



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DURANTE A
FERMENTAÇÃO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum Schumann*)**

CRISTIANO TIAGO SILVA DE SANTANA

**Ilhéus – Bahia – Brasil
Janeiro de 2013**

CRISTIANO TIAGO SILVA DE SANTANA

**ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DURANTE A
FERMENTAÇÃO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum Schumann*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:
Bioprospecção de Organismos,
Genes e Moléculas**

**Ilhéus – Bahia – Brasil
Janeiro de 2013**

S232

Santana, Cristiano Tiago Silva de.

Análise físico-química e microbiológica durante a fermentação de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schumann) / Cristiano Tiago Silva de Santana. – Ilhéus, BA: UESC, 2013.

79f. : il. ; anexos.

Orientadora: Rachel Rezende Passos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências: f. 55-66.

1. Cupuaçu. 2. Fermentação. 3. Microorganismos. 4. Físico-química. I. Título.

CDD 634.6

CRISTIANO TIAGO SILVA DE SANTANA

ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DURANTE A
FERMENTAÇÃO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum Schumann*)

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração:
Bioprospecção de Organismos,
Genes e Moléculas.

APROVADO: 31 de janeiro de 2013.

Prof. (a) Dr^a Carla Cristina Romano

UESC

Prof. Dr. Marco Gilberto Cardoso Costa

UESC

Prof.(a) Dr^a Carolina Schaper Bizzotto

Centro Mars de Ciência do Cacau

Prof.(a) Dr^a Rachel Rezende Passos

Orientadora

A minha amada esposa Patricia Fabiane Miranda de Souza e filha
Janine de Souza Santana pela dedicação e renúncias necessárias para a
realização de mais uma das etapas da vida.

DEDICO

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os momentos da minha vida.

À UESC através do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de obter novos conhecimentos durante a realização do curso.

À minha orientadora, Dr^a Raquel Passos Rezende, pelos valiosos momentos de ensinamentos.

À Mars Cacau, pelo apoio financeiro a este projeto, assim como a concessão da bolsa de mestrado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos dias especiais de aprendizado.

À Dr. Cristiano Villela, pela valiosa ajuda na condução dos experimentos.

À família MCCS, pela intensa colaboração desde as equipes do campo aos laboratórios e administrativo.

A toda minha família: irmãos, sobrinhos, tios, primos e a todos que torceram pela realização deste projeto.

A todos os amigos e colegas que participaram direta ou indiretamente na construção e realização deste trabalho.

Obrigado a todos e que Deus os abençoe em todos os momentos da vida.

EXTRATO

SANTANA, Cristiano T. S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia janeiro de 2013. **ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DURANTE A FERMENTAÇÃO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum Schumann*)**. Orientadora: Dr^a. Rachel Passos Rezende. Co-orientador: Dr. João Carlos Teixeira Dias.

Em análises sensoriais do produto final do cupuaçu também conhecido como cupulate, alguns autores descobriram características singulares, e quando comparado ao chocolate, demonstrou similaridade em suas propriedades. No entanto, no processo de fermentação do cupuaçu ainda são desconhecidos os microrganismos envolvidos, assim como algumas características físico-químicas, dificultando a obtenção de amêndoas uniformes. Com objetivo de elucidar o processo fermentativo do cupuaçu, neste trabalho durante o processo de fermentação foram isoladas e identificadas leveduras (LEV), fungos filamentosos (FF), bactérias acéticas (BAA), bactérias lácticas (BAL) e bactérias mesófilas. Os microrganismos foram identificados através da amplificação e sequenciamento das regiões do rDNA ITS1 para LEV e FF e rDNA 16S para as bactérias. O estudo físico-químico do processo fermentativo envolveu medidas de temperatura, pH, acidez total titulável; medidas de sacarose, glicose e frutose, os ácidos orgânicos, cítrico, acético e láctico e os alcoóis, etanol e metanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados mostraram todos os microrganismos presentes em todos os períodos, havendo predomínios e sucessões durante a fermentação. Os dados físico-químicos obtidos, também modificaram em períodos distintos e concomitantemente com as alterações da microbiota. Como primeiro trabalho que envolve a identificação genética dos microrganismos aliado aos resultados físicos e químicos, ficou possível estabelecer vínculo direto e indireto entre ambos e conseqüentemente o perfil de mudanças. A disponibilização destes dados, ou seja, com a informação dos principais protagonistas do processo fermentativo do cupuaçu, pode-se dizer que o mesmo não é totalmente desconhecido.

Palavras chave: Cupuaçu, fermentação, microrganismo, físico, químico.

EXTRACT

SANTANA, Cristiano T. S., University of Santa Cruz, Ilheus - Bahia January 2013. **PHYSICAL AND CHEMICAL ANALYSIS DURING FERMENTATION Microbiological CUPUACU (*Theobroma grandiflorum Schumann*)**. Supervisor: Dr ^a. Rachel Passos Rezende. Co-supervisor: Dr. Joao Carlos Teixeira Dias.

In sensory analysis of the final product cupuaçu aka cupulate, some authors have found unique characteristics, and compared to chocolate, showed similarity in their properties. However, in the fermentation process cupuassu are still unknown microorganisms involved, as well as some physico-chemical characteristics, making it difficult to obtain uniform almonds. In order to elucidate the fermentation cupuaçu, this work during the fermentation process were isolated and identified yeast (LEV), filamentous fungi (FF), acetic bacteria (BAA), lactic acid bacteria (LAB) and mesophilic bacteria. The microorganisms were identified by amplification and sequencing of regions of rDNA and ITS1 LEV FF and 16S rDNA for bacteria. The physico-chemical study of the fermentation process involved measures of temperature, pH, total acidity; measures of sucrose, glucose and fructose, organic acids, citric acid and lactic acid and alcohols, ethanol and methanol by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed all microorganisms present in all periods, with prevalences and succession during fermentation. The physicochemical data obtained also changed in different periods and concomitantly with changes in microbiota. As the first work that involves the genetic identification of microorganisms coupled with physical and chemical results, it was possible to establish direct and indirect link between them and consequently the profile changes. The availability of these data, ie, the information of the main protagonists of the fermentation process cupuaçu, one can say that it is not totally unknown.

Keywords: Cupuacu, fermentation, microorganism, physicist, chemist.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cupuaçuzeiro: a) árvore; b) folhas; c) flor; d) fruto; e) cotilédone envolvido com a polpa.....	5
Figura 2. Centro Mars de Ciência do Cacau --latitude 14° 43` 14.70``-e longitude 39° 22` 3.06``	19
Figura 3. Cupuaçu. a) frutos dos cultivares redondo e mamorana em diferentes formatos; b) coleta c) quebra; d) despulpagem; e) acondicionamento para fermentação.....	20
Figura 4. Contagem média para a micropopulação presente durante a fermentação.....	33
Figura 5. Mudança de temperatura durante a fermentação.....	39
Figura 6. Mudança de pH e TA na polpa e cotilédone durante a fermentação.....	40
Figura 7. Mudança no teor de sacarose, glicose e frutose na polpa durante a fermentação.....	42
Figura 8. Mudanças no teor de sacarose, glicose e frutose em cotilédone durante a fermentação.....	43
Figura 9. Mudança no teor de ácido cítrico, ácido láctico e ácido acético na polpa durante a fermentação.....	44
Figura 10. Mudança no teor de ácido cítrico, ácido láctico e ácido acético na cotilédone durante a fermentação.....	45
Figura 11. Mudanças no teor de metanol e etanol na polpa durante a fermentação.....	46
Figura 12. Mudança no teor de metanol e etanol no cotilédone durante a fermentação.....	47
Figura 13. Principais momentos de crescimento de micro-organismos, produção de alcoóis e ácidos orgânicos durante fermentação do cupuaçu.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programação de corrida para análise em CLAE.....	31
Tabela 2. Identificação de leveduras presentes na fermentação de cupuaçu.....	34
Tabela 3. Identificação de fungos filamentosos presentes na fermentação de cupuaçu.....	35
Tabela 4. Identificação de bactérias lácticas presentes na fermentação de cupuaçu.....	36
Tabela 5. Identificação de bactérias acéticas presentes na fermentação de cupuaçu.....	37
Tabela 6. Identificação de bactérias mesófilas presentes na fermentação de cupuaçu.....	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Acesso GenBank NCBI de leveduras identificadas.....	67
Anexo 2. Acesso GenBank NCBI de fungos filamentosos identificados.....	67
Anexo 3. Acesso GenBank NCBI de bactérias lácticas identificadas.....	68
Anexo 4. Acesso GenBank NCBI de bactérias acéticas identificadas.....	69
Anexo 5. Acesso GenBank NCBI de bactérias mesófilas identificadas.....	70
Anexo 6. Cromatogramas das análises de açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis.....	71

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Aspectos gerais.....	4
2.1.1. O cupuaçuzeiro.....	4
2.2. Importância econômica.....	6
2.3. Técnica da fermentação.....	7
2.4. Microbiologia na fermentação.....	8
2.5. Identificação molecular de microrganismos.....	11
2.6. Mudanças físico-químicas durante o processo de fermentação.....	13
3. OBJETIVOS	18
3.1. Geral.....	18
3.2. Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1. Fermentação.....	19
4.2. Amostragem para análises.....	20
4.3. Isolamento e purificação de microrganismos.....	21
4.3.1. Isolamento.....	21
4.3.2. Purificação.....	22
4.4. Identificação dos microrganismos isolados purificados.....	23
4.4.1. Extração de dna	23
4.4.2. Reação de PCR e sequenciamento.....	25
4.5. Análise físico-química da polpa e cotilédone.....	27
4.5.1. Temperatura.....	27
4.5.2. Preparo de amostras para análise de açúcares, ácidos orgânicos, alcoóis, pH e acidez titulável.....	27
4.5.2.1. Polpa.....	27
4.5.2.2. Cotilédone.....	28
4.5.3. Análise pH e acidez titulável.....	29
4.5.4. Análise de açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis.....	29

5. RESULTADOS.....	32
5.1. Micropopulação durante o processo fermentativo	32
5.1.2. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)	32
5.1.2. Microrganismos identificados	33
5.2. Mudanças físico-químicas durante o processo fermentativo	39
5.2.1. Temperatura	39
5.2.2. Acidez titulável e pH	39
5.2.3. Quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis na polpa e no cotilédone do cupuaçu	41
5.2.3.1. Quantificação dos açúcares na polpa e no cotilédone	41
5.2.3.2. Quantificação dos ácidos orgânicos na polpa e no cotilédone.....	43
5.2.3.3. Quantificação dos alcoóis na polpa e no cotilédone.....	45
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

O *Theobroma grandiflorum* é conhecido popularmente no Brasil como cupuaçu, principalmente na capital e em pequenas cidades do Amazonas (SETEC/CEFETAM, 2007). Considerado um fruto promissor e com características peculiares, nativo da Amazônia, começou a ser cultivado pelas comunidades indígenas como fonte primária de alimento na floresta amazônica, se destacando como a mais explorada comercialmente da região. Há também cultivo de espécimes isolados nos estados de São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro. Sua industrialização está baseada principalmente na produção de polpa da fruta (YANG et al., 2003, NAZARÉ, 2000; QUEIROZ & GARCIA, 1999), que apresenta acidez natural e elevado teor de pectina, características que favorecem a fabricação de produtos diversos (VENTURIERI et al., 1993; ROCHA, et al., 1999) encontrados em forma de sucos, cremes, compotas, sorvetes dentre outros tipos de aplicações culinárias (SOUZA et al., 1999).

O cupuaçuzeiro é uma espécie em domesticação, recebendo atenção crescente de diversas instituições de pesquisa, principalmente das situadas na região Amazônica. Entretanto, como se trata de planta perene, e tendo as pesquisas se iniciado em época relativamente recente, existem ainda diversos aspectos de seu processo de cultivo, e de processamento da fruta, necessitando de melhor definição em termos de indicações/recomendações com base técnico científica.

Acredita-se que o processo de fermentação do cupuaçu ocorra de maneira similar a fermentação às espécies de seu gênero. Porém, devido às

diferenças na composição da polpa, a diversidade de microrganismos e os metabólitos gerados podem variar.

Pode se dizer que a fermentação que ocorre em cupuaçu é favorecida por microrganismos como leveduras e bactérias ainda desconhecidos, presentes no ambiente. Estes microrganismos devem possibilitar transformações bioquímicas que originam precursores de aroma, sabor e cor do cupulate, que em análises sensoriais não apresentou diferenças significativas em suas propriedades, quando comparadas ao do chocolate, excetuando a sua textura, que foi mais bem aceita pelos degustadores, o que possibilitaria sua comercialização sem grandes dificuldades pelos consumidores (NAZARÉ, et al. 1990).

Embora a similaridade das amêndoas do cupuaçu com outras espécies em particular o cacau, tem-se despertado interesse científico e comercial, o processo de industrialização até então é rudimentar e sem nenhum tipo de controle, o que compromete a uniformidade da qualidade das amêndoas, e por conseguinte, o produto final. Com isto, para otimizar o processo fermentativo, é imprescindível obter um sistema eficiente, conhecer os principais microrganismos e as mudanças físicas e químicas ocorrentes.

Para o estudo da microflora o emprego de ferramentas moleculares como a amplificação de genes alvos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o posterior sequenciamento destas regiões como o rDNA 16s para bactérias e ITS1 para fungos filamentosos e leveduras, são empregadas frequentemente como fonte de heterogeneidade para distinguir espécies. Estas ferramentas propiciam com maior precisão e sensibilidade quando comparadas com as técnicas convencionais que analisam características fenotípicas (EDEL,

1998; LIU et al., 2002; SAUFRAMANIEN et al., 2003; CORRÊA, et al. 2007; CHAKRAVORTY, et al. 2007). Com estas características dos genes do rDNA das regiões do-ITS1 e 16S do rRNA,-é possível-avaliar precisamente a genética de populações entre diversos grupos taxonômicos (EDGECOMBE et al., 2000; HICKERSON & CUNNINGHAM, 2000; COLGAN et al., 2008; CHAKRAVORTY, et al., 2007; MALAY & PAULAY, 2009).

Estudos microbiológicos aliados as análises físico químicas como temperatura, pH, acidez total titulável, açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis presentes no processo fermentativo são imprescindíveis para o entendimento do processo fermentativo através da avaliação da dinâmica microbiana para traçar o perfil das modificações sucedidas durante o fermentação. Tecnicamente o estudo de diversidade e mudanças físico-químicas ocorrentes viabilizará pesquisas posteriores em busca da fermentação ideal, e produção de cotilédones uniformes, assim como os principais precursores dos sabores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais

2.1.1. O Cupuaçuzeiro

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schumann*) faz parte da família Malvaceae que possui aproximadamente de 65 gêneros e 1.000 espécies (RIBEIRO et al.,1999). O gênero *Theobroma*, corresponde a 22 espécies e é considerado o de maior importância econômica, destacando-se o *T. cacao* L. e *T. grandiflorum* (DUCKE,1953).

O cupuaçuzeiro (figura 1a) é uma espécie arbórea de médio porte (o diâmetro da copa atinge 7m e altura média de 4 a 10m) suas folhas são longas e largas (figura 1b) e as flores grandes e de cor vermelho escuro (figura 1c). Os frutos são grandes, redondos, com casca dura e lisa e de cor marrom escuro (figura 1d) e os cotilédones são envolvidas por uma polpa branca (figura 1e) (SETEC/CEFETAM, 2007).

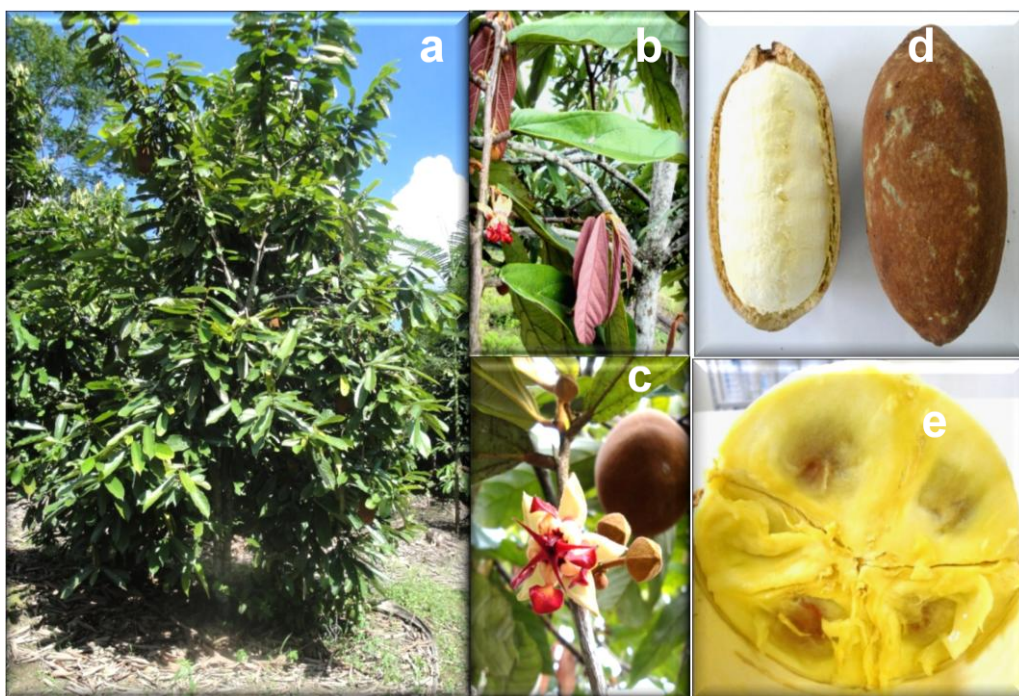


Figura 1. Cupuaçu: a) árvore; b) folhas; c) flor; d) fruto; e) cotilédone envolvido com a polpa.

A árvore do cupuaçu é de origem da Amazônia oriental, nativa da floresta tropical úmida de terra firme e várzea alta (CUATRECASAS, 1964; CALZAVARA, 1970; CALZAVARA et al., 1984; AGUILAR & GASPAROTTO, 1999). No Brasil é encontrado por toda a bacia amazônica, principalmente nos estados da região norte. Amazonas, Pará, Acre, Rondônia e Roraima são os maiores produtores da fruta no país. Na Bahia há também uma larga produção da fruta (SETEC/CEFETAM, 2007). Plantações pequenas podem ser encontradas em São Paulo e no Rio de Janeiro assim como em outros países como no Equador, Guiana, Martinica, Costa Rica, São Tomé, Trinidad Tobago, Ghana, Venezuela, Peru e Colômbia (VENTURIERI, 1993; AGUILAR & GASPAROTTO, 1999).

Os cultivares conhecidos e explorados comercialmente são denominados de cupuaçu-redondo, cupuaçu-mamorana, cupuaçu sem-semente. O cupuaçu redondo apresenta, geralmente, frutas com extremidades arredondadas, casca

com 6 mm a 7 mm de espessura com peso médio de 1,5 kg, sendo considerado o tipo mais cultivado na região Amazônica. O cupuaçu mamorana apresenta frutas com as extremidades alongadas, casca com 6 mm a 7mm de espessura, pesando em média 2,5 kg. O Cupuaçu sem sementes ou também conhecido como “sem caroço” ou cupuaçu de-massa é um mutante que possui fruta arredondada, pesa em média 2,5 kg, chegando a atingir 4,0 kg, rendendo cerca de 70% da fruta, enquanto os com semente rendem cerca 30% (SOUZA, 2001).

2.2. Importância econômica

Do gênero *Theobroma*, as espécies cupuaçu e cacau são as de maior importância quando se refere aos aspectos econômicos e sociais. Tradicionalmente, o cupuaçu é cultivado com maior constância nas pequenas propriedades familiares, e na maioria das vezes consorciada a outras culturas como a mandioca, milho, feijão bananeira ou mamoeiro (CEPLAC/CEPEC, 2011). Tem-se também áreas que fazem parte de projetos como o Projeto de Reflorestamento Econômico Consorciado Adesado (RECA) e o Projeto de Reflorestamento Econômico Para Ajuda Mútua (PREPAM), com cultivos de Sistemas Agroflorestais (SAF's), que consorciam cupuaçu, pupunha e castanha-do-Brasil (RIBEIRO, et al. 2005).

O interesse comercial pelo cupuaçu é cada vez maior devido ao sabor agradável da polpa e rentabilidade como cultura perene, além da facilidade na industrialização das sementes da fruta que desperta grande interesse tanto no mercado nacional quanto no internacional (SOUZA, 2007).

A polpa quando conservada em condições adequadas (temperaturas abaixo de -12°C), constitui-se excelente matéria prima para a industrialização na produção de néctares, sucos, sorvetes, doces, compotas, geléias, pudins, cremes, mousses, tortas, bolos, pães, biscoitos, pizzas, salames, licores, iogurtes e sobremesas em geral (RIBEIRO, et al. 2005).

