resistência do filme e do tamanho da bolha. Uma série de eventos determinam o colapso da espuma: ruptura do filme de proteína adsorvido na interface ar/espuma; ruptura da lâmina aquosa que separa as bolhas, o aumento do tamanho da bolha por coalescência e a velocidade de transporte de bolhas maiores através da espuma até a interface com o ar (KINSELLA, 1976; BORDERIAS e MONTEIRO, 1988; CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989). É uma propriedade funcional de interface que depende da natureza da proteína, da solubilidade e do estado de desnaturação da proteína, da presença de sais e de outros aditivos utilizados no processamento dos alimentos (SGARBIERI, 1996).

Os dados da capacidade espumante para a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de cupuaçu, estão apresentados na Tabela 3. Observou-se uma capacidade reduzida de formar espuma para os três produtos, tanto no pH 3,5 como no pH 7,0, porém com uma alta estabilidade de espuma ao longo do tempo (Figuras 3, 4 e 5).

Em pH 3,5, ponto isoelétrico das proteínas do cupuaçu, observou-se a menor formação de espuma tanto para o concentrado como para o isolado protéico de semente de cupuaçu, 1,32 e 6,67%, respectivamente. Esta constatação era esperada, uma vez que neste pH as proteínas estão precipitadas e, portanto impossibilitadas para formar espuma. Já para a farinha desengordurada verificou-se maior formação de espuma em pH 3,5. Isso provavelmente seja devido ao fato de alguns hidrocolóides ou outros compostos presentes, que também possam contribuir para a formação de espuma, apresentarem-se insolúveis em pH 7, prejudicando assim a formação de espuma nestas condições.

O concentrado protéico de semente de cupuaçu apresentou a menor capacidade de formação de espuma nos dois pHs estudados. Esta observação está de acordo com Glória (1996), que estudando produtos protéicos de castanha-do-Pará, encontrou menor formação de espuma no concentrado protéico, em ponto isoelétrico. O valor de formação de espuma encontrado no presente trabalho para o concentrado protéico de cupuaçu, de 1,32 e 2,64%, em pH 3,5 e 7, respectivamente, encontra-se abaixo do observado para castanha do Pará, de 9,90% (GLORIA,

1996) e para concentrado protéico obtido de fava, que apresentou formação de espuma de 15% e estabilidade de 77% (OTEGUI *et al.*, 1997).

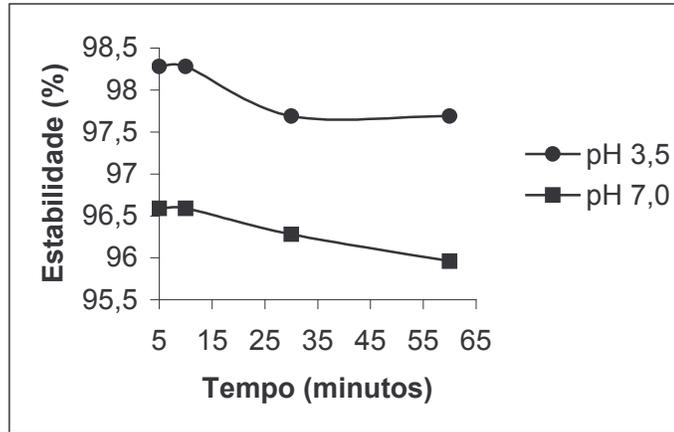
Para o isolado protéico de semente de cupuaçu, observou-se a maior capacidade de formação de espuma em pH 7, 16,62%, embora ainda reduzida quando comparada à capacidade espumante de alguns isolados protéicos como o de grão-de-bico, que apresentou formação de espuma de 47,5% e estabilidade de 66,6% (PAREDES-LÓPEZ, ORDORICA-FALOMIR e OLIVARES-VÁZQUEZ, 1991) e isolado protéico de castanha do Pará, com 170% de formação de espuma (GLORIA, 1996). Já Liadakis *et al.* (1998), estudando três diferentes isolados protéicos de soja comerciais, encontrou, para capacidade espumante, valores variando de 18 a 66,8%.

Sgarbieri (1996), estudando farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de feijão, conseguiu um aumento de volume de 32,2, 64,3 e 7,7%, respectivamente. O autor também ressalta a baixa capacidade espumante do isolado de feijão.

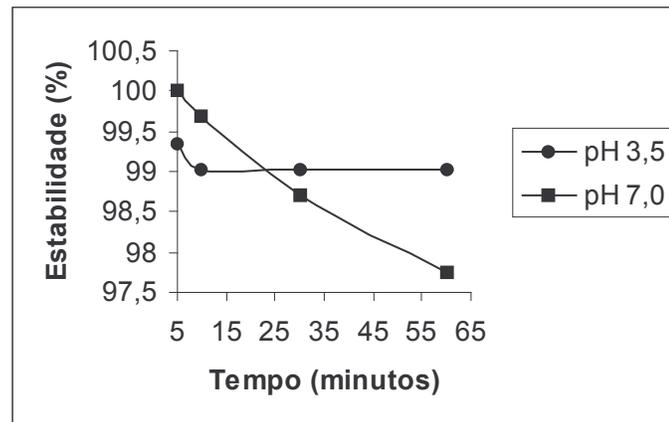
**Tabela 3** Capacidade de formação de espuma da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0.

Amostra	Aumento de volume (%)	
	pH 3,5	pH 7,0
Farinha desengordurada	14,67 ± 1,89 a	5,58 ± 1,42 b
Concentrado protéico	1,32 ± 0,01 b	2,64 ± 0,02 b
Isolado protéico	6,67 ± 0,01 b	16,62 ± 1,46 a

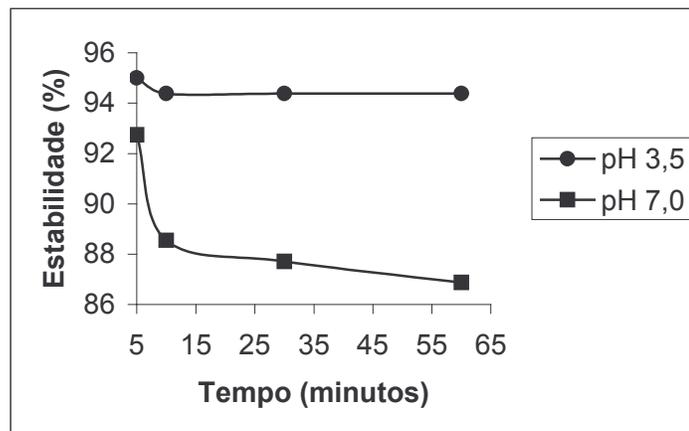
Médias com letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 3** Estabilidade da espuma da farinha desengordurada de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0, ao longo do tempo.



