

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E TECNOLOGIA  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



**ANÁLISE DO EFEITO DA ADIÇÃO DAS POLPA DE AÇAÍ  
(*Euterpe oleracea*) E PINHA (*Annona squamosa* L.) NO  
BENEFECIAMENTO DAS AMÊNDOAS DE CUPUAÇU  
(*THEOBROMA GRANDIFLORUM*). E NA OBTENÇÃO DO  
CUPULATE.**

BELÉM

2023

ERICA NASCIMENTO BESSA

**ANÁLISE DO EFEITO DA ADIÇÃO DAS POLPA DE AÇAÍ  
(*Euterpe oleracea*) E PINHA (*Annona squamosa* L.) NO  
BENEFECIAMENTO DAS AMÊNDOAS DE CUPUAÇU  
(*THEOBROMA GRANDIFLORUM*). E NA OBTENÇÃO DO  
CUPULATE.**

Projeto de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para a disciplina de TCC II,  
do curso superior de Tecnologia em  
Alimentos da Universidade do Estado do  
Pará.

Orientador (a): Prof Dr<sup>a</sup> Maricely Janette  
Uría Toro

Data de aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2023

Banca examinadora:

\_\_\_\_\_ Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maricely Janette Uría Toro

Dr<sup>a</sup> em Química Analítica

Universidade do Estado do Pará

\_\_\_\_\_ - Membro

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane do Socorro Nunes dos Santos Brasil

Dr<sup>o</sup> em Química Analítica

Universidade do Estado do Pará

\_\_\_\_\_ - Membro

Mestre Adilson Ferreira Santos Filho

Doutorando em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Universidade Federal do Pará

BELÉM

2023

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, à minha família que nunca me deixou desanimar e aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sido o meu sustentar em momentos em que me senti desamparada e desanimada. Sou grata também à minha Comunidade, Cristo Alegria, a qual sou membra consagrada, por me proporcionar muitos momentos em que minhas forças foram renovadas.

Agradeço de uma maneira muito especial à minha família. Aos meus pais, Bento José Rodrigues Bessa e Ana Denize Ferreira do Nascimento, que sempre acreditaram em mim, mesmo quando nem eu conseguia, vocês foram a minha fortaleza, o meu consolo, o colo que eu precisava para descansar e criar forças para continuar; sem o auxílio de vocês nada eu conseguiria. Ao meu querido irmão, Herick Müller Nascimento da Silva, que sempre foi um exemplo de profissional que eu busquei ser, obrigada, meu irmão, por ter um coração tão bondoso e amável e sempre me inspirar, mesmo sem perceber, a ser melhor. Amo todos vocês, nunca duvidem disso!

Agradeço também aos meus amigos, que sempre estiveram presentes, me confortando e me encorajando a seguir em frente, sou grata pelo dom da vida de cada um.

Sou eternamente grata à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maricely Janette Uría Toro, que sempre me aconselhou e me guiou, não só no âmbito acadêmico, mas através de sua história, pude me tornar uma mulher melhor e mais madura. E a todos os estagiários, monitores e técnicos, em vocês pude encontrar, não somente profissionais sérios e comprometidos com o seu serviço, mas encontrei amigos; muito obrigada por tudo!

## RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é o fruto, típico da Região Norte do Brasil, oriundo da árvore, pré-colombiana, que é conhecida como cupuaçuzeiro, cupuaçueiro ou cupu. (Vasconcelos *et al.*, 1975; Smiderle *et al.*, 2019). Em virtude do crescimento da demanda da polpa do fruto de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), a indústria de alimentos tem buscado diversas formas para o aproveitamento de suas sementes, que são ricas em gorduras e proteínas (Cohen *et al.*, 2005); dentre as possibilidades tem-se o cupulate que é o beneficiamento das amêndoas do cupuaçu. O açaí apresenta também uma grande quantidade de variados compostos fenólicos em alta concentração, assim como a pinha que além destes compostos possui tocoferóis, ácido ascórbico (Yamaguchi *et al.*, 2015; Vasco, Ruales, Kamal-Eldin, 2008). A fermentação da amêndoa do cupuaçu tem papel fundamental na formação dos precursores de sabor do cupulate, portanto, neste estudo, foram realizadas duas fermentações com o objetivo de comparar as duas entre si. A fermentação controle (FC) composta apenas por amêndoa e polpa de cupuaçu e já a outra Fermentação (FII), tinha adição de polpa de açaí e pinha na sua massa fermentativa. Neste presente trabalho foram avaliadas e comparados os parâmetros fermentativos de ambas as fermentações (FC e FII); foram elaborados cupulates ao leite e 50% de ambas as fermentações; foram analisados qualitativamente os metabólitos secundários, foram analisados compostos fenólicos através do método Folin-Ciocalteu, capacidade antioxidantes através do radical ABTS<sup>•+</sup>; foi determinada a quantidade de hidroximetilfurfural; e também foi feita análise microbiológica tanto nas amêndoas fermentadas secas e torradas e nos cupulates ao leite e 50%, dos dois processos fermentativos. Onde a FII teve o pico fermentativo no 4º dia e teve seu término no 6º dia, já a FC teve apenas no 5º dia e terminou com 8 dias de fermentação. Na análise de Compostos fenólicos a amostra ALS, da FC, obteve o menor resultado (531,47 mEq/100g amostra) e a SAF teve o maior resultado (2512,95 mEq/100g amostra), da FII. Na análise da avaliação da Capacidade Antioxidante o comportamento foi o mesmo sendo o valor mínimo 8,62 µMTrolox/gAmostra (ALS da FC) e o máximo 165,8 µMTrolox/gAmostra (SAF da FII). Referente ao HMF o resultado máximo obtido foi de 53,11 mg/Kg na amostra TS da FC e o mínimo foi de 5,61 mg/Kg da amostra da FII. Portanto, pode-se concluir, através destes resultados, pode-se averiguar que a fermentação com adição de polpa de cupuaçu, açaí e pinha, obteve resultados superiores, quando comparada à fermentação controle, tratando-se do processo de beneficiamento das amêndoas, quantidade de compostos bioativos.

**Palavras-chave:** fermentação, cupuaçu, cupulate, compostos fenólicos, capacidade antioxidante

## ABSTRACT

Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) is the fruit, typical of the Northern Region of Brazil, originating from the pre-Columbian tree, which is known as cupuaçuzeiro, cupuaqueiro or cupu. (Vasconcelos et al, 1975; Smiderle et al., 2019). Due to the growing demand for cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) fruit pulp, the food industry has sought different ways to use its seeds, which are rich in fats and proteins (Cohen et al., 2005); Among the possibilities is cupulate, which is the processing of cupuaçu almonds. Açaí also has a large amount of various phenolic compounds in high concentration, as does custard apple, which in addition to these compounds has tocopherols and ascorbic acid (Yamaguchi et al., 2015; Vasco, Ruales, Kamal-Eldin, 2008). Cupuaçu almond fermentation plays a fundamental role in the formation of cupulate flavor precursors, therefore, in this study, two fermentations were carried out with the aim of comparing the two with each other. The control fermentation (FC) consisted only of almonds and cupuaçu pulp and the other fermentation (FII) had the addition of açaí pulp and pine cones in its fermentation mass. In this present work, the fermentative parameters of both fermentations (FC and FII) were evaluated and compared; cupulates were made using milk and 50% of both fermentations; secondary metabolites were qualitatively analyzed, phenolic compounds were analyzed using the Folin-Ciocalteu method, antioxidant capacity through the ABTS.+ radical; the amount of hydroxymethylfurfural was determined; and microbiological analysis was also carried out on both the dry and roasted fermented almonds and the milk cupulates and 50% of the two fermentative processes. Where FII had its fermentation peak on the 4th day and ended on the 6th day, FC only had it on the 5th day and ended with 8 days of fermentation. In the analysis of phenolic compounds, the ALS sample, from FC, obtained the lowest result (531.47 mEq/100g sample) and SAF had the highest result (2512.95 mEq/100g sample), from FII. Regarding HMF, the maximum result obtained was 53.11 mg/Kg in the TS sample from FC and the minimum was 5.61 mg/Kg from the FII sample. Therefore, it can be

concluded, through these results, it can be seen that fermentation with the addition of cupuaçu pulp, açaí and pine cone, obtained superior results, when compared to control fermentation, in the case of the almond processing process, quantity of bioactive compounds.

**Keywords:** fermentation, cupuaçu, cupulate, phenolic compounds, antioxidant capacity

## SUMÁRIO

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1.INTRODUÇÃO.....                                               | 14 |
| 2.OBJETIVOS.....                                                | 15 |
| 2.1 Objetivo Geral.....                                         | 15 |
| 2.2 Objetivo Específico.....                                    | 15 |
| 3.REVISÃO DE LITERATURA.....                                    | 16 |
| 3.1 CUPUAÇU .....                                               | 16 |
| 3.1.1 Caracterização Botânica do Cupuaçu.....                   | 16 |
| 3.1.1.1 Planta.....                                             | 17 |
| 3.1.1.2 Folha.....                                              | 17 |
| 3.1.1.3 Flor.....                                               | 17 |
| 3.1.1.4 Fruto.....                                              | 17 |
| 3.1.1.5 Sementes.....                                           | 18 |
| 3.1.2 Características Químicas e Nutricionais do Cupuaçu.....   | 19 |
| 3.1.2 Importância Socioeconômica do Cupuaçu e do Cupulate ..... | 19 |
| 3.2 AÇAÍ ( <i>Euterpe oleracea</i> ) .....                      | 20 |
| 3.3 PINHA ( <i>Annona squamosa</i> L.).....                     | 22 |
| 3.4 ENZIMAS POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE.....                  | 23 |
| 3.5 CUPULATE.....                                               | 25 |
| 3.6 PRÉ-PROCESSAMENTO DO CUPUAÇU.....                           | 26 |
| 3.6.1 Colheita e Pré-Seleção do fruto.....                      | 26 |
| 3.6.2 Fermentação.....                                          | 27 |
| 3.6.2.1 Enzimas na fermentação do cacau.....                    | 30 |
| 3.6.2.2 Compostos Formadores de Aroma e Sabor.....              | 33 |
| 3.6.3 Secagem.....                                              | 34 |

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.6.4 Limpeza das amêndoas fermentadas e secas.....</b>                            | <b>34</b> |
| <b>3.6.5 Torragem.....</b>                                                            | <b>35</b> |
| 3.6.5.1 Reação de Maillard.....                                                       | 39        |
| <b>3.6.6 Prensagem e obtenção da torta e manteiga.....</b>                            | <b>44</b> |
| <b>3.6.7 Moagem e produção do pó de cupuaçu.....</b>                                  | <b>45</b> |
| <b>3.6.8 Alcalinização.....</b>                                                       | <b>45</b> |
| <b>3.7 PROCESSAMENTO DO CUPULATE.....</b>                                             | <b>46</b> |
| <b>3.8 COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES.....</b>                                         | <b>47</b> |
| <b>3.9 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....</b>                       | <b>48</b> |
| <b>3.10 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....</b> | <b>49</b> |
| <b>3.11 TESTE DE CORTE.....</b>                                                       | <b>51</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                     | <b>51</b> |
| 4.1 COLETAS DAS AMÊNDOAS DO CUPUAÇU.....                                              | 51        |
| 4.2 HIGIENIZAÇÃO.....                                                                 | 52        |
| 4.3 DESPOLPAMENTO.....                                                                | 52        |
| 4.4 FERMENTAÇÃO (FERMENTAÇÃO CONTROLE).....                                           | 53        |
| 4.5 FERMENTAÇÃO DAS AMÊNDOAS DO CUPUAÇU COM ADIÇÃO DAS POLPAS DE AÇAÍ E PINHA.....    | 55        |
| 4.6 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO.....                | 55        |
| 4.6.1 Temperatura.....                                                                | 55        |
| 4.6.2 Acidez.....                                                                     | 55        |
| 4.6.3 °Brix e pH.....                                                                 | 55        |
| 4.6.4 Teste de Corte.....                                                             | 56        |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7 ANÁLISES DAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS.....                       | 56 |
| 4.7.1 Preparo do Extrato Bruto.....                                   | 56 |
| 4.7.2 Fitoquímica.....                                                | 56 |
| 4.7.3 Compostos Fenólicos.....                                        | 56 |
| 4.7.4 Análise da Capacidade Antioxidante.....                         | 57 |
| 4.7.5 Determinação de HMF.....                                        | 57 |
| 4.8 PREPARO DO CUPULATE EM TABLETES.....                              | 58 |
| 4.8.1 Secagem.....                                                    | 58 |
| 4.8.2Torragem.....                                                    | 59 |
| 4.8.3 Trituração E Moagem.....                                        | 59 |
| 4.8.4 Alcalinização e Prensagem do Líquor.....                        | 59 |
| 4.8.5 Adição e Mistura dos Ingredientes.....                          | 59 |
| 4.8.6 Refinamento.....                                                | 60 |
| 4.8.7 Conchamento.....                                                | 60 |
| 4.8.8 Modelagem e Resfriamento.....                                   | 60 |
| 4.9 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NO CUPULATE.....                    | 60 |
| 4.9.1 Determinação de pH.....                                         | 60 |
| 4.9.2 Determinação de Acidez.....                                     | 60 |
| 4.9.3 Determinação de Umidade.....                                    | 61 |
| 4.9.4 Determinação de Cinzas.....                                     | 61 |
| 4.9.5 Determinação de Lipídios.....                                   | 61 |
| 4.9.5.1 Extração de Gordura por Soxhlet.....                          | 61 |
| 4.9.4.2 Extração de Gordura A Frio.....                               | 61 |
| 4.9.6 Determinação de Proteína.....                                   | 62 |
| 4.9.7 Determinação de Açúcares Redutores, Não Redutores e Totais..... | 62 |

|                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.9.7 Determinação de Carboidratos.....</b>                                                                                | <b>64</b> |
| 4.10 ANÁLISES DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO CUPULATE.....                                                                         | 64        |
| <b>4.10.1 Preparo do Extrato Bruto para as Análises de Compostos Bioativos.....</b>                                           | <b>64</b> |
| <b>4.10.2 Teste Fitoquímico.....</b>                                                                                          | <b>64</b> |
| <b>4.10.3 Compostos Fenólicos.....</b>                                                                                        | <b>64</b> |
| 4.11 ATIVIDADE ANTIOXIANTE NO CUPULATE.....                                                                                   | 65        |
| <b>4.11.1 ABTS.....</b>                                                                                                       | <b>65</b> |
| 4.12 ANÁLISE DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) .....                                                                              | 65        |
| 4.13 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS NO CUPULATE.....                                                                                | 66        |
| <b>4.13.1 Coliformes Fecais e Totais.....</b>                                                                                 | <b>66</b> |
| 4.13.1.1 Teste Presuntivo.....                                                                                                | 66        |
| 4.13.1.2 Teste Confirmativo.....                                                                                              | 67        |
| <b>4.13.2 Bolors e Leveduras.....</b>                                                                                         | <b>67</b> |
| <b>4.13.3 Bactérias Mesófilas.....</b>                                                                                        | <b>67</b> |
| <b>4.13.4 <i>Salmonella</i> sp.....</b>                                                                                       | <b>68</b> |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                         | <b>68</b> |
| 5.1 CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO DA FERMENTAÇÃO.....                                                                               | 69        |
| 5.2 TESTE DE CORTE.....                                                                                                       | 70        |
| 5.3 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS DO CUPULATE EM BARRA.....                                                                        | 73        |
| 5.4 ANÁLISE QUALITATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS.....                                         | 75        |
| 5.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS CUPULATES EM BARRA E DAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS..... | 77        |
| 5.6 DETERMINAÇÃO DE HIDROXIMETILFURFURAL NAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS E NAS BARRAS DE CUPULATE.....                          | 81        |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGIA DOS CUPILATES EM BARRA AO LEITE E MEIO AMARGO ..... | 83 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                                             | 85 |

## 1. INTRODUÇÃO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é o fruto, típico da Região Norte do Brasil, encontrada principalmente nos estados do Pará, Amapá e Amazonas, oriundo da árvore, pré-colombiana, que é conhecida como cupuaçuzeiro, cupuaçueiro ou cupu. (Vasconcelos *et al.*, 1975; Smiderle *et al.*, 2019). Dentre as frutas regionais da Amazônia, o cupuaçu destaca-se como uma das mais apreciadas e conseqüentemente muito consumida pelos habitantes desta região (De Nazaré, Barbosa & Viégas, 1990). A polpa do fruto é muito usada na preparação de sucos, geleias, polpa enlatada, bombons, refrescos e entre outras formulações culinárias, por possui sabor e aroma característicos. (Bastos, 2002; Smiderle *et al.*, 2019)

Em virtude do crescimento da demanda da polpa do fruto de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), a indústria de alimentos tem buscado diversas formas para o aproveitamento de suas sementes, que são ricas em gorduras e proteínas (Cohen *et al.*, 2005). As amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) apresentam potencial para várias utilidades, dentre elas a fabricação do cupulate.

O cupulate é obtido através da modificação das amêndoas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), já beneficiadas, para alcançar sabores, texturas, odores e aparência semelhantes ao chocolate oriundos das amêndoas do cacau, além de apresentar vantagens como o menor preço e a presença de substâncias como a teobromina, uma substância estimulante mais saudável do que a cafeína (SETEC, 2007). Esse produto final tem diversas formas de processamento, como por exemplo, em tabletes (em variadas concentrações) e em pó (Fraife Filho, 2018; Lannes, Medeiros & Amaral, 2002).