A amêndoa origina o cupulate, “chocolate” de cupuaçu que começou a ser estudado pelo CPATU (Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental) da Embrapa, em 1986. Apresenta algumas vantagens como menor custo onde uma tonelada do produto à base de cacau tem custo de 10 a 25% superior à tonelada do cupulate. Segundo NAZARÉ e colaboradores (1990), as análises sensoriais do cupulate não apresentam diferenças significativas em suas propriedades (sabor, cor, odor) quando comparadas ao do chocolate, excetuando a textura do cupulate, que foi mais bem aceita pelos degustadores, o que possibilitaria sua comercialização sem grandes dificuldades pelos consumidores.

2.3. Técnica da Fermentação

O cotilédone do cupuaçu já foi estudada baseando-se nos métodos empregados no cacau (ARAGÃO, 1992). O mesmo ocorre com sua industrialização, abrangendo as etapas de fermentação, secagem e torração (CARVALHO et al. 2008).

Os frutos quando colhidos devem ficar no campo por um período de no máximo três a quatro dias (ROHAM, 1964; CEPLAC 1980). Esta é a média de tempo aconselhável para a pós colheita, necessária para liberação de açúcares

retidos na polpa que envolve a cotilédone, que por sua vez são essenciais para a fermentação (SOBRAL, 1982 *apud* ARAGÃO 1992). Intervalos superiores de pós colheita, apresentam frutos secos com acentuada diminuição de açúcares ocasionando o risco de ocorrer germinação (CEPLAC, 1980).

Em pesquisas da fermentação do cupuaçu já foram empregados diferentes métodos obtendo resultados satisfatórios (NAZARÉ, et al. (1990); ARAGÃO (1992), VASCONCELOS, (1999) e VENTURIERI & AGUIAR (1988)). Para melhoria do *flavor* foram realizados a neutralização da polpa (COUTINHO, 1969) com adequação na concentração de carbonato de cálcio (NAZARÉ, et al. 1983 *apud* ARAGÃO, 1992) e incremento de sacarose na massa (NAZARÉ, et al. 1990).

Vasconcelos (1999) utilizando caixas T-60 de acordo com Grimaldi (1978) com dimensões 190x120x60cm e espaçamento de 0,2cm entre as tábuas, fermentou semente de cupuaçu provenientes de resíduos de uma produção industrial e baseado nos estudos físicos e químicos do processo fermentativo observou que as amêndoas fermentadas possuíam características de qualidade superior concluindo que a metodologia empregada era adequada.

Já em um experimento de Aragão (1992) para fermentação de cupuaçu foi utilizada uma caixa de madeira com dimensões de 40x40x60 cm e o com frestas no fundo da caixa de 0,5 cm de largura. Durante sete dias foi efetivado revolvimentos a cada 24horas. Segundo o autor o processo fermentativo foi efetivo, pois, após o processamento da amêndoa notou-se que o produto possuí características de amêndoa fermentada.

2.4. Microbiologia da fermentação

Supõe-se que ocorre sucessão da microbiota para o favorece às modificações bioquímicas e físico-químicas durante o processo da fermentação (NAZARÉ, et al. 1990; ARAGÃO, 1992, VASCONCELOS, 1999; CARVALHO, 2008) . Partindo deste pressuposto pode se dizer que:

Em geral com a quebra do fruto, a polpa que envolve a semente é imediatamente contaminada por microrganismos do ambiente e dá início ao processo fermentativo pela degradação anaeróbica da glicose e outros nutrientes orgânicos para obtenção de energia (NELSON e COX, 2006).

Favorecida pela acidez da polpa e pH, o início da fermentação é marcada pela proliferação de várias espécies de leveduras e começo da conversão anaeróbica dos açúcares da polpa em etanol, marcando a primeira atividade microbiológica, conhecida como fermentação alcoólica (LOPEZ & QUESNEL, 1973; NELSON & COX, 2006). O resultado da primeira ação pode ser o aumento da temperatura da massa, rompendo as células da polpa nas primeiras 24-36 horas, dando origem ao aparecimento de exsudação aquosa também conhecida como mel, que transborda pelas frestas do fundo da caixa (LOPEZ & QUESNEL, 1973; CAMU, 2008).

A função primária de alguns gêneros de leveduras é a conversão de sacarose, glicose e frutose a etanol e CO₂. A penetração do etanol em amêndoa pode ocorrer através da produção deste na polpa que favorece a entrada do mesmo. Além do etanol outras leveduras isoladas, possuem a

capacidade de produzir ácidos orgânicos como acético e lático (GÁLVEZ et. al., 2007).

As leveduras quando metabolizam o ácido cítrico causam elevação gradual do pH favorecendo o desenvolvimento de bactérias lácticas. Espécies de bactérias lácticas podem fermentar uma extensa variedade de açúcares, dentre eles as pentoses e consumir ácido málico e cítrico para produção de ácido lático, acético e dióxido de carbono, resultando na queda da acidez e elevação do pH (CARR, 1982 *apud* DRUMMOND, 1998; CAMU, 2008).

A suspensão do crescimento das bactérias lácticas em fermentação ocorre principalmente devido ao fim da presença dos açúcares utilizados como substrato. Depois dos dois dias de fermentação, a aeração da massa, a redução dos açúcares, a presença de etanol e ácido lático, a elevação da temperatura para cerca de 35-40 °C e pH acima de 4, ocorre o favorecimento do desenvolvimento de bactérias acéticas que são capazes de crescer na presença de etanol. O etanol utilizado como substrato na presença de oxigênio favorece a conversão do mesmo a ácido acético e água, produzindo considerável quantidade de energia através de uma reação exotérmica, elevando a temperatura para cerca de 50 °C (GÁLVEZ et al., 2007).

As leveduras e as bactérias lácticas, além de produzirem etanol e ácido lático respectivamente, possuem papel importante na degradação da polpa devido a secreção de enzimas pectinolíticas (THOMPSON et al., 2001; SCHWAN & WHEALS, 2004).

Ardhana & Fleet (2003) também relatam que a presença de quantidade significativa de espécies de fungos filamentosos possui elevado potencial lítico na mucilagem que envolve o cotilédone no início do processo fermentativo

durante as 24-36 horas de fermentação. Geralmente sucedem com maior intensidade nos últimos dias da fermentação e são comumente relacionados com a formação de “*off flavors*” e deterioração (SCHWAN & WHEALS, 2004).

As bactérias acéticas encontradas comumente em fermentação, além de propiciarem a acidez e elevada temperatura da massa, são responsáveis pela hidrólise e difusão das proteínas no cotilédono. A partir de 72 horas de fermentação a quantidade de bactérias acéticas começam a diminuir (DIMICK & HOSKIN, 1981 *apud* MATTIETTO, 2001).

Há relatos também que o papel das bactérias mesofílicas não foi totalmente elucidado, no entanto, tem-se especulado que ambas podem causar *off-flavours* devido a sua elevada capacidade enzimática e produção de ácidos graxos livres de cadeias curtas (SCHWAN et al., 1986; SCHWAN & WHEALS, 2004).

2.5. Identificação molecular de microrganismos

Com o avanço da biologia molecular, a extração do DNA e amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) aliada ao sequenciamento, permitem o estudo de microfloras com maior precisão e sensibilidade quando comparadas com as técnicas convencionais que analisam características principalmente morfofisiológicas (CORRÊA et al. 2007). Neste contexto o rDNA tem sido vastamente utilizado pelo fato de apresentar múltiplas cópias no genoma, possuir regiões altamente conservadas e alternadas com regiões variáveis (KURTZMAN & ROBNETT, 1998; LUDWIG & KLENK, 2001; GUPTA & GRIFFITHS, 2002; EDEL, 1998; LIU et al., 2002; SAUFRAMANIEN et al., 2003)

O rDNA é utilizado para se obter dados detalhados para comparações entre diferentes grupos taxonômicos devido a presença de regiões codificantes e não codificantes, que evoluem em diferentes táxons, além do fato de que os ribossomos estão presentes em todos os organismos de uma origem evolutiva em comum. Isto disponibiliza informações imprescindíveis para estudos que utilizam a análise do rDNA para avaliação de diversidade de microrganismos, incluindo leveduras, fungos filamentosos e bactérias (GLARE & INWOOD, 1998; VALENTE et al., 1999; DRIVER et al., 2000; KATSU et al., 2004; HERMOSA et al., 2004; COLGAN et al., 2008; MALAY & PAULAY, 2009).

O rDNA dos fungos e leveduras é arranjado em unidades em tandem. Uma unidade inclui 3 genes rDNA (18S, 5,8S e 28S) e cada unidade é separada por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). Os ITSs entre os genes evoluem bem mais rápido, sendo consideradas regiões menos conservadas e frequentemente utilizadas como uma fonte de heterogeneidade para distinguir espécies de fungos e leveduras de seus respectivos gêneros e/ou diversidade intraespécies (EDEL, 1998; LIU et al., 2002; SAUFRAMANIEN et al., 2003).

As regiões do ITS são amplamente utilizadas pra caracterização molecular por motivos como: tamanho pequeno das regiões ITS (cerca de 500-800pb), permitindo facilidade na amplificação por PCR; característica multicópia da repetição rDNA, facilitando a amplificação destas regiões; a variabilidade desta região entre espécies distintas morfologicamente (BRIDGE & ARORA 1998).

Já no estudo de diversidade de bactérias o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (rDNA 16S) é amplamente utilizada por ser considerado um bom marcador molecular, que inclui a distribuição universal; função e estrutura conservada entre os táxons; transferência lateral ausente;

tamanho de sequência (1.500pb) suficiente para o aparecimento de divergências (LUDWIG & KLENK, 2001; GUPTA & GRIFFITHS, 2002). Segundo Chakravorty e colaboradores (2007) este gene contém nove regiões hipervariáveis (V1-V9) que demonstra considerável diversidade entre os diferentes gêneros e espécies bacterianas.

Com as características dos genes do rDNA das regiões do ITS1 e 16S do rRNA, torna-se possível a avaliação sistemática genética de populações entre diversos grupos taxonômicos (EDGECOMBE et al., 2000; HICKERSON & CUNNINGHAM, 2000; COLGAN et al., 2008; CHAKRAVORTY, et al., 2007; MALAY & PAULAY, 2009).

2.6. Mudanças físico-químicas durante o processo de fermentação

No processo fermentativo das sementes ocorre a etapa fundamental para processamento, pois é fase responsável pelo desenvolvimento dos precursores de inúmeros compostos de sabor. A fermentação começa naturalmente pela ação da atividade microbiana na polpa mucilaginosa, que envolve o cotilédone. Os principais metabólitos de origem do metabolismo dos microrganismos são os alcoóis e os ácidos orgânicos, além do calor gerado durante os primeiros dias de fermentação que promovem a destruição do poder germinativo da semente e desencadeiam primordiais transformações físico-químicas e estruturais (SCHWAN, 1996; BECKETT, 1994; MATTIETTO, 2001; SCHWAN & WHEALS, 2004; GALVEZ, et al., 2007).

Nos cotilédones de cupuaçu durante a fermentação o valor de pH encontrado inicia-se com 6,30, que decresce no decorrer do processo. Com 72

horas de fermentação atingi o valor mínimo de 5,36, na sequência e com pequenas oscilações se estabiliza e ao final da fermentação fica com pH em torno de 5,72 (VASCONCELOS, 1999).

Na polpa o pH encontrado inicialmente fica em torno de 3,55 atingindo 6,22 no final do processo. A elevação do pH é atribuída a assimilação do ácido cítrico encontrado na polpa que reveste a testa e é consumido pelas leveduras e bactérias lácticas ao longo da fermentação (ROHAN, 1964).

Trabalhos realizados por ARAGÃO (1992) e VASCONCELOS (1999), mostram que durante a fermentação ocorre elevação constante de pH com estabilização nos últimos dias.

Os perfis de pH na testa e no cotilédone evidenciam a influência da diversidade de ácidos desenvolvidos no decorrer da fermentação do cupuaçu (MATTIETTO, 2001).

Relatos relacionados à acidez no cotilédone mostram pequena mudança na acidez após 24 horas de fermentação. A acidez máxima foi atingida após as 48 horas do processo. Após atingir o valor máximo, a acidez diminui e permaneceu inalterada, mas, com pequenas oscilações até o final da fermentação (VASCONCELOS, 1999). ARAGÃO (1992) encontrou perfil de acidez similar, com a ressalva que em seu trabalho o valor máximo foi detectado após 24 horas de fermentação.

Na polpa a quantificação mais elevada de acidez titulável ficou em torno de 1,73, expressa em NaOH por 100g da amostra (VASCONCELOS, 2001).

Dados referentes às alterações na temperatura da massa durante a fermentação demonstram mudanças significativas, no início fica em torno de 30 °C e aumenta linearmente até atingir 47 °C em 72 horas do processo, a partir

deste tempo diminui gradativamente e com oscilações atingindo 41 °C no final da fermentação (MATTIETTO, 2001).

No entanto, diferente de Mattietto (2001) os perfis de temperaturas obtidos nos trabalhos realizados por Nazaré e colaboradores (1990), Aragão (1992) e Vasconcelos (1999), não é relatado oscilações nos últimos dias de fermentação.

Dados da formação de açúcares redutores produzidos a partir da sacarose presente nos cotilédones não fermentadas, são considerados uma das principais classes de compostos precursores do sabor (MATTIETTO, 2001).

A sacarose é hidrolisada durante a fermentação à glicose e frutose, estes chegam às suas concentrações ótimas dos açúcares redutores coincidindo com o desenvolvimento máximo do sabor (ROHAN & STEWART, 1967 *apud* MATTIETTO, 2001).

O teor de sacarose inicial fica em torno de 1,5-2% nas amêndoas frescas. Nos primeiros dias de fermentação este açúcar diminui rapidamente e o teor máximo dos açúcares redutores produzidos a partir do quarto dia, glicose e frutose ficam em torno de 0,05-2% e 0,3-5% (PEZOA, 1989 *apud* ZAMALLOA, 1994; CROS & JEANJEAN, 1995).

Estudando a fermentação do cupuaçu, VASCONCELOS (1999) percebeu que às transformações ocorridas nos açúcares são similares às descritas para o cacau. A concentração de sacarose ficou em torno de 1,84%, que foi rapidamente consumida. Já o teor de glicose e frutose encontrados no final da fermentação, após sete dias, ficou em cerca de 0,46% e 0,6% respectivamente.

Em estudo feito por Mattietto (2001) de ácidos orgânicos encontrados nos cotilédones de cupuaçu provenientes da fermentação do cupuaçu, destaca-se no início da fermentação a presença do ácido cítrico que a partir de 24 horas do processo fermentativo encontrar-se com concentração em torno de 0,28%, e com passar dos dias diminui suavemente atingindo no fim da fermentação 0,14%. O ácido láctico não é detectado no início da fermentação, mas, a partir de 24 horas é quantificado com cerca de 0,03%, obtendo acréscimo suave até atingindo pico máximo em 72 horas com 0,50%, decrescendo até não ser detectável ao fim do processo. Abaixo de 0,1% o ácido acético é encontrado no início da fermentação, no entanto, domina o processo a partir de 72 horas com sua maior concentração neste mesmo tempo em torno de 1,57% e com decréscimo para cerca de 0,82% no fim da fermentação.

Neste mesmo estudo a detecção de etanol em fermentação de cupuaçu começou a partir do tempo 24 horas com 0,56%, diminuindo para 0,2% no tempo 48 horas, sendo que a partir deste tempo os valores encontrados não foram significativos, provavelmente o mesmo tenha sido metabolizado por microrganismos do processo fermentativo.

Com relação à detecção e determinação de metanol em fermentação de cupuaçu, não foi encontrado trabalhos que citassem a presença do mesmo. No entanto, há relatos da presença de pectinas polimérica com elevado grau de esterificação na polpa mucilagínosa que envolve o cotilédone de cupuaçu (VRIESMANN, L. C., 2008). Sabe-se também, que na mesma contêm segmentos lineares de ácido galacturônico, cujos grupos carboxílicos podem esta metilesterificados com metanol (ROLIN, 1993 *apud* FERREIRA, 2008). As

proporções de grupos carboxílicos esterificados por metoxilas, são divididos em pectinas com alto teor de metoxilação e com baixo teor de metoxilação (TURQUOIS et al., 1999). O grau de esterificação de metanol em pectinas varia de acordo com a maturação dos frutos (LANZARINI e PIFFERI (1989) *apud* OLIVEIRA, 2006). Dependendo do teor de esterificação a metoxilação de pectinas, principalmente as de alta metoxilação, quando presentes, pode ocorrer desmetoxilação causada por pectinesterases (SERRAT et al. 2002). Estas enzimas removem os grupos metoxílicos de substâncias pécticas liberando metanol e H⁺. (SILVA, et al. 1997). Em meio ácido ocorre a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4, desmetoxilando os grupos esterificados das pectinas e em meio alcalino ocorre rápida desmetoxilação pela ruptura da ligação glicosídica pelo mecanismo de β -eliminação do C₄ (BOBBIO, 1992).

Sendo assim, torna-se possível a detecção e quantificação de metanol ao longo da fermentação de cupuaçu devido à composição polimérica de pectina da mucilagem que envolve o cotilédone.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Conhecer perfil de microrganismos e características físico-químicas durante o processo fermentativo do cupuaçu.

3.2. Específicos

Identificar a diversidade de leveduras e fungos filamentosos e bactérias acéticas, lácticas e mesófilas por técnicas dependentes de cultivo aliada ao sequenciamento das regiões gênicas ITS1 e 16S;

Quantificar parâmetros físicos e químicos de produtos provenientes da polpa e semente do cupuaçu procedentes do processo de fermentação;

Conhecer perfil e vínculo entre as mudanças microbiológicas, físicas e químicas para disponibilização de informações sobre processo fermentativo do cupuaçu.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fermentação

O experimento foi executado no Centro Mars de Ciência do Cacau (MCCS) (figura 2) localizado na latitude $14^{\circ} 43' 14.70''$ e longitude $39^{\circ} 22' 3.06''$, cidade de Barro Preto – Bahia – Brasil.



Figura 2. Centro Mars de Ciência do Cacau - latitude $14^{\circ} 43' 14.70''$ e longitude $39^{\circ} 22' 3.06''$ (Google Maps, 2012).

Três sucessivas fermentações foram realizadas com frutos maduros de dois cultivares e tamanhos variados (figura 3a) (após queda livre) de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) colhidos (figura 3b) e partidos (figura 3c) no dia seguinte à colheita e a etapa de fermentação foi realizada pela adaptação da metodologia proposta por Aragão (1992). Para cada experimento cerca de 600 frutos foram despulpados (despulpador Itametal mod.1.0 DF) parcialmente por

3 minutos (figura 3d) e aproximadamente 150,0Kg das sementes foram acondicionadas (figura 3e) em caixa de madeira de 60 cm³, permitindo a fermentação por 7 dias. Após 48 horas de fermentação, os cotilédones contidas nas caixas foram revolvidas em intervalos de 24 horas até 168 horas.

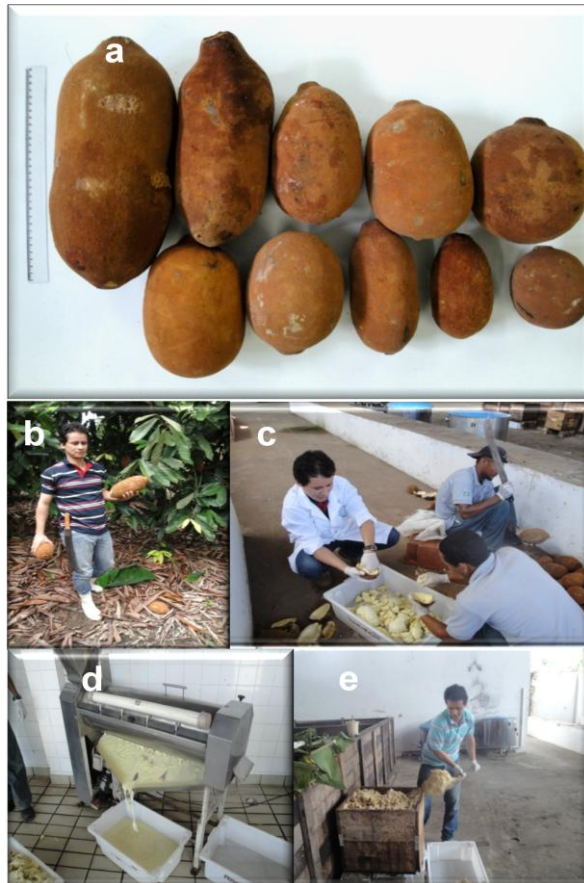


Figura 3: cupuaçu - a) frutos dos cultivares redondo e mamorana em diferentes formatos; b) coleta c) quebra; d) despulpagem; e) acondicionamento para fermentação.

4.2. Amostragem para análises

Para obter uma amostra representativa foram coletadas de cara réplica no total cerca de 100 gramas da massa por diversos pontos das caixas. As amostras foram transferidas para sacos estéreis (Nasco Whirl-Pak[®]) antes do

início e durante a fermentação em intervalos de 24 h até às 168 horas, representando os tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168h. Uma parte da amostra foi utilizada para o isolamento de microrganismos por técnica dependente de cultivo e a outra para análises físico-químicas.