**Figura 4** Estabilidade da espuma do concentrado protéico de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0, ao longo do tempo.



**Figura 5** Estabilidade da espuma do isolado protéico de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0, ao longo do tempo.

Kinsella (1981) relatou que algumas propriedades que facilitam a formação de espuma pelas proteínas, como a flexibilidade da molécula, não asseguram a sua estabilidade. Em contrapartida, outras características moleculares que favorecem sua estabilidade, como interações intermoleculares e coesividade, não são compatíveis com a facilidade de formação de espuma. Por outro lado, uma direta relação entre capacidade de formação de espuma e solubilidade da proteína, para proteínas de origem vegetal, tem sido sugerida. Em pHs ácidos ou básicos (longe do pI das proteínas), ocorre um aumento de cargas na molécula de proteína, as quais enfraquecem as interações hidrofóbicas, aumentando a flexibilidade da proteína. Isto permite a proteína difundir mais rapidamente para a interface ar-água e encapsular partículas de ar e assim, aumentar a formação de espuma (CHAU, CHENG e WONG, 1997). Este comportamento pode ser percebido no presente trabalho, onde o concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu apresentaram um aumento na formação de espuma, ainda que pequeno, quando comparados os resultados obtidos nos dois pHs estudados. Exceção nota-se para a farinha desengordurada de semente de cupuaçu, que apresentou uma queda na formação de espuma em pH 7,0.

De acordo com Lin, Humbert e Sosulski (1974), a exposição da proteína a condições extremas de alcalinidade (pH 11 a 12) durante o processo de produção do isolado protéico, pode melhorar a capacidade de formação e estabilidade da espuma.

Em isolados protéicos de soja, observa-se, para formação de espuma, valores variando de 18,0 a 395,0% (BÉROT, DESHAYES e GUEGUEN, 1995; LIADAKIS *et al.*, 1998; PEZOA-GARCÍA, 1985; CHAU, CHENG e WONG, 1997). Segundo Kinsella (1984), o volume de expansão e as propriedades da espuma, variam com os equipamentos e métodos usados em sua preparação. Devido a esta extensa possibilidade de variabilidade, a comparação e interpretação dos resultados da propriedade espumante, obtidos em diferentes tipos de proteínas, condições, métodos e laboratórios, é freqüentemente dificultada ou impossibilitada.

Como já dito anteriormente, verificou-se baixa capacidade de formação de espuma para os três produtos estudados, farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de semente de cupuaçu, quando comparado a produtos similares obtidos de outras sementes. Isto sugere a possibilidade de utilização desses produtos como ingredientes, principalmente em alimentos onde a formação de espuma e incorporação de ar forem prejudiciais devido à possibilidade de ocorrência de vários tipos de oxidações ou alterações indesejáveis.

### **3.2.4 Capacidade de geleificação**

A etapa inicial no processo de geleificação das proteínas globulares, consiste no aquecimento da solução protéica acima de sua temperatura de desnaturação. Após o resfriamento, os grupamentos expostos do polipeptídeo desnaturado integram-se, conduzindo a formação de uma complexa rede que atua como uma matriz capaz de reter água e outros componentes (DAMODARAM, 1988).

Para a farinha desengordurada e o concentrado protéico de cupuaçu, não foi observada formação de gel nas concentrações testadas (soluções de 10 e 15% do respectivo produto), nos pHs estudados (3,5 e 7,0). Concentrações mais elevadas não chegaram a produzir uma solução adequada para posterior formação de gel, formando-se simplesmente uma pasta semi-sólida. Para o isolado, testou-se também concentrações de 20 e 30% de produto, nos pHs 3,5 e 7,0. Em pH 7,0 e temperatura de aquecimento de 90°C, houve uma formação muito incipiente de gel, apenas no fundo e nas laterais do tubo. Nas demais condições testadas para o isolado, não ocorreu nenhuma formação de gel.

Ao contrário do que foi encontrado neste trabalho para produtos protéicos de semente de cupuaçu, Takeiti (2002), estudando isolados protéicos de soja, observou a formação de géis nestes produtos, partindo de uma dispersão protéica com 14% de proteína.

Otegui (1997) relata que a capacidade de geleificação depende não somente da concentração de proteína, mas, também, do tipo de proteína e dos componentes não protéicos.

### **3.2.5 Capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão**

As proteínas são consideradas bons agentes emulsificantes devido à sua capacidade de adsorção na interface, o que proporciona estabilidade contra a separação de fases de vários sistemas alimentícios, como produtos lácteos, de panificação, sorvetes, maioneses e embutidos de carnes (KESTER e RICHARDSON, 1984).

As características de uma emulsão são afetadas por uma série de fatores: tipo e geometria do equipamento utilizado, velocidade de adição do óleo, volume da fase oleosa, temperatura, pH, força iônica, solubilidade e hidrofobicidade da proteína, presença de açúcares e agentes de superfície de baixo peso molecular, exposição ao oxigênio, concentração de proteínas solúveis e da capacidade emulsificante da proteína. O processo de emulsificação demanda muita energia e é um processo dinâmico que envolve a criação de interfaces óleo/água, a adsorção de surfactantes para estabilizar a interface e a coalescência das gotículas não estabilizadas. Uma vez formada, a emulsão é termodinamicamente instável (KINSELLA, 1981; BORDERÍAS e MONTERO, 1988).

Enquanto a formação da emulsão depende de uma rápida adsorção, desdobramento na interface e reorientação, a estabilidade é determinada pelo decréscimo da energia livre interfacial e também pelas propriedades reológicas do filme protéico formado (DAMODARAN, 1996).

Os resultados obtidos para capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão, da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu, estão apresentado na Tabela 4. Observa-se que somente a farinha desengordurada de cupuaçu, apresentou capacidade de formar emulsão em pH 3,5. Já em pH 7,0, os três produtos estudados apresentaram alta capacidade emulsificante e alta estabilidade de emulsão. Isto pode ser explicado pelo fato de que há um aumento na propriedade emulsificante com o aumento da solubilidade protéica (PAREDES-LÓPEZ, ORDORICA-FALOMIR e OLIVARES-VÁZQUEZ, 1991; CHAU, CHEUNG e WONG, 1997).

Em trabalho realizado por Swamylingappa e Srinivas (1994), o isolado protéico de soja apresentou uma capacidade emulsificante de 98mL de óleo/ g de proteína e uma estabilidade de emulsão de 55%. Já para isolado protéico de grão-de-bico, Paredes-López, Ordorica-Falomir e Olivares-Vázquez (1991), encontraram valores de 72,9% para atividade emulsificante e de 85% para estabilidade de emulsão.