O açaí também apresenta também uma grande quantidade de variados compostos fenólicos em alta concentração, dentre eles antocianinas, flavonas e ácidos fenólicos; que possuem capacidade antioxidante (Gordon *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2015). A pinha, assim como o açaí, também é rica em componentes antioxidantes e vitaminas; entretanto, apesar do seu consumo ter aumentado nos últimos anos e por consequência, os estudos sobre a fruta, ainda se faz necessário muitas pesquisas sobre como utiliza-la na indústria de alimentos.

Dessa forma o presente trabalho tem por objetivo adicionar polpas das frutas de açaí e pinha, que possuem boas quantidades de enzimas e compostos bioativos, visando avaliar o beneficiamento do processo fermentativo das amêndoas de cupuaçu e suas influências nas

características microbiológicas, físico-químicas e compostos bioativos, tanto durante o processo fermentativo quanto no produto final (cupulate).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho é acompanhar o processo fermentativo das amêndoas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) sem e com adição de polpas de frutas, sendo elas pinha (*Annona squamosa* L.) e açaí (*Euterpe oleracea*), e obtenção de um cupulate no final de ambas fermentações.

### 2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- Realizar uma fermentação natural de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), e usá-la como controle;
- Realizar uma segunda fermentação controlada com adição de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) e açaí (*Euterpe oleracea*);
- Avaliar as características da massa fermentativa (temperatura, pH, teor de sólidos solúveis, acidez) e o consumo de nutrientes (açúcares e proteínas), e comparar os efeitos da adição das polpas de pinha (*Annona squamosa* L.) e açaí (*Euterpe oleracea*) na fermentação;
- Elaboração do cupulate de ambas as fermentações (controle e a com adição de polpa de frutas)
- Analisar no produto final (cupulate) as características físico-químicas, análise de HMF (hidroximetilfurfural), análises microbiológicas, conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CUPUAÇU

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é um dos mais importantes frutos amazônicos, sendo originário do Sudeste e Sul da Região Amazônica, conhecido por sua polpa ácida com aroma intenso, possui grande capacidade mercadológica (Souza *et al.*, 2020). As características bromatológicas consiste em aproximadamente 45% composto de cascas, 35% de polpa e 20% de sementes sendo a polpa (mesocarpo), a principal fonte de comercialização, sendo muito utilizados na produção de sucos néctares, licores, geleias, entre outros (Nazaré *et al.*, 1990).

O nome do cupuaçu é oriundo da língua Tupi, e significa kupu: similar ao cacau e açu: grande (Santos, 2003). Também pode ser conhecido por nomes vernaculares como por exemplo: copoasu, cupuaçuzeiro, cupuarana, cupu-assu, copoaçú, cupu do mato, pupú, pupuaçú; e na língua inglesa como: copoasu, brazilian cocoa, cupuaçu, large-flowered cocoa (Lima, 2012).

Por conta do grande valor social e econômico que representa para o país, no ano de 2008 uma lei que designa o cupuaçu como fruta nacional brasileira, foi sancionada (Sousa, 2011). De acordo com Alves (2002), a espécie pré-colombiana de cupuaçu, no Brasil, possivelmente foi disseminada a partir da região pré-amazônica, no Estado do Maranhão, para os outros estados da região norte, por meio da migração dos povos indígenas.

Embora seja um fruto de grande potencial, ainda é muito negligenciado pelos fatores culturais, regionais, econômicos e sazonais.

##### 3.1.1 Caracterização Botânica do Cupuaçu

###### 3.1.1.1 Planta

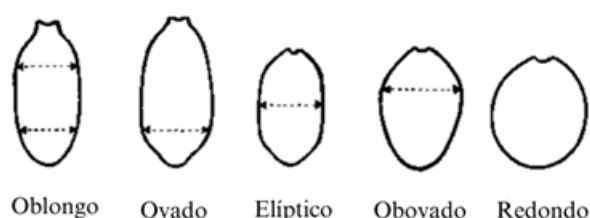
O cupuaçu, de nome científico *Theobroma grandiflorum*, pertence à família *Sterculiaceae*, a mesma do cacaueiro, é um fruto oriundo do cupuaçuzeiro. A planta do cupuaçuzeiro, sendo este uma espécie perene e nativa da Amazônia, possui em média 4-8 metros de altura, com 7 metros de diâmetro; entretanto sua altura pode chegar até 20 metro e o diâmetro do caule até 45 cm, em ambiente tropical e úmido, apresenta raízes de cerca de 20-25

cm de profundidade do solo, com muitas raízes laterais ou secundárias (Dos Santos, 2019; Gondim, 2001; Souza, 2017; Smiderle *et al.*, 2019).

O cupuaçuzeiro se desenvolve melhor em climas de temperaturas na faixa de 21,6°C e 27,5°C, umidade relativa do ar de 77% e 88% e o índice pluviométrico mais adequado varia entre 1.900 a 3.100 mm (Souza *et al.*, 2007).

O cupuaçu possui vários formatos, dentre eles o oblongo, ovalado, elíptico, obovoide ou redondo (Imagem), o seu diâmetro transversal pode variar de 9-15 cm e o longitudinal de 10-40 cm, seu peso é em média 1200g, sendo, em média, 38% de polpa, 17% de amêndoas, 2% da placenta e 43% da casca. Nos frutos do cupuaçu, sem sementes, o percentual de polpa pode subir para, em média, 64% (Souza & Sousa, 2002).

Imagem 1 – Formatos do Fruto do Cupuaçu



Fonte: Souza & Sousa, 2002

#### 3.1.1.2 Folha

Quando jovens, as folhas do cupuaçuzeiro, possuem uma coloração rósea, são simples e alternas, coberta por pelos. Com o decorrer dos anos a coloração muda, para o verde com o comprimento de 20-35 cm e 6-11 cm de largura (Souza, 2017; Dos Santos, 2019).

#### 3.1.1.3 Flor

O cupuaçuzeiro possui as maiores flores do gênero *Theobroma*, com coloração que variam de branco ao vermelho violeta, são pendiculares com 3-5 cm (Souza, 2017; Dos Santos, 2019).

#### 3.1.1.4 Fruto

Assim como as flores, os frutos são os maiores dentre os do gênero *Theobroma*, possui formas ovoides de 12 a 25 cm de comprimento e 10 a 12 cm de diâmetro com peso médio de 1200g (Dos Santos, 2019). No que se refere a casca (epicarpo mais mesocarpo), o

epicarpo possui um aspecto de madeira, coberto por um revestimento ferrugíneo, que quando raspado, expõe uma outra camada clorofilada; o mesocarpo é esponjoso, pouco resistente e levemente mais rígido que o endocarpo (polpa que envolve as amêndoas), que já possui como características a maciez, e um pouco transparente, limitado internamente por uma película.

Em média um fruto possui 36 amêndoas, estando posicionadas em torno de um eixo central, conhecido popularmente como talo, estando longitudinalmente em relação ao comprimento da fruta.

#### 3.1.1.5 Sementes

As sementes do fruto são notadas como recalcitrantes, pois não podem sofrer perda de sua umidade interior ou ser estocadas em baixas temperaturas, podendo perder a sua viabilidade. Se as sementes forem acondicionadas com a umidade variando entre 49,8 e 51,7%, torna-se possível manter o seu armazenamento (Santos, 2003).

Tais sementes são divididas em 3 partes: o envoltório (casca), cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, localizado na base da semente e unido aos dois cotilédones. Devido a o envoltório estar aderido aos dois cotilédones, há dificuldade na remoção da casca, diferente do que ocorre com a amêndoa do cacau, pois existe um espaço entre as duas estruturas (Santos, 2003).

Equiparando as sementes de cupuaçu com as de cacau, é possível perceber que as de cupuaçu possuem uma quantidade maior em lipídeos e amido, e menor em proteínas, polifenóis e carboidratos (Martini, 2004). As proteínas apresentam-se na forma de granulações espalhadas no citoplasma. Durante a proteólise, os aminoácidos são liberados e juntam-se com constituintes fenólicos gerando o composto quinona, diminuindo assim o amargor e adstringência. No cacau são armazenadas dois tipos de proteínas: globulina-7S (vicilina) e a albumina e, apenas a primeira é responsável pela formação dos precursores de aroma do chocolate. Nas sementes do cupuaçu também foram encontradas quantidades significativas de globulina e albumina, sendo a última a de maior quantidade (Carvalho *et al.*, 2008).

As sementes são usadas na produção do “chocolate do cupuaçu”, chamado de cupulate (sem apresentar alterações significativas nas características físico-químicas ao do chocolate, oriundo da fermentação das amêndoas de cacau) e também muito utilizado pela indústria farmacêutica e de cosméticos (Smiderle *et al.*, 2019).

### 3.1.2 Características Químicas e Nutricionais do Cupuaçu

O *Theobroma grandiflorum* possui características sensoriais, descritas no estudo de Roger *et al.* (2004) como caráter ácido (pH 3,4). Referente a sua composição bromatológica encontra-se valores relevantes de proteína (8,8%), de lipídios (12,7%), cinzas (5,3%), fibras (14,3%) e matéria seca (12,1%). Segundo Lima (2013), o fruto possui em média 34,3 mg/g de potássio 15,7 mg/g de fósforo, 13,1 mg/g de magnésio, 5,5 mg/g de cálcio e 2,5 mg/g de sódio.

O teor de gordura nas amêndoas do cupuaçu, tem 41% de ácidos graxos oleico, 32% de esteárico, 7,5% de palmítico, 10% de eicosanóico, 4,6% de linoleico, 11% de aráquico e 1,8% de beênico (Pugliese, 2010; Dos Santos, 2019; Smiderle *et al.*, 2019). De acordo com os estudos de Franco e Shibamoto (2000), o aroma brilhante e característico da baga se deve ao efeito sinérgico de vários compostos voláteis, principalmente ésteres, dos quais 42 % é butanoato de etila e 22 % é etil-hexanoato, confirmando os dados apresentados por Alves e Jennings (1979), esses mesmos componentes foram caracterizados como os principais componentes da celulose.

### 3.1.2 Importância Socioeconômica do Cupuaçu

A Região Amazônica tem uma grande produção, destinada ao mercado regional e local, de cupuaçu, que possui características tecnológicas e sensoriais, importantes para a elaboração de outros produtos (Dos Santos, 2019; De Nazaré, Barbosa & Viégas, 1990; Gondim, 2001).

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum) é uma das 22 espécies do gênero *Theobroma*, do qual o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é a espécie economicamente mais importante. Atualmente, a comercialização do fruto está associada ao consumo da polpa que ainda é grande parte da produção da espécie, devido as suas propriedades sensoriais (Pugliese *et al.*, 2013). A amêndoa, apesar de não ser tão comercializada quanto a polpa, tem promovido interesse das empresas do ramo farmacêutico e cosmético em consequência de estudos que revelam a presença de antioxidantes (Oliveira; Genovese, 2013).

Devido ao seu alto teor de gordura, valor nutricional e baixo custo, a fruta tem chamado a atenção no cenário nacional e internacional, impulsionando a economia da região por meio da produção de polpa, suco, sorvete e confeitaria (Oliveira; Genovese, 2013; Souza *et al.*, 2011). Outra vertente da exploração comercial dessa fruta emergente é a fabricação de

cosméticos e fitofármacos, o que tem voltado a atenção dos pesquisadores para a geração de novos produtos e tecnologias a partir dessas matérias-primas (Lima, 2013).

Embora as sementes quase alcancem os 20% do total do fruto, elas são, na sua maioria, são descartadas no processo de beneficiamento do fruto. Entretanto, essas sementes apresentam características botânicas e químicas similares com o cacau, possibilitando a elaboração de produtos parecidos com o chocolate (Da Silva; Farias, 2018).

Ultimamente, muitos consumidores têm procurado adquirir um estilo de vida mais saudável e, por consequência, a indústria alimentícia vem estudando maneiras de adicionar componentes alimentares mais saudáveis e que possam auxiliar na redução calórica e agregando valor nutricional ao produto (Carlos *et al.*, 2019). Com a crescente procura por frutas tropicais e produtos derivados, a indústria agroalimentar tem buscado alternativas para aproveitar e valorizar as sementes de cupuaçu altamente ricas em proteínas, gorduras, minerais, compostos bioativos e muitos outros componentes, mas que várias vezes são descartados e acabam como lixo (Souza *et al.*, 2020).

Apesar de ser uma grande fonte de renda para os produtores, que comercializam o fruto por inteiro, o cupuaçu é muito perecível e, como esses produtores, na maior parte das vezes, possuem pouca infraestrutura para a produção, colheita e pós-colheita. Levando isto em consideração faz-se necessários encontrar outros meios de comercialização, como por exemplo, o beneficiamento e refrigeração da polpa, ampliando o período da safra. (Dos Santos, 2019)

### 3.2 AÇAÍ (*Euterpe oleracea*)

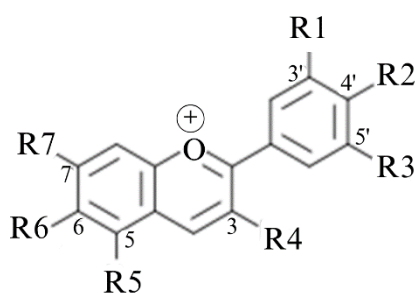
O açaí (*Euterpe oleracea*), nativo da Região Amazônica, embora seja encontrado com muito mais facilidade no Estado do Pará, o açaizeiro pode também ser encontrado em outros estados como o Tocantins, Maranhão, Amapá e inclusive em outros países do Norte da América do Sul, como Venezuela e Guiana (Yamaguchi *et al.*, 2015).

Por conta do alto teor de lipídios, sendo eles mono e poli-insaturados (que corresponde cerca de 50% da matéria seca), a polpa do açaí é considerada um alimento energético. Apesar de haver várias divergências sobre a composição centesimal da polpa de açaí, esta possui cerca de 25% de fibras e 10% de proteína, em base seca, já a quantidade de açúcares simples é menor do que 5%. Além desses componentes o açaí também apresenta uma

boa fonte de minerais, dentre eles o sódio, fósforo, zinco, manganês, ferro, potássio e magnésio (Yamaguchi *et al.*, 2015).

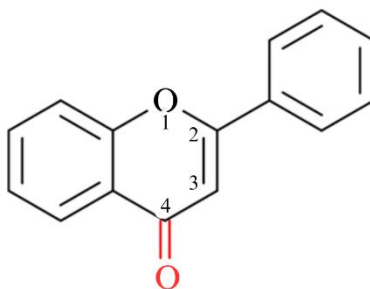
O açaí também apresenta também uma grande quantidade de variados compostos fenólicos em alta concentração, dentre eles antocianinas, flavonas e ácidos fenólicos, mostrados nas imagens 2, 3 e 4 que possuem atividade antioxidante (Gordon *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2015).

Imagem 2 – Estrutura de Antocianina



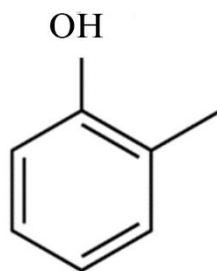
Fonte: Autora

Imagem 3 – Estrutura de Flavona



Fonte: Autora

Imagem 4 – Estrutura de Ácidos Fenólicos



Fonte: Autora

### 3.3 PINHA (*Annona squamosa* L.)

A fruta Pinha, conhecida também como ata e fruta-do-conde e em inglês conhecida como “custard apple” e “sugar apple”, sua polpa possui coloração branca ou amarela com aroma agradável e doce. É de origem Tropical, sendo o seu fruto um sincarpo arredondado ovóide, esférico ou cordiforme (formato de um coração), com 5 a 10cm de diâmetro, na sua maioria, formado por carpelos grandes, coberto de pequenas elevações achatadas em forma de tubérculos e regularmente distribuídos (Couceiro, 1973).

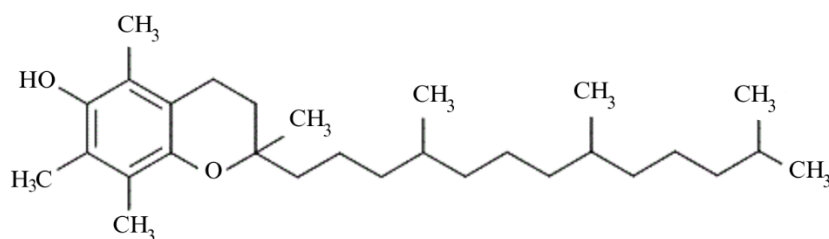
A pinha é um fruto climatérico, cuja maturação, em condições ambientais controladas (20-25°C e UR 80%), ocorre de forma muito mais rápida, em média de 3-5 dias após a colheita, gerando mudanças de textura e aroma. Na colheita do fruto deve-se observar os afastamentos dos carpelos e a coloração verde-amarelada dos tecidos intercarpelares (Liao et al, 1983).

Ainda que, a demanda pelo consumo da pinha, esteja em constante crescimento para a indústria, existe uma carência de conhecimentos sobre sua caracterização bioquímica (Kavati, 1997). A composição nutricional é constituída por 25,3% de carboidratos, 2,1% de fibras, 1,0% de proteínas, 0,3% de lipídeos, 0,7% de cinzas, 23mg de cálcio/100g e 25mg de magnésio/100g (Taco, 2011).