4.3. Isolamento e purificação de microrganismos

4.3.1. Isolamento

Após homogeneização vigorosa por 3 minutos das réplicas coletadas a cada tempo, alíquotas de 25g foram diluídas em uma proporção de 1:10 (10^{-1}) de água peptonada 0,1% (Himedia) em temperatura ambiente e vortexada (VX-2500-VWR) por 2 minutos em um frasco de 340mL estéril (Samavidros 109305019). Imediatamente, após cada coleta e em capela de segurança biológica (Pachane PA420 – classe II) foram feitas três diluições seriadas no intervalo de 10^{-2} até 10^{-8} na proporção de 1:9mL de água peptonada 0,1% (Himedia) e vortexada (AP56-PHENIX) suavemente em tubo cônico de 50mL estéreis (Ref.:91050 – Techno Plastic) (SILVA, et al. 2007).

Após as respectivas diluições e em ambiente estéril (Pachane PA420 – classe II), duplicatas de cerca de 0,100mL foram imediatamente inoculadas por plaqueamento de superfície “*spread plate*” (SILVA, et al. 2007) em placas de Petri de 90x15mm estéreis e preenchidas com cerca de 25mL de meios de inoculações específicos, previamente esterilizados.

As leveduras foram enumeradas pela inoculação em ágar extrato de malte (Himedia), contendo 100 mg/L de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) e 50 mg/L clortetraciclina (Sigma-Aldrich), após 3 a 5 dias de incubação a 28 °C.

Para as bactérias lácticas foi feita enumeração após inoculação de superfície em ágar MRS (Himedia), contendo 0,2% de ácido sórbico (Merck) e cicloheximida 0,1% (Sigma-Aldrich) para suprimir o crescimento de leveduras, e 0,1% de cisteína-HCl (Sigma-Aldrich) para obter condições anaeróbias durante a incubação, além disso, as placas foram seladas em saco de polietileno e incubadas durante 3 a 4 dias à 30°C.

As bactérias do ácido acético foram enumeradas após inoculação em superfície GYC Agar (50g/L de glicose (Merck), extrato de levedura 10 g/L (Merck), carbonato de cálcio, 30g/L (Merck), ágar 20g/L (Merck), pH = 5,6), contendo cicloheximida 0,1% e incubadas por 3 dias a 30 °C (DRYSDALE AND FLEET, 1988; ARDHANA AND FLEET, 2003).

As bactérias mesofílicas, foram isoladas e enumeradas em ágar nutriente e 400m/L de cicloheximida (Sigma-Aldrich) e incubação por 2 dias a 30 °C (SILVA, et al. 2007).

Para isolamento dos fungos filamentosos, foi feita inoculação em ágar DRDC (5g peptona, 10g glicose, 1g fosfato de potássio, 0,5g sulfato de magnésio, 0,002g dicloram, 0,025g rosa de bengala, 0,1g clorafenicol e 15g Agar) e incubados por dois dias a 28 °C (SAMSON et al. 1992).

A contagem de colônias foi feita em contador (CP600 – Phoenix) e calculada em UFC/g pela média aritmética das duplicatas e respectivas diluições e multiplicação desta pelo inverso das diluições seriadas (SILVA, et al. 2007).

4.3.2. Purificação

A análise macroscópica foi feita empregando microscópio estereoscópio (Optech Germany mod. SZ) e retirado de cada isolamento colônias com características macro-morfológicas distintas para subsequentemente purificação. Nesta etapa procedeu-se com plaqueamento dos isolados selecionados, conforme inoculações feitas em meios seletivos utilizados anteriormente (item 4.3.1).

Após, confirmação macroscópica da purificação, uma colônia de cada inoculação foi submetida ao crescimento em cerca de 0,625mL de meio líquido acondicionados em tubos de 2,00mL (Cryou tubes - TRP[®]) sob agitação (Tecnal TE-421). Sendo que as leveduras foram inoculadas em meio YGP (5g/L extrato de levedura (Himedia), 10g/L peptona (Himedia), 10g/L glicose (Sigma-Aldrich), pH 5-6) e incubados por 2 dias a 28 °C a 180rpm, as BAA em YG (10g/L extrato de levedura (Himedia), 50g/L glicose (Sigma-Aldrich), pH 5-6) e incubados por 2 dias a 30 °C a 140rpm, as BAL em caldo MRS 55,15g/L (Himedia) e incubados por 2 dias a 30 °C a 140rpm, as BM em caldo nutriente 13g/L (Himedia) e incubados por 2 dias a 30 °C a 140rpm e o FF em caldo micológico 50g/L (Himedia) e incubados por 2 dias a 28 °C a 180rpm.

Após a cultura previamente crescida, foi adicionado 0,375mL de glicerol a 40% (v/v) estéril, homogeneizada, submetida ao congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenamento a -80 °C (CodLab CL374-80V) para análises moleculares posteriores.

4.4. Identificação dos microrganismos isolados purificados

4.4.1. Extração de DNA

Os isolados purificados foram submetidos ao crescimento em meio líquido e incubados sob agitação (Tecnal TE-421) em placas de 96 poços com capacidade de 2,00mL (Masterblock® - Greiner Bio-one) com adição de 10µL da suspensão do microrganismo purificado e 990µL de meio seletivo conforme item 4.3.1.

Após incubação os mesmos foram centrifugados a 4.000rpm, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 2,00mL de água ultrapura e vortexou por 2 minutos. Na sequência foi centrifugado novamente à 4.000rpm, cerca de 0,80mL do sobrenadante foi descartado e o restante foi vortexado por 2 minutos para subsequente extração de DNA.

Da suspensão dos isolados purificados, cerca de 10uL foram transferidos individualmente para placas de 96 poços com capacidade de 200µL (Multiplate® PCR Plates™, Low 96-well Clear, Cat. MLL9601, Bio-Rad). Para bactérias utilizou-se 50µL de Quick Extract Bacterial Extraction Solution (Epicentre, Cat. No. QEB09050) acrescido de 0,5µL de Ready-Lyse Lisozyme Solution (Epicentre, Cat. No. R1810M), posteriormente a solução foi vortexada por 2 min e incubadas à temperatura ambiente por 2 horas para que todas as bactérias fossem lisadas. Na sequência foram incubadas a 80 °C por 2 minutos para inviabilizar possíveis bactérias remanescentes e centrifugadas a 1.500rpm por 10 minutos para separação do pellet. O sobrenadante contendo DNA extraído foi transferido para uma nova placa e armazenado a -20 °C para posterior amplificação.

A extração de DNA das leveduras e fungos filamentosos foi realizada pela adaptação do método da HahnLab (2002), adicionou-se 10µL da

suspensão de isolados purificados a 30µL de SDS 0,2%, vortexou por 2 minutos e incubou-se a 90 °C por 4 minutos para lise. Posteriormente procedeu-se com a centrifugação a 4.000rpm por 1 minuto para pelletização de resíduos, retirou-se o sobrenadante com DNA extraído para um a nova placa e armazenou a -20 °C para posterior amplificação.

4.4.2. Reação de PCR e sequenciamento

Após a extração de DNA dos microrganismos purificados foi feita amplificação pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o rDNA correspondente ao gene 18S-5.8S-28S e ITS da região ITS1 rRNA para análise populacional de leveduras e fungos filamentosos e o gene 16S rDNA da região V1 (16S rRNA) para análise de diversidade de bactérias.

Para cada reação obteve-se um volume final de 50 µL contendo, 25,8µL de água nuclease free water; 10µL de 5X green Go Taq Flexi Buffer (Promega©); 2,5mM MgCl₂ (Promega©); 0,4mM de dTNP (Promega©); 0,2 µL de Triton[®] X-100 (Merck) a 25% para otimizar a atividade polimerase devido ao uso de detergentes na extração de DNA; 1,25u de GoTaq[®] DNA Polymerase 5u/µl (Promega); para leveduras 0,2mM do primer; ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') (IDT ref. 84967912) e 0,2mM do primer ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (IDT ref. 84967913); para bactérias 0,2mM primer 1512r (5'- ACGGCTACCTTGTTACGACT – 3') (IDT ref. 87064102) e 0,2 mM do primer 27f (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') (IDT ref. 87064103). Em cada poço da placa de PCR foi adicionado 49µL dos reagentes descritos acima, com 1µL do DNA extraído.

A amplificação (S1000™ Thermal Cycler - BioRad) do DNA pela PCR foi programada para bactérias com 94 °C/1minutos (desnaturação); 30 ciclos de 94°C/1minutos (desnaturação), 55 °C/1minutos (hibridação / anelamento) 72°C/1minutos (extensão); 72 °C/1minutos (extensão) e 4 °C de refrigeração para estocagem a -20 °C. Em leveduras a reações de PCR foram programadas com 95°C/2minutos (desnaturação); 30 ciclos de 95 °C/1minutos (desnaturação), 57°C/1minutos (hibridação / anelamento); 72 °C/1minutos (extensão); 72 °C/1minutos (extensão) e 4°C refrigeração para estocagem a -20 °C.

Após amplificação 5µL do produto de PCR de cada reação foi aplicado em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,5% (1,5g de agarose em solução TBE (10,8g tris base (Sigma-Aldrich), 0,2g ácido bórico (Fmaia) e 4mL EDTA (Sigma-Aldrich) a 0,5mM/L)) e submetidos as amostras à eletroforese em banho de TBE com 100V por cerca de 1 hora (Biorad reader 1000/500 Power Suply – Hooper Simple Sub (HSD)). Também foi aplicado padrão (High DNA Mass Ladder, Cat. No. 10496-016 - Invitrogen) para visualização do tamanho de pares de base.

Posteriormente o gel foi emerso em solução de brometo de étidio 0,1% por cerca de 15 minutos e fotodocumentado (Transiluminados L.PIX – Loccus Biotecnologia) para confirmação da amplificação.

O produto da PCR amplificado foi sequenciado (Applied Biosystems 3730xl) pelo método de Sanger da região 16S rDNA e ITS1 rDNA amplificados pelos primers 27f e ITS1 respectivamente. As sequências foram analisadas com programa SeqScape® e NCBI,s v2.2.10 (Macrogen Inc. - 908 World

Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul 153-781, Korea).

4.5. Análises físicas e químicas da polpa e do cotilédone

Como as condições externas e os dados obtidos durante as 3 fermentações foram muito similares, os resultados foram expressos mostramos os valores médios e desvios-padrão para todas as medições.

4.5.1. Temperatura

Para aferição da temperatura foi utilizado uma sonda portátil (Tinytag Ultra 2 – TGU-4510 em conformidade com a norma ISO 9001 e ISO 14001 – Gemini Data Loggers (UK) Ltd.) imersa na massa de cupuaçu durante o processo fermentativo.

4.5.2. Preparo de amostras para análise de açúcares, ácidos orgânicos, alcoóis, pH e acidez titulável

4.5.2.1. Polpa

Cerca de 25 g de cotilédones foram despulpadas (Walita LiqMais adaptado – Mod. RI 1725 - Philips) com 100,00 mL de água ultrapura por 1,5 minutos e toda solução foi transferida para um balão volumétrico de 250,00 mL. Com cerca de 80mL o despulpador foi lavado e a alíquota transferida para o

mesmo balão volumétrico, que por fim foi avolumado com água UP. Após aferição a solução foi transferida para um béquer e homogeneizada (Mix Malory Robot 330 Mod. 18690.01) por 30 segundos. Desta amostra 20mL foram diluídos para 100,00mL em balão volumétrico. Sendo que para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), aproximadamente 2,00 mL foram filtrados com membrana millipore (Millex™ LCR PTFE 0,45UM 13MM – JBR13LCRO) para um tubo de 2,00 mL (Screw caps, green, Amber vial – Part Number: 5182-0558 - Agilent) e o restante encaminhado para análise de acidez titulável (TA) e pH.

Para obtenção da concentração de polpa na amostra realizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Concentração da amostra (mg/mL)} = P1 - P2 / VT$$

P1 = peso inicial da cotilédone + polpa

P2 = peso da cotilédone após despolar

VT = volume total

4.5.2.2. Cotilédone

Cerca de 5 g das cotilédones despulpadas e sem a testa (retirada com auxílio do bisturi), foram colocadas em uma proveta de 50 mL avolumada com água UP à 70 °C. Após aferição foi transferidas para uma béquer e trituradas (Mix Malory Robot 330 Mod. 18690.01) por 1 minuto. Depois da trituração a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completado com água UP. Desta solução cerca 98 mL foi destinado para análise de TA e pH e

os 2 mL remanescentes foram centrifugados a 6.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana (Millipore Millex™ LCR PTFE 0,45UM 13MM – JBR13LCRO) para frasco um de 2 mL (Screw caps, green, Amber vial – Part Number: 5182-0558 - Agilent).

Para obtenção da concentração de amostra realizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Concentração da amostra (mg/mL)} = \text{SDT} \times 1000 / \text{VT}$$

SDT = Peso da cotilédone despolpada sem testa

VT = Volume total

4.5.3. Análise de pH e acidez total titulável

A determinação de pH foi realizada em duplicatas de cerca de 49 mL, empregando o pHmetro (*UltraBASIC*, UB-10, Denver Instrument) previamente calibrado. Em paralelo à análise de pH as mesmas amostras foram utilizadas para determinação de TA por titulometria de neutralização, utilizando NaOH com cerca 0,1 mol/L como solução padrão titulante, previamente padronizada com bftalato de potássio e indicador colorimétrico fenolftaleína 0,1% em solução hidroalcolica. Após calibração as amostras foram tituladas com a solução padrão até atingir aproximadamente pH 8,20 (VOGEL, 2002; HARRIS, 2008).

Segue abaixo a fórmula utilizada para quantificação de acidez total titulável.

$$\text{mg NaOH /g} = \frac{\text{NaOH gasto(mL)} \times \text{conc. NaOH(mol/L)} \times \text{peso molar NaOH(g)}}{\text{Conc. amostra(g/mL)} \times \text{volume amostra(mL)}}$$

4.5.4. Análise de açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis

Os teores de açúcares (sacarose, frutose e glicose), ácidos orgânicos (acético, cítrico e láctico) e álcoois (etanol e metanol) foram quantificados por CLAE (Agilent 1200 com detector de índice de refração (Rid)). O software de aquisição de dados usado foi o Agilent Chemstation (revisão B.04.01). A coluna utilizada foi a Aminex (Biorad HPX-87H, 300 mm x 78 mm (Cat. # 125 – 0140) S.N. 433842)) com fase móvel H₂SO₄ (Vetec) à 4mM. Os padrões externos (Cromatograma 1 – anexo 05) utilizados para calibração foi a sacarose P.A.-A.C.S. (Synth); a d-glicose anidra P.A.-A.C.S. (Synth); a frutose (Sigma-Aldrich); o ácido cítrico monohidratado (J.T.Baker); o ácido láctico 85% (Reagen); o ácido acético glacial (J.T.Baker); o álcool etílico (J.T.Baker); o álcool metílico (J.T.Baker). Ambos padrões foram preparados por dissolução em água ultrapurificada (UP 900, Bio Human) e filtrados em membrana (Millipore Millex™ LCR PTFE 0,45UM 13MM – JBR13LCRO).

A curva de calibração foi construída empregando o programa Agilent Chemstation (revisão B.04.01) utilizando 8 pontos de referência, estabelecidos por uma curva quadrática e correlação linear resultando um em coeficiente de correlação de cerca 0.9999.

Para análise das amostras o equipamento foi configurado (tabela 1) e os resultados adquiridos pós-corrída, foram integrados e cálculos baseados na curva de calibração conforme os respectivos tempos de retenção empregando programa Agilent Chemstation (rev. B.04.01).

Tabela 1. Parâmetros para análise de açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis em CLAE

Descrição	Configuração
Volume de injeção	2 µL
Réplicas	3
Fluxo	0,6 mL/min.
Pressão (bar)	~100
Temperatura da coluna	25 °C
Tempo de corrida	28 min.
Detector	Rid

5. RESULTADOS

5.1. Micropopulação durante o processo fermentativo

5.1.2. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

O figura 4 representa a contagem de UFC de microrganismos, que iniciou o processo da fermentação com $\log(\text{UFC/g}) = 4,66 (\pm 0,13)$ de leveduras com elevação para $\log(\text{UFC/g}) = 8,23 (\pm 0,14)$ em 24 horas e queda para $\log(\text{UFC/g}) = 6,20 (\pm 0,21)$ em 48 horas e permaneceu entre $\log(\text{UFC/g}) = 5,88 (\pm 0,04) - 6,50 (\pm 0,05)$ das 72 as 168 horas de fermentação. Já os fungos filamentosos iniciou a fermentação com $\log(\text{UFC/g}) = 4,49 (\pm 0,79)$ decrescendo para $\log(\text{UFC/g}) = 2,88$ em 48 horas e das 72 as 168 horas não foram encontrados UFC. As bactérias lácticas iniciaram a fermentação com $\log(\text{UFC/g}) = 4,82 (\pm 0,20)$, com pico de $\log(\text{UFC/g}) = 8,59 (\pm 0,08) - 8,58 (\pm 0,11)$ em 48 - 72 horas e decréscimo para $\log(\text{UFC/g}) = 7,48 (\pm 0,05)$ das 96 as 168 horas. As bactérias acéticas iniciaram com $\log(\text{UFC/g}) = 4,85 (\pm 0,16)$ e pequenas variações de 24 - 120 horas com $\log(\text{UFC/g}) = 6,05 (\pm 0,11) - 6,79 (\pm 0,35)$, com elevação para $\log(\text{UFC/g}) = 7,48 (\pm 0,09)$ em 144 horas e queda para $\log(\text{UFC/g}) = 6,48 (\pm 0,09)$ em 168 horas. As bactérias mesófilas iniciaram com $\log(\text{UFC/g}) = 5,01 (\pm 0,02)$ com aumento contínuo até atingir $\log(\text{UFC/g}) = 9,01 (\pm 0,57)$ em 72 horas e decréscimo para $\log(\text{UFC/g}) = 8,48 (\pm 0,21)$ em 168 horas de fermentação.

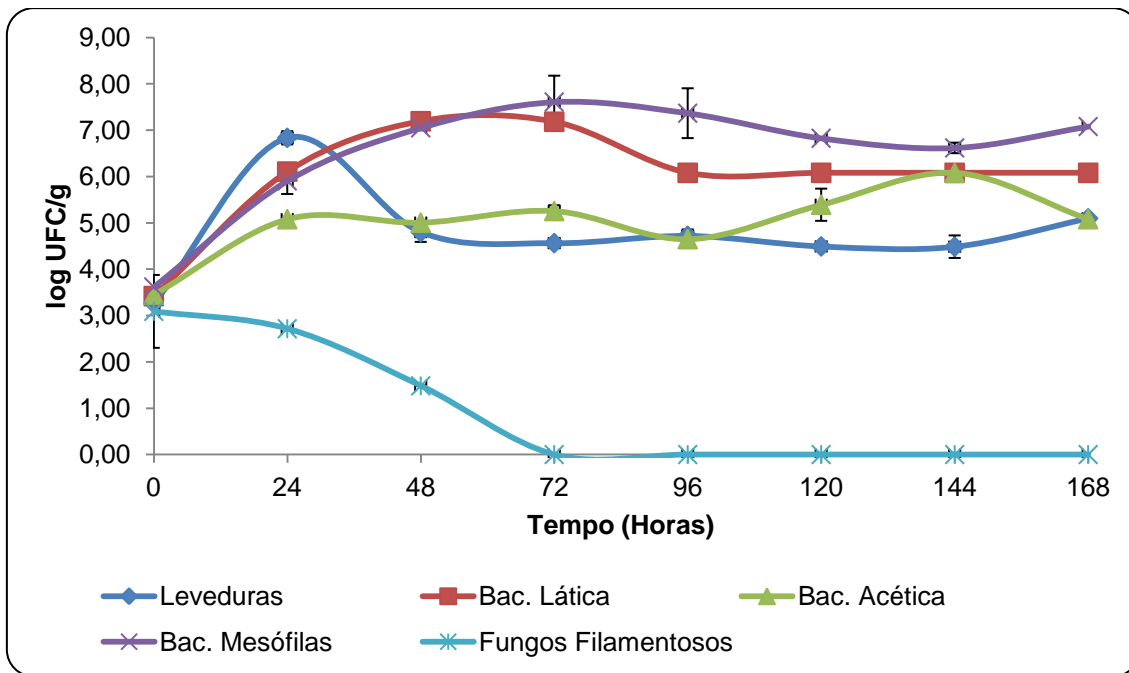


Figura 4. Contagem média com respectivos desvios padrões para a micropopulação presente durante a fermentação.