Liadakis *et al.* (1998), observaram valores de capacidade emulsificante de 431,3 e 386,7mL de óleo/ g de proteína, para o isolado protéico de semente de tomate e um isolado protéico comercial de soja, respectivamente.

**Tabela 4** Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0.

Amostra	Capacidade Emulsificante (mL de óleo/ g de produto)		Estabilidade de Emulsão (%)	
	pH 3,5	pH 7,0	pH 3,5	pH 7,0
Farinha desengordurada	367,5 ± 3,53	987,5 ± 1,8 b	99,4 ± 0,43	99,6 ± 0,16 a
Concentrado protéico	*	977,5 ± 2,1 b	*	98,0 ± 0,36 a
Isolado protéico	*	1380,0 ± 9,9 a	*	98,4 ± 0,83 a

\* não houve formação de emulsão

Médias com letras iguais, em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Segundo Silva, Bora e Neto (1997), estudando isolado protéico de semente de algaroba modificado por acetilação, encontraram resultados de 238mL óleo/100mg proteína, para o isolado com 91,1% de modificação. Já para o isolado que não sofreu modificação, o resultado foi de 91,3mL óleo/100mg proteína. Os autores também observaram um aumento na capacidade emulsificante com o aumento do pH. A estabilidade de emulsão variou de 92,69 a 95,6%, de acordo com a modificação sofrida pelo isolado de semente de algaroba.

Já Ma (1984), estudando a proteína de aveia, encontrou uma capacidade emulsificante de 196mL óleo/g proteína.

Novamente deve ser ressaltado o cuidado na comparação de resultados para a propriedade emulsificante, uma vez que, como já foi dito anteriormente, existe grande variedade de condições laboratoriais, de métodos, tipo de matéria-prima, etc.

#### 4. CONCLUSÕES

- Os perfis de solubilidade do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu são similares aos de outras proteínas vegetais, sendo caracterizados por uma alta solubilidade em pH alcalino, mínima solubilidade no ponto isoelétrico e moderada solubilidade em meio ácido. Tanto para o concentrado como para o isolado protéico de cupuaçu, a mínima solubilidade foi observada na

faixa de pH 3 a 5, sendo que esta faixa engloba o ponto isoelétrico das proteínas do cupuaçu (3,5).

- Observou-se que, de maneira geral, o isolado protéico de cupuaçu apresentou maior solubilidade em comparação com o concentrado protéico.

- Tanto a farinha como o concentrado apresentaram alta capacidade de retenção de água e de óleo, observando-se para o isolado protéico os menores valores em ambos os atributos avaliados.

- Observou-se boa capacidade emulsificante em pH 7,0, para a farinha, o concentrado e o isolado protéico, 987,50, 977,50 e 1380,00mL óleo/g produto, respectivamente.

- Os três produtos tiveram uma reduzida capacidade de formação de espuma tanto no pH 3,5 como no pH 7,0, porém a espuma mostrou alta estabilidade.

- Não foi verificada formação de gel, nas concentrações e pHs testados, em nenhum dos produtos estudados (farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de cupuaçu).

- Os três produtos estudados (farinha desengordurada, concentrado e isolado protéico de cupuaçu) apresentam características próprias, diferentes das de outras sementes, abrindo possibilidades de utilização, não somente para enriquecer produtos alimentícios, mas também para alvejar certas propriedades funcionais. Contudo, maiores pesquisas são necessárias com o objetivo de estudar o desempenho da funcionalidade destes em sistemas complexos de alimentos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Washington: Worwitz, W., 1997.

AULER, F. **Produção e caracterização de farinhas e concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus cruentus*)**. 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BÉROT, S.; DESHAYES, G.; GUEGUEN, J. Cottonseed protein-rich products from glandless African varieties. 2-Pilot-plant scale production of protein isolates. **Sciences des Aliments**, v. 15, p. 335-346, 1995.

BOATRIGT, W. L.; HETTIARACHCHY, N. S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 72, n. 12, p.1439-1444, 1995.

BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 28, n. 2, p. 159-169, 1988.

CÂNDIDO, L. M. B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais.** 1998. 207p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

CHAU, C. F.; CHEUNG, C. K.; WONG, Y. S. Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2500-2503, 1997.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias.** Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.

DAMODARAN, S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 262-269, 1988.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides and protein. In: FENEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**, 3ed., New York: Marcel Dekker, 1996. 373p..

DE KANTEREWICZ, A. M. R.; ELIZALDE, B. E.; PILOSOFF, A. M. R.; BHARTHOLOMAI, G. B. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n.5, p. 1381-1383, Sept./Oct. 1987.

GLÓRIA, M. M. **Obtenção e caracterização de concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará.** 1996. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

HENN, R. L.; NETTO, F. M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates (SPI). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3009-3015, 1998.

KESTER, J. J.; RICHARDSON, T. Modification of whey proteins to improve functionality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 2757-2774, 1984.

KHALIL, M. M. Biochemical and technological studies on the production of isolated guar protein. **Nahrung**, v. 45, n. 1, p. 21-24, 2001.

KINSELLA, J. E. Functional properties in foods: a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton: CRC Press, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KINSELLA, J. E. Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams. **Food Chemistry**, v. 7, p. 273, 1981.

KINSELLA, J. E. Relationships between structure and functional properties of food proteins. In: FOX, P. CONDON, J. **Food Proteins**. New York, Applied Science Publisher, 1984. p.12.

KINSELLA, J. E.; DAMODARAN, S.; GERMAN, A. B. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. In: ALTSCHUL, A. M.; WILCKE, H. L. **New protein foods**. 2ed. Orlando, Academic Press, 1985. v. 5, cap. V, p. 107-179.

LIADAKIS, G. N.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Isolation of tomato seed meal proteins with salt solutions. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 450-453, 1998.

LIN, M. J. Y.; HUMBERT, E. S.; SOSULSKI, F. W. Certain functional properties of sunflower meal products. **Journal of Food Science**, v, 39, n. 2, p. 368-370, 1974.

MA, C. Y. Functional properties of acylated oat proteins. **Journal Food Science**, Chicago, v. 49, p. 1128-1131, 1984.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGESTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. M.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, Nov./Dec. 1985.

OTEGUI, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; DE DIEGO, A.; CID, C.; MACARULLA, M. T.; PARTEARROYO, M. A. Properties of spray-dried and freeze-dried faba bean protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 439-443, 1997.