Os fenóis são os principais componentes antioxidantes presentes em frutas e vegetais, são constituídos por várias classes: ácidos fenólicos, antocianinas e tocoferóis (Imagem 5); além de rica em ácido ascórbico (Imagem 6) (Vasco, Ruales, Kamal-Eldin, 2008). Sendo que a concentração destes compostos depende do grau de maturação, variedade, clima,

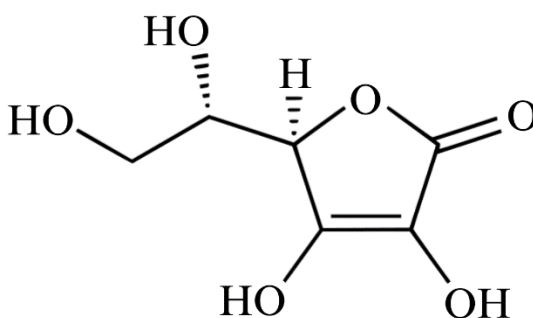
composição do solo, localização geográfica, condições de armazenamentos e entre outros (Haminiuk *et al.*, 2012).

Imagem 5 – Estrutura do Tocoferól



Fonte: Autora

Imagem 6 – Estrutura do Ácido Ascórbico

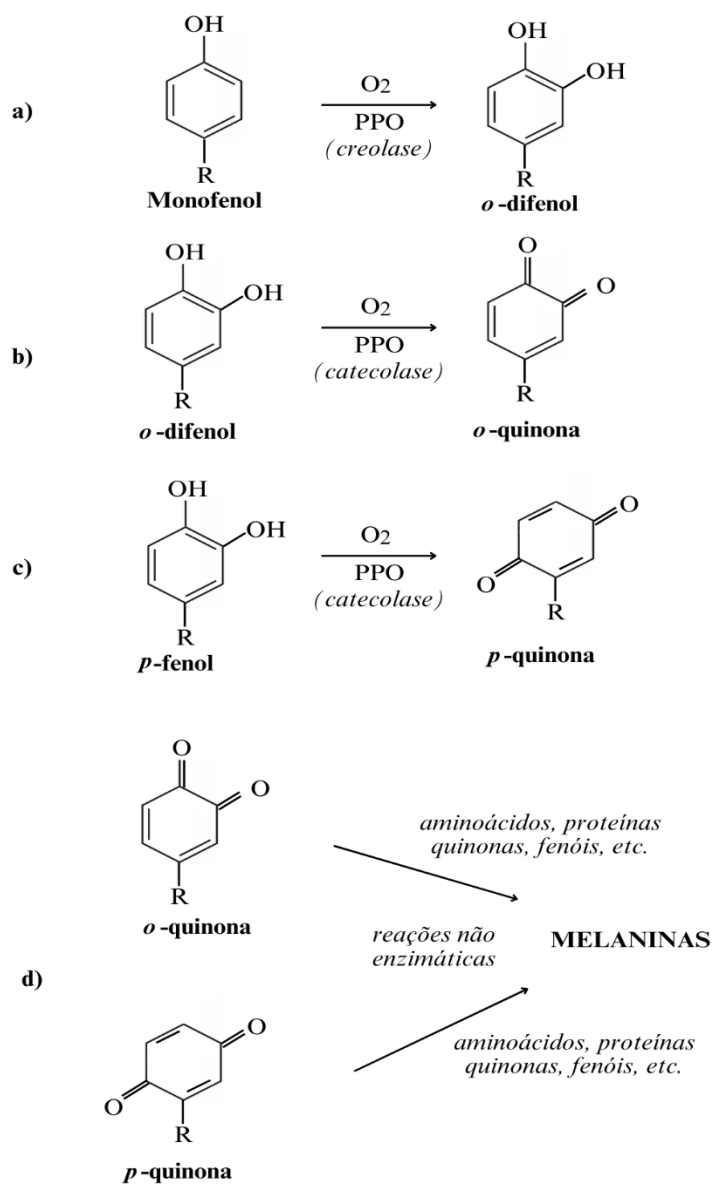


Fonte: Autora

### 3.4 ENZIMAS POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE

As enzimas polifenoloxidase (PPO), pertencentes ao grupo das oxidoredutoras, possuem ação específica sobre substratos fenólicos e dispõem do mesmo formato de sítio ativo, que apresentam um par de átomos de cobre. Essas enzimas normalmente são classificadas em dois grupos, dependendo do substrato usado: as monofenol-oxigenases, que convertem difenóis em quinonas. Referindo-se a este último caso, as PPO são ainda denominadas como catecolases se o substrato é um o-difenol ou lacases, se este é um p-difenol (Imagem 7). Apesar da maioria das difenoloxirredutases apresentarem atividade de cresolases, é comum que muitas monofenoloxigenases, não tenham atividade sobre difenóis (Koblits, 2013; Yoruk, 2003).

Imagem 7 – Reações envolvidas no escurecimento enzimático devido à ação de polifenoloxidasas



Onde: a) atividade de cresolases sobre monofenóis; b) atividade de catecolases sobre *o*-difenóis; c) atividade de lacases sobre *p*-difenóis; d) formação de melaninas a partir da complexação de quinonas com diversos compostos orgânicos.

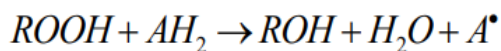
Fonte: Adaptado de Koblits (2013)

A produção de quinonas acontece a partir da ação enzimática na presença de oxigênio. Essas substâncias são altamente reativas e reagem entre si e com outros compostos orgânicos, resultando em produtos de condensação de elevada massa molecular e de coloração escura, chamados de melanina (Fennema, Damodaran, Parkin, 2018).

Tratando-se do açaí, a exposição da polpa às condições atmosféricas do ambiente já é suficiente para que, em alguns minutos, já ocorra numa mudança de coloração, de púrpura para marrom escuro, devido às reações de escurecimento enzimático (Jesus; Leite; Cristianni, 2018). Além desta alteração, tais reações enzimáticas podem acarretar na formação de odores e sabores indesejáveis (*off-flavor*) assim como também a diminuição do valor nutricional, no produto final, devido a destruição dos aminoácidos presentes, dentre eles a tirosina e fenilalanina (Koblitz, 2013).

As peroxidases (POD) também são oxirredutases, mas em comparação à polifenoloxidase, são menos específicas em relação ao substrato, podendo, além dos fenóis, oxidar outros compostos como vitaminas, lipídios, ácidos orgânicos e clorofilas. Tal como as PPO, as POD podem ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos e a sua atividade catalítica pode ocasionar também na formação de compostos polimerizados de coloração escura (Imagem 8) (Koblitz, 2013).

Imagem 8 – Reação Geral Catalisada pela Peroxidase



Fonte: Koblitz (2013)

O radical ( $A^\bullet$ ) formado é muito reativo e complexa-se com variadas moléculas, formando compostos condensados de elevado peso molecular e coloração escura. Apesar do peróxido (ROOH) seja um substrato importante para as reações de oxidação catalisadas pela POD, tais enzimas ainda podem atuar na falta deste substrato, usando o oxigênio molecular (Koblitz, 2013).

A reação dessas enzimas também pode ocasionar na degradação de carotenóides, clorofila, antocianinas, vitaminas e oxidação dos lipídios, que, neste último caso, tem por consequência a formação de compostos voláteis que caracterizam um típico aroma de ranço.

### 3.5 CUPULATE

De acordo com a Resolução nº 264, de 22 de setembro de 2005, classifica-se como chocolate o produto elaborado a partir de derivados de cacau, massa, pó e/ou manteiga com outras misturas, que deve conter no mínimo 25% (g/100 g) de sólidos totais de cacau. Portanto,

esta etapa da fabricação do chocolate segue as etapas de mistura dos ingredientes, descascamento, conchagem, têmpera, moldagem, resfriamento e modelagem (Nogueira, 2015).

O cupulate é o principal produto a ser produzido após a obtenção do líquido. O cupulate pode ser definido como um produto homogêneo, adquirido através da junção de produtos oriundo do cupuaçu, sendo que eles podem ou não serem misturados entre si ou com a junção de leite e derivados, açúcares/edulcorantes, assim como também outros aditivos e agentes flavorizantes. A produção do cupulate, por meio do método convencional, é constituído de 6 etapas básicas como a mistura, conchagem, temperagem, moldagem e resfriamento (Codex alimentarius, 2003)

A proporção dos ingredientes varia de acordo com a legislação do país e preferências do consumidor, sendo os ingredientes base para a produção de chocolate, açúcar, manteiga de cacau, cacau em pó, leite em pó, lecitina de soja (Richter; Lannes, 2007). De acordo com o Cohen *et al.* (2005), maior teor de ácidos graxos monoinsaturados agrega maior maciez à gordura característica bastante admirada por consumidores no teste de aceitação do cupulate. O uso da gordura natural desprovida de ligações trans ainda pode substituir a hidrogenada na elaboração de bolos e sorvetes.

Tratando-se das proteínas das amêndoas de cupuaçu, que possuem valor biológico por ter uma boa composição aminoacídica e teores que ultrapassam as quantidades de referência de crianças e adultos, para alguns dos aminoácidos essenciais. As suas proteínas, além de enriquecerem o alimento, melhoram algumas propriedades funcionais, como por exemplo a capacidade de emulsificação (Lopes *et al.*, 2008).

### 3.6 PRÉ-PROCESSAMENTO DO CUPUAÇU

O processamento das sementes de cupuaçu, visando à obtenção de cupulates, pode ser dividido em duas fases, pré-processamento das sementes e processamento das amêndoas.

#### 3.6.1 Colheita e Pré-Seleção do fruto

A elaboração do cupulate se inicia com o processamento das amêndoas do cupuaçu. A colheita do cupuaçu é o início do beneficiamento. O cupuaçu, quando atinge o seu amadurecimento, se solta da planta e cai no solo; por isso a colheita do fruto deve ser feita de uma ou mais vezes ao dia, para que não ocorra uma contaminação ou alguma injúria no

cupuaçu. Essa coleta diária, deve ser feita manualmente e os frutos são armazenados em recipientes, como sacos (oferecem uma facilidade no transporte, porém não protegem de danos mecânicos) e caixas plástica (facilitam a limpeza e são mais leves) (Souza *et al.*, 2011; Dos Santos, 2019).

Após a colheita, os frutos devem passar por uma pré-seleção, com o objetivo de evitar o contato de frutos sadios com os contaminados, lavados, em água corrente, com o intuito de diminuir as sujidades e a carga microbiana da casca. Posterior lavagem, o cupuaçu será despulpado com muito cuidado para que não ocorra nenhum tipo de contaminação (Souza *et al.*, 2011; Dos Santos, 2019). Para o despulpamento, usa-se uma faca de aço inoxidável para separar a polpa da semente. Esse processo deve ser realizado em até 2-3 dias da colheita, para que a qualidade das amêndoas não se altere.

A época de colheita do cupuaçu ocorre no período de seca, na Região Amazônica, nos meses de julho a setembro. Entretanto a época da safra ocorre no período chuvoso, que encontra-se nos meses de outubro a junho (com pico em março) (Souza *et al.*, 2011).

Terminando o processo de quebra dos frutos, as amêndoas serão postas para fermentar, em um tacho de fermentação, de maneira que a mistura futura seja realizada facilmente.

### **3.6.2 Fermentação**

O processo de beneficiamento das amêndoas do cupuaçu, inclui processos como a fermentação, secagem e torração. O processo fermentativo é responsável pelo desenvolvimento de vários compostos de afetam o sabor do produto final (Carvalho, Garcia, Farfan, 2008).

A fermentação das amêndoas do cupuaçu é realizada por vários microrganismos, e cada grupo, dentre eles leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, irá se desenvolver conforme as condições do meio. As leveduras, presentes em um meio em condição de anaerobiose, irá produzir etanol a partir dos (Carvalho, Garcia, Farfan, 2008).

Existem três fases para que ocorra essa fermentação: a primeira é denominada de adaptação, onde os microrganismos atuantes começam a crescer, pois ainda tem uma certa presença de oxigênio; a segunda fase, tumultuosa ou principal, tem uma grande liberação de dióxido de carbono; e, por fim, a fase estacionária onde a atividade das leveduras diminui, assim como o gás carbônico e precipitação do fermento (De Góes-Favoni *et al.*, 2018).

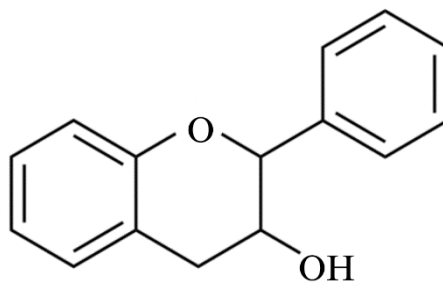
Nesse processo fermentativo, ocorre um aumento de aminoácidos livre e peptídeos, formação de açúcares redutores pela quebra da molécula da sacarose, que são os principais compostos responsáveis pelo sabor do cupulate (Carvalho, Garcia, Farfan, 2008).

Após o corte longitudinal do fruto, as sementes são colocadas em bandejas de fermentação, que geralmente são instaladas em áreas abertas e protegidas do vento, a pelo menos 15 centímetros do solo e das paredes, o que promove a fermentação em temperatura constante. Esses cochos devem ser construídos em madeira que não reaja com a massa fermentada, não agregue odores e seja à prova de umidade. Durante esse processo, a exsudação se forma e se separa da massa fermentada, portanto, a calha deve ter orifícios de no máximo 6-10 milímetros de diâmetro e não mais de 15 centímetros de distância para facilitar a drenagem. mel e favorece um bom arejamento da massa. Cubra os cochos com folhas de bananeira para reduzir a perda de umidade e a temperatura da polpa (Ceplac, 2012).

Somente a folha de bananeira é usada por apresentar uma palma fechada, ideal para conservação do calor que é gerado através da ação dos microrganismos.

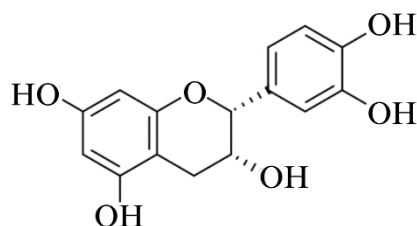
A fermentação das amêndoas de cupuaçu é uma etapa especialmente importante para a produção do cupulate, pois além de desenvolver o flavor a amêndoa precisa perder a sua acidez, que é proveniente dos ácidos como: cítrico, láctico, oxálico e succínico; e também diminua a sua adstringência, que é resultante da presença de polifenóis, dentre eles os flavan-3-óis e procianidinas (Imagens 9 e 10) (Braco *et al.*, 1969; Biehl, 1973).

Imagem 9 – Estrutura de Flavan-3-ol



Fonte: Autora

Imagem 10 - Estrutura de Procianidina



Fonte: Autora

A fermentação é primordial para a qualidade das amêndoas de cupuaçu em virtude das reações bioquímicas que provocam a morte do embrião, liberação de enzimas e substratos, hidrólise de açúcares e proteínas, difusão de compostos fenólicos que entram em contato com as enzimas (Efraim, 2009).

O processo fermentativo possui um tempo médio de 5 a 7 dias até o seu término, em que acontecem as duas fermentações. A fermentação alcoólica, a primeira a ocorrer, começa com o corte do fruto e dura entre 24-36 horas, as leveduras anaeróbicas, responsáveis pela conversão do açúcar em etanol em pH abaixo de 4. Tendo finalizado este estágio, a ação das bactérias lácteas predomina a transformação dos açúcares e ácidos orgânicos em ácido lático, que ocorre a partir das 48 horas e vai até as 96 horas após o início da fermentação. Concluída a fermentação alcoólica, acontece a conversão do etanol em ácido acético, realizada por ação das bactérias acéticas, ocorrendo o aumento da temperatura em até 50°C, configurando assim uma reação exotérmica. Após a conclusão do processo fermentativo, é necessário secar as amêndoas para evitar a ocorrência de uma fermentação indesejada, conhecida por sua característica de odor desagradável, a proteolítica (Imbert, 2017).

Ao longo da fermentação alcoólica, o calor gerado, faz com que ocorra a morte do embrião das amêndoas. Como consequência, iniciam-se reações bioquímicas para a formação do sabor e da coloração característica (Papalexandratou *et al.*, 2011). No decorrer das 36 horas, após o início da fermentação, as bactérias lácticas crescem, devido as condições favoráveis de pH e micro aerobiose, proporcionadas pela fase anterior. Predominam por um período de 16 a 24 horas, em média.

Metabolizam os açúcares restantes mostrando a degradação da polpa e formando, entre outros metabólicos, o ácido lático que promoverá as condições favoráveis para o crescimento das bactérias acéticas, de pH e aeração. O álcool, oriundo das primeiras 48 horas

da fermentação, propicia um ambiente favorável para as bactérias acéticas existentes no meio que oxidam o etanol a ácido acético (Ferrão, 2008; Kostinek *et al.*, 2008).

O processo fermentativo ocorre de maneira natural que envolve vários microrganismos e pode acontecer de 4 a 7 dias (Saltini *et al.*, 2013). Os cochos fermentativos devem conter furos de diâmetros para que possa escorrer o exsudado, líquido rico em açúcar, que pode ser utilizado na produção de sumos, geleias, refrigerantes, destilados finos, vinagre, vinho, gelados e doces; tendo como características.

Os cochos fermentativos, com furos no fundo, escoam um líquido açucarado, chamado exsudado, conhecido como o mel do cacau, usado na produção de sucos, geleias, refrigerantes, destilados, vinhos, vinagre, sorvete e doces. O sumo tem um sabor diferente e agradável, sendo semelhante a algumas frutas tropicais, como a graviola, o bacuri e cupuaçu. Esse sumo também é rico em vitaminas, pectina e açúcares como glicose, frutose e sacarose e apresenta aspecto pastoso e alta viscosidade (Ceplac, 2008).