5.1.2. Microrganismos Identificados

De 9 gêneros das leveduras encontradas, foram identificadas 17 espécies durante o processo fermentativo do cupuaçu (tabela 2). Espécies de *Candida* foram identificadas do início ao fim da fermentação, sendo que a *C. ethanólica* dominou das 48 as 168 horas. O gênero *Hanseniaspora* dentre suas 3 espécies esteve presente somente do início às 48 horas. O gênero *Galactomyces* e duas de suas espécies *G. geotrichum* e *G. reessii* predominaram somente no início da fermentação. O gênero *Pichia* com 5 de suas espécies esteve presente em tempos distintos do início ao fim, sendo que a *P. cecembensis* e outras espécies não identificadas foram encontradas em tempos isolados, sendo que a *P. fermentans*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii* e a *P. membranifaciens* encontradas em intervalos de tempo durante o processo fermentativo. As espécies *Issatchenkia terrícola* e *Issatchenkia orientalis* foram

identificadas somente em 24 e 96 horas respectivamente. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* participou das 48 às 120 horas. Outras espécies de leveduras como *Debaryomyces etchellsii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Trichosporon asahii* e espécies não identificadas dos gêneros *Saccharomycetales*, *Saccharomycetes* e *Kazachstania*, estiveram presentes em tempos pontuais e isolados durante a fermentação.

Tabela 2. Identificação de leveduras presentes na fermentação de cupuaçu

*Microrganismos	Tempo de Fermentação em horas							
	0	24	48	72	96	120	144	168
<i>Candida berthetii</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida ethanolica</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida quercitrusa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida xylopsoci</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces etchellsii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Dipodascaceae sp</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Galactomyces sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Galactomyces geotrichum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Galactomyces reessii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora sp.</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Issatchenkia terricola</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Kazachstania sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia sp.</i>	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Pichia cecembensis</i>	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Pichia fermentans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Pichia membranifaciens</i>	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Saccharomycetales sp</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomycetes sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-

* Acesso GenBank NCBI - anexo 1.

Dentre os fungos filamentosos foram identificadas 3 gêneros com 3 espécies distintas e um eucarionte incultivável não identificado (tabela 4). Todos os gêneros foram encontrados somente do início até as 48 horas de fermentação. As espécies *Aspergillus giganteus* e *Aspergillus tamaritii* prevaleceram das 0 – 24 horas. Uma espécie não identificada do gênero *Geotrichum* foi encontrada somente com 24 horas de fermentação e a espécie *Paecilomyces variotii* e um eucarionte incultivável após 48 horas do processo

Tabela 3. Identificação de fungos filamentosos presentes na fermentação de cupuaçu

*Microorganismos	Tempo de Fermentação em horas							
	0	24	48	72	96	120	144	168
<i>Aspergillus giganteus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus tamaritii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum sp</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Uncultured eukaryote</i>	-	-	+	-	-	-	-	-

* Acesso GenBank NCBI - anexo 2.

As bactérias lácticas participaram da fermentação durante todo processo fermentativo. Foram encontrados 4 gêneros dentre estes 10 espécies (tabela 4). Uma espécie não identificada do gênero *Enterococcus* e as espécies *E. camelliae* e *E. faecalis* estavam presentes somente em 168 horas com exceção da *E. durans* que foi encontrada em 72 horas. As espécies do gênero *Lactobacillus*, foram as únicas que participaram do processo do início ao fim da fermentação dentre as bactérias lácticas, contudo, ambas estiveram presentes em intervalos de tempos distintos, sendo elas os *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e uma espécie não identificada que esteve presente até as 144 horas. Outras espécies como *Pediococcus acidilactici* foi encontrada em 144 horas e a *Weissella ghanensis* até às 48 horas.

Tabela 4. Identificação de bactérias lácticas presentes na fermentação de cupuaçu

*Microrganismos	Tempo de Fermentação em horas							
	0	24	48	72	96	120	144	168
<i>Enterococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Enterococcus camelliae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Enterococcus durans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Weissella ghanensis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-

* Acesso GenBank NCBI - anexo 3.

As bactérias acéticas também participaram do início ao fim da fermentação. Foram identificados 4 gêneros e 13 espécies com exceção de 3 bactérias incultiváveis não identificadas presentes durante todo processo e em tempos distintos (tabela 5). O gênero *Acetobacter* foi a que apresentou maior número de espécies, em torno de 9, ambas em tempos e intervalos diferentes, mas, durante toda fermentação. Dentre elas a *A. ghanensis*, *A. indonesiensis*, *A. lovaniensis*, *A. malorum*, *A. orientalis*, *A. orleanensis*, *A. pasteurianus*, *A. pero+ydans* e *A. tropicalis*, com exceção de outra espécie não identificada. Outro gênero encontrado foi o *Gluconobacter* com a as espécies *G. cerinus*, *G. frateurii*, *G. japonicus*, ambas presentes somente no início e em 48 horas de fermentação, no entanto, uma espécie não identificada foi encontrada no tempo 0-48 horas.

Tabela 5. Identificação de bactérias acéticas presentes na fermentação de cupuaçu

*Microrganismos	Tempo de Fermentação em horas							
	0	24	48	72	96	120	144	168
<i>Acetobacter</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Acetobacter ghanensis</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Acetobacter indonesiensis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Acetobacter malorum</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Acetobacter orientalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter orleanensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Acetobacter peroxydans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter tropicalis</i>	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>Arthrobacter</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Asaia krungthepensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter cerinus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter frateurii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter japonicus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter</i> sp.	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Uncultured bacterium</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Uncultured organism</i>	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Uncultured Acetobacter</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-

* Acesso GenBank NCBI - anexo 4.

Dentre os 16 gêneros de bactérias mesófilas encontradas durante toda fermentação, 13 espécies foram identificadas (tabela 6). A maior diversidade foi do gênero *Bacillus* com 8 espécies, sendo eles o *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. macroides*, *B. oleronius*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. vallismortis*, encontrados principalmente entre as 24 e 120 exceto as 48 horas. A espécie *Lysinibacillus fusiformis* e uma outra do mesmo gênero não identificada estavam presentes nos tempos 96 e 144 respectivamente. Outras espécies como *Corynebacterium flavescens*, *Providencia sneebia*, *Rummeliibacillus stabekisii*, *Staphylococcus saprophyticus* e outras espécies não identificadas dos gêneros *Kurthia*, *Paenibacillus* e *Stenotrophomonas*, foram encontrados principalmente de 72 – 168 horas menos o *Paenibacillus*

sp.presente no início da fermentação. Além disso, outras bactérias ainda não classificadas como *Bacterium NLAE-zl-C434* e *P687* estavam presentes nos tempos 144 e 168 horas dentre outras não cultiváveis durante todo processo.

Tabela 6. Identificação de bactérias mesófilas presentes na fermentação de cupuaçu

*Microorganismos	Tempo de Fermentação em horas							
	0	24	48	72	96	120	144	168
<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus macroides</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus oleronius</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Bacillus vallismortis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bacterium NLAE-zl-C434</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacterium NLAE-zl-P687</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Corynebacterium flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Kurthia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lysinibacillus</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Providencia sneebia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	+
Uncultured Bacilli bacterium	+	-	-	-	-	-	-	-
Uncultured bacterium	-	+	+	-	-	-	+	+
Uncultured compost bacterium	-	-	-	-	-	-	+	+
Uncultured gamma proteobacterium	-	-	-	-	-	+	-	-
Uncultured organism	-	-	-	-	-	-	+	+
Uncultured organism	-	+	+	+	+	+	+	+

* Acesso GenBank NCBI - anexo 5.

5.2. Mudanças físico-químicas durante o processo fermentativo

5.2.1. Temperatura

O figura 5 demonstra as mudanças de temperatura da massa elevando-se continuamente sem sofrer influências significativas da temperatura ambiente. O processo inicia com 30,29 °C e chega a 38,70 °C em 168 horas, que pode representar o fim da fermentação.

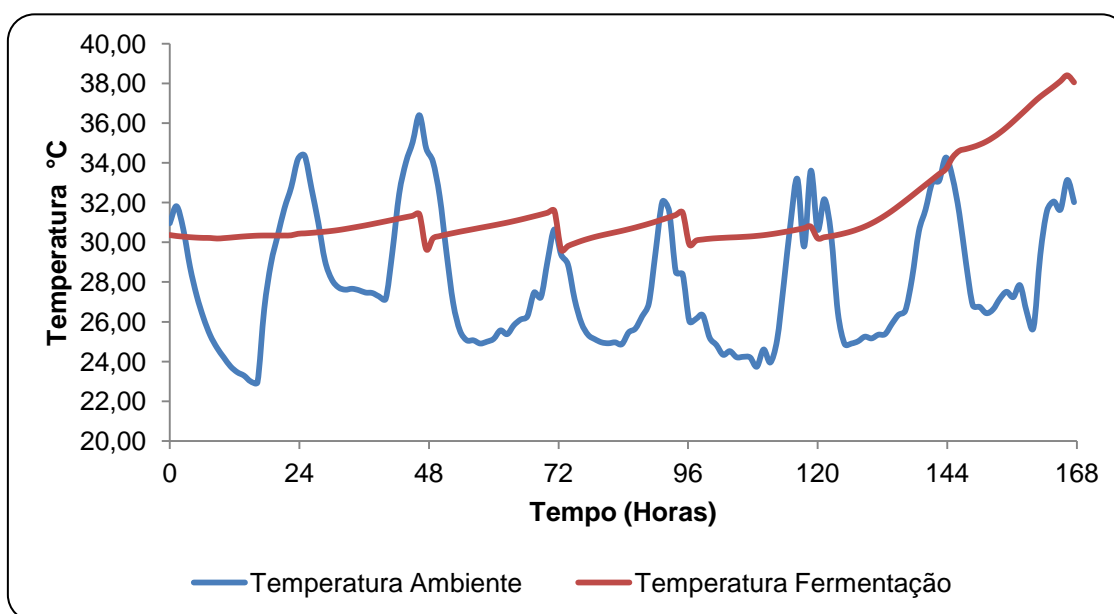


Figura 5. Mudanças de temperatura durante a fermentação.

5.2.2. Acidez titulável e pH

No figura 6 é demonstrado a evolução do pH e TA na polpa e na cotilédone durante a fermentação. Na polpa o início da fermentação foi marcado com pH 3,41 ($\pm 0,03$) e TA com 36,40($\pm 0,20$) mg NaOH/g. Em 48 horas a TA na polpa caiu bruscamente atingindo 19,77($\pm 0,40$) mg NaOH/g e o

pH aumentou para 3,91. Com 72 horas ocorreu aumento da TA para 33,86(\pm 2,05) mg NaOH/g com leve diminuição do pH para 3,83 e até as 144 horas houve pequenas variações em ambos. No decorrer do tempo a TA diminuiu para 22,58(\pm 0,89) mg NaOH/g com elevação do pH para 4,01 após atingirem as 168 horas.

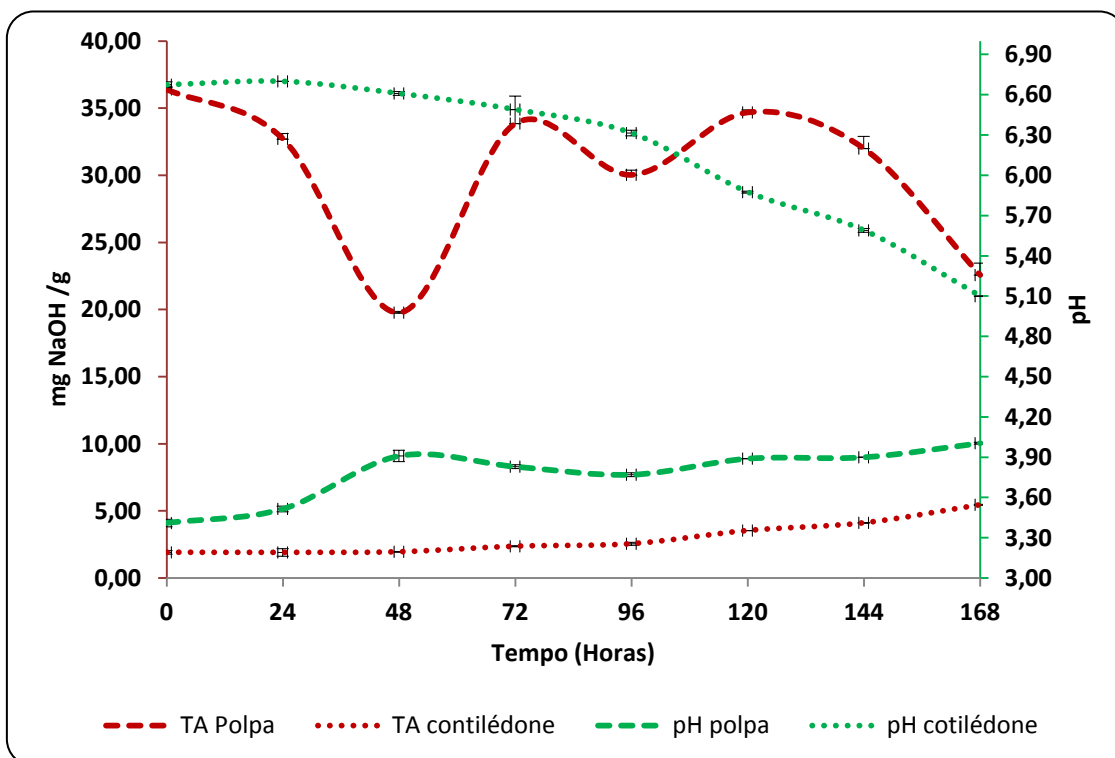


Figura 6. Mudança de pH e acidez titulável total com desvio padrão durante a fermentação do cupuaçu.

No cotilédone o pH e TA inicial foram de 6,68 e 1,92(\pm 0,13) mg NaOH/g respectivamente, no decorrer do processo houve discretas oscilações e em 168 horas a TA alcançou 5,46(\pm 0,04) mg NaOH/g e o pH reduziu para 5,10.

5.2.3. Quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis na polpa e no cotilédone do cupuaçu

5.2.3.1. Quantificação dos açúcares na polpa e no cotilédone

Os açúcares, sacarose, glicose e frutose presentes na polpa (figura 7) foram quantificados no início da fermentação com 100,61 ($\pm 0,33$) mg/g, 40,22 ($\pm 0,24$) mg/g e 41,29 ($\pm 0,42$) mg/g respectivamente. Em 24 horas ambos decresceram para 64,24 ($\pm 0,06$) mg/g de sacarose, 16,36 ($\pm 0,11$) mg/g de glicose e 18,06 ($\pm 0,12$) mg/g de frutose. A partir das 48 horas a sacarose diminuiu exponencialmente atingindo 2,08 ($\pm 0,14$) mg/g em 168 horas, já a glicose e frutose tiveram seu pico em 72 horas com 43,00 ($\pm 0,18$) mg/g e 76,86 ($\pm 0,31$) mg/g respectivamente, e a partir deste tempo ocorreu queda gradativa da glicose até não ser mais quantificada após 144 horas e a frutose chegou a 34,38 ($\pm 0,01$) mg/g em 168 horas.

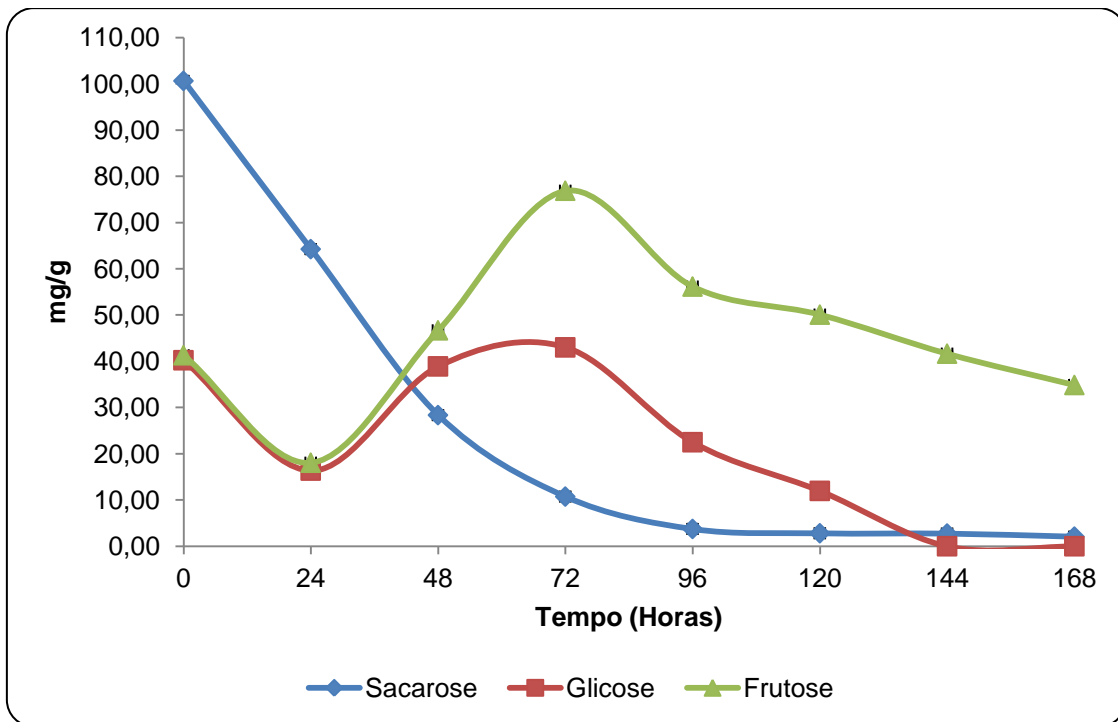


Figura 7. Mudanças na polpa de cupuaçu com respectivos desvios padrões do teor de sacarose, glicose e frutose durante a fermentação. Cromatogramas disponíveis no anexo 6.

No cotilédone as mudanças referentes aos açúcares foram discretas e com pequenas variações (figura 8). A sacarose no início ficou com teor de 15,02 ($\pm 0,03$) mg/g com queda para 10,71 ($\pm 0,04$) mg/g em 24 horas decrescendo continuamente até atingir 9,10 ($\pm 0,01$) mg/g em 144 horas e 6,28 ($\pm 0,001$) mg/g em 168 horas. Já a glicose e frutose começaram na fermentação com valores de 0,40 ($\pm 0,0001$) mg/g e 1,56 ($\pm 0,12$) mg/g respectivamente, elevando-se ambos para 1,59 ($\pm 0,01$) mg/g e 3,11 ($\pm 0,04$) mg/g em 144 horas e 3,25 ($\pm 0,02$) mg/g e 5,03 ($\pm 0,05$) mg/g 168 horas.

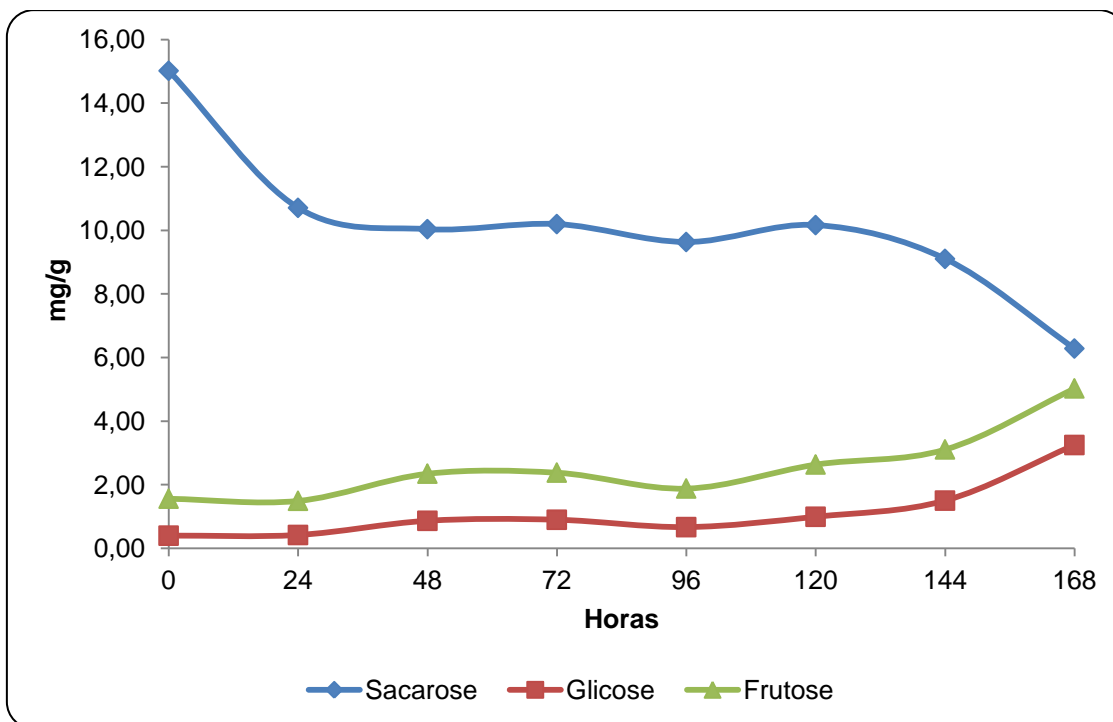


Figura 8. Mudanças no cotilédone de cupuaçu com respectivos desvios padrões do teor de sacarose, glicose e frutose em semente durante a fermentação. Cromatogramas disponíveis no anexo 6.