PAREDES-LÓPEZ, O.; ORDORICA-FALOMIR, C.; OLIVARES-VÁZQUEZ, M. R. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 726-729, 1991.

PEZOA-GARCÍA, N. H. **Estudo sobre a utilização de hidrociclones para a separação de partículas no processamento de concentrado e isolado protéico de soja**. 1985. 109p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, v. 64, p. 237-243, 1999.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações - modificações**. São Paulo. Livraria Varela, 1996. 517p.

SILVA, J. B.; BORA, P. S.; NETO, V. Q. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) modificado por acetilação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 263-269, 1997.

SOSULSKI, F.; HUMBERT, E. S.; BUI, K.; JONES, J. D. Functional properties of rapessed flour, concentrates and isolates. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 6, p. 1349-1376, 1976.

SWAMYLINGAPPA, B.; SRINIVAS, H. Preparation and properties of protein isolate from hexane-acetic acid treated commercial soybean meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2907-2911, 1994.

TAKEITI, C. Y. **Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2002. 102p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

TOMOSKOZI, S.; LÁSZTITY, R.; HARASZI, R. BATICZ, O. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. **Nahrung**, v. 45, n. 6, p. 399-401, 2001.

VILALBA, F. A. **Fragmentação mecânica de amêndoas de cupuaçu (*Teobroma grandiflorum*) por meio de um beneficiador de cilindros**. Campinas: UNICAMP, 2003. 78p. (Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos).

VOUTSINAS, L. P.; NAKAI, S.; HARWALKAR, V. R. Relationships between protein hydrophobicity and thermal functional properties of food proteins. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, v. 16, n. 3, p. 185-190, 1983.



## CAPÍTULO 6

### CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE CONCENTRADO E ISOLADO PROTÉICO OBTIDOS A PARTIR DE SEMENTES DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum).

Ana Vânia Carvalho<sup>1</sup>; Nelson Horacio Pezoa García<sup>1</sup>; Jaime Amaya Farfán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP - C.P. 6121 - CEP 13083-970

<sup>2</sup>Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição - UNICAMP - Campinas - SP- Brasil.

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi a caracterização, quanto ao perfil eletroforético e composição de aminoácidos, das proteínas de concentrado e isolado protéico obtidos a partir de sementes de cupuaçu. Observou-se, através do perfil eletroforético das proteínas do concentrado e do isolado protéico, a presença de três principais bandas protéicas, com pesos moleculares variando de 20,03 a 39,79kDa além de três bandas fracas adicionais. As bandas mais fracas parecem ter sido seletivamente perdidas durante a extração alcalina para produção do isolado protéico, estando presentes apenas na farinha desengordurada e no concentrado protéico. Observou-se que a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de cupuaçu, apresentaram boa composição aminoacídica, com teores superiores aos recomendados para a grande maioria dos aminoácidos.

**Palavras-chave:** semente de cupuaçu, concentrado e isolado protéico, eletroforese, perfil de aminoácidos.

#### SUMMARY

The objective of this study was to characterize the protein of the protein concentrate and isolate obtained from cupuacu seeds in terms of their electrophoresis profiles and amino acid composition. The electrophoresis profile of the proteins indicated the presence of three main protein bands, with molecular weights ranging from 20.03 to 39.79 kDa, in addition to three weaker bands. The weaker bands seem to have been lost during the alkaline extraction for the production of the protein isolate, as they were only detected in the defatted flour and in the protein concentrate. All products (defatted flour, protein concentrate and isolate) presented good

amino acid compositions, as the contents of most amino acids were higher than those recommended for daily intake.

**Key-words:** cupuaçu seeds, protein concentrate, protein isolate, electrophoresis, amino acid profile.

## 1. INTRODUÇÃO

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 agradável e exótico (MATTIETTO, 2001). No beneficiamento do cupuaçu há o aproveitamento de somente 35% do fruto, correspondente à polpa. As sementes e a casca correspondem a 20 e 45% do peso do fruto, respectivamente, porém praticamente não são utilizadas (VASCONCELOS, 1999). Contudo, a possibilidade de aproveitamento das sementes, não só para a fabricação de produtos similares ao chocolate, mas principalmente como alimentos alternativos com qualidade nutricional superior, vem despertando grande atenção. Lopes (2000), estudando amêndoas de cupuaçu e cacau, encontrou que o valor biológico das amêndoas de cupuaçu foi significativamente superior ao do cacau, sugerindo que, após testes adequados, produtos à base de suas sementes poderiam ser usados, principalmente para o consumidor infantil.

O valor nutricional das proteínas como formadoras dos tecidos e promotoras da boa saúde em qualquer estágio de vida é bem conhecido. Apesar do valor calórico da proteína ser importante em determinadas condições fisiológicas, a sua maior importância está na quantidade e tipo de peptídeos e aminoácidos fornecidos ao organismo (RUSSEL, 1972).

As proteínas dos vegetais são todas “imperfeitas” como fontes individuais de aminoácidos essenciais, mas comumente podem satisfazer as necessidades de aminoácidos através de uma dieta variada. A aceitação de uma proteína como matéria-prima na indústria de alimentos não está condicionada apenas às suas propriedades nutritivas. Suas propriedades funcionais afetam de forma decisiva sua possibilidade de uso em alimentos industrializados (SGARBIERI, 1996).

O objetivo deste estudo foi a caracterização das proteínas de concentrado e isolado protéico obtidos a partir de sementes de cupuaçu, quanto ao perfil eletroforético e composição de aminoácidos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima

Foram utilizadas sementes de cupuaçu *in natura* devidamente secas, provenientes da Cooperativa Mista de Tomé-Açu (CAMTA), no Estado do Pará. As sementes foram quebradas em moinho de cilindros, segundo metodologia proposta por Vilalba (2003). A seguir, os *nibs* obtidos foram laminados em um rolo laminador e após isso, submetidos à extração parcial da gordura em prensa hidráulica de discos, utilizando-se pressão gradual até atingir 50 toneladas, em um período de tempo de extração de 50 minutos. Seguidamente foi complementada a extração de gordura utilizando-se o método proposto por Boatright e Hettiarachchy (1995), com algumas modificações. Uma parte do material semi-desengordurado foi misturado com cinco partes de hexano, agitado manualmente por 10 minutos e centrifugado a 1000xg por 10 minutos a 20°C. Após a centrifugação, o hexano contendo a gordura foi separado do precipitado e posteriormente recuperado para ser utilizado em novas extrações. A operação de extração da gordura foi repetida por mais 5 vezes. A seguir, o material desengordurado foi mantido em capela com circulação de ar por 6 horas e posteriormente permaneceu em estufa com circulação de ar a 30°C, durante 16 horas. O material desengordurado foi moído até aproximadamente 297µm, obtendo-se a farinha de sementes de cupuaçu, a qual foi utilizada no preparo do concentrado e isolado protéico.