Nesta etapa, a polpa do cupuaçu é metabolizado por microrganismos, produzindo principalmente etanol e ácido acético, que são absorvidos pelos cotilédones, ocasionando a morte da amêndoa e propiciando alterações físico-químicas críticas na formação do sabor. Dentre essas alterações, podemos realçar a formação de aminoácidos com compostos fenólicos, produzindo quinonas, reduzindo assim o amargor e a adstringência das amêndoas (Huang; Barringer, 2010).

#### 3.6.2.1 Enzimas na fermentação do cacau

A ação das enzimas nas amêndoas de cupuaçu durante o processo fermentativo vem sendo estudado desde a segunda metade do século XX, onde começou-se a acreditar que as enzimas, proteases, invertases e polifenoloxidase, possuem um papel importante na formação do sabor do chocolate (Hansen *et al.*, 1998). Nos dias de hoje, também se sabe que as enzimas endógenas, além das microbianas, auxiliam na formação dos precursores de sabor, a partir das próprias amêndoas. Tendo como principal consequência, da fermentação, a diminuição do pH, cooperando com a ação enzimática (Macedo *et al.*, 2016)

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas e, por este motivo, possuem grande aplicabilidade biotecnológica e industrial. As enzimas hidrolíticas são usadas nos processos industriais, sendo utilizadas nas indústrias têxteis (amilase, pectinase, celulase, oxidorredutase), de papel (lipase, oxidorredutase, xilanase), detergentes (celulase,

lipase, protease, oxidorreductase), alimentícia (lactase, lipase, celulase, pectinase, protease, oxidorreductase) e de couro (lipase e protease) (Nielsen *et al.*, 1998; Kirk *et al.*, 2002).

A presença das enzimas na massa fermentativa promove a degradação dos compostos presentes na polpa, ocasionando a perda de fluidos e a aeração da massa, contribuindo para o crescimento das bactérias (Silva, 2011). As enzimas hidrolíticas e as pectinolíticas quando entram em contato com o substrato, podem melhorar a aeração da massa; e as enzimas amilolíticas, que produzem o aumento da contração dos açúcares redutores por meio da hidrólise do amido; e as enzimas proteolíticas que geram uma melhor concentração de aminoácidos livres. Tais enzimas também possuem um papel muito importante para a formação do *flavor* do produto final (Amin *et al.*, 1998; Schwan, 1998).

De acordo com os estudos de Yoshiyama & Ito (1996), a enzima polifenoloxidase, de fonte microbiana *Coriolus versicolor*, foi bem satisfatória na diminuição da adstringência das amêndoas do cacau pelos compostos fenólicos como flavonóides e proantocianidinas, bem como diminuindo significativamente os compostos fenólicos totais, que são naturalmente. (Imagem 11)

Nas primeiras etapas do beneficiamento da amêndoa do cupuaçu, a fermentação e a secagem, ocorre a formação da coloração, aroma e sabor (*flavor*) característicos do cupulate. A atividade enzimática é catalisada por enzimas endógenas, dentre elas a peroxidase. Estas enzimas são hemiproteínas bem distribuídas em plantas superiores, sendo também encontradas em animais e microrganismos. Tratando-se das plantas estão relacionados com diversos processos metabólicos, tais como oxidação de compostos fenólicos defesa contra patógenos, ligação de proteínas e polissacarídeos à parede celular e, de maneira particular, polimerização de ligninas (Garcia, 2006).

Uma das suas principais atuações é na oxidação das moléculas fenólicas utilizando o seu poder redutor do peróxido de hidrogênio, formando substâncias coloridas, resultando no escurecimento enzimático (sakharov; Ardila, 1999). Todas as enzimas peroxidases, especificamente de plantas superiores, possuem a mesma estrutura geral, que consiste num grupo prostético heme (ferriprotoporfirina IX) e dez  $\alpha$ -hélices e, no processo catalítico, oxidam, ao transitar o íon férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) ao seu estado valência mais alto ( $\text{Fe}^{+4}$ ) (Passardi *et al.*, 2004).

A POD perde a sua capacidade catalítica de acordo com o avanço do processo fermentativo e, esta perda, pode resultar em amêndoas mal fermentadas, pois esta enzima é uma das principais envolvidas na oxidação de compostos fenólicos e, por consequência, nas mudanças de coloração das amêndoas (Carneiro *et al.*, 2020).

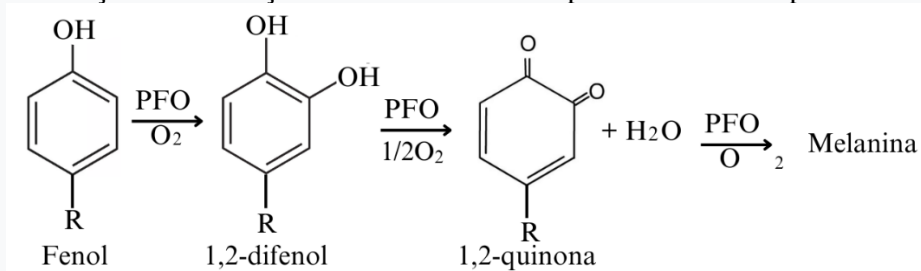
Mesmo sendo evidente a importancia da enzimas durante o processo fermentativo, ainda faz-se muito necessário outros estudos que abordem sua regulação dos processos enzimáticos durante a fermentação, quais substratos enzimáticos estão relacionados ao seu sabor (flavor) das amêndoas de cupuaçu de maior qualidade e quais fatores limitam o seu processo, como por exemplo, a disponibilidade de substrato ou enzimas, genótipos, condições de cultivo ou processo de fermentação (Macedo *et al.*, 2016)

A invertase promove a hidrólise na sacarose em açúcares redutores, glicose e frutose, durante a fermentação. A participação desta enzima é muito importante na reação de Maillard, por ser a principal responsável pela formação do aroma e do sabor característico do cupulate (Pezoa-García, 1989).

Inicialmente, essa reação envolve a condensação de grupos carbonílicos de açúcares redutores com grupos aminos oriundos, em sua maioria, de aminoácidos livres, seguida da degradação dos produtos originados, formando varios compostos oxigenados (Rosli *et al.*, 1996). Tais açúcares são sinificativos precursores do sabor do cupulate, e sua atuação aperfeiçoará nas etapas seguintes do processamento do cupuaçu (Huang, Barringer, 2010).

A alta atuação da PPO, pode atuar fortemente no teor dos compostos fenólicos, durante e após a fermentação, por conta da intensa ação da PPO sobre esses compostos na fase aeróbica da fermentação, convertendo tais compostos em quinonas (Misnawi *et al.*, 2002). A colaboração desses substratos fenólicos para o escurecimento enzimático depende de sua localização e concentração no substrato, bem como a intensidade da coloração de seus pigmentos macromoleculares adquiridos através das quinonas, o que pode levar a alterações nas suas características sensoriais (Misnawi *et al.*, 2002). Apesar de, na maioria dos casos, isso seja indesejável, o escurecimento oxidativo em chá, café, cacau e ameixa é interessante (Lima *et al.*, 2001).

Imagem 11 – Reação de Oxidação Enzimática de Compostos Fenólicos pela Polifenoloxidase



Fonte: Adaptado de Misnawi *et al.*, 2002

### 3.6.2.2 Compostos Formadores de Aroma e Sabor

Para a formação do aroma e sabor característicos do cupulate, as amêndoas devem passar por um processo de beneficiamento (fermentação), seguidos de secagem e torração. (Marabesi, 2018)

Tratando-se da obtenção do cupulate, os cotilédones são os principais responsáveis. Os componentes produzidos através das alterações químicas nos cotilédones sendo estas a morte do embrião e a quebra das barreiras internas dos cotilédones durante o processo fermentativo, são os responsáveis pelo aroma, sabor e cor do cupulate (Owuso *et al.*, 2012). Os cotilédones são constituídos principalmente por gordura, 54% do peso seco, e são formados por dois tipos de células: células do parênquima (armazenadoras) que possui glóbulos de lipídios, proteínas e amido, em contrapartida as células pigmentativas guardam os polifenóis e metilxantinas (Del Boca, 1962; Ferrão, 2002). Os polifenóis compõem 12-20% do peso seco causadores da adstringência característica no sabor final do cupulate. Eles são classificados em três grandes grupos: antocianinas catequinas e protocianinas. A teobromina e a cafeína, atribuem um amargor nas sementes e formam 1,5% do peso seco das amêndoas (Owuso *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos, especialmente as antocianinas e as antocatequinas, concentram-se nas células especiais do cotilédone e nos sistemas enzimáticos causando as transformações das características sensoriais (Owuso *et al.*, 2012).

As antocianinas transformam-se primeiro em antocianidinas, responsável pela coloração violácea, se decompondo rapidamente em compostos incolores e se condensam, formando os taninos flavonóicos. As antocatequinas, ao condensar-se formam os taninos catéquicos, evidenciando a cor acastanhadas que, em combinação com aminoácidos e proteínas, dão origem a componentes que afetam o sabor (Ferrão, 2008).

É necessário condições de anaerobiose, processo que ocorre durante a fermentação das amêndoas de cupuaçu, para que ocorra a transformação das antocianinas, pois há pouco espaço entre as sementes para reter o oxigênio, entretanto, a transformação das antocatequinas é facilitada por condições de aerobiose, visto que as enzimas que atuam no processo, são as polifenoloxidasas. O revolvimento, ligado a degradação da massa fermentativa ajuda na ventilação da massa, que é determinado por essa fase (Ferrão, 2008).

Os polifenóis das amêndoas de cupuaçu são armazenados nas células de pigmento dos cotilédones. Tais células possuem coloração branco para fundo púrpura, dependendo da quantidade de antocianinas- (Ferrão, 2008).

Os polifenóis se expandem em conjunto com os líquidos das células responsáveis pelo armazenamento e são sujeitos a uma oxidação e complexação durante o processo fermentativo. As moléculas de açúcar são hidrolisadas transformando-se em galactose e anarbinose por glicases e as antocianinas. Polifenóis e quinonas formam complexos com outros polifenóis, peptídeos e proteínas diminuindo sua solubilidade e a adstringência formando a cor marrom característica das amêndoas de cupuaçu (Ferrão, 2008).

É possível ter como identificador da qualidade das amêndoas a quantidade de antocianinas, assim como a coloração é o indicador da qualidade do sabor e seu, futuro uso na produção de cupulate, e o teste de corte (Camu *et al.*, 2008b; Sarmiento, 2007).

No decorrer do processo fermentativo das amêndoas a oxidação das cianinas e a complexação das catequinas em aminoácidos e proteínas, auxiliando na redução significativa na adstringência e amargor das amêndoas (Carvalho *et al.*, 2008). A degradação dos polifenóis deve acontecer de modo eficiente, visando melhorias na qualidade das sementes (Daud *et al.*, 2007). Apesar disso, as fermentações realizadas por muito tempo podem causar deterioração proteica das sementes e, a partir daí, liberação de amônia, ocasionando na coloração marrom dos produtos (Oetter, 1995).

Os flavonóides que atuam com propriedades antioxidantes e que propiciam impactos positivos para a saúde humana, estão presentes nas amêndoas de cacau após a fermentação e torrefação, na sua maior parte, são transformados num material insolúvel de coloração vermelho-marrom, responsável pela cor característica do cupulate (Davriex *et al.*, 2006; Porter *et al.*, 1991).

No final do processo fermentativo, a ação das bactérias acéticas aumenta, que vão consumir o álcool produzido oxidando-o que resultará em ácido acético. Esse ácido acético produzido gera modificações na parede celular das sementes, que vai torna-la permeável, impossibilitando a germinação, permitindo que os substratos e as enzimas do interior das amêndoas interajam, produzindo os formadores do aroma (Marabesi, 2018). Terminado esse processo fermentativo, a secagem e a torração são realizadas, que irão estabilizar o sabor, o aroma, a umidade e a coloração (Reação de Maillard, que ocorre na presença de peptídeos, aminoácidos e açúcares redutores) (Ferrão, 2008; Marabesi, 2018).

### **3.6.3 Secagem**

A secagem natural baseia-se em distribuir os grãos em bandejas ou esterias em áreas com o clima seco expondo-os no sol e durante a noite guarda-los para evitar contato com a chuva, sendo constantemente homogeneizados para assegurar uma secagem uniforme nos grãos. Este mesmo processo pode ser realizado de maneira artificial com o auxílio de alternativas mecânicas e/ou elétricas para forçar o contato do ar com as sementes (Beckett, 2009).

Segundo Campos e Teixeira (2006), a utilização da secagem artificial em processos industriais apresenta diversas vantagens, como melhorar a qualidade do produto seco e reduzir a secagem excessiva ou insuficiente em alguns casos (que, quando ocorre, pode levar a deterioração do grão). Esse processo, responsável tanto pela redução da atividade de água das amêndoas, ajudando na conservação, quanto pela volatilização do excesso de ácido acético que é formado durante a fermentação (Minifie, 1999). Além disso, ao utilizarmos este processo, ocorre a aceleração da oxidação de compostos fenólicos beneficiando a mudança de coloração e diminuindo a adstringência residual no produto (Koblitz, 2011).

De acordo com Efraim et al. (2006), basta apenas 3% de amêndoas contaminadas para que ocorra a modificação no sabor da massa fermentativa. A amêndoa deve apresentar ao final da secagem, umidade final entre 6-8%, se a amêndoa obter uma umidade muito baixa, a casca fica quebradiça, e se tiver uma umidade muito alta facilitará o desenvolvimento de fungos (Lopes, 2000).

A secagem do cacau promove a retirada da água e com isso continua as alterações bioquímicas que se iniciam durante a fermentação, as enzimas que atuam no interior na

amêndoa e promovem reações químicas importantes que contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais. A temperatura é muito importante para a qualidade final das amêndoas. O uso de temperaturas mais altas ou mais baixas gera uma diminuição da qualidade do produto final, por conta da desativação das enzimas ou uma diminuição da atividade catalítica (Tomlins *et al.*, 1993; Souza, Peixoto, De Toledo, 1995).

#### **3.6.4 Limpeza das amêndoas fermentadas e secas**

Após a fermentação e secagem das amêndoas, as amêndoas seguem para a etapa de peneiramento onde são retiradas as sujeiras e demais impurezas por meio de peneiras, esteiras, imãs, sistemas de vibração e vácuo. Dessa forma, amêndoas inteiras podem ser torradas diretamente ou trituradas antes da torrefação (Efraim, 2009).

#### **3.6.5 Torragem**

Posterior a etapa de fermentação e secagem, as amêndoas já estão prontas para entrarem no processo de torrefação. Tal processo, consiste num tratamento térmico com temperatura variando de 110°C-140°C, deve-se ter cuidado para que a temperatura não ultrapasse o limite pois pode gerar a alteração das características sensoriais desejáveis e das características intrínsecas do cupuaçu (Drouden, 1996).

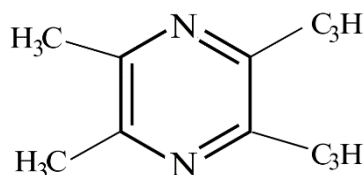
A torra é uma etapa de extrema importância para o desenvolvimento das características sensoriais do produto final, através da reação de Maillard, partindo de precursores formados durante a fermentação e a secagem. Na torragem acontece a diminuição da concentração dos ácidos voláteis indesejáveis, dentre eles o ácido acético, e também a inativação das enzimas, responsáveis pela degradação da manteiga (Granvogl *et al.*, 2006).

Um complexo de cerca de 400-500 compostos cominados, incluindo aldeídos, tiazóis, pirazinas, fenóis, furanos, cetonas, álcoois e ésteres, são responsáveis pelo sabor característico do cupulate, dessa maneira é difícil caracteriza-lo por um único componente, otimizar as condições de torrefação, significa desenvolver ao máximo o potencial aromático das amêndoas (Queiroz & Garcia, 1999; Ramli, 2006, Frauendorfer *et al.*, 2008).

Esses precursores-chave de compostos de sabor desenvolvem compostos heterocíclicos voláteis, no decorrer da torragem, onde, apesar de sua formação não ser totalmente compreendida, produzem as pirazinas (Imagem 12). As pirazinas são compostos

aromáticos que aumentam de concentração gradualmente com o decorrer da torrefação, a diminuição do teor de algumas delas nas amêndoas de cacau é coincidente com o início do excesso de torrefação, possivelmente devido a uma volatilização, devido a elevada temperatura (Afoakwa *et al.*, 2008).

Imagem 12 - Composto Pirazina



Fonte: Autora

A torragem das amêndoas, podem ser realizadas nela inteira, fragmentadas (nibs) e, em alguns casos, moídas, chamado também de massa de cupuaçu. Ao se trabalhar com a torra dos nibs, é importante diminuir a intensidade da torrefação, para que seja facilitada a propagação do calor e, como resultado, a diminuição do consumo de energia. Já a massa de cacau, por ter sua estrutura toda homogênea e com uma granulometria bem menor das demais, é muito mais fácil adquirir uma torra homogênea no fim do processo (Lopes, 2000).

Após a fermentação e da secagem as amêndoas são sujeitas a elevadas temperaturas que, juntando com o oxigênio presente no ambiente, ocasiona a oxidação dos compostos fenólicos. Quanto maior for o tempo da torragem, menor será a quantidade final dos compostos bioativos que, conseqüentemente, melhora as características sensoriais, dentre elas o flavor e a textura; intensificará o sabor, aumenta a viscosidade, diminuição da adstringência, por conta dos compostos fenólicos, e o amargor, devido a presença dos alcaloides (dentre eles a theobromina, cafeína e dicetopiperazina) (Zelensky *et al.*, 20013).