5.2.3.2. Quantificação dos ácidos orgânicos na polpa e no cotilédone

No figura 9 as mudanças dos ácidos orgânicos em polpa, foram mais significativas a partir das 48-72 horas de fermentação. Enquanto o ácido cítrico inicia o processo com 65,81 ($\pm 0,60$) mg/g e o ácido láctico com 0,96 ($\pm 0,54$) mg/g, o ácido acético não foi encontrado. A partir das 48 horas ocorreram modificações distintas, o ácido cítrico diminui para 12,90 ($\pm 0,52$) mg/g e depois das 72 horas não foi mais detectado, já o ácido láctico e acético atingiram pico em 72 horas com 44,34 ($\pm 1,30$) mg/g e 44,63 ($\pm 0,32$) mg/g respectivamente, a partir deste tempo decresceram para 19,71 ($\pm 0,58$) mg/g e 31,92 ($\pm 0,10$) mg/g em 168 horas.

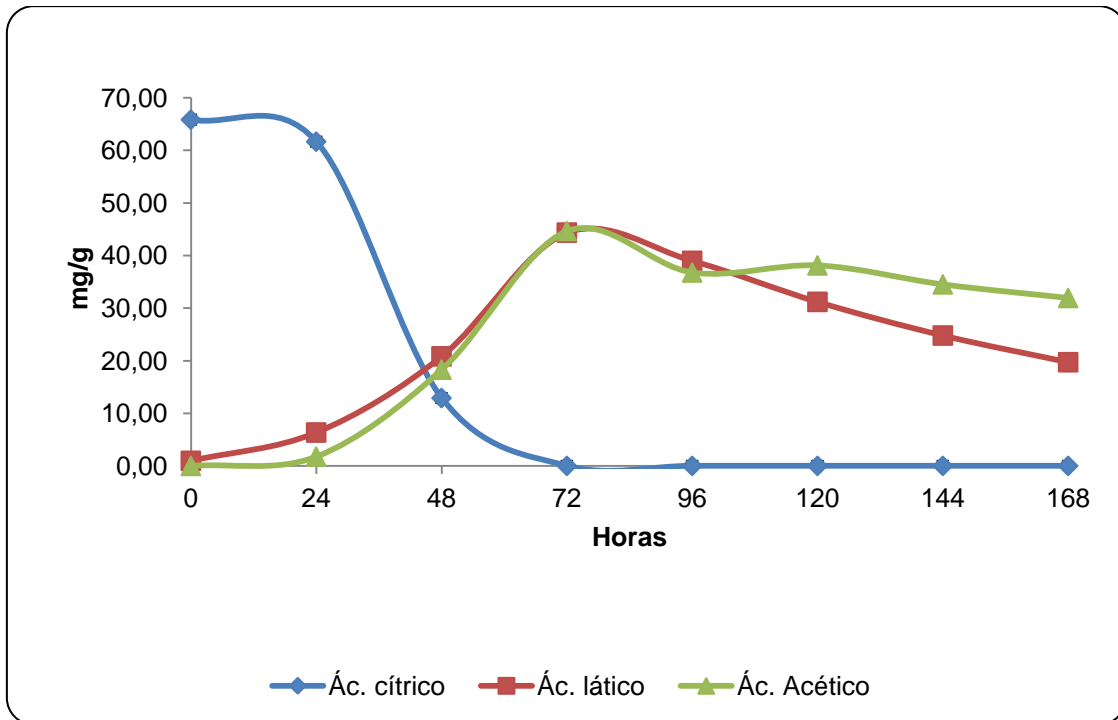


Figura 9. Mudanças na polpa de cupuaçu com respectivos desvios padrões do teor do ácido cítrico, láctico e acético durante a fermentação. Cromatogramas disponíveis no anexo 6.

No cotilédone as alterações expressivas dos ácidos orgânicos ocorreram a partir das 72 horas de fermentação (figura 10). O ácido cítrico começou o processo com $3,60(\pm 0,0005)$ mg/g aumentando discretamente em 72 horas para $3,99 (\pm 0,01)$ mg/g e começou a diminuir a partir deste momento atingindo $1,55 (\pm 0,02)$ mg/g em 168 horas. Os ácidos láctico e acético foram encontrados somente a partir das 72 horas com $0,31 (\pm 0,03)$ mg/g e $0,59 (\pm 0,02)$ mg/g respectivamente, na sequência aumentaram sucessivamente chegando a alcançar $1,04 (\pm 0,06)$ mg/g de ácido láctico em 144 horas com perda para $0,67 (\pm 0,07)$ mg/g em 168 horas, já o ácido acético atingiu pico neste tempo com $6,62 (\pm 0,01)$ mg/g.

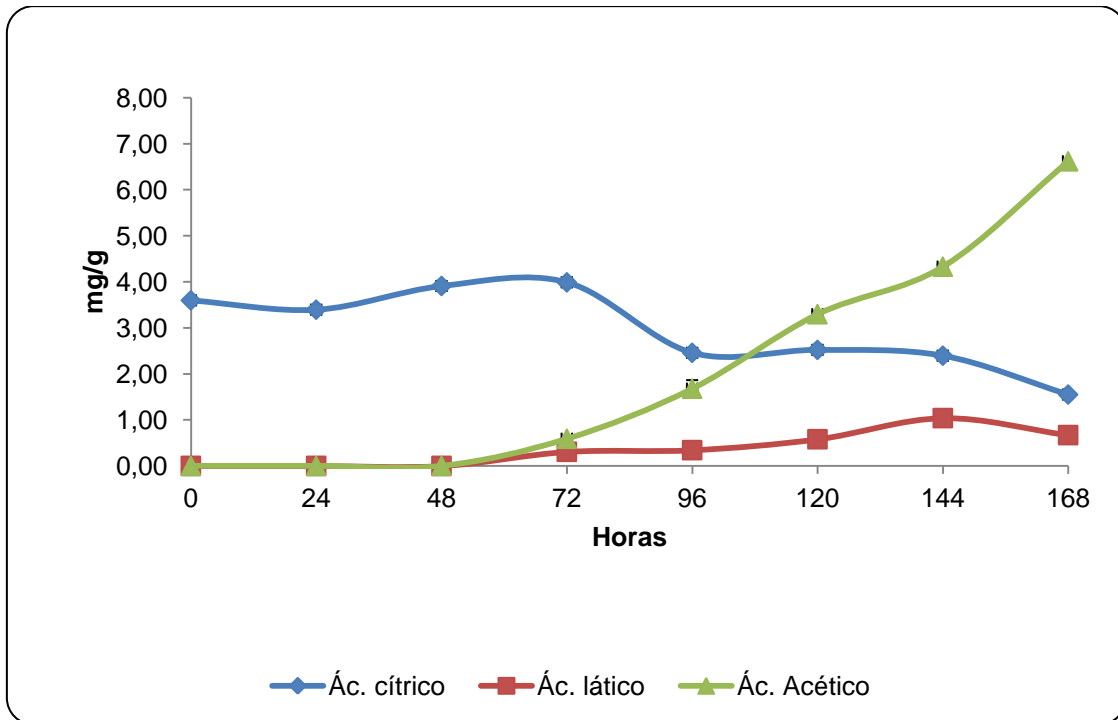


Figura 10. Mudanças no cotilédone de cupuaçu com respectivos desvios padrões do teor do ácido cítrico, láctico e acético durante a fermentação. Cromatogramas disponíveis no anexo 6.

5.2.3.3 Quantificação dos alcoóis na polpa e no cotilédone

As alterações na polpa dos alcoóis (figura 11) foram distintas, enquanto o metanol inicia o processo com 36,34 ($\pm 0,26$) mg/g decorrendo para 77,51 ($\pm 1,51$) mg/g em 72 horas e com pequenas variações atingiu 80,02 ($\pm 0,78$) mg/g em 168 horas, o etanol começa com 11,63 ($\pm 0,98$) mg/g chegando ao seu máximo em 24 horas com 32,03 ($\pm 0,30$) mg/g, decaindo com pequenas mudanças, alcançando 8,29 ($\pm 0,28$) mg/g em 168 horas.

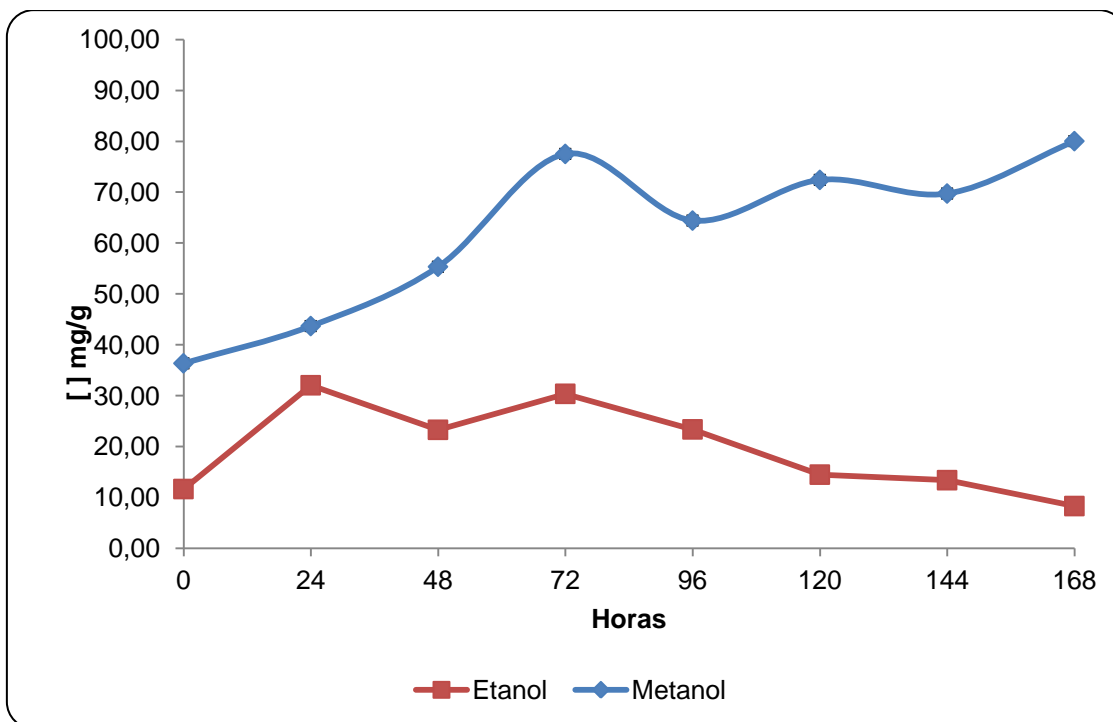


Figura 11. Mudanças na polpa de cupuaçu com respectivos desvios padrões do teor de metanol e etanol durante a fermentação. Cromatogramas disponíveis no anexo 6.

Na figura 12 que representa as alterações no teor de alcoóis no cotilédone, o metanol foi encontrado somente após 144 horas de fermentação com $0,25 (\pm 0,07)$ mg/g e ligeiro acréscimo em 168 horas para $1,18 (\pm 0,02)$ mg/g. O etanol diferentemente, foi quantificado desde o início com $0,85 (\pm 0,03)$ mg/g e teor máximo em 24 horas de $2,39 (\pm 0,21)$ mg/g, no decorrer do processo ficou entre $1,97 - 2,22 (\pm 0,08)$ mg/g até 144 horas, decrescendo para $1,20 (\pm 0,08)$ mg/g em 168 horas.

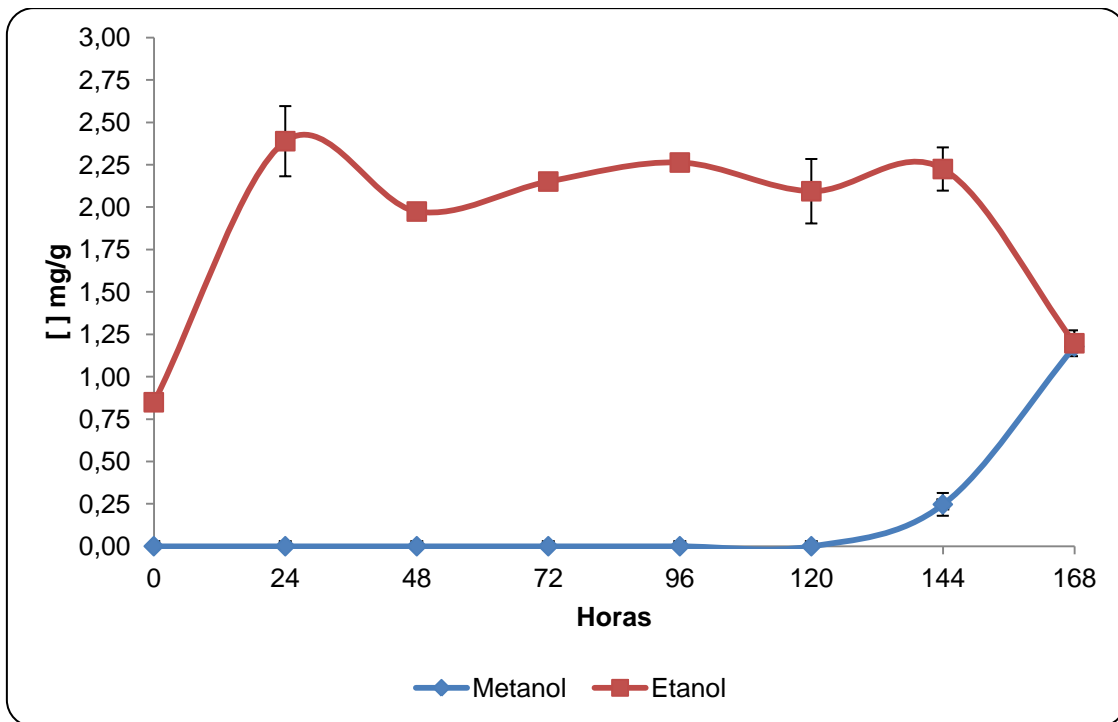


Figura 12. Mudanças no cotilédone de cupuaçu com respectivos desvios padrões do teor de metanol e etanol durante a fermentação. Cromatogramas disponíveis no anexo 6.

6. DISCUSSÃO

Beneficiada pela acidez e o pH, a fermentação inicia pela proliferação de várias espécies de leveduras e conseqüente começo da conversão anaeróbica dos açúcares da polpa em etanol, que marca a primeira atividade microbiológica, conhecida como fermentação alcoólica (LOPEZ & QUESNEL, 1973; NELSON & COX, 2006). As leveduras participaram de todo processo fermentativo e o seu pico de crescimento foi em 24 horas coincidindo com do etanol e sem aumento significativo da temperatura quando comparado ao início do processo. As principais espécies encontradas neste momento foram as *Candida berthetii*, *Candida quercitrusa*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora* sp., *Issatchenkia terrícola*, *Pichia fermentans* e *Pichia kluyveri*. Destaque também deve ser dado às outras espécies (tabela 2) que contribuíram, sobretudo com consumo de ácido cítrico e conseqüente queda da acidez e elevação do pH e em especial à *Candida ethanolica*, que apesar de não ser encontrada no auge de crescimento das leveduras, esteve presente em todos os outros dias de fermentação.

Com baixa da acidez e aumento do pH ocorre favorecimento ao crescimento das bactérias lácticas (CAMU, 2008), que atingiram pico de crescimento com a presença das espécies *Enterococcus durans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus* sp., que coincidem com a maior produção de ácido láctico. Além de outras bactérias das espécies *Enterococcus* sp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici* e *Weissella ghanensi*, que estiveram presentes

durante todo processo fermentativo, coincidindo ambas com as modificações da acidez e pH, ou seja, queda e elevação concomitante devido ao consumo e produção do ácido láctico.

Além das mudanças da acidez e do pH, a temperatura e o etanol beneficiam o crescimento das bactérias acéticas (GÁLVEZ et al., 2007), que obtiveram pico de crescimento no sexto dia de fermentação com a presença das espécies *Acetobacter malorum*, *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter* sp., além de uma espécie incultivável não identificada, resultando no início da elevação da temperatura da massa. Outras bactérias como as *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter orleanensis*, *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter tropicalis*, *Arthrobacter* sp., *Asaia krungthepensis*, *Gluconobacter cerinus*, *Gluconobacter frateurii*, *Gluconobacter japonicus*, *Gluconobacter* sp. e outras espécie incultiváveis não identificadas, estiveram presentes em momentos distintos durante a fermentação.

Os resultados mostraram que às bactérias mesófilas predominaram a fermentação com a permanência das espécies *Bacillus circulans*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Paenibacillus* sp., dentre outras espécies incultiváveis não identificadas. Com relação a predominância das BM é possível que não haja relação com as alterações físico-químicas, no entanto, em um dado momento coincidiu com a elevação das BAL, o teor de glicose, frutose, ácido láctico e ácido acético. Porém, segundo Camu (2008) estas modificações estão mais relacionadas com as LEV e BAL. Outras BM como os *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus macroides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacterium NLAE-zl-C434*, *Bacterium NLAE-zl-*

P687, Corynebacterium flavescens, Enterococcus camelliae, Enterococcus faecalis, Enterococcus sp., Kurthia sp., Lysinibacillus fusiformis, Lysinibacillus sp., Providencia sneebia, Rummeliibacillus stabekisii, Stenotrophomonas sp. e Bacillus oleronius, participaram em tempos diferentes da fermentação principalmente no final do processo.

Na tabela 3, demonstra-se que os fungos filamentosos participaram da fermentação apenas durante os 3 primeiros dias, e sem nenhum tipo aparente de contribuição relacionada às características físico-químicas. Neste caso e segundo relatos de Schwan e Wheals (2004), os FF não estão relacionados com “*off flavors*”, já que não estão presentes no final do processo fermentativo.

A obtenção de dados referentes ao pH na polpa e no cotilédone, mostra que ambos evoluíram de forma diferente, isto devido às possíveis influências das micropopulações, principalmente das BAA que são responsáveis pela produção de ácidos orgânicos que durante o processo liberam energia na forma de calor elevando a temperatura concomitantemente (GÁLVEZ et al., 2007). Neste processo em particular a alteração de 30,29 para 38,70 °C favoreceu a difusão dos ácidos através da testa, modificando o pH e a acidez no cotilédone. Com isto, a acidez na polpa decresceu (36,40 – 22,58 mg NaOH/g), no cotilédone elevou-se (1,92 – 5,46 mg NaOH/g) e conseqüentemente o pH na polpa aumentou (3,41 – 4,01) e no cotilédone decaiu (6,68 – 5,10), tudo isto ocorreu devido a difusão da polpa pela testa dos ácido orgânicos.

As alterações físico químicas também foram marcadas pelo início do consumo dos açúcares, principalmente pelas leveduras com uso da sacarose para produção do etanol e os açúcares redutores glicose e frutose, que no

terceiro dia de fermentação atingiram teor máximo de 43 mg/g e 76,86 mg/g respectivamente. Além das modificações ocorridas pela ação dos microrganismos, houve também contribuição da elevação da temperatura para degradação dos açúcares, principalmente nos dois últimos dias de fermentação. No decorrer do processo a sacarose foi consumida quase que totalmente tanto na polpa de 100,61 – 2,08 mg/g, quanto no cotilédone de 15,02 – 6,28 mg/g. A glicose foi totalmente esgotada na polpa de 40,22- 0,00 mg/g, mas, obteve elevação do seu teor no cotilédone de 0,40 – 3,35mg/g, já a frutose finalizou com teor próximo ao do início do processo de 41,29 – 34,86 mg/g na polpa e 1,56 – 5,03mg/g no cotilédone. O desenvolvimento dos açúcares redutores no cotilédone podem está contribuindo potencialmente com desenvolvimento do sabor, o que condiz com o trabalho de Mattietto (2001).

Já os ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico proveniente da polpa, favoreceu o crescimento de microrganismos no início da fermentação pela diminuição do pH, que no decorrer do processo foi totalmente consumido em dois dias pelos microrganismos, exceto no cotilédone. Em contrapartida os ácido acético e láctico foram produzidos, sobretudo, pela ação das BAA e BAL, especialmente a partir do terceiro dia, contribuindo assim com a diminuição do pH, já que o ácido cítrico foi esgotado. Os resultados referentes aos ácidos láctico e cítrico encontrados tanto no início quanto no fim da fermentação respectivamente, contradizem aos dados de Mattietto (2001).

Como no trabalho de Vasconcelos (1999) o pico de etanol foi alcançado no segundo dia de fermentação, no entanto, neste trabalho o etanol também esteve presente durante todo processo no intervalo de 8,29 – 32,03mg/g, sofrendo variações principalmente pelo consumo por microrganismos. A

constante presença do etanol ocorreu principalmente pelo fato das leveduras estarem presentes quantitativamente do início ao fim, assim como a sacarose que é utilizada como principal substrato ao favorecimento da fermentação alcoólica. No cotilédone devido a possível difusão pela testa do etanol produzido externamente foi quantificado do início a fim do processo (0,85 – 1,20 mg/g) com pequenas variações.