## **2.2 Obtenção do concentrado e isolado protéico de semente de cupuaçu**

O concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu foram obtidos conforme descrito no Capítulo 4.

## **2.3 Teor de proteína**

Utilizou-se, na quantificação do teor protéico da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico, o método semi micro Kjeldahl, baseado na hidrólise e posterior destilação da amostra, de acordo com o método 31.1.08 da AOAC (1997).

## **2.4 Perfil de aminoácidos**

### **2.4.1 Composição em aminoácidos totais**

Foi determinada por hidrólise ácida da amostra desengordurada, com HCl 6 N a 110°C, à vácuo, por 22 horas. A amostra foi recuperada em diluente de citrato de sódio pH 2,2, marca Pickering (SPACKMAN *et al.*, 1958).

As determinações foram feitas utilizando CLAE TSP – Thermo Separation Products (Riviera Beach, Estados Unidos), com bomba degaseificadora, acoplada a um módulo de pré-reação Pickering Laboratories PCX 3100 post column reaction module (Mountain View, Canadá), operando com detector de UV, nas faixas de 440 a 570 nm, modelo Spectro System UV2000. Foi utilizada coluna analítica Pickering Laboratories 1193250 (Na<sup>+</sup> 8µm, 3mm ID x 250mm) acoplada a uma pré-coluna Pickering Laboratories 1192020 (Na<sup>+</sup> 8µm, 2mm ID x 20mm). Soluções de Na (3,15; 7,4 e 0,2N) foram utilizadas com um fluxo de 0,3mL/min a 55°C na coluna e 130°C no reator.

### **2.4.2 Triptofano**

O aminoácido triptofano foi determinado após hidrólise enzimática com pronase, a 40°C, por 24 horas, seguida de reação colorimétrica, na ausência de luz, com dimetilamino benzaldeído (DAB) e nitrito de sódio, e posterior leitura em espectrofotômetro, a 540nm (SPIES, 1967).

## 2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A determinação do perfil eletroforético das proteínas da semente, amêndoa fermentada, amêndoa torrada e frações protéicas foi realizada de acordo com Laemmli (1970), com algumas modificações, utilizando-se o Sistema Mini- Protean II com fonte Bio Rad (Oregon, Estados Unidos) . As amostras (0,4% de proteína) foram dispersas em 1 mL de tampão contendo 42,5% de água destilada, 12,5% de Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), 20% de glicerol, 20% de SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,1% de bromofenol, aquecidas à 95°C por 5 minutos e após resfriamento, alíquotas de 5 $\mu$ L de cada amostra foram aplicadas no gel. Utilizou-se o gel de separação a 12% e o gel de empilhamento a 4%. Após a corrida, os géis foram mantidos em solução corante de Brilliant Blue G a 0,1% em ácido fosfórico por 24 horas e a seguir descorados em água destilada.

Os pesos moleculares da proteína foram determinados utilizando-se o padrão Pharmacia (17-0446-01): fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4kDa).

A densitometria dos géis foi realizada em densitômetro Sharp JX 330, empregando o *software* Image Master (Pharmacia) (Upsula, Suécia), para calcular os pesos moleculares aparentes de cada banda comparando-os à proteína-padrão.

## 2.6 Análises estatísticas

Os resultados das várias características avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas, comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SAS 8.0 (Statistical Analysis System).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Perfil de aminoácidos**

A Tabela 1 apresenta os teores de proteína total e aminoácidos totais da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu, comparado ao padrão referência (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE ACADEMIES, 2002). Observa-se uma ligeira variação nos teores de aminoácidos entre os três produtos estudados. Verifica-se que a farinha, o concentrado e o isolado protéico de sementes de cupuaçu apresentaram teores de proteína de 27,7, 31,2 e 64,3%, respectivamente.

De acordo com os dados apresentados, a histidina aparece como aminoácido limitante na farinha desengordurada, no concentrado e no isolado protéico de cupuaçu, com Escore Químico de 0,64 para a farinha desengordurada, 0,55 para o concentrado e 0,61 para o isolado protéico.

**Tabela 1** Teor de proteína total (%) e aminoácidos totais (mg/100mg de proteína) da farinha desengordurada, do concentrado, do isolado protéico de cupuaçu, do padrão de referência (IMA, 2002) e escores químicos.

Aminoácidos	Teor de aminoácidos			Escore químico			
	Farinha	Concentrado	Isolado	IMA <sup>a</sup>	EQ <sub>F</sub>	EQ <sub>C</sub>	EQ <sub>I</sub>
<b>Indispensáveis</b>							
Leucina	7,23 ± 0,14	6,74 ± 0,12	7,52 ± 0,07	5,5	1,31	1,23	1,37
Lisina	5,71 ± 0,04	5,36 ± 0,01	4,99 ± 0,02	5,1	1,12	1,05	0,98
Treonina	5,28 ± 0,04	5,16 ± 0,05	5,42 ± 0,09	2,7	1,96	1,91	2,00
Fenilalanina	4,38 ± 0,04	3,94 ± 0,09	4,38 ± 0,02	4,7 <sup>b</sup>	1,71 <sup>b</sup>	1,58 <sup>b</sup>	1,92 <sup>b</sup>
Tirosina	3,69 ± 0,11	3,50 ± 0,03	4,66 ± 0,02				
Valina	5,71 ± 0,14	5,07 ± 0,06	5,54 ± 0,05	3,2	1,78	1,58	1,73
Histidina	1,16 ± 0,03	0,99 ± 0,01	1,09 ± 0,04	1,8	0,64	0,55	0,61
Isoleucina	4,30 ± 0,15	3,62 ± 0,04	4,07 ± 0,04	2,5	1,72	1,45	1,63
Metionina	1,41 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,25 ± 0,01	2,5 <sup>c</sup>	1,60 <sup>c</sup>	0,94 <sup>c</sup>	0,95 <sup>c</sup>
Cistina	2,60 ± 0,05	1,99 ± 0,04	2,13 ± 0,02				
Triptofano	1,66 ± 0,02	1,60 ± 0,05	2,30 ± 0,07	0,8	2,08	2,00	2,88
<b>Não indispensáveis</b>							
Ac. Glutâmico	14,21 ± 0,20	13,12 ± 0,19	15,16 ± 0,22				
Arginina	5,93 ± 0,13	5,48 ± 0,07	6,83 ± 0,04				
Ác. Aspártico	12,19 ± 0,12	11,64 ± 0,15	14,53 ± 0,09				
Glicina	5,39 ± 0,01	4,84 ± 0,04	5,80 ± 0,05				
Serina	5,50 ± 0,17	5,39 ± 0,09	5,49 ± 0,03				
Prolina	4,52 ± 0,09	4,81 ± 0,05	4,68 ± 0,04				
Alanina	4,63 ± 0,11	3,88 ± 0,06	4,07 ± 0,06				
<b>Proteína Total (%)</b>	<b>27,7 ± 0,13</b>	<b>31,2 ± 0,24</b>	<b>64,3 ± 0,35</b>				

<sup>a</sup> Teor de aminoácidos para crianças de 1 a 3 anos (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE ACADEMIES, 2002).