No decorrer da torragem acontece a degradação da metade dos aminoácidos, assim como a desnaturação parcial das proteínas e a destruição de grande parte dos açúcares redutores presentes na fermentação. Neste processo, também ocorre a perda de compostos voláteis, englobando as cetonas, aldeídos, furanos, álcoois, pirazinas e ésteres. Dessa forma, a torra diminui a umidade, solta o invólucro fibroso do cotilédone (amêndoa) portanto, o mesmo, torna-se mais escuro (Minifie, 1989).

#### 3.6.5.1 Reação de Maillard

A reação de Maillard (RM), uma das mais importantes e complexas reações que acontecem durante a torração, é também chamada de escurecimento não enzimático. São reações que acontecem entre grupos de carbonila dos açúcares redutores e os grupos amida dos aminoácidos, e acontecem através da formação de compostos intermediários de Amadori e a posterior degradação de Strecker (Imagem13) (Mascarós, 1993).

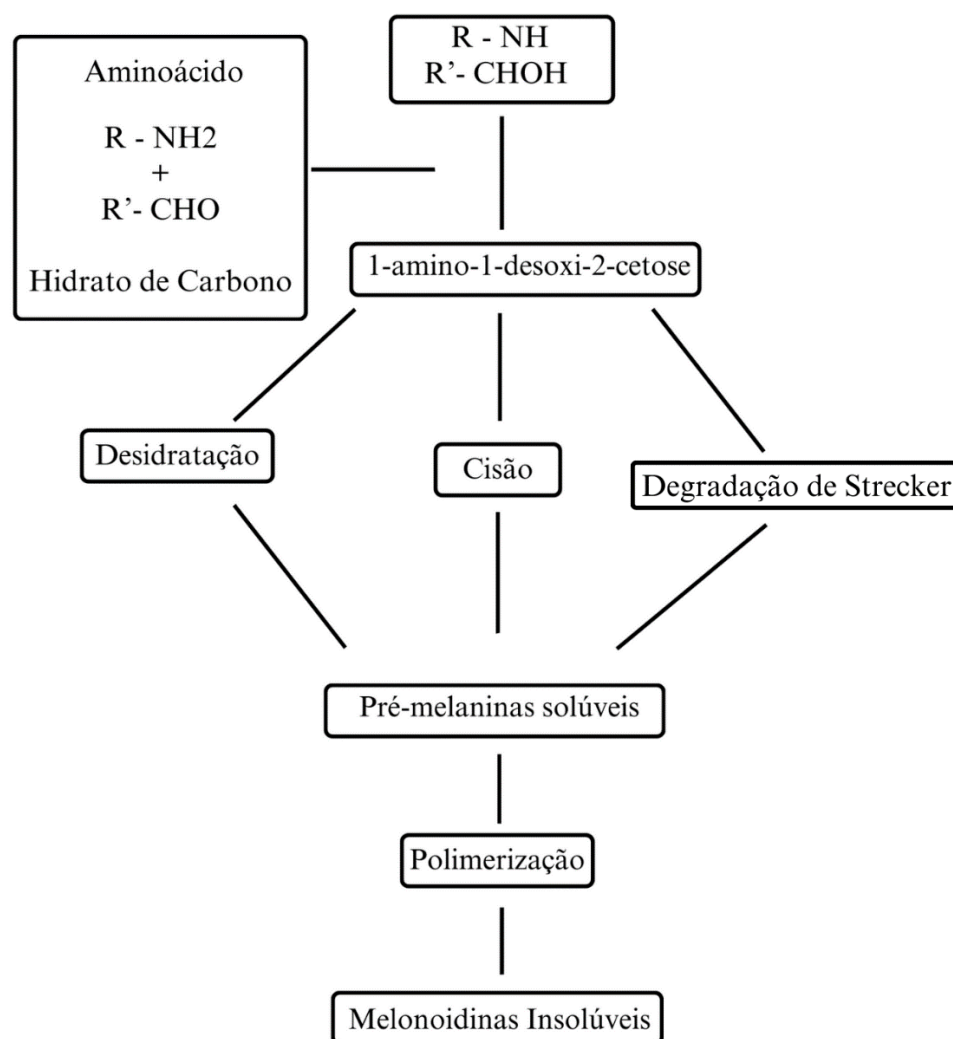
Esta reação não enzimática ocorre com pH variando de 3 a 10, sendo que o pH básico facilita a reação e o ácido tende a dificultar sua reação. A umidade ideal para que aconteça é no intervalo de 7 a 15% (Zamalloa, 1994).

Durante o processo de torra a formação dos compostos de Amadori apresenta um máximo de concentração, por conta da primeira produção e posteriormente um rápido processo de decomposição, formando principalmente aldeídos, cetonas e dicetonas. Entre os aldeídos estão inclusos os compostos heterocíclicos ácidos e terpenos, que são substâncias importantes para o aroma característico. De acordo com Mascarós (1993) o aroma característico do cupulate está relacionado com fenil acetaldeído, terpenos e um número variável de pirazinas.

Uma boa parte dos produtos desta reação, são almejados devido às suas propriedades sensoriais e fisiológicas, sendo que outros podem apresentar, em sua composição, componentes danosos para a saúde do consumidor. Dentre os produtos desejados por suas características sensoriais temos: a Furosina (FUR), o Hidroximetilfurfural (HMF) e a Nε-carboximetilisina (CML); por possuírem precursores de pigmentos escuros que são formados na primeira fase da RM (Bastos *et al.*, 2011).

A RM pode ser dividida em três etapas principais que estão demonstradas na Imagem 13

Imagem 13 – Etapas da Reação de Maillard



Fonte: Autora

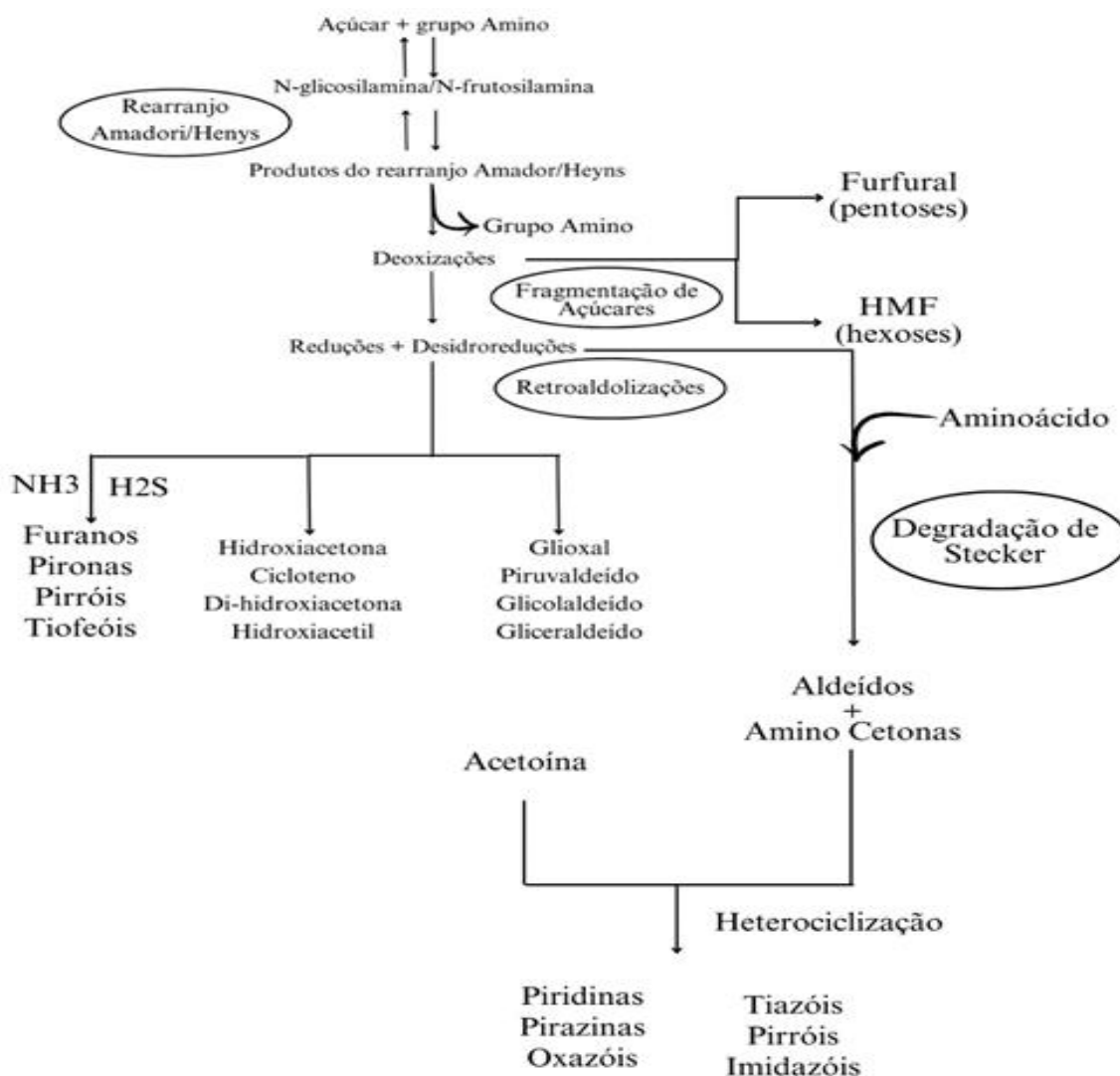
Entre os compostos aromáticos produzidos, em maior quantidade, no decorrer da Reação de Maillard as pirazinas, que são importantes para o sabor característico do produto final (representando até 25% dos componentes identificados na fração aromática das amêndoas torradas) e podem ser considerados como indicadores de qualidade dos produtos torrados (Barel, 1987; Fadini, 1998).

A etapa seguinte da RM se dá a partir dos Produto do Rearranjo de Amadori (PRA) ou Produto do rearranjo de Heyns (PRH), que surgirá produtos oriundos da quebra do açúcar, liberando assim o grupo amino de sua estrutura.

Na etapa final, ocorrem reações de desidratação, fragmentação, ciclização e polimerização em que os grupos amino participam novamente.

Tratando-se da formação do aroma característico, a Degradação de Strecker (DS) (Imagem 14) é de extrema importância, pois é nela que ocorre a degradação dos aminoácidos por desaminação e descarboxilação. Através da imagem, é possível notar que, tratando-se das proteínas e peptídeos o grupo amino reativo é o da lisina e também do grupo N terminal, posto que os grupos  $\alpha$ -amino estão comprometidos, portanto, não estão disponíveis nem para RM nem para a DS, devido a ligação peptídica (Van Boekel, 2006).

Imagem 14 – Visão Geral da RM

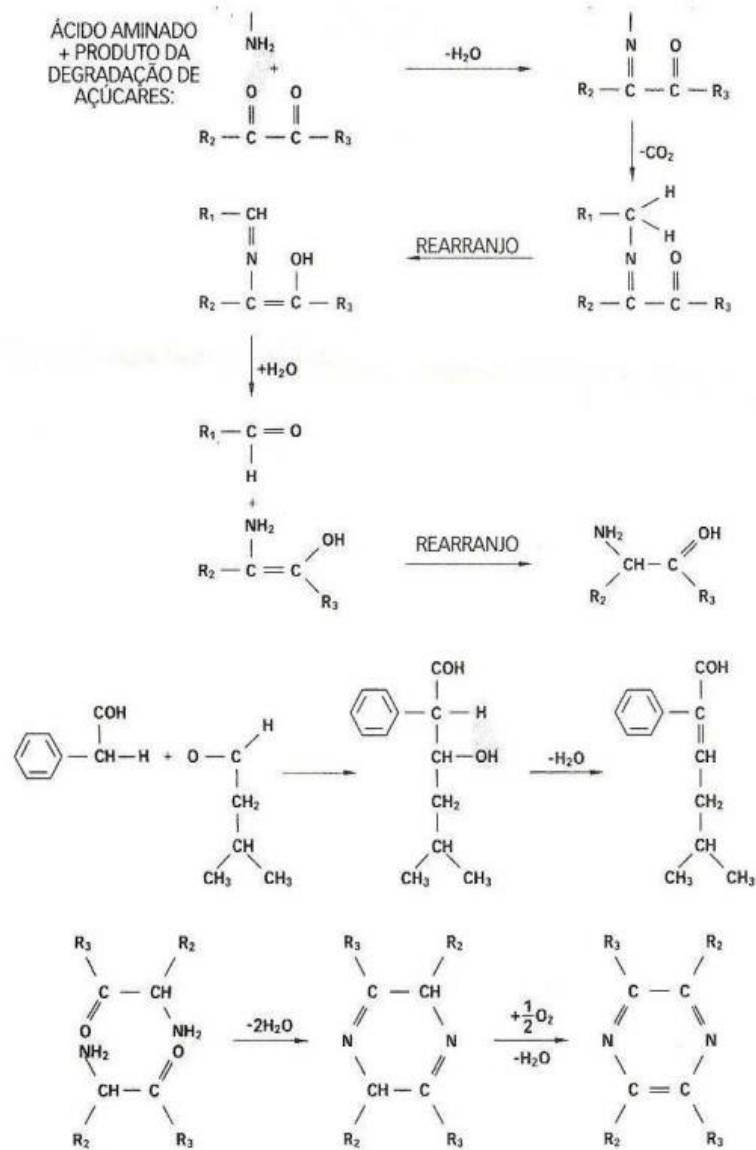


Fonte: Autora

Na Imagem 15 abaixo, pode-se verificar como realmente funciona a formação do aroma característico do chocolate, que é desenvolvido durante a torras das amêndoas já

fermentadas. Os aromas vão surgindo através dos precursores que são criados no decorrer do processo fermentativo por meio de condensação de funções aminas com funções cetonas/hexonas dos açúcares. Os aldeídos podem realizar a reação de condensação, dando origem ao 5-metil-3-fenil-2-hexanal (responsável pelo aroma do chocolate), produzido através da condensação do fenilacetaldeído oriundo da fenilalanina) com o isovaleraldeído (oriundo da leucina). As cetonaminas se condensam para produzir as pirazinas (Pontillon, 2009). A estrutura do aminoácido determina qual o aldeído que será produzido, assim como também, pode ditar qual amina e ácido podem ser gerados da degradação do aminoácido. Cada reação que acontece entre os aldeídos e as aminas, são responsáveis pela diversificação dos aromas encontrados nos chocolates, como pode-se mencionar: a leucina e glicose formam o aroma “doce”; a treonina, glutamina e glicose produzem o aroma do chocolate, apenas quando aquecidas a 100°C; enquanto que a valina e glicose, quando submetidas a uma temperatura de 180°C, produzem aroma descrito como “penetrante”. Quando o meio, onde ocorre tais reações, se encontra em pH ácido são gerados o HMF e outros produtos furfúrais (Dimick & Hoskin, 1999; Counet *et al.*, 2002; Ramli *et al.*; Granvogl *et al.*, 2006).

Imagem 15 – Visão específica da formação do *flavor* de chocolate



Fonte: Van Boekel, 2006

As Alquilpirazinas e os aldeídos gerados pela **DS** são os principais compostos voláteis contribuintes para o aroma de chocolate e alguns deles estão listados na Imagem 16 (Belitz *et al.*, 2004).

Imagem 16 – Compostos voláteis do cacau

| <b>Composto</b>              | <b>Qualidade do odor</b> |
|------------------------------|--------------------------|
| 3-metilbutanal               | Maltado                  |
| etil 2-metilbutanona         | Frutado                  |
| Hexanal                      | Verde                    |
| Desconhecido                 | frutado, ceroso          |
| 2-metoxi-3-isopropilpirazina | Terra                    |
| (E)-2-Octenal                | gorduroso, terra         |
| Desconhecido                 | Sebo                     |
| 2-etil-3,5-dimetilpirazina   | terra, torrado           |
| 2,3-dietil-5-metilpirazina   | terra, torrado           |
| (E)-2-Nonenal                | sebo, verde              |
| Desconhecido                 | pungente, grama          |
| Desconhecido                 | doce, ceroso             |
| Fenilacetaldeído             | mel                      |
| (Z)-4-Heptanal               | biscoito                 |
| $\delta$ -Octenolactona      | doce, coco               |
| $\delta$ -Decalactona        | doce, pêssego            |

Fonte: Adaptado de Belitz *et al.*, 2004

Estas pirazinas são componentes aromáticos heterocíclicos que aumentam de concentração a partir do prosseguimento da torra, sendo que, deve-se ressaltar, que a queda do teor de algumas pirazinas na amêndoa, devido a sua volatilização por conta do aumento da temperatura da torração. Portanto, quando a torra é realizada com a temperatura adequada, a quantidade de pirazinas aumenta, e por consequência há uma qualidade superior no produto final (Pezoa, 1989). Em 1988 aproximadamente 532 compostos aromáticos, foram isolados de amêndoas de cacau torradas, as quais foram identificados pelo menos 79 oriundos de pirazinas (Tabela 1) (SILWAR, 1988).