Diferente da produção de etanol ocorrido principalmente pela conversão dos açúcares pelas leveduras, o metanol pode ter sido produzido de forma indireta devido a presença de pectinas poliméricas com elevado grau de esterificação na polpa mucilagínosa que envolve o cotilédone de cupuaçu (VRIESMANN, L. C., 2008), ação de pectinesterases (SERRAT et al. 2002) e modificações na acidez durante todos os tempos da fermentação, em que a medida que o pH da massa se elevava os teores do álcool aumentava consideravelmente chegando à 80 mg/g. E assim como na difusão ocorrida com etanol no cotilédone o mesmo ocorreu com metanol, no entanto, foi encontrado somente nos dois últimos dias com 0,25 e 1,18 mg/g.

A figura 13 abaixo ilustra os principais acontecimentos ocorridos na polpa mucilagínosa durante o processo de fermentação do cupuaçu. Como a presença do fungo filamentososo durante às primeira 48 horas; o auge de crescimento das leveduras coincidindo com pico de produção do etanol, assim como as bactérias lácticas com o ácido láctico. Contudo, as bactérias acéticas não coincidiram com pico de produção do ácido acético, possivelmente devido à diversidade de espécies que podem ser especializadas na produção do ácido, isto também contribui com elevação da temperatura principalmente no fim do processo pela conversão do etanol à ácido acético liberando energia na

forma de calor. Já o alto nível do metanol coincidiu com elevação do pH que favoreceu a rápida desmetoxilação das pectinas por pectinesterases. A modificação do pH na polpa pode ter ocorrido principalmente pela difusão dos ácidos pela testa da semente, facilitada pela permeabilidade que pode ter sido aumentada pela elevação da temperatura.

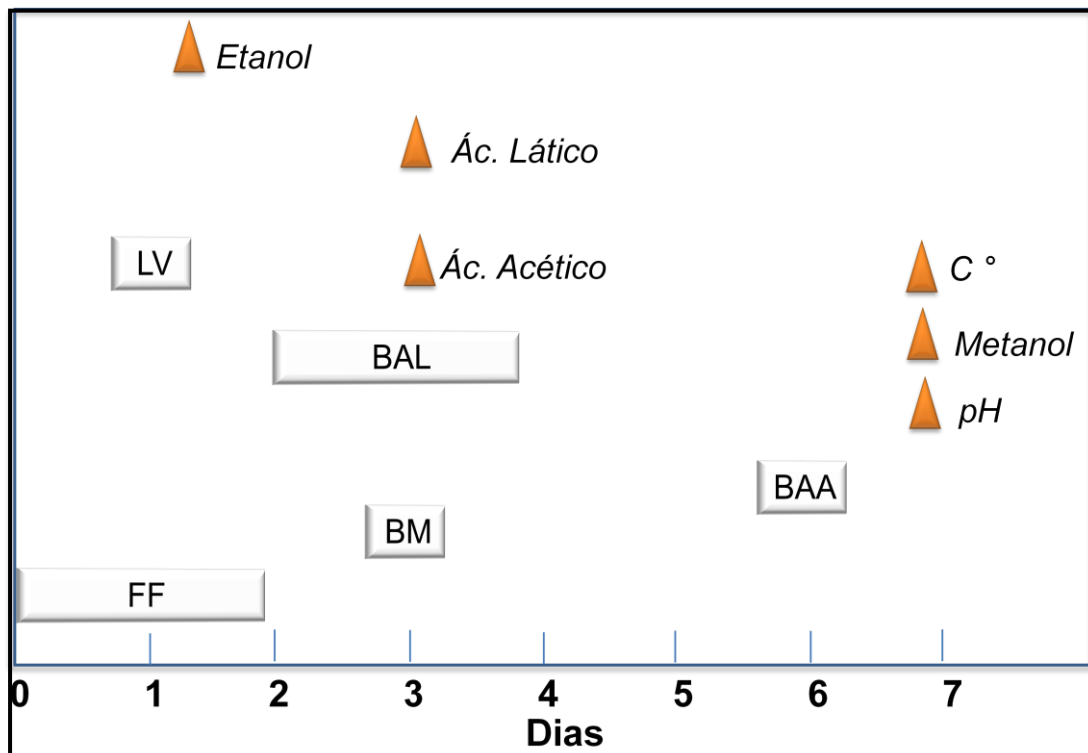


Figura 13. Principais momentos de crescimento de micro-organismos, produção de alcoóis e ácidos orgânicos durante fermentação do cupuaçu.

7. CONCLUSÕES

O sequenciamento de regiões gênicas específicas possibilitou identificar micropopulações importantes para fermentação. Porém, alguns microrganismos incultiváveis e outros não identificados, já que estão presentes, apesar de não terem aparente influência significativa no processo, tornam-se importantes à identificação para estabelecimento da ligação de ambos com a fermentação. Os resultados físicos e químicos conforme relatos de outros trabalhos mostram que ambos os processos fermentativos diferem, principalmente pelo fato do perfil mudanças ser diferente, assim como os dados quantitativos que podem está relacionados à maturação e despulpagem do fruto. Contudo, os dados das identificações dos microrganismos aliado aos resultados físicos e químicos possibilitam estabelecer vínculo direto e indireto entre ambos e conseqüentemente o perfil de mudanças. Com estas informações, o processo fermentativo do cupuaçu deixa de ser totalmente desconhecido.

8. REFERÊNCIAS

AGUILAR, J.A.D. & GASPAROTTO, L.. **Aspectos cronológicos e biológicos da brocado-fruto no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e seu controle**. EMBRAPA Amazônia Ocidental. Séries Documentos, n.3, Manaus-Am. 17p; 1999.

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

ARDHANA, M., Fleet, G.H., 2003. The microbial ecology of cocoa fermentations in Indonesia. **Int. J. Food Microbiol.** 86, 87–99.

ARDHANA, M..M. & Fleet, G.H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, 86: 87-89, 2003.

BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. Editora S.T. Beckett, 2^o edição. London: Blackie Academic. 408p, 1994.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO F.O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2^a Ed. São Paulo: Livraria Varela, 151p, 1992.

BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K. Interpretation of PCR methods for species definition. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P.

(EDS.) **Applications in PCR mycology. CABI Publishing**, p. 63-84. 1998.

CALZAVARA, B.B.G. **Cupuaçuzeiro**, Belém. EMBRAPA/CPATU, 1987. 5p.
(Recomendações básicas).

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.N. **Fruticultura Tropical: o cupuaçuzeiro – cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. EMBRAPA-CPATU: Belém, 1984. 101p.

CAMU, N., WINTER, T., VERBRUGGHE, K., CLEENWERCK, I., VANDAMME, P., TAKRAMA, J. S., VANCANNEYT, M. AND-VUYST, L., Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1809–1824 of Cocoa Beans in Ghana, Mar. 2007.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A.; Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 28(4): 986-993, out. dez. 2008

CEPLAC, Comissão Execultiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Normas técnicas para o cultivo do cacau no Recôncavo Baiano**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, 1980, 43p.

CEPLAC/Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC. **Cultivo do cupuaçuzeiro para o estado da Bahia**. Itabuna, Bahia. Disponível em:

<<http://www.ceplac.gov.br/radar/cupuaçuzeiro.htm>>. Consulta em: outubro de 2011.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D.-A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal. Microbiol Methods.**; 69(2): 330–339. May 2007.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

COLGAN, D. J.; HITCHINGS, P.A. & BEACHAM, E. Multi-gene analyses of the phylogenetic relationships among the mollusca, Annelida, and Arthropoda. *Zoological Studies*. 47(3): 338-351, 2008.

CORRÊA, D.B.A.; FERREIRA, M.; BALANI, D.M.; NETO, R J.; DESTÉFANO, S.A.L. Avaliação da região espaçadora 16s-23s DNAr como marcador molecular para diferenciação de *acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae* e *burkholderia gladioli* pv. *Gladioli* patogênicas a orquídeas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.74, n.3, p.233-238, jul./set., 2007.

CROS, E.; JEANJEAN, N. Cocoa quality: effect of fermentation and drying. **Plantations, recherche, développement**. Maio-junho, 1995

CUNHA, C. R.; JACKIX, M. N. H.; CORTELAZZO, A. E VASCONCELOS, M. A. **M. Alterações na Microestrutura das Amêndoas durante a Fermentação de sementes de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**, In: II Simpósio Latino

Americano de Ciências de Alimentos, 14 de novembro de 1997. Campinas – SP.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allied. A taxonomic of the genus Theobroma. **Contributions U. S. of the Natural Herbarium**, v.35, n.6, p.379-614, 1964

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarthizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol. Res.**, 104:134-150, 2000.

DRYSDALE, G.S., FLEET, G.H., 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. **Am. Journal. Enol. Vitic.** 39, 143–156.

DUCKE, A. **As espécies brasileiras do gênero Theobroma L.** Belém: Instituto Agrônômico do Norte, 1953. 89p. (Boletim Técnico, 28).

EDEL, V. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: BRIDGE, P. D., ARORA, D.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. Applications in PCR mycology. CABI Publishing, p. 1-20. 1998.

EDGECOMBE, G.D.; WILSON, G. D. F.; COLGAN, D. J.; GRAY, M. R. & CASSIS, G. Arthropod cladistics: Combined analysis of histone H3 and U2 snRNA sequences and morphology. **Cladistics**, 16: 155-203, 2000.

FERREIRA, G. M..**Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu** – Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e

Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2008.

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

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

GLARE, T. R.; INWOOD, A. J. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* ssp. from **New Zealand Mycol. Res.**, 102:250-256, 1998.

GOOGLE MAPS 2012. Latitude 14° 43` 14.70`` e Longitude 39° 22` 3.06``. Disponível em: <<https://maps.google.com/>> . Acessado em: Janeiro de 2012.

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**. 22:303-316, 1978.

HAHN LAB. Yeast Colony PCR Disponível em: http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/mol_bio_meth/pcr_yeast_colony.html. Acessado em janeiro de 2012.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 7ª.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HERMOSA, M. R.; KECK, E.; CHAMORRO, I.; RUBIO, B.; SANZ, L.; VIZCAINO, J. A.; GRONDONA, I.; MONTE, E. Genetic diversity show in *Trichoderma* biocontrol isolates. **Mycol. Res.**, 108:897-906, 2004.

HICKERSON, M. J. & CUNNINGHAM, C. W. Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura). **Molecular Biology and Evolution**, 17(4): 639-644, 2000.

INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. **Clube do Cupuaçu e INPA promovem Oficina da Cultura do Cupuaçu. On-line.** Disponível em: http://www.inpa.gov.br/em_evidencia/03-07-17_oficina_cultura_cupuacu.htm. Acesso em 29/01/2011.

KATSU, M.; KIDD, S.; ANDO, A.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K.; MEYER, W. The internal transcribed spacers and 5.8s rRNA gene show extensive diverity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS Yeast Res.**, 4:377-388, 2004.

KELM, M.A.; JOHNSON, J.C.; ROBBINS, R.J.; HAMMERSTONE, J.F.; SCHMITZ, H.H.; CLAE separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase”, **J Agric. Food Chem.** 54, 2006.

LIU, Z Y.; LIANG, Z. Q.; LIANG, Z. Q.; LIU, A. Y.; YAO, Y. J.; HYDE, K. D.; YU, Z. N. Molecular evidence for teleomorph-anamorph conections in *Cordyceps* based

on ITS-5.8S rDNA sequences. **Mycol. Res.**, 106: 1100-1108, 2002.

LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V. C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 24, n. 3, p. 319, 1973.

MALAY, M. C. D. & PAULAY, G. Peripatric speciation drives diversification and distributional pattern of reef hermit crabs (Decapoda: Diogenidae: *Calcinus*). **Evolution**, 64 (3): 634-662, 2009.

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*).** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas. Campinas, São Paulo 2001. 145p.

NAZARÉ, R.F.R. de; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R.M.F. **Processamento das sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate.** Belém: EMBRAPA CPATU. EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa, 108. 38p, 1990

QUEIROZ, M. B.; GARCIA, N. H. P. Avaliação da torração de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1/2, p. 167-173, 1999.

OLIVEIRA, M. C. S. **.Avaliação do Processo de Fermentação Alcoólica de Suco de Maçã Obtido por Liquefação Enzimática.** Dissertação (Mestrado).

Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2006. 99p.

RIBERIRO, G. D.; COSTA, R. S. C.; FERREIRA, M.G.R.; NASCENTE, A.S.; NUNES, A.M.; TEIXEIRA, C. A.D.; GAMA, M.M.B. Cultivo do Cupuaçu em Rondônia. **Embrapa Rondônia. Sistemas de Produção**, 9.-ISSN 1807-1805 Versão Eletrônica. Dezembro de 2005.

ROCHA N. O. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, J. E. U.;-LEMEIRA, O A.; SOUZA A. R.; MARADIAGA, J. B. G. Cupuaçu. In: Principais produtos extrativos da Amazônia e seus coeficientes técnicos. Brasília: **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, Centro Nacional de Desenvolvimento Sustentado das Populações Tradicionais. p. 24-40. 1999.

ROHAN, T. H. **El beneficio del cacao bruto destinado al Mercado**. FAO: Estudio Agropecuario. 223p. 1964.

ROHAN, T. A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 32, p. 395-398, 1967.

SAMSON, R.A., HOCKING, A.D., PITT, J.I. & KING, A.D. **Modern methods in food mycology**. Amsterdam: Elsevier, 1992.

SAUFRAMANIEN, I.; JOSHI, A.; GAPOLOKRISHNA, T. Intraspecific variation the internal transcribed spacer regio of rDNA in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). **Current. Science.**, 85:798-802, 2003.

Schwan, R. F., Vanetti, M. C. D., Silva, D. O., Lopez, A., De Moraes, C. A. (1986). Characterization and distribution of aerobic, spore-forming bacteria from cacao fermentations in Bahia. **Journal of Food Science** 51, 1583-1584.

SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Appl. Environ. microbiol**, v. 64, n. 4, p. 1477-1483, 1998.

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

SCHWAN, R. F.; LOPEZ, A.; SILVA, D. O.; VANETTI, M. C. D. Influência da frequência e intervalos de revolvimento sobre a fermentação do cacau e qualidade do chocolate. **Revista Agrotópica**, v. 2, n. 1, p. 22-31, 1990.

SCHWAN, R.F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44: 1-17. 2004.

SETEC, Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica; CEFETAM, Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas. Cartilhas Temáticas: **Cupuaçu**.

Brasília, novembro. 25p 2007.

SERRAT, M.; BERMÚDEZ, R.C.; VILLA, T.G. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.97, n.3, p.193-208, 2002.

SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. **Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão.** Boletim do SBCTA, Campinas, v.31, n.2, p.249-260, 1997.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 3. ed. - São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SOUZA, A. das G.C. de.; SILVA, S.E.L. da.; TAVARES, A.M.; RODRIGUES, M. do R.L. **A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.).** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular Técnica, 2). 39p, 1999.

SOUZA, T. M. G.; THOMAZINI, M. J.; CAVALCANTE, M. J. B.; SOUZA, J. M. L. **Aspectos da Produção de Cupuaçu.** Rio Branco: Embrapa Acre, 43p. 2001.

SOUZA, A. G. C. [et al.]. **Boas Práticas Agrícolas da Cultura do Cupuaçuzeiro.** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 56p. 2007.

THOMPSON, S. S., MILLER, K. B. & LOPEZ, A.S. **Cocoa and coffee**. In: Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. P.721-733. In: Doyle, M. P., Beauchat, L. R. & Montville, T. J. (eds), 2nd ed. 2001.

TURQUOIS, T.; RINAUDO, M.; TARAVEL, F.R.; HEYRAUD, A.. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: Influence of extrinsic parameters on their gelling properties. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 255-262, 1999.

VALENTE, P. RAMOS, J. P. LONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. Canadian **Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 949-958, 1999.

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

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

VENTURIERI, G. A.; RONCHI-TELES, B.; FERRAZ, I. D. K.; LOURDE, M.; HAMADA, N. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento**.

Belém: Clube do Cupu. p. 108. 1993.

VRIESMANN, L. C. **Extração, Caracterização e Aspectos Reológicos de Polissacarídeos da Polpa dos Frutos de Theobroma Grandiflorum (Cupuaçu)**. Dissertação de mestrado em Ciências Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 2008.

VOGEL, Arthur Israel. **Análise química quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

YANG, H. et al. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu"). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1501-1504, 2003.

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**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1994, 111p.

ANEXO 1

Acesso *GenBank	Microrganismo
AB534175.1; GU246259.1	<i>Candida berthetii</i>
AB534618.1; EU794730.1	<i>Candida ethanolica</i>
AM160627.1	<i>Candida quercitrusa</i>
FR819718.1	<i>Candida xylopsoci</i>
AJ586528.1	<i>Debaryomyces etchellsii</i>
FJ491945.1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
FM199951.1; FM199954.1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
JN084125.1; JN084126.1	<i>Hanseniaspora sp.</i>
AB469379.1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
FM199958.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>
EU315767.1; EF648009.1	<i>Issatchenkia terricola</i>
GQ181169.1	<i>Kazachstania sp.</i>
EU315768.1	<i>Pichia cecembensis</i>
HQ680960.1; EU647835.1	<i>Pichia fermentans</i>
FM864201.1	<i>Pichia kluyveri</i>
JQ425391.1	<i>Pichia kudriavzevii</i>
FJ231462.1	<i>Pichia membranifaciens</i>
JN900496.1; JF781422.1; HM044858.1	<i>Pichia sp.</i>
FN393995.1; D89886.1; AB533539.1; JN093147.1; AM900406.1; AM262830.1; JQ070126.1; EU145764.1; BK006945.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GU931323.1	<i>Saccharomycetes sp.</i>
CU329672.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

*National Center for Biotechnology Information (NCBI,s v2.2.10) - GenBank®

ANEXO 2

Acesso *GenBank	Microrganismos
EF669987.1	<i>Aspergillus giganteus</i>
JQ257030.1	<i>Aspergillus tamaritii</i>
JQ437608.1	<i>Geotrichum sp</i>
AF033395.1	<i>Paecilomyces variotii</i>
FJ176541.1	<i>Uncultured eukaryote</i>

*National Center for Biotechnology Information (NCBI,s v2.2.10) - GenBank®

ANEXO 3

Acesso *GenBank	Microorganismo
NR_044046.1	<i>Acetobacter ghanensis</i>
EF681860.1; AB052715.1; EF681860.1	<i>Acetobacter indonesiensis</i>
AB682084.1; FJ157231.1	<i>Acetobacter lovaniensis</i>
JF346073.1	<i>Acetobacter malorum</i>
AB682068.1	<i>Acetobacter orientalis</i>
AB680031.1	<i>Acetobacter orleanensis</i>
FN429074.1; AB682238.1; FN429074.1; JQ513820.1; EU780146.1; JQ513820.1; EU126660.1; FN429074.1; JF346078.1; JQ513820.1; AB682238.1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
AB680509.1	<i>Acetobacter peroxydans</i>
AB680014.1; FJ869877.1; GQ246703.1; AB680014.1; GQ359861.1; GQ246703.1; DQ887340.1; DQ887341.1	<i>Acetobacter sp.</i>
AB681066.1; AJ419842.1; NR_036881.1	<i>Acetobacter tropicalis</i>
FR749844.1	<i>Arthrobacter sp.</i>
AB682032.1	<i>Asaia krungthepensis</i>
EU196374.1	<i>Gluconobacter cerinus</i>
AB682091.1; AB682081.1	<i>Gluconobacter frateurii</i>
JF346081.1	<i>Gluconobacter japonicus</i>
EU807750.1; JQ314039.1; AB682095.1	<i>Gluconobacter sp.</i>
GU808395.1; GU808382.1; JN569932.1; HM556419.1	<i>Uncultured bacterium</i>
HQ761410.1; HQ749275.1; HQ759207.1	<i>Uncultured organism</i>
FJ348419.1	<i>Uncultured Acetobacter sp.</i>

*National Center for Biotechnology Information (NCBI,s v2.2.10) - GenBank®

ANEXO 4

Acesso *GenBank	Microrganismo
HQ603860.1	<i>Enterococcus durans</i>
FJ514018.1	<i>Enterococcus sp.</i>
JQ350808.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
JQ236621.1	<i>Lactobacillus brevis</i>
JN560840.1; JF728260.1; JQ805677.1	<i>Lactobacillus casei</i>
EU407607.1; EU825662.1; GQ183906.1; GU560043.1; GU560043.1; HM035543.1; HM058792.1; HM462428.1; HM989920.1; HQ379178.1; HQ677597.1; JN039355.1; JN703792.1; JQ013298.1; JQ073735.1; JQ083644.1; JQ805673.1; JN039355.1; JF414736.1; GQ131282.1; HQ379178.1; EU407607.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>
AB617650.1; JQ801723.1; JQ801725.1; AB598986.1; JQ801723.1; JQ046408.1; JN853603.1; HM462426.1; JQ801725.1; AB601179.1; HE646365.1; JQ446516.1; JQ319663.1; AB572047.1; HQ286594.1; JQ801725.1; JQ236622.1; AB601179.1; AB572045.1; JN560914.1; JQ801723.1; JQ046408.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
EU600913.1; FJ538515.1; EU600911.1; EU600912.1; FJ538538.1	<i>Lactobacillus sp.</i>
JN942103.1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
AM882998.1	<i>Weissella ghanensis</i>