<sup>b</sup> fenilalanina + tirosina

<sup>c</sup> metionina + cisteína

EQ<sub>F</sub> : Escore químico da farinha desengordurada; EQ<sub>C</sub>: Escore químico do concentrado protéico; EQ<sub>I</sub>: Escore químico do isolado protéico

Para a farinha desengordurada de cupuaçu, observa-se altos teores de aminoácidos sulfurados, com Escore Químico de 1,60. Já para o concentrado e o isolado protéico, nota-se uma perda destes aminoácidos durante o processamento, com Escores Químicos de 0,94 e 0,95. Os teores de aminoácidos sulfurados encontrados no concentrado e isolado protéico, 2,37 e 2,38mg/100mg de proteína, respectivamente, encontram-se ligeiramente inferiores ao padrão de referência, que recomenda teores de 2,5mg/100mg de proteína, para crianças de 1 a 3 anos (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE ACADEMIES, 2002).

Quando se compara os teores de aminoácidos entre sementes de cupuaçu e cacau (LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001) verifica-se para o cupuaçu teores superiores para praticamente todos os aminoácidos, principalmente no que diz respeito aos aminoácidos leucina, isoleucina e tirosina, que são considerados limitantes no cacau.

Em trabalho realizado com isolado protéico de grão de bico, observou-se também uma redução nos teores de lisina, metionina e cisteína por ocasião do processamento. Os autores concluíram que essa diminuição seja, provavelmente, devido a uma grande redução das albuminas, as quais são ricas em lisina e aminoácidos sulfurados (SÁNCHEZ-VIOQUE *et al.*, 1999).

Em trabalho realizado por Lásztity *et al.* (2001), os autores também observaram uma redução nos teores de metionina e cisteína após o processamento de isolados protéicos de sementes de tremoço. Segundo eles, essas mudanças podem estar relacionadas com a perda de algumas proteínas solúveis e/ou ligadas a danos causados pela extração alcalina.

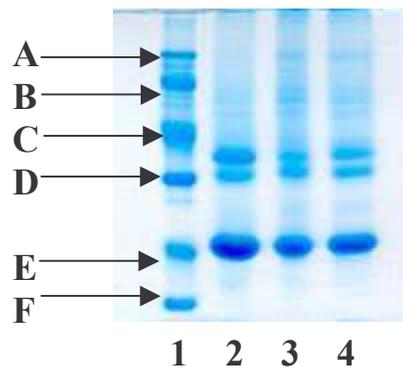
Tömöskezi *et al.* (2001), estudando proteínas isoladas de ervilha, observaram uma ligeira redução nos teores de metionina do isolado quando comparado à farinha de ervilha. Porém, para o aminoácido cisteína houve um aumento nos teores quando a proteína foi isolada.

Auler (2002), estudando concentrados e isolados protéicos de sementes de amaranto, encontrou altos teores de aminoácidos sulfurados tanto para as farinhas como para os concentrados obtidos. A autora relata que a presença destes aminoácidos pode favorecer inúmeras propriedades funcionais, tanto na área tecnológica (formação de gel) como na área fisiológica.

Em relação aos aminoácidos não indispensáveis, observaram-se teores elevados de ácido glutâmico e ácido aspártico, para a farinha desengordurada, para o concentrado e para o isolado protéico de semente de cupuaçu. Este fato pode contribuir para a melhoria das propriedades funcionais tecnológicas que exigem a presença de aminoácidos polares para conferir solubilidade à proteína (SGARBIERI, 1998).

### 3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu

O perfil eletroforético das proteínas, a descrição de seus pesos moleculares e a área de cada banda protéica, da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de cupuaçu estão apresentados na Figura 2, Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.



**Figura 2** Perfil eletroforético da proteína da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu, em gel 12% de poliacrilamida - SDS. Coluna 1: padrão *Pharmacia* (A: 97kDa, B: 66kDa, C: 45kDa, D: 30kDa, E: 20,1kDa, F: 14,4kDa); coluna 2: isolado protéico de semente de cupuaçu; coluna 3: concentrado protéico de semente de cupuaçu; coluna 4: farinha desengordurada de semente de cupuaçu.

**Tabela 2** Pesos moleculares das proteínas da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu.

<b>Farinha desengordurada</b>	<b>Concentrado protéico</b>	<b>Isolado protéico</b>
<b>(kDa)</b>	<b>(kDa)</b>	<b>(kDa)</b>
15,76	15,47	15,70
20,54	20,03	20,39
26,39	25,92	*
34,91	34,91	34,79
39,65	39,65	39,79
43,89	44,05	47,19
53,40	53,40	53,02
57,43	58,69	61,76
82,58	82,58	*

\* não detectadas

**Tabela 3** Área de cada banda protéica relativa à área total da proteína da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu, calculadas a partir da densitometria dos géis.

<b>Bandas</b>	<b>Distribuição das Bandas (%)</b>		
	<b>Farinha</b>	<b>Concentrado</b>	<b>Isolado protéico</b>
<b>(kDa)</b>	<b>desengordurada</b>	<b>protéico</b>	
15,47 – 15,76	3,24	3,06	2,53
20,03 - 20,54	45,73	46,40	49,17
25,92 –26,39	2,56	2,11	*
34,79 - 34,91	17,94	16,53	16,43
39,65 - 39,79	14,62	13,84	17,57
43,89 – 47,20	5,55	5,78	5,45
53,02 - 53,40	4,42	4,73	3,27
57,43 – 61,76	3,71	5,76	5,58
82,58	2,24	1,79	*

\* não detectadas

Pelo perfil eletroforético das proteínas mostrado na Figura 2, observa-se a presença de três principais bandas protéicas, com pesos moleculares variando de 20,03 a 39,79kDa e seis bandas fracas adicionais. Duas bandas mais fracas parecem ter sido seletivamente perdidas durante a produção do isolado protéico. É evidente que o mais proeminente de todos é o componente com peso molecular aparente próximo a 20kDa, seguido por dois componentes maiores de pesos moleculares aparentes próximos a 34,8 e 39,7kDa.