Juntamente com a reação de Maillard, também são produzidas, por meio de decomposição, outros compostos aromáticos dos quais os mais importantes são os produzidos por meio da termólise de peptídeos, que gera principalmente as dicetopirazinas. O amargor característico de produtos oriundos torrados destaca-se por conta da presença de dioxipirazinas, assim como a teobromina a cafeína (Mascarós, 1993)

Tabela 1 – Compostos Aromáticos Isolados das Amêndoas Torradas de Cacau

| <b>Componentes</b>      | <b>número</b> | <b>Componentes</b>     | <b>número</b> |
|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| 1. Alifáticos           | (194)         | 4. Heterocíclico       | (201)         |
| Hidrocarbonetos         | 10            | Compostos Oxigenados   | (37)          |
| Álcoois                 | 18            | Furanos                | 22            |
| Aldeídos                | 16            | Sulfetos               | 01            |
| Cetonas, di e           | 18            | Lactonas               | 06            |
| hidroxicetonas          |               | Outros                 | 08            |
| Ácidos                  | 35            | Compostos Nitrogenados | (140)         |
| Ésteres                 | 44            | Pirróis                | 14            |
| Éteres, acetaldeídos    | 06            | Pirróis (halogenados)  | 02            |
| Aminas                  | 33            | Piridinas              | 13            |
| Nitrilos                | 01            | Pirazinas              | 79            |
| Compostos de enxofre    | 10            | Ciclopentapirazinas    | 13            |
|                         |               | Quinoxaleinas          | 10            |
|                         |               | Outros                 | 09            |
| 2. Alicíclicos          | (20)          | Thiazóis               | 09            |
| Hidrocarbonetos         | 07            | Oxazóis                | 15            |
| Álcoois                 | 05            |                        |               |
| Cetonas, dicetonas      | 04            |                        |               |
| Ésteres                 | 01            |                        |               |
| Outros                  | 03            | TOTAL                  | 532           |
| 3. Aromáticos           | (93)          |                        |               |
| Hidrocarbonetos         | 32            |                        |               |
| Fenóis                  | 08            |                        |               |
| Álcoois                 | 05            |                        |               |
| Aldeídos                | 05            |                        |               |
| Cetonas                 | 05            |                        |               |
| Ácidos                  | 17            |                        |               |
| Ésteres                 | 13            |                        |               |
| Éteres, acetaldeídos    | 02            |                        |               |
| Compostos de Nitrogênio | 04            |                        |               |
| Compostos de Enxofre    | 02            |                        |               |

Fonte: Adaptado de Silwar (1988)

### 3.6.6 Prensagem e obtenção da torta e manteiga

Tendo obtido o líquido, inicia-se a etapa da prensagem, onde é adquirido, através de uma alta pressão, a manteiga, que é o produto de maior valor agregado numa processadora de cacau, e em conjunto, é obtida a torta, com o teor de gordura reduzido cerca de 12-22% e uma

alta concentração de cacau. Uma vez que é obtida a torta, faz-se necessário que a mesma passe por sucessivas moagens para que suas partículas sejam diminuídas e possam ser utilizadas posteriormente (Minifie, 1999; Ferrão, 2002; Beckett, 2008).

### **3.6.7 Moagem e produção do pó de cupuaçu**

Com a realização da prensagem, as partículas de cacau e a gordura residual tornam-se densamente compactadas na torta e usualmente são submetidas a uma etapa de quebra antes de serem reduzidas a pó em moinhos (Minifie, 1999).

Uma parte do pó de cacau é flavorizada com baunilha, canela e outros condimentos, e é destinada à produção de bebidas achocolatadas, produtos de confeitaria e achocolatados (Minifie, 1999; Beckett, 2008).

### **3.6.8 Alcalinização**

Este processo foi desenvolvido na Holanda em 1828, e primordialmente foi usada com o intuito de mudar a tonalidade e aumentar a solubilidade do pó do cacau em soluções aquosas, além de influenciar no aroma característico (Minifie, 1999; Beckett, 2008).

A alcalinização consiste no tratamento das amêndoas (em desuso), nibs, líquido ou pó de cacau com soluções básicas ou suspensões básicas. Usualmente são usados carbonatos de sódio ou potássio, usualmente na proporção máxima de 2,5 a 3 equivalente álcali por 100 parte do cacau. Com adição dessas soluções básicas, ocorre a elevação do pH, que para a maior parte das amêndoas fermentadas varia de 5,2 a 5,6, para um valor de 6,8 a 7,5 (no caso do pó de cacau preto, pode chegar até 8,5, sendo este utilizado como corante) (Minifie, 1999).

Nos estudos de Dimick & Hoskin (1999), verificaram que os nibs de cacau da Malásia e do Brasil são caracterizados por alta acidez e pouco aroma de chocolate, limitando o desenvolvimento de possíveis atributos de aroma no processamento. As melhoras na qualidade dos nibs e do líquido, podem ser adquiridas com tratamentos realizados por soluções básicas, e com a adição destas soluções para a diminuição da acidez, adquiriu-se uma intensificação no aroma do cacau (Sharif, 1997).

As tortas podem ser divididas de acordo com o teor de gordura ou grau de alcalinidade e podem ser misturados antes da polvilhação, processo que normaliza o tamanho do grão do pó e depois esfria porque a manteiga ainda presente no pó cristaliza de forma estável, evitando possíveis descolorações (Souza, 2017).

### 3.7 PROCESSAMENTO DO CUPULATE

De acordo com a Resolução nº 264, de 22 de setembro de 2005, classifica-se como chocolate o produto elaborado a partir de derivados de cacau, massa, pó e/ou manteiga com outras misturas, que deve conter no mínimo 25% (g/100 g) de sólidos totais de cacau. Portanto, esta etapa da fabricação do chocolate segue as etapas de mistura dos ingredientes, descascamento, conchagem, têmpera, moldagem, resfriamento e modelagem (Nogueira, 2015).

O cupulate é o principal produto a ser produzido após a obtenção do líquido. O cupulate pode ser definido como um produto homogêneo, adquirido através da junção de produtos oriundo do cupuaçu, sendo que eles podem ou não serem misturados entre si ou com a junção de leite e derivados, açúcares/edulcorantes, assim como também outros aditivos e agentes flavorizantes. A produção do cupulate, por meio do método convencional, é constituído de 6 etapas básicas como a mistura, conchagem, temperagem, moldagem e resfriamento (Codex alimentarius, 2003)

A proporção dos ingredientes varia de acordo com a legislação do país e preferências do consumidor, sendo os ingredientes base para a produção de chocolate, açúcar, manteiga de cacau, cacau em pó, leite em pó, lecitina de soja (Richter; Lannes, 2007). A mistura é a etapa que responsável pela homogeneização os ingredientes sólidos e líquidos, normalmente em tachos aquecidos a 40°C, para facilitar na mistura com a manteiga (Luccas, 2001).

O processo de refino, corresponde a diminuição do tamanho das partículas da massa, em que é submetida a ação mecânica de forças de atrito por rolos, a fim de obter uma textura mais suave, também é responsável pelo comportamento de fusão e as propriedades reológicas do cupulate. O procedimento seguinte, nomeado de conchagem, consiste em mexer constantemente a massa, o que contribui para a formação da textura desejada, o que também influencia no sabor final (Martins, 2007). O tamanho das partículas obtidas através deste processo não deve ser maior do que a 25, para que o consumidor não sinta uma “arenosidade” ao consumir o cupulate (Cohen *et al.*, 2004).

Por intermédio da conchagem as partículas sólidas, como açúcar e os nibs, são envolvidas com gordura, separadas pelo atrito tornam-se arredondadas, auxiliando no revestimento das partículas sólidas pela gordura ocasionando a uma diminuição da umidade, volatilizando os ácidos graxos e aldeídos (sendo esta diminuição cerca de 50%), a variação da cor à emulsificação e oxidação de taninos (Efraim, 2009; Frisse, 1985). Esta etapa tem por

duração média de 6-96 horas, com temperatura podendo variar entre 40-80°C (se for utilizado uma temperatura maior pode-se causar uma desnaturação das proteínas do leite e, por consequência, um empelotamento na massa, intensificando a RM, gerando um aroma de queimado). Quanto maior o tempo usado nesta etapa, melhor será a qualidade do produto final. Através da conchagem ocorre a melhora as propriedades físicas do fluido, diminuindo o coeficiente de viscosidade plástica de Casson, assim como ao acrescentar o emulsificante lecitina de soja (Cohen & Jackix, 2009).

Der modo similar a produção do chocolate de cacau, os componentes das amêndoas de cupuaçu, e os ácidos e açúcares que a envolvem, passam por um trabalho metabólico microbiano. A fermentação, somada com o forneamento e os outros processos, gera alterações físico-químicas (Nazaré, 1990). Almeja-se, portanto, que essa etapa interfira na composição dos bioativos do cupuaçu.

A temperagem tem por finalidade formar cristais de gordura, que são importantes para a solidificação e brilho do produto final, por meio do aumento da temperatura seguido de resfriamento da massa, de forma controlada (Martins, 2007). Inicia-se por meio de uma fusão completa e controlada da manteiga que, através de um tratamento térmico (40-45°C) e mecânico, gera uma quantidade específica de cristais uma forma mais estável; seguido de um resfriamento de 20-29°C, sob agitação, para que ocorra a cristalização da gordura; com posterior aquecimento (32°C), para derreter os cristais instáveis, mas ainda formando outros estáveis (Pirouzian *et al*, 2020; Corzzini, 2017; Quast *et al.*, 2007; Embrapa, 2003).

Por fim o chocolate é envolto por uma folha de alumínio para que seja protegido da luz, umidade e odores externos, prevenindo assim a volatilização prematuras de certas componentes aromáticos.

### 3.8 COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO PROCESSO FERMENTATIVO

De acordo com os estudos de Cros *et al.* (1982), os principais compostos fenólicos são as leucocianidinas, catequinas e antocianinas, que representam respectivamente 58%, 37% e 4% do total. Durante o processo fermentativo, esses compostos fenólicos, que estão presentes nas células de pigmentos dos cotilédones da amêndoa, se difundem através do líquido celular, passam por um processo de oxidação seguido de sua condensação em moléculas de elevado peso molecular, como por exemplo taninos (HANSEN *et al.*, 1998).

Tais compostos estão associados com o sabor característico de chocolate; entretanto é necessário que sejam liberados das suas células armazenadoras durante a fermentação. Caso isso não ocorra, o produto final não possuirá seu sabor característico (Rohan, 1964).

Alguns dos aminoácidos que são produzidos da hidrólise proteolítica no decorrer da fermentação, complexam-se com constituintes fenólicos, como as quinonas por exemplo. Essa complexação diminui o sabor desagradável e a adstringência do cacau, oriundos da inalteração das proteínas que são submetidas a temperaturas elevadas na etapa da torra (Forysth *et al.*, 1958).

Existe uma redução na quantidade de compostos fenólicos durante a fermentação que, de acordo com os estudos de Cros *et al.* (1982) a quantidade inicial é diminuída em cerca de 70% após oito dias de processo fermentativo.

Yoshiyama & Ito (1996), estudaram a variação dos compostos fenólicos das amêndoas que foram pouco fermentadas, e que foram submetidas ao aquecimento por autoclavagem (120°C/10 minutos), seguida de torra (120°C/20 minutos); e puderam concluir que os compostos permaneceram presentes em 84%. Essa diminuição é devida às elevadas temperaturas que as amêndoas são colocadas, na presença de oxigênio, aumentando portanto a oxidação dos polifenóis.

### 3.9 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Todos os seres vivos possuem atividade metabólica, o metabolismo é o conjunto das reações químicas que acontecem no interior da célula. Tratando-se das células vegetais, o seu metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário (Vainstein *et al.*, 2001). Compreende-se por metabolismo primário, um conjunto de reações/processos metabólicos que tem função principal no vegetal, como a fotossíntese, a respiração celular e o transporte de solutos. Dentre os compostos envolvidos no metabolismo primário das plantas, que possuem distribuição universal são, os aminoácidos, lipídios, nucleotídeos, carboidratos e da clorofila. Já, por outro lado, o metabolismo secundário gera compostos que não possuem uma distribuição universal, pois estes não são necessários para todas as plantas (Vizzotto *et al.*, 2010).

Existem 3 grandes grupos metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico; os terpenos são gerados a partir do ácido mevalônico (localizado no citoplasma da

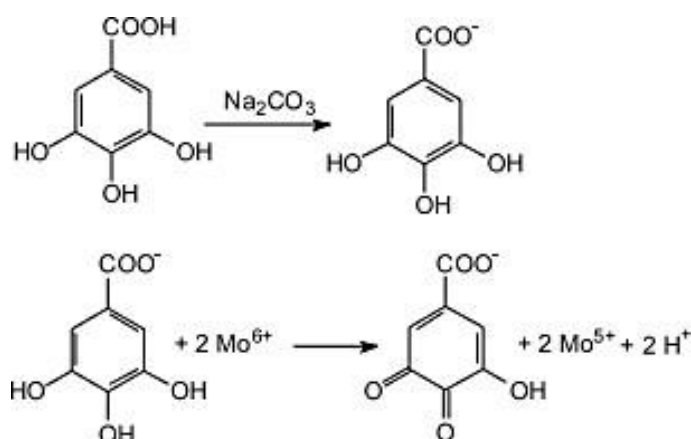
célula) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto); e os alcaloides, que são oriundos de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e, também, de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (Vizzotto *et al.*, 2010).

É existente uma quantidade enorme de metabólitos secundários que podem ser tóxicos ou benéficos para a saúde do consumidor; como os flavonoides que auxiliam na prevenção e atenuação de doenças (Sanbongi *et al.*, 1998; Wollgast & Anklan, 2000; Vinson *et al.*, 2006; Sies *et al.*, 2005; Grassi *et al.*, 2005; Heiss *et al.*, 2007), sendo que grande parte dos benefícios adquiridos ao consumirem derivados do cacau é devido a proantocianidinas (Wollgast & Anklan 2000; Steinberg *et al.*, 2003); flavonóis, compostos de pigmento amarelo claro (Bobbio & Bobbio, 1995), tem sido relacionado com a inibição de cânceres, conformes os estudos de Pimentel *et al.* (2005); antocianinas, encontrados em frutas escuras, possuem um papel importante na prevenção de algumas doenças devido seu potencial antioxidante (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Kuskoski *et al.*, 2004; Downham *et al.*, 2000); alcaloides, podem provocar distúrbios neuropsíquicos como a escopolamina e a hisoscina (Bevilaqua *et al.*, 2007). Diante disto, faz-se necessário realizar estudos visando a verificação da presença ou ausência dos metabólitos secundários presentes nos alimentos que serão consumidos.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A quantificação espectrofotométrica dos compostos fenólicos totais é realizada por meio de uma variedade de metodologias, entretanto, a que mais se é utilizada é a que faz uso do reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965). Este reagente é formado por misturas dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, onde o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+, todavia, dependendo dos agentes redutores presentes no meio, como ao compostos fenólicos, produzem-se o molibdênio azul e o tungstênio azul, identificados por espectrometria em comprimento de onda de 720 a 760 nm, onde a média do seu estado de oxidação dos metais se encontra no intervalo de 5-6, cuja a sua cor possibilita a determinação da concentração das substâncias redutoras, que podem ou não serem compostos fenólicos (Sousa *et al.*, 2007; Bonoli *et al.*, 2004; Damiani *et al.*, 2014).

Figura 16 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

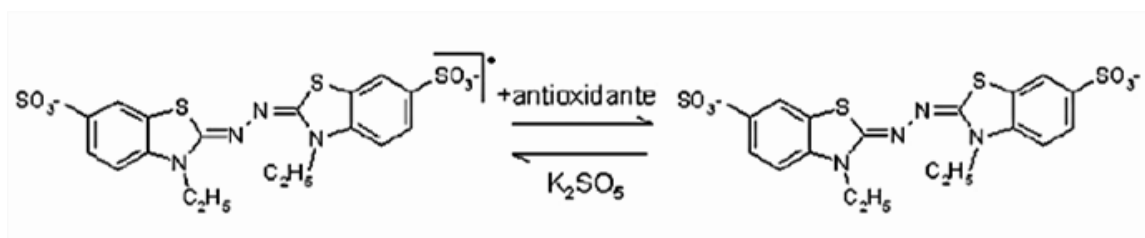


Fonte: Oliveira *et al* (2009).

Certos indicativos epidemiológicos, mostram que há uma crescente procura dos consumidores para produtos que contenham quantidades significativas de antioxidantes, em vista disso, houve também um aumento do número de metodologias para determinar a capacidade antioxidante destes alimentos, que podemos citar, entre os principais: FRAP (que baseia-se na redução do íons de ferro), DPPH (baseado na captura do radical orgânico) e o ABTS (Frankel & Meyer, 2000; Aruoma, 2003; Pérez-Jiménez & Sauracalixto, 2006).

A metodologia utilizando como radical o ABTS, pode ser usada tanto para extratos hidrofílicos quanto para extratos lipofílicos e a forma como seus resultados são expressos são em TEAC (atividade antioxidante total equivalente ao trolox), facilitando assim a comparação com outros estudos. Este radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico) pode ser formado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática; onde normalmente se usa o persulfato de potássio quando realizada. O radical que é formado, é cromóforo, estável e com uma alta solubilidade em água e um máximo de absorvância de 414nm, com leituras secundárias em 645nm, 734nm e 815nm (Miller et al., 1993; Rufino, 2007).

Figura 17 - Estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante.



Fonte: RUFINO *et al* (1999).