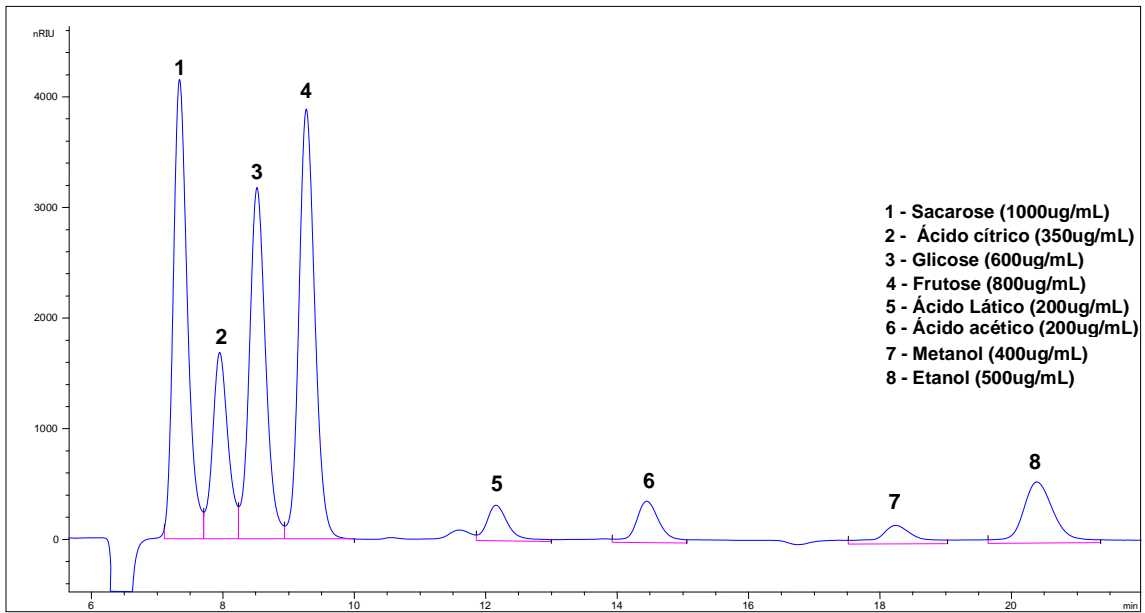
*National Center for Biotechnology Information (NCBI,s v2.2.10) - GenBank®

ANEXO 5

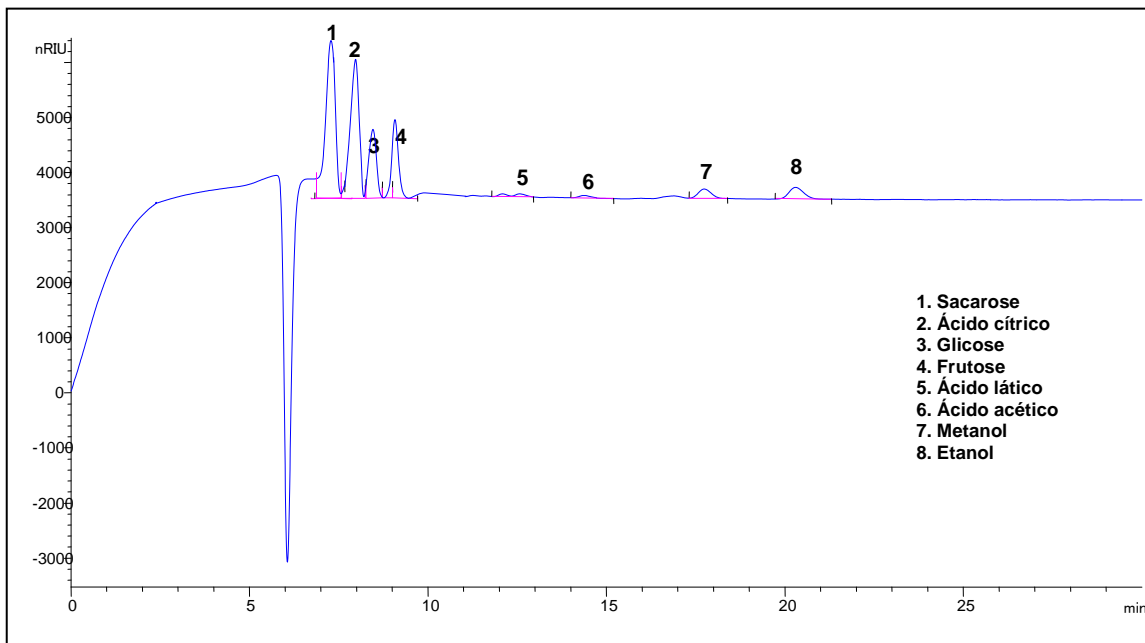
Acesso *GenBank	Microorganismo
GU323369.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
HQ684009.1	<i>Bacillus cereus</i>
JN409450.1; JN644554.1	<i>Bacillus circulans</i>
DQ289063.1	<i>Bacillus macroides</i>
HM584270.1	<i>Bacillus pumilus</i>
GQ340488.1; GQ340520.1; JQ266276.1; HE662640.2; HM107812.1; HQ230309.1 GU227615.1; EF656456.1	<i>Bacillus sp.</i>
JQ810917.1	<i>Bacillus subtilis</i>
JQ608138.1	<i>Bacillus vallismortis</i>
JQ607536.1	<i>Bacterium NLAE-zl-C434</i>
EU071589.1	<i>Bacterium NLAE-zl-P687</i>
AB681573.1	<i>Corynebacterium flavescens</i>
HQ721272.1	<i>Enterococcus camelliae</i>
FJ463817.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
GU397444.1; JN251773.1; JQ398850.1	<i>Enterococcus sp.</i>
JN400329.1	<i>Kurthia sp.</i>
AB618498.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
FJ899682.1	<i>Lysinibacillus sp.</i>
HM038003.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
AB682217.1	<i>Providencia sneebia</i>
FJ210844.1	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>
EU075218.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
GU166191.1; GQ267869.1; GQ477831.1; HM556555.1; JF111732.1 FN667182.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
AJ619045.1	<i>Uncultured bacterium</i>
HQ811434.1; HQ811510.1; HQ811675.1; HQ761410.1; HQ811790.1; HQ759207.1 JN366717.1	<i>Uncultured compost bacterium</i>
HM112740.1; GQ072102.1; JF229391.1	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>
	<i>Uncultured organism</i>
	<i>Bacillus oleronius</i>
	<i>Uncultured Bacilli bacterium</i>

*National Center for Biotechnology Information (NCBI,s v2.2.10) - GenBank®

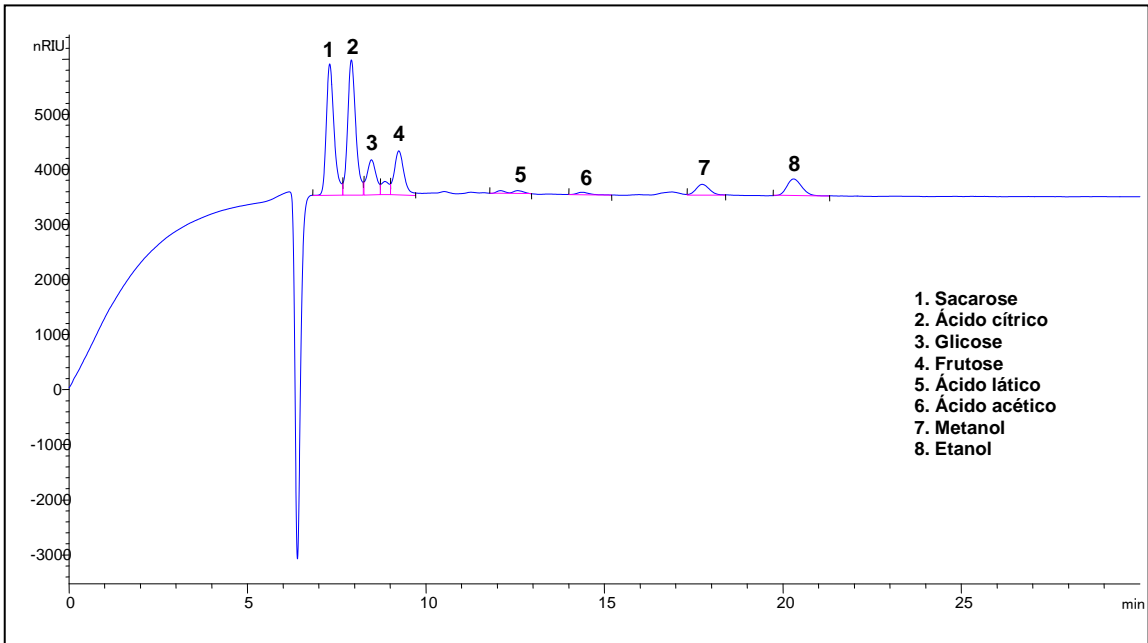
ANEXO 6



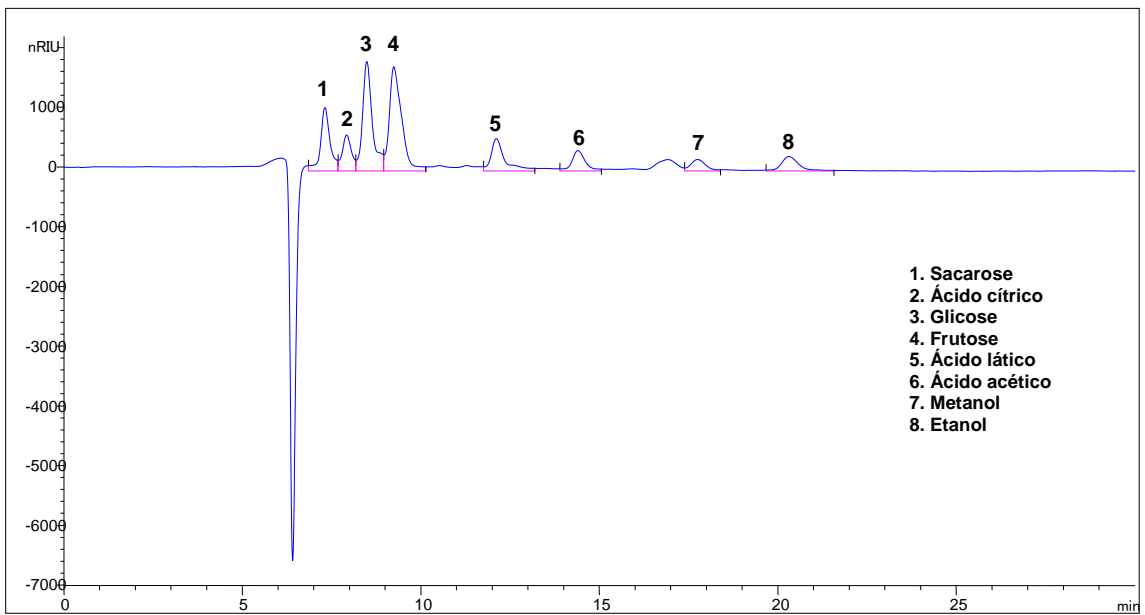
Cromatograma 1. RID1 A, Refractive Index Signal (soluções padrão)



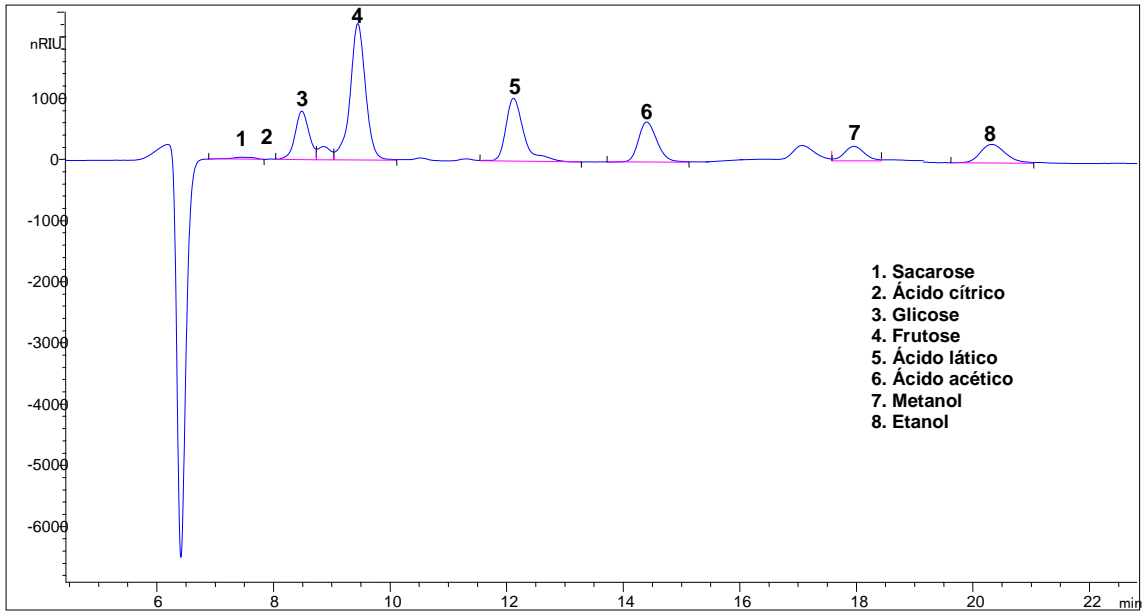
Cromatograma 2. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 0h)



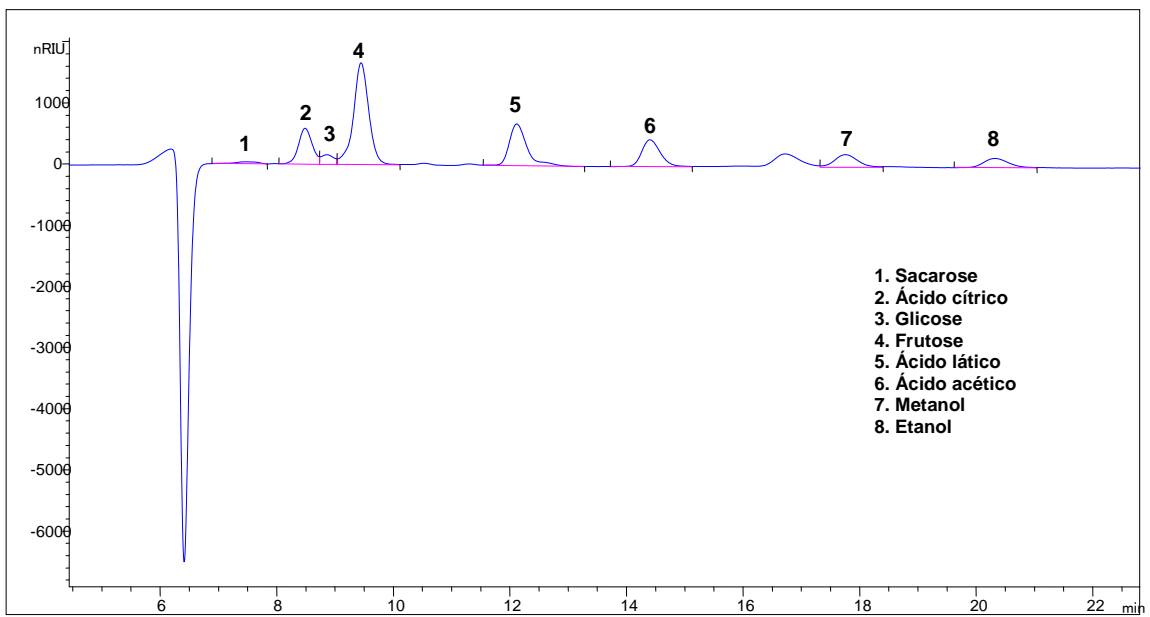
Cromatograma 3. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 24h)



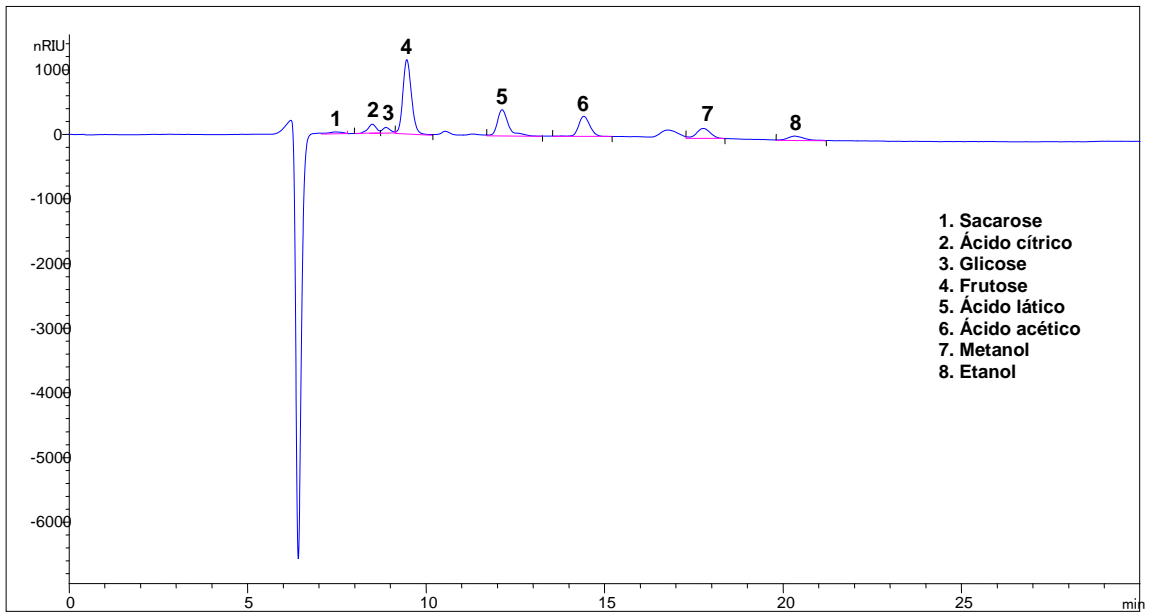
Cromatograma 4. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 48h)



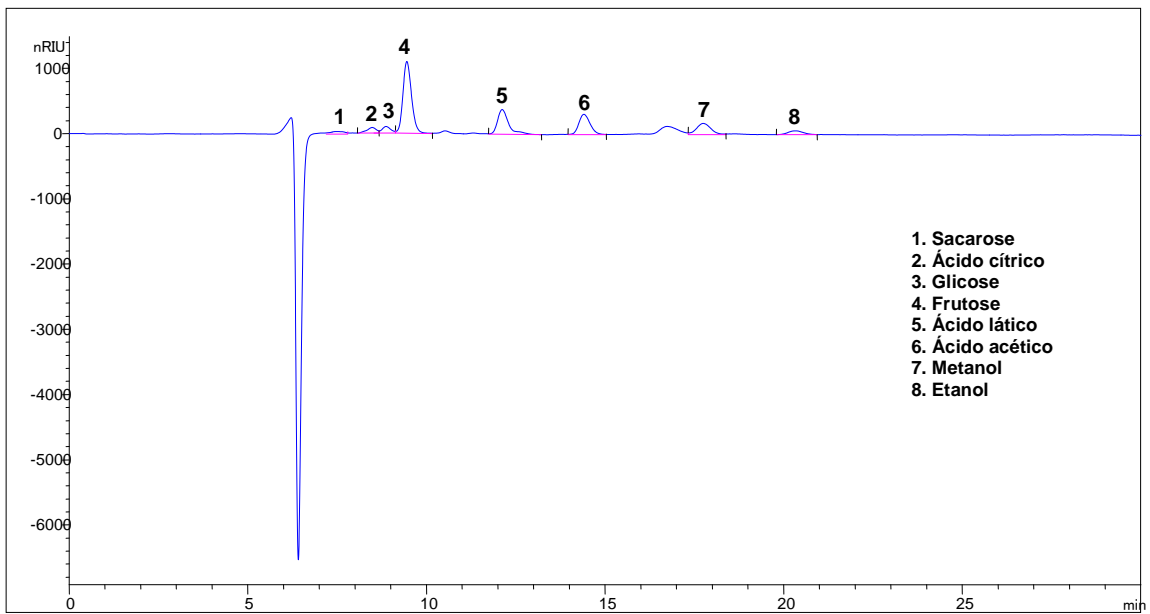
Cromatograma 5. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 72h)