Adicionalmente, nota-se que o tratamento alcalino empregado na obtenção do isolado protéico não alterou a mobilidade eletroforética de nenhuma das bandas. Observa-se também que, embora existam outros componentes que possam estar associados à proteína na farinha ou no concentrado, eles não alteraram significativamente a carga elétrica da proteína ou, principalmente, a massa do complexo nativo.

Diversos trabalhos realizados com sementes de cacau descrevem a presença de quatro principais bandas protéicas para este produto, com pesos moleculares próximos a 47, 31, 21 e 14,5kDa. Após o processo fermentativo, estudos relataram que os polipeptídios com pesos moleculares de 47, 31 e 14,5kDa estavam ausentes, indicando que eles foram clivados em subunidades menores e que provavelmente sejam importantes para a formação de precursores do sabor do cacau. Já a fração de peso molecular próximo a 21kDa, mostrou-se resistente à proteólise durante a fermentação, não sendo degradada (BIEHL, WEWETZER e PASSERN, 1982; VOIGT, BIEHL e WAZIR, 1993; MACDONALD, MASTERS e PETTIPHER, 1994; AMIN, JINAP e JAMILAH, 1997; LERCETEAU *et al.*, 1999).

#### 4. CONCLUSÕES

- Todos os três produtos estudados, a farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu, apresentaram boa composição aminoacídica. A histidina foi o único aminoácido limitante nos três produtos. Já os aminoácidos sulfurados apresentaram teores adequados na farinha desengordurada, porém esses teores foram ligeiramente inferiores aos recomendados quando se analisou o concentrado e o isolado protéico.

- Três bandas fortes e distintas (20,4, 34,8 e 39,7kDa) foram observadas nos perfis eletroforéticos das proteínas de semente de cupuaçu presentes na farinha desengordurada, no concentrado e no isolado. Seis bandas adicionais tênues foram observadas na farinha e no concentrado, sendo duas delas praticamente ausentes no isolado.

- Sugere-se que novos estudos devam ser realizados, com o objetivo de aplicações futuras para este produto amazônico, atualmente sub-utilizado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Washington: Worwitz, W., 1997.

AULER, F. **Produção e caracterização de farinhas e concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus cruentus*)**. 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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

BOATRIGHT, W. L.; HETTIARACHCHY, N. S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 72, n. 12, p. 1439-1444, 1995.

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. Protein and amino acids. In: INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids**. Washington: The National Academies Press, 2002. Part 2, chap 10, p. 1-143.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LÁSZTITY, R.; KHALIL, M. M.; HARASZI, R.; BATICZ, O.; TÖMÖSKOZI, S. Isolation, functional properties and potential use of protein preparations from lupin. **Nahrung**, v. 45, n. 6, p. 396-398, 2001.

LERCETEAU, E.; ROGERS, J.; PÉTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 4, p. 619-625, 1999.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. 2000. 112p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MacDONALD, H. M.; MASTERS, K. E.; PETTIPHER, G. L. Partial purification of cocoa seed proteins and studies into the degradation of cocoa storage protein. **Café Cacao Thé**, v. 38, n. 2, p. 119-124, 1994.

MATTIETTO, R. A. **Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 2001. 164p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

OTEGUI, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; DE DIEGO, A.; CID, C.; MACARULLA, M. T.; PARTEARROYO, M. A. Properties of spray-dried and freeze-dried faba bean protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 439-443, 1997.

RUSSEL, C. **Chocolate Production and Use**, Books for Industry, 1972.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, v. 64, p. 237-243, 1999.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações - modificações.** São Paulo. Livraria Varela, 1996. 517p.

SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 32, n. 1, p. 105-126, 1998.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 30, n. 3, p. 1190-1206, June, 1958.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 1412-1415, 1967.

TOMOSKOZI, S.; LÁSZTITY, R.; HARASZI, R. BATICZ, O. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. **Nahrung**, v. 45, n. 6, p. 399-401, 2001.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).** 1999. 114p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

VILALBA, F. A. **Fragmentação mecânica de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) por meio de um beneficiador de cilindros.** 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

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





## CONCLUSÕES GERAIS

- O ponto isoelétrico das proteínas de sementes de cupuaçu situou-se na faixa de pH 3,5, sendo que nestas condições apresentaram ainda uma solubilidade protéica de 16,90%. Em pH 9, máximo pH estudado, a solubilidade de 61,88% é considerada baixa.

- As proteínas de cupuaçu possuem menor solubilidade que outras proteínas vegetais, nas faixas de pH de obtenção de isolados protéicos (pH 9) e maior solubilidade nas faixas do ponto isoelétrico, o que implica em um menor rendimento na obtenção de concentrados e isolados protéicos de cupuaçu.

- No respectivo ponto isoelétrico, as amêndoas fermentadas e amêndoas fermentadas torradas de semente de cupuaçu apresentaram uma solubilidade protéica de 16,28 e 10,28%, respectivamente.

- Em pH 9 observou-se uma solubilidade de 58,22% para as amêndoas fermentadas e 32,96% para as amêndoas fermentadas e torradas, respectivamente, sugerindo que o tratamento térmico provavelmente tenha causado desnaturação das proteínas.

- As sementes de cupuaçu apresentaram boa composição aminoacídica.

- As etapas de fermentação e torração provocaram uma ligeira redução nos teores de aminoácidos totais, quando comparado às sementes que não foram submetidas a essas etapas de processamento.

- Observou-se para sementes de cacau, a presença de quatro bandas protéicas principais, com pesos moleculares próximos a 17,7, 21,3, 37,3 e 55,3kDa. Para a semente e a amêndoa fermentada de cupuaçu, verificou-se também a presença de quatro bandas protéicas principais, com pesos moleculares próximos a 15,5, 20,4, 27,1 e 33,6kDa.

- As amêndoas que foram submetidas aos processos de fermentação, seguido de torração, observou-se, pelo perfil eletroforético das proteínas, a presença de uma única banda protéica forte, com peso molecular aparente de 21,0kDa. Para as demais bandas, houve um aparente total desaparecimento. Este fato pode ser atribuído à ocorrência de diversas reações químicas durante o processo de torração.