### 3.11 TESTE DE CORTE

O teste de corte é um forte indicativo da qualidade interna das amêndoas fermentadas, secas e torradas (Icco, 2011; Brasil, 2008). Esta verificação se dá por meio de um corte longitudinal que nos dá um indicativo da presença e ausência de compostos fenólicos na amêndoa (Efraim *et al.*, 2010), por exemplo os cotilédones das amêndoas do cacau Forasteiro possuem coloração violeta, indicando assim a presença de compostos fenólicos, e, no decorrer do processo fermentativo, acontece uma difusão dos conteúdos celulares permitindo assim reações bioquímicas que, por consequência, mudam a coloração para marrom e a há a formação de sulcos (depressão linear encontrada no interior dos cotilédones) (Brito, 2000; Efraim *et al.*, 2011).

De acordo com a Instrução Normativa nº38, de 23 de junho de 2008, do MAPA, as amêndoas devem estar limpas, secas, verificar seus requisitos de qualidade, amostragem, apresentação. Para a amêndoas do Tipo 1 e 2, a umidade pode se encontrar em até 8% e para os Tipo 3, até 9% (Brasil, 2008).

## 4.MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETAS DO CUPUAÇU

As amostras foram adquiridas, no Mercado do Ver-O-Peso, e levadas para o Centro de Ciências Naturais e Tecnologia (CCNT) da Universidade do Estado do Pará (UEPA) para dar início ao processo de beneficiamento do cupuaçu.

## 4.2 HIGIENIZAÇÃO

Após a coleta, foi realizada uma pré-seleção, descartando os frutos com injúrias, para poder dar início à limpeza, feita manualmente com água corrente, no Laboratório de Química do CCNT/UEPA.

## 4.3 DESPOLPAMENTO

Terminada a limpeza dos frutos, eles foram despolpados, com o auxílio de uma faca de aço inoxidável, manualmente com cuidado para que não ocorresse nenhuma contaminação e nem a quebra da amêndoa.

## 4.4 FERMENTAÇÃO DAS AMÊNDIAS DO CUPUAÇU SEM ADIÇÃO DE POLPAS DE FRUTAS (FERMENTAÇÃO CONTROLE)

Cerca de 2Kg de amêndoas do cupuaçu, após despolpamento manual, foram acondicionadas para fermentar (com 300g da polpa do cupuaçu), em um cocho de madeira (30 x 30 x 40 cm), com furos na parte de baixo, com o intuito de separar o exsudado, e recoberto com folhas de bananeira, para auxiliar na temperatura. Imagens 18, e 19.

Imagem 18 – Cocho Fermentativo Revestido de folhas de Bananeira sem Amêndoas



Fonte: Autora

Imagem 19 – Cocho com massa fermentativa recoberta por folhas de bananeira



Fonte: Autora

A cada 24 horas, massa fermentativa passou por um processo de homogeneização, com o auxílio de uma colher de madeira; após completar toda a fermentação, o mosto fermentativo foi retirado para iniciar a produção do cupulate em barra.

#### 4.5 FERMENTAÇÃO DAS AMÊNDOAS DO CUPUAÇU COM ADIÇÃO DAS POLPAS DE AÇAÍ E PINHA

A segunda fermentação foi realizada da mesma maneira que a fermentação controle, diferenciando-se apenas na adição das polpas das frutas: pinha (Imagem 20), cupuaçu (Imagem 21), açaí (Imagem 22) (totalizando 300g de polpa na massa fermentativa, sendo 100g para cada fruta). Na imagem 23 mostra a massa fermentativa com as folhas de Bananeira.

Imagem 20 – 100g de Pinha



Fonte: Autora

Imagem 21 – 100g de Cupuaçu



Fonte: Autora

Imagem 22 – 100g de Açaí



Fonte: Autora

Imagem 23 – Mistura das 3 Polpas de Fruta



Fonte: Autora

Imagem 24 – Massa Fermentativa revestida com as Folhas de Bananeira



Fonte: Autora

#### 4.6 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO

O acompanhamento físico-químico do processo fermentativo das sementes foi realizado diariamente, no Laboratório de Química e no Laboratório de Alimentos da UEPA, pelas determinações de temperatura, acidez, °Brix e pH do material (AOAC, 2011), teste de corte e controle fitoquímico. Sendo que todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da análise fitoquímico.

##### 4.6.1 Temperatura

As tomadas de temperatura das amêndoas durante o processo fermentativo foram realizadas com o auxílio de um termômetro.

##### 4.6.2 Acidez e pH

Para determinação da acidez, foram pesadas três vezes cerca de 2g de amêndoas, seguidas de agitação, com 20 mL de água destilada. Do extrato obtido, foi retirado 10 mL para ser titulado com o NaOH a 0,1M. Desse mesmo extrato, foi realizada a leitura do pH, através do pHmetro (MS TECNOPON- mPA210).

##### 4.6.3 °Brix (Sólidos Solúveis)

A determinação do teor de sólidos solúveis foi realizada através da leitura no refratômetro de mão, com escala de 0 a 45°C, conforme o Instituto Adolf Lutz (2017).

#### **4.6.4 Teste de Corte**

A análise de teste de corte foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 38 de 23 de junho de 2008 (MAPA), onde amêndoas foram cortadas transversalmente para a avaliação da coloração (marrom, intermediária e violeta) e se havia a compartimentação dos cotilédones (sucos formados durante a fermentação).

### **4.7 ANÁLISES DAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS**

#### **4.7.1 Preparo do Extrato Bruto**

A metodologia usada para o preparo da amostra foi baseada em Summa et al. (2006), e para a extração usando metanol como solvente baseou-se em Jonfia-Essien et al. (2008).

A extração foi feita em triplicata homogeneizando-se cerca de 0,5g de amostra desengordurada, pelos dois métodos mencionados anteriormente (soxhlet e a frio), com mais 20mL de metal/água na proporção de 80:20, com o auxílio de um agitador magnético por 30 minutos. Seguido a este processo, este conteúdo foi filtrado a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos âmbar, para as posteriores análises (Compostos fenólicos, fitoquímica e capacidade antioxidante).

#### **4.7.2 Analise Fitoquímico**

Todas as análises fitoquímicas seguiram o procedimento de Matos (1998), com o intuito de verificar a presença de compostos bioativos na amêndoa como: fenóis, taninos pirogálicos, taninos flobafênicos, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavonóis, leuco antonocianidinas, catequinas, flavanonas e flavononóis.

Para tais estudos foram analisadas amostras secas e torradas da amêndoa do cacau em quatro diferentes solventes (Etanol 80%, Metanol 80%, Água, Acetona 70% e Hexano) e a análise da eficiência dos extratos foram avaliados a partir da intensidade de sua coloração.

#### **4.7.3 Compostos Fenólicos**

Foi determinado através do método proposto por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé et al. (2005), realizado em espectrofotômetro numa absorvância de 760nm, utilizando como solução extratora acetona/água 70:30, carbonato de sódio 7,5% e o reagente de Folin-Ciocalteu.

Em seguida, foi realizada uma curva padrão de ácido gálico, elaborada com as concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L. Posteriormente, foram lidas as absorvâncias à 760nm no espectrofotômetro, utilizando cubetas de plástico, o conteúdo de compostos fenólicos totais, portanto, foi calculado utilizando a equação linear, baseada na curva padrão de calibração, onde o eixo Y equivale a absorvância, e o eixo X a concentração de ácido gálico (mg/L) e seu resultado foi expresso em mg equivalentes de ácido gálico/100g de amostra.

#### **4.7.4 Análise da Capacidade Antioxidante**

O extrato que foi usado para a análise foi o mesmo das determinações anteriores. A análise quantitativa para a capacidade antioxidante foi feita seguindo o método proposto por Ruffino et al. (1999). A curva de calibração feita com o padrão Trolox com concentrações de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 mg/L, sendo que os resultados são interpolados na curva de calibração e expressos em atividade antioxidante em  $\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$  (RUFFINO *et al*, 2007a).

Posteriormente, foram realizadas quatro diluições (20%, 40%, 60%, 80% e 100%) a partir do extrato, as quais serão analisadas em triplicata. Logo em seguida foi feita a leitura no espectrofotômetro.

#### **4.7.5 Determinação de HMF**

Os preparos dos reagentes usados na análise, foram seguidos pelo método de Zenebon *et al.* (2005),

Foram preparadas de início três soluções sendo elas: Carrer I, composta por 15g de ferrocianeto de potássio; já a Carrer II, é feita com 30g de acetato de zinco; e por ultimo, foi feita uma solução padrão de Bissulfito 0,2%.

Foram pesadas, para a análise cerca de 0,5g de cada amostra com gordura e desengordurada, totalizando 8 amostras de cada processo fermentativo. Esta amostra foi diluída com o auxílio de água destilada, e colocada num balão volumétrico de 50mL, antes de aferi-lo foram adicionados 0,5mL de Carrer I e mais 0,5 mL de Carrer II. Tendo aferido o balão, foi agitado e deixado em repouso.

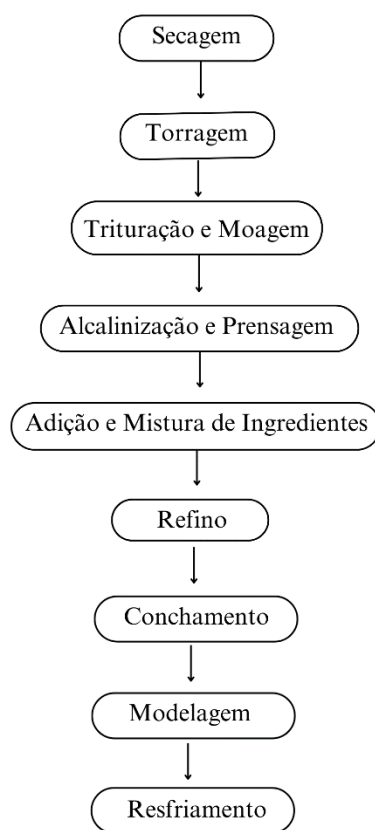
Em seguida, o que estava no balão foi filtrado a vácuo, e o filtrado foi usado para a leitura no espectrofotômetro nas 284nm e 336nm, cujas as absorvâncias adquiridas foram utilizadas na fórmula abaixo.

$$HMF = \frac{(284nm - 336nm) \times 149,7 \times 5}{P_A}$$

#### 4.8 PREPARO DO CUPULATE EM TABLETES

Os seguintes processos, exemplificados no fluxograma 1 abaixo, foram realizados nos Laboratórios de Alimentos e Química da Universidade do Estado do Pará, no Centro de Ciências Naturais e Tecnologia, Campus V.

Fluxograma 1 – Etapas de Elaboração do Cupulate em Tabletes



Fonte: Autora

##### 4.8.1 Secagem

As amêndoas do cupuaçu, depois de fermentadas, foram secadas artificialmente até atingir, no máximo, 6% de umidade residual, que foi aferida por uma balança infravermelho.

#### 4.8.2 Torragem

Após estarem secas, as amêndoas foram torradas durante cerca de 120-150°C/5-20 minutos, com o auxílio de assadeiras em um forno industrial. Durante esse processo, as amêndoas foram constantemente agitadas para que a torração ocorresse de maneira uniforme. As condições de tempo e temperatura foram baseadas na metodologia de Voigt *et al.* (1994).

#### 4.8.3 Trituração E Moagem

Posterior ao processo de torragem, essas amêndoas, já previamente descascadas, passaram por um processo de trituração, através de um multiprocessador. Em seguida, essas partículas foram moídas por moedor de grãos, até formar a massa do líquido.

#### 4.8.4 Alcalinização e Prensagem do Líquor

Foi adicionada, ao licor do cupuaçu, uma solução alcalina (NaOH 0,1M) para que fosse atingido um pH próximo ao neutro. Em seguida, esse líquido passou por uma prensagem em temperatura de 60°C, para que a manteiga fosse separada da torta de cupuaçu.

#### 4.8.5 Adição e Mistura dos Ingredientes

Nesta etapa, todos os ingredientes foram homogeneizados (40°C) em pó com os líquidos e semi-líquidos até adquirir-se uma massa adequada para o processo do refino. A quantidade dos ingredientes variou de acordo com o cupulate em questão, como mostra na Tabela abaixo.

Tabela 2 – Quantidade dos Ingredientes de cada Formulação

| Formulação do Cupulate em Barra |                   |       |              |          |
|---------------------------------|-------------------|-------|--------------|----------|
|                                 | Cupulate Ao Leite |       | Cupulate 50% |          |
|                                 | %                 | g     | %            | g        |
| Manteiga                        | 6,5               | 34,1  | 9            | 42,5892  |
| Leite                           | 38                | 199,6 | 23,5         | 219,4664 |
| Açúcar                          | 24                | 126,1 | 11           | 58,3     |
| Lecitina                        | 0,4               | 2,1   | 0,4          | 2,3555   |
| Baunilha                        | 0,1               | 0,5   | 0,1          | 0,58889  |
| Amêndoa                         | 31                | 162,8 | 56           | 265      |
| TOTAL                           | 100               | 525,2 | 100          | 588,3    |

Fonte: Autora

#### **4.8.6 Refinamento**

No processo do refino a massa passou novamente pelo moedor de grãos, com o intuito de melhor formação da massa para evitar a sua aeração.

#### **4.8.7 Conchamento**

Neste processo a massa, já refinada, recebeu uma nova quantidade de manteiga de cupuaçu, seguida de agitação com constante aquecimento (até 60°C), resultando numa massa líquida e cremosa com textura e brilho, semelhantes ao do chocolate.

#### **4.8.8 Modelagem e Resfriamento**

Terminado o conchamento, a massa, ainda aquecida a 60°C, foi acondicionada nos moldes para que o cupulate obtivesse o formato desejado.

As fôrmas foram colocadas para resfriar em temperatura controlada entre 12-15°C, para facilitar a liberação do produto dos moldes. Tendo terminado este processo, o cupulate foi estocado sob temperatura de 20°C.

### **4.9 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NO CUPULATE**

As seguintes determinações foram realizadas nos Laboratórios de Alimentos e Química da Universidade do Estado do Pará, no Centro de Ciências Naturais e Tecnologia, Campus V.

#### **4.9.1 Determinação de pH**

A análise foi realizada na proporção 1:1, onde a cada 1g de amostra foi diluída e homogeneizada com 10mL de água destilada. Posteriormente, após diluído, o pH foi determinado com o auxílio do Phmetro previamente calibrado.

#### **4.9.2 Determinação de Acidez**

Foi realizada, em triplicata, pelo método de titulação utilizando solução de hidróxido de sódio 0,1 M conforme metodologia descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008) e AOAC (1995), as quais foram expressas em meq NaOH n/g.

Foram pesadas cerca de 2g de amostra, misturadas com 20mL de água destilada previamente aquecida a uma temperatura inferior a 60°C, para que não ocorresse uma possível

caramelização da amostra, com o intuito de facilitar a homogeneização. Posteriormente este conteúdo foi usado para fazer a titulometria com NaOH 0,1M. O método usado na titulação foi o da potenciometria, onde se é verificado quando de mL de NaOH 0,1M são gastos até chegar num pH de 8,03.

#### **4.9.3 Determinação de Umidade**

Foram pesadas, em triplicata, 3g da amostra em uma balança analítica, numa cápsula de porcelana, previamente tarada e tratada. Em seguida, a cápsula foi levada à estufa, com circulação forçada de ar, à 65°C, até peso constante. Após ser retirada da estufa, foi acondicionada num dessecador com sílica gel para serem resfriadas.

O percentual de umidade foi calculado de acordo com a metodologia da AOAC (2005), onde é feita pela diferença do peso final em relação ao inicial.

#### **4.9.4 Determinação de Cinzas**

O teor de cinzas foi realizado em triplicata e determinado por incineração em mufla a 550°e finalizada com as cinzas apresentando cor branca (Lutz, 2008).

O peso final foi registrado; a quantidade de cinzas foi calculada pela diferença entre a massa inicial e a final; o percentual se deu pela razão desta diferença com o pes inicial da amostra, multiplicado por 100 (Lutz, 2008)

#### **4.9.5 Determinação de Lipídios**

##### **4.9.4.1 Extração de Gordura por Soxhlet**

A determinação de lipídios totais foi feita através do método por extração em aparelho Soxhlet com utilização de hexano como solvente (AOAC, 2011).

##### **4.9.4.2 Extração de Gordura A Frio**

Foram pesadas cerca de 3 gramas de amostras (amêndoa torrada, seca, barra de cupulate ao leite e 50%), posteriormente foi adicionado 120mL de solvente (hexano), sendo assim uma proporção de 1:4, seguida de agitação por 60 minutos.

Finalizada a agitação, foi iniciado o processo de filtração à vácuo. O papel de filtro, já previamente pesado, foi aferido com a amostra desengordurada; o solvente, ainda com gordura foi levado para o Soxhlet, onde passou-se por dois processos: separação do solvente e da gordura, e sua purificação.

Tais pesos verificados durante essa extração, foram utilizados para o cálculo final da quantificação de lipídeos de cada amostra.

#### **4.9.6 Determinação de Proteína**

Foi feita pelo método Micro-Kjeldahl, do teor de nitrogênio total de acordo com a metodologia da AOAC (2011), com fator de conversão do nitrogênio para proteína de 6,25.