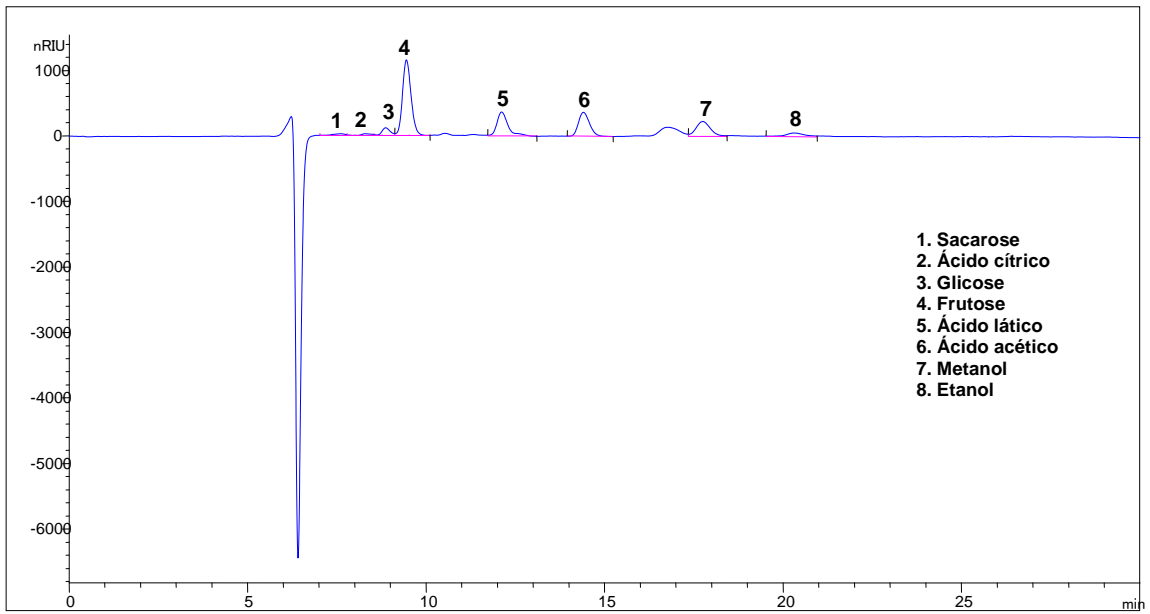
Cromatograma 6. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 96h)



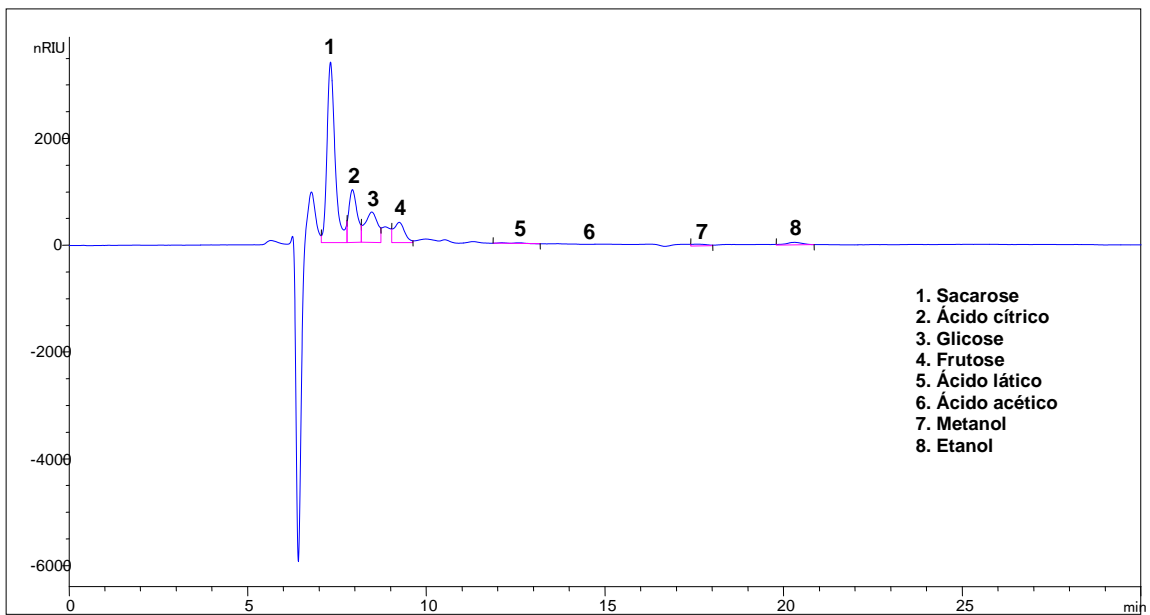
Cromatograma 7. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 120h)



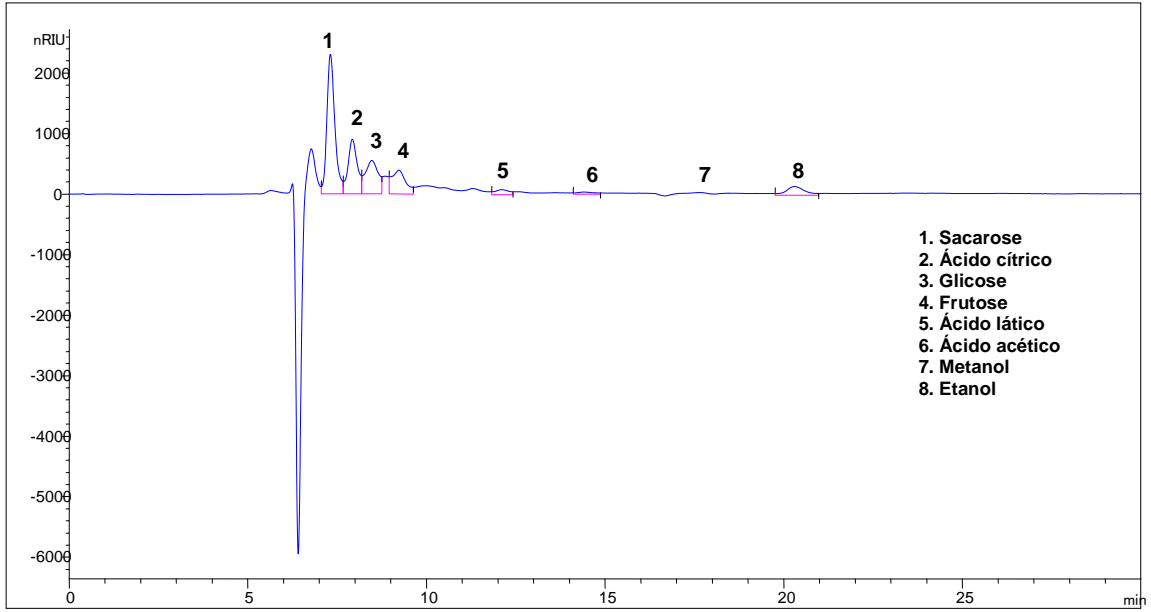
Cromatograma 8. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 144h)



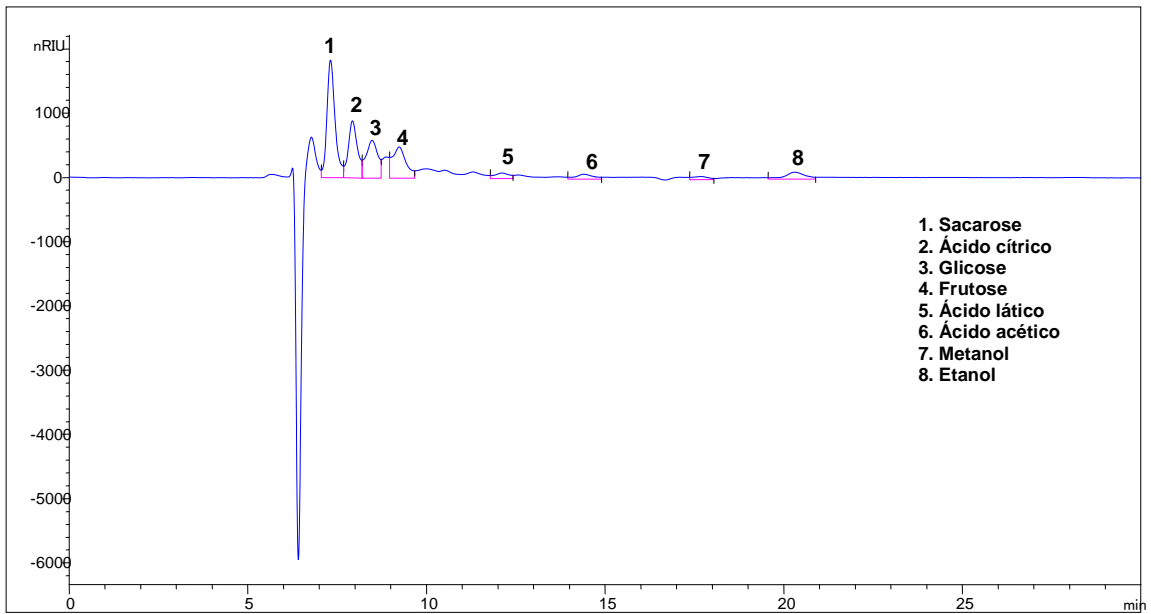
Cromatograma 9. RID1 A, Refractive Index Signal (Polpa Tempo 168h)



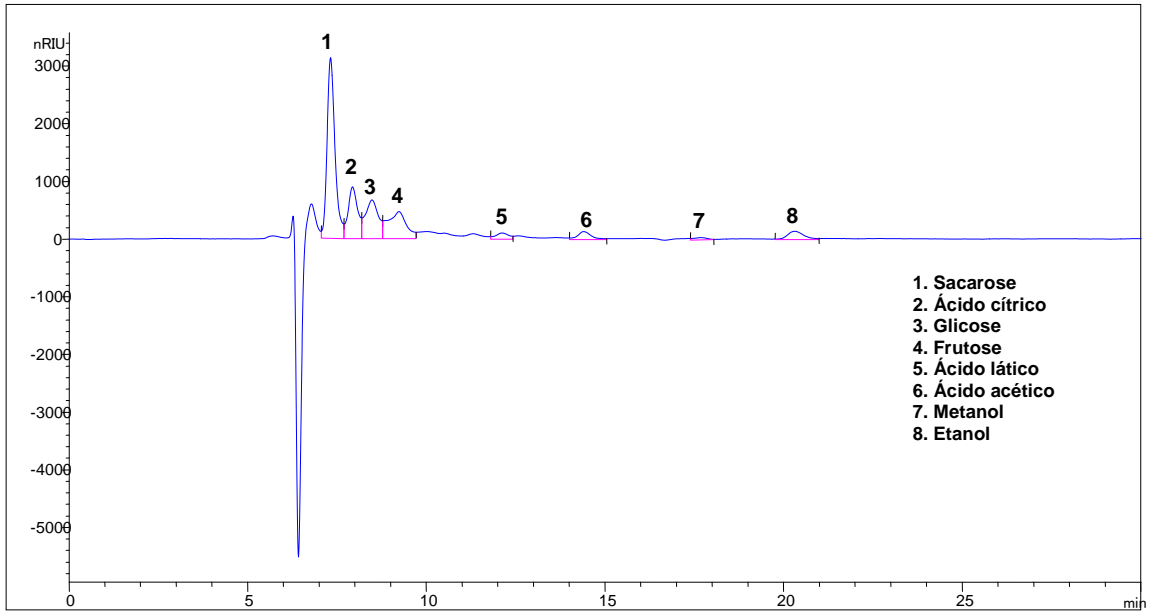
Cromatograma 10. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 0h)



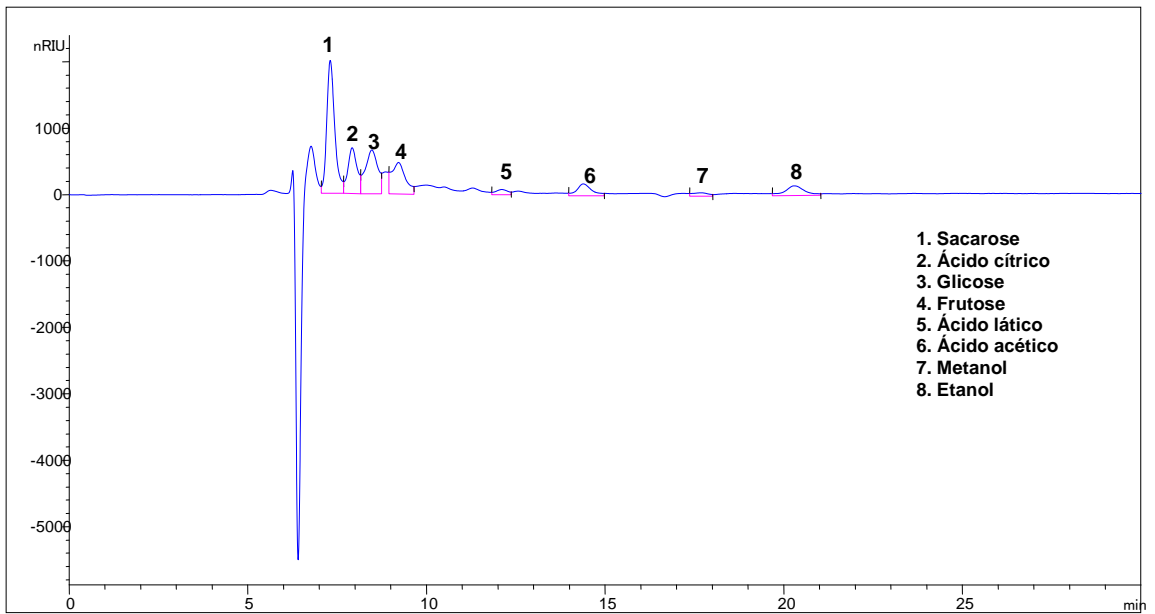
Cromatograma 11. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 24h)



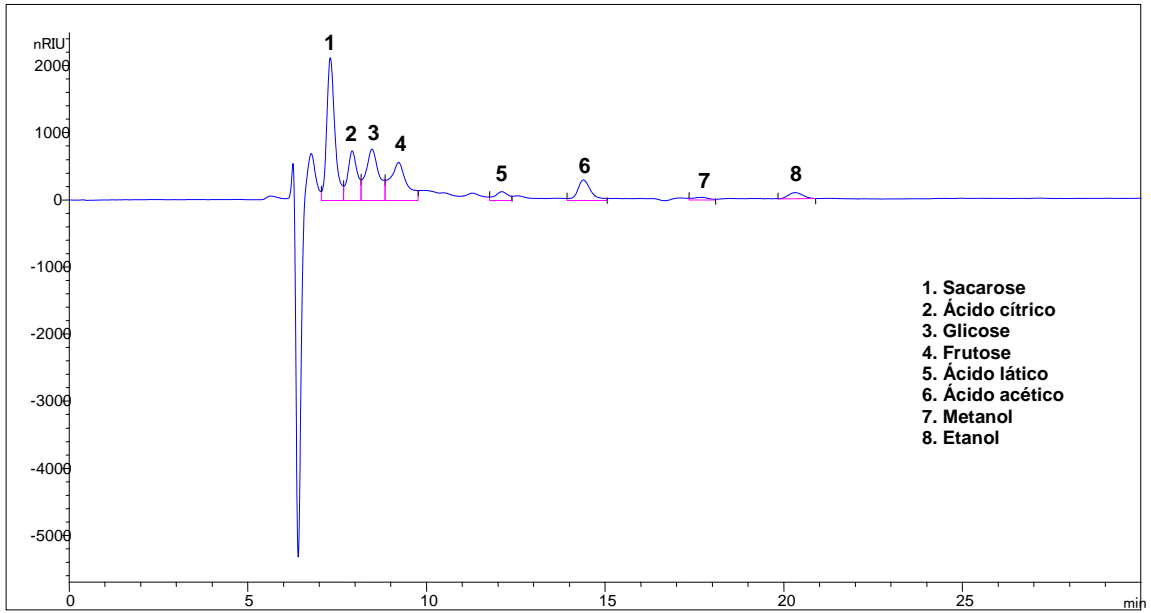
Cromatograma 12. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 48h)



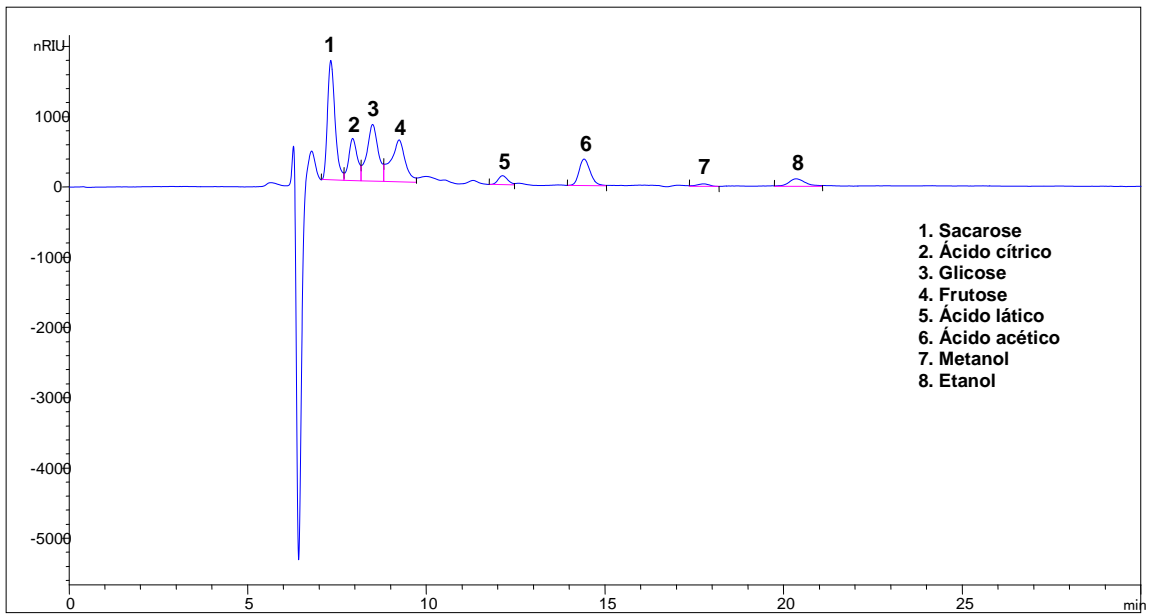
Cromatograma 13. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 72h)



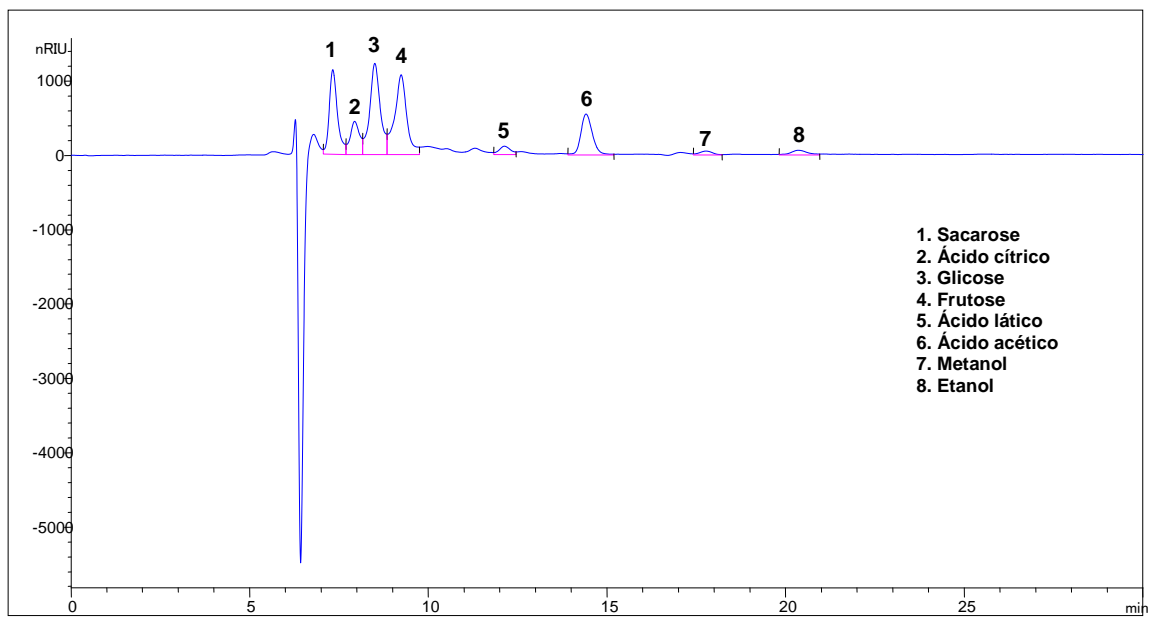
Cromatograma 14. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 96h)



Cromatograma 15. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 120h)



Cromatograma 16. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 144h)



Cromatograma 17. RID1 A, Refractive Index Signal (Cotilédone Tempo 168h)