- As extrações para fracionamento das proteínas em diferentes solubilidades resultaram em frações protéicas impuras, com a presença de quatro bandas principais em todas as frações protéicas isoladas (16,1, 21,2, 34,8 e 40,5kDa), sendo a banda de peso molecular próximo a

21,1kDa a mais abundante em todos os casos. Esta banda é aparentemente muito semelhante à fração albumina do cacau, que apresenta peso molecular aparente de 21,3kDa.

- Utilizando-se as metodologias propostas neste trabalho, é possível a obtenção de concentrado e isolado protéico a partir de sementes de cupuaçu, com 31,18 e 64,33% de proteína, respectivamente.

- As proteínas do cupuaçu parecem estar interagindo com outros componentes da semente que previnem a sua liberação, impedindo a obtenção de concentrados e isolados com teores protéicos mais elevados.

- Tanto a farinha como o concentrado apresentaram boa capacidade de retenção de água e de óleo.

- A farinha, o concentrado e o isolado protéico mostraram boa capacidade emulsificante em pH 7,0, com valores de 987,50, 977,50 e 1380,00mL óleo/g produto, respectivamente. Dessa forma, estes produtos apresentam potencial de utilização, não somente para enriquecer outros alimentos, mas também para melhorar certas propriedades funcionais.

- A farinha desengordurada, o concentrado e o isolado protéico de semente de cupuaçu apresentaram boa composição aminoacídica. A histidina foi o único aminoácido limitante nos três produtos. Já os aminoácidos sulfurados apresentaram teores adequados na farinha desengordurada, porém esses teores foram ligeiramente inferiores aos recomendados quando se analisou o concentrado e o isolado protéico.

- Três bandas fortes e distintas (20,4, 34,8 e 39,7kDa) foram observadas nos perfis eletroforéticos das proteínas da farinha desengordurada, do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu. Cinco bandas tênues adicionais foram observadas na farinha e no concentrado, sendo duas delas praticamente ausentes no isolado.

- Maiores pesquisas são necessárias com o objetivo de estudar o desempenho da funcionalidade destes produtos protéicos em sistemas complexos de alimentos.

## ANEXOS

**Tabela 1** Valores médios e desvios padrões das temperaturas, durante o processo de torração de amêndoas de cupuaçu, por 50 minutos.

<b>Tempo (minuto)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
0	143,07 ± 3,13
2	90,57 ± 0,99
4	101,13 ± 1,82
6	110,03 ± 1,79
8	115,57 ± 2,31
10	121,33 ± 0,55
12	124,93 ± 1,17
14	128,27 ± 0,81
16	131,43 ± 1,59
18	133,13 ± 1,59
20	135,00 ± 1,39
22	136,90 ± 1,57
24	138,47 ± 1,66
26	139,93 ± 1,78
28	141,10 ± 2,01
30	142,20 ± 1,65
32	143,23 ± 1,68
34	144,23 ± 1,89
36	145,03 ± 1,78
38	145,70 ± 1,84
40	146,43 ± 2,18
42	147,07 ± 1,96
44	147,73 ± 2,27
46	148,07 ± 2,02
48	148,33 ± 2,06
50	148,57 ± 2,02

**Tabela 2** Valores médios e desvios padrões da solubilidade protéica da semente, amêndoa fermentada e amêndoa fermentada torrada de cupuaçu, em função do pH de extração.

pH	% solubilidade protéica		
	semente	amêndoa fermentada	amêndoa torrada
<b>2,0</b>	28,85 ± 0,66	25,62 ± 0,82	11,61 ± 0,41
<b>3,0</b>	18,03 ± 0,02	16,28 ± 0,50	10,53 ± 0,40
<b>3,5</b>	16,91 ± 0,38	16,55 ± 0,13	10,28 ± 0,02
<b>4,0</b>	18,23 ± 0,13	17,66 ± 0,33	10,80 ± 0,40
<b>5,0</b>	29,62 ± 0,14	26,47 ± 0,31	12,40 ± 0,19
<b>6,0</b>	36,33 ± 0,01	31,63 ± 0,40	14,68 ± 0,07
<b>7,0</b>	42,48 ± 0,04	40,90 ± 0,37	19,18 ± 1,22
<b>8,0</b>	51,61 ± 0,52	50,36 ± 1,11	24,73 ± 0,55
<b>9,0</b>	61,88 ± 0,45	58,22 ± 0,66	32,96 ± 0,23

**Tabela 3** Valores médios e desvios padrões da solubilidade protéica do concentrado e do isolado protéico de semente de cupuaçu, em função do pH de extração.

pH	% solubilidade protéica	
	concentrado	isolado
<b>2,0</b>	22,34 ± 0,27	51,43 ± 0,40
<b>3,0</b>	2,28 ± 0,15	2,95 ± 0,28
<b>4,0</b>	2,37 ± 0,16	0,99 ± 0,11
<b>5,0</b>	12,47 ± 0,87	2,78 ± 0,31
<b>6,0</b>	23,57 ± 1,36	16,71 ± 0,98
<b>7,0</b>	42,48 ± 1,84	61,61 ± 0,71
<b>8,0</b>	49,38 ± 1,12	90,99 ± 0,64
<b>9,0</b>	57,39 ± 1,67	97,08 ± 1,28
<b>10,00</b>	68,79 ± 1,16	97,17 ± 0,32

**Tabela 4** Valores médios e desvios padrões da estabilidade da espuma da farinha desengordurada de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0, ao longo do tempo.

pH	Estabilidade de espuma (%)			
	5 minutos	10 minutos	30 minutos	60 minutos
3,5	98,28 ± 2,44	98,28 ± 2,44	97,67 ± 1,61	97,69 ± 1,61
7,0	96,59 ± 1,29	96,59 ± 1,29	96,28 ± 0,85	95,96 ± 0,40

**Tabela 5** Valores médios e desvios padrões da estabilidade da espuma do concentrado protéico de semente de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0, ao longo do tempo.

pH	Estabilidade de espuma (%)			
	5 minutos	10 minutos	30 minutos	60 minutos
3,5	99,35 ± 0,92	99,03 ± 0,46	99,03 ± 0,46	99,03 ± 0,46
7,0	100 ± 0,01	99,68 ± 0,45	98,71 ± 0,01	97,74 ± 0,44

**Tabela 6** Valores médios e desvios padrões da estabilidade da espuma do isolado protéico de semente de cupuaçu, em pH 3,5 e 7,0, ao longo do tempo.

pH	Estabilidade de espuma (%)			
	5 minutos	10 minutos	30 minutos	60 minutos
3,5	95 ± 0,00	94,38 ± 0,00	94,38 ± 0,00	94,38 ± 0,00
7,0	92,74 ± 0,74	88,55 ± 0,30	87,71 ± 0,10	86,87 ± 0,29