#### **4.9.7 Determinação de Açúcares Redutores, Não Redutores e Totais**

Foi realizada através de uma adaptação do método de DNS, desenvolvido por Maldonade, Carvalho & Ferreira (2013), que consiste na capacidade do (DNS) ser reduzido pela glicose a composto nitroamino análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalisílico), altamente pigmentado (Imagem 25)

Imagem 25 – Reações envolvidas no método de DNS

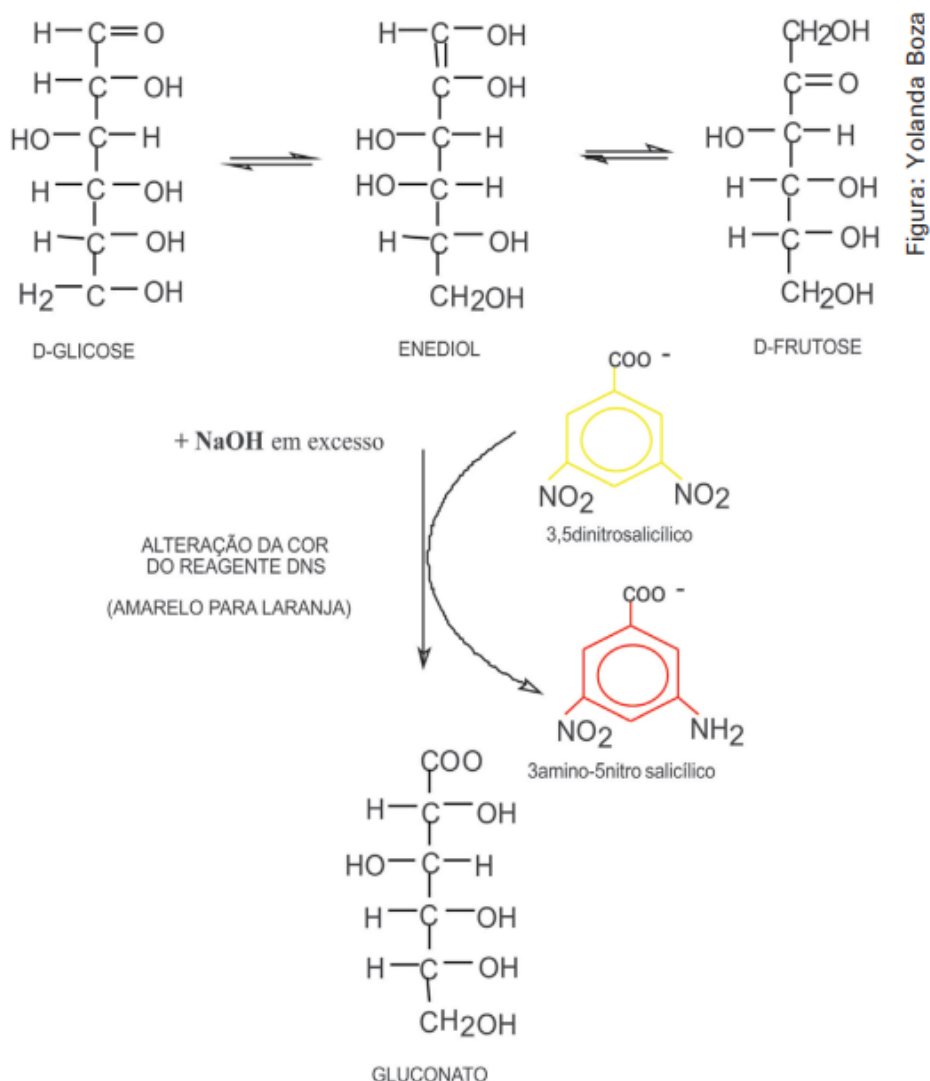


Figura: Yolanda Boza

Fonte: Maldonade, Carvalho & Ferreira (2013)

Foi pesado cerca de 0,5g de cada amostra, que foram diluídas com o auxílio de água destilada, e 0 2mL de HCl 2M em banho maria em ebulição por cerca de 10 minutos. Resfriou-se a amostra com banho de gelo e acrescentou-se, posteriormente, 2mL de NaOH 2M e homogeneizou-se.

Num tubo de ensaio adicionou-se 0,25mL do filtrado (feito para quantificar os redutores e os totais) e 0,25 da solução padrão de DNS, submeteu-se ao aquecimento em água fervente, resfriou-se até temperatura ambiente, adicionou-se 4mL de tartarato de sódio e potássio no mesmo tubo, agitou-se e levou-se para o espectrofotômetro para realizar a leitura em 540nm.

Para a determinação dos açúcares não-redutores basta apenas realizar a diferença entre os resultados obtidos das leituras dos açúcares totais e redutores.

#### **4.9.7 Determinação de Carboidratos**

Será feita, de acordo com Holland et al. (1994) pela diferença entre a umidade, cinzas, proteína e lipídios, por meio da fórmula abaixo.

$$100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídio})$$

#### **4.10 ANÁLISES DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO CUPULATE**

As seguintes análises foram realizadas no Laboratório de Química da Universidade do Estado do Pará, localizado no Centro de Ciências Naturais e Tecnologia-Campus V.

##### **4.10.1 Preparo do Extrato Bruto para as Análises de Compostos Bioativos**

A metodologia que será empregada para o preparo da amostra desengordurada foi baseada em Summa et al. (2006), e para a extração usando metanol como solvente é baseada em Jonfia-Essien et al. (2008).

A extração foi feita em duplicata homogeneizando-se cerca de 0,5g de amostra desengordurada, pelos dois métodos mencionados anteriormente (soxhlet e a frio), com mais 20mL de metal/água na proporção de 80:20, com o auxílio de um agitador magnético por 30 minutos. Seguido a este processo, este conteúdo foi filtrado a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos âmbar.

##### **4.10.2 Teste Fitoquímico**

A metodologia seguida foi a mesma que a usada para as amêndoas secas e torradas. E os resultados foram apenas expressos em positivos e negativos, de acordo com cada reação e a intensidade da coloração apresentada.

##### **4.10.3 Compostos Fenólicos**

Foi determinado pelo método proposto por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé et al. (2005), feita em espectrofotômetro e lendo as absorbâncias a 760nm,

utilizando como solução extratora acetona/água 70:30, carbonato de sódio 7,5% e o reagente de Folin-Ciocalteu.

Por conseguinte, realizou-se uma curva padrão de ácido gálico que foi elaborada com as seguintes concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L. Em seguida foram lidas as absorvâncias à 760nm no espectrofotômetro, utilizando cubetas de plástico, o conteúdo de compostos fenólicos totais, portanto, foi calculado utilizando a equação linear, baseada na curva padrão de calibração, onde o eixo Y equivale a absorvância, e o eixo X a concentração de ácido gálico (mg/L) e seu resultado foi expresso em mg equivalentes de ácido gálico/100g de amostra.

Semelhante ao que foi realizado nas amostras de amêndoa seca e torrada, diferenciando-se apenas na diluição das concentrações dos seus extratos.

#### 4.11 ATIVIDADE ANTIOXIANTE NO CUPULATE

##### 4.11.1 ABTS

AS leituras serão realizadas nas quatro diluições (10%, 30%, 50%, 70% e 100%) a partir do extrato, que serão analisadas, de acordo com Ruffino *et al.* (2007) em triplicata. Logo em seguida foi feita a leitura no espectrofotômetro.

Semelhante ao que foi realizado nas amostras de amêndoa seca e torrada, diferenciando-se apenas na diluição das concentrações dos seus extratos.

#### 4.12 ANÁLISE DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

O preparo dos reagentes foi seguido pelo método de Zenebon *et al.* (2005), que foram explicados na análise realizada nas amêndoas secas e torradas

Foram pesadas, para a análise cerca de 0,5g de cada amostra com gordura e desengordurada, totalizando 8 amostras de cada processo fermentativo. Esta amostra foi diluída com o auxílio de água destilada, e colocada num balão volumétrico de 50mL, antes de aferi-lo foram adicionados 0,5mL de Carrer I e mais 0,5 mL de Carrer II. Tendo aferido o balão, foi agitado e deixado em repouso.

Em seguida, o que estava no balão foi filtrado a vácuo, e o filtrado foi usado para a leitura no espectrofotômetro nas 284nm e 336nm, cujas as absorbâncias adquiridas foram utilizadas na fórmula abaixo.

$$HMF = \frac{(284nm - 336nm) \times 149,7 \times 5}{P_A}$$

Sendo que o fator 149,7 originou-se da razão do peso molecular do HMF (126), absorvividade molecular do HMF a 284nm (16830), conversão de unidade de grama para miligrama (1000), diluição da amostra (10) e conversão de grama para quilograma (100), conforme demonstrado na equação abaixo:

$$Fator = 149,7 = \frac{126}{16830} \times \frac{1000}{10} \times \frac{1000}{5}$$

#### 4.13 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS NO CUPULATE

As análises microbiológicas, de contagem de coliformes totais e fecais, *Salmonella* spp, bolores e leveduras, bactérias mesófilas e *Bacillus cereus*. foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 e com a metodologia de Silva et al. (2017), e os resultados foram comparados com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária pela RDC nº 12 de 2001.

##### 4.13.1 Coliformes Totais e Termotolerantes

###### 4.13.1.1 Teste Presuntivo

Foi realizada pela técnica de tubos múltiplos seguindo a metodologia de Silva et al. (2017). Para a primeira diluição foi homogeneizado 25 g de amostra de Cupulate em barra, com 225 mL de Água Peptonada 0,1 %, esta seria a diluição  $10^{-1}$ . Para a segunda diluição foi transferido 1 ml da diluição  $10^{-1}$  para um tubo contendo diluente, sendo está a diluição  $10^{-2}$ . Para a terceira diluição foi transferido 1 ml da diluição  $10^{-2}$  para um tubo contendo diluente, sendo está a diluição  $10^{-3}$ . Todos os tubos contendo os diluentes continham 9 mL de Água Peptonada 0,1%.

Partindo das diluições preparadas, foi transferido 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo contendo 10 mL de Caldo Lauryl Sulfato Triptose, com tubos de Duhran invertidos, em triplicata. O mesmo se fez com as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Os tubos foram incubados em estufa a 35° C/24-48 horas.

#### 4.13.1.2 Teste Confirmativo

Tendo passado as 48h, os tubos com presença de gás foram reservados, e foram transferidas alçadas com alça de platina de cada cultura de caldo Lauryl para o tubo contendo 10 ml de Caldo Verde Bile Brilhante para coliformes totais, após isso tubos foram incubados a 35°C de 24-48 horas.

Do mesmo modo, os tubos com presença de gás foram reservados, e foram transferidas alçadas com alça de platina de cada cultura de caldo Lauryl para o tubo contendo 10 ml de Caldo *Escherichia coli* para coliformes fecais, após isso tubos foram incubados em banho-maria a 46° de 24-48 horas.

Para a quantificação de coliformes totais e fecais foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP) na tabela de NMP para as diluições inoculadas.

#### 4.14.1 Bolores e Leveduras

Para a primeira diluição foi homogeneizado 25 g de amostra de cupulate, com 225 mL de Água Peptonada 0,1 %, esta seria a diluição  $10^{-1}$ . Para a segunda diluição foi transferido 1 ml da diluição  $10^{-1}$  para um tubo contendo diluente, sendo esta a diluição  $10^{-2}$ . Para a terceira diluição foi transferido 1 ml da diluição  $10^{-2}$  para um tubo contendo diluente, sendo esta a diluição  $10^{-3}$ . Todos os tubos contendo os diluentes continham 9 mL de Água Peptonada 0,1 %.

Posteriormente, foi transferido 0,1 mL de cada diluição para placas previamente preparadas contendo meios de cultura Agar Dextrose de batata (PDA) resfriado e feito o espalhamento com uma alça de Drigaslky estéril cuidadosamente. Após isso, as placas foram invertidas e incubadas a 27°C por 5 dias. Após o período de incubação, as colônias foram contadas em um contador de colônias e realizados os cálculos para unidades formadoras de colônia (UFC/g).

#### 4.14.2 Bactérias Mesófilas

Na primeira diluição foi homogeneizado 25 g de amostra de cupulate em barra, com 225 mL de Água Peptonada 0,1 %, esta seria diluição  $10^{-1}$ . Para a segunda diluição foi transferido 1 ml da diluição  $10^{-1}$  para um tubo contendo diluente, sendo está a diluição  $10^{-2}$ . Para a terceira diluição foi transferido 1 ml da diluição  $10^{-2}$  para um tubo contendo diluente, sendo está a diluição  $10^{-3}$ . Todos os tubos contendo os diluentes continham 9 mL de Água Peptonada 0,1 %.

Depois disso, foi transferido 1 ml de cada diluição em placas de petri previamente

esterilizadas e vazias, e adicionados 15 mL de Agar Padrão para contagem (PCA) previamente fundido e resfriado. Misturou-se o inóculo com o meio em uma superfície plana, movimentado cuidadosamente em movimentos circulares no sentido horário e anti-horário a fim de se ter homogeneidade do inóculo com o meio de cultura.

Feito isso, após a solidificação total do meio nas placas, elas foram invertidas e incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, as colônias foram contadas em um contador de colônias e realizados os cálculos para unidades formadoras de colônia (UFC/g).

#### **4.13.5 *Salmonella* sp**

Primeiramente, foi feito o pré enriquecimento das amostras de cupulate em barra. Pesou-se 25 g de amostra e se homogeneizou com 225 ml de Água Peptonada Tamponada (BPW), e depois foi incubada a 35°C por 24 horas. Terminado esse período de incubação, foi feito o enriquecimento seletivo. Se adicionou 1 ml da cultura pré-enriquecida em tubos contendo 10 ml de meio Caldo Selenito Cistina, assim como também em tubos que continham 10 ml de caldo Tetracionato. Depois disso, os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas.

Posteriormente, nos tubos com Caldo Selenito Cistina e Tetracionato foram feitas alçadas com alça de platina e estriadas em placas contendo meio Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), outras contendo Ágar Bismuto Sulfito (BS), e outras com Ágar Verde Brilhante (BG). As placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas.

Após isso, foram feitas a confirmação preliminar das colônias. Sendo que para cada meio de cultura, as colônias de *Salmonella* se caracterizam de forma distinta: as placas contendo Ágar XLD, as colônias se caracterizam de cor rosa escuro, com o centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente ao redor; já as placas contendo Ágar BS apresentam colônias castanhas, cinzas ou pretas, com ou sem brilho metálico; as placas contendo BG, as colônias se apresentam opacas e róseas, lisas e com bordas rodeadas por halos vermelhos.

Foram selecionadas possíveis colônias típicas de cada placa e retiradas com a alça de platina e incubadas em tubos inclinados contendo Ágar Tríplice de Açúcar Ferro (TSI), outros com Ágar Lisina Ferro (LIA). Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas.

Após esse período, observou-se a possível ocorrência de reação típica positiva ou negativa: em TSI, a superfície avermelhada e o fundo do tubo amarelado, com ou sem escurecimento; enquanto que em LIA, a superfície e o fundo se apresentam roxos com escurecimento

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO DA FERMENTAÇÃO

Nos gráficos 1 e 2 e nas tabelas 2 e 3 estão apresentados os comportamentos das análises de °Brix, pH, Temperatura e % de acidez total, do processo fermentativo I (controle) e II (com adição de polpas de frutas).

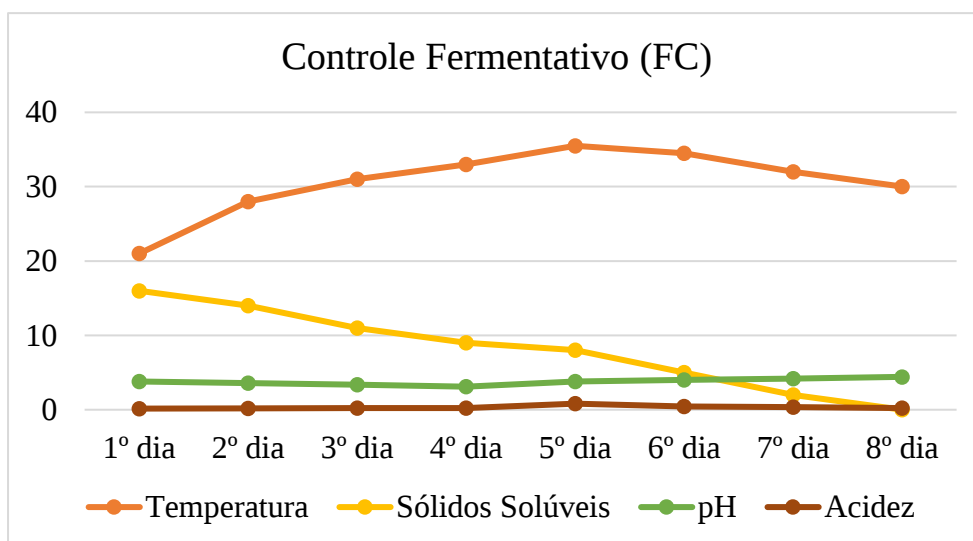
As amêndoas recém-despolpadas iniciaram a fermentação com a temperatura um pouco acima de 21°C (T0) sendo que esta seguiu em constante aumento até o quinto dia, quando ultrapassou a 37°C (T5), entretanto no decorrer dos dias do processo fermentativo esta temperatura foi diminuindo até chegar em 30°C (T7). Tal comportamento do processo fermentativo foram semelhantes aos observados no estudo de Mattietto (2001)

Tabela 3 – Controle Físico-químico da Fermentação Controle (FC)

| Fermentação Controle I |          |         |          |          |           |          |         |         |
|------------------------|----------|---------|----------|----------|-----------|----------|---------|---------|
|                        | 1º dia   | 2º dia  | 3º dia   | 4º dia   | 5º dia    | 6º dia   | 7º dia  | 8º dia  |
| Temperatura            | 21       | 28      | 31       | 33       | 37        | 34,5     | 32      | 30      |
| Sólidos Solúveis       | 16       | 14      | 11       | 9        | 8         | 5        | 2       | 0       |
| pH                     | 3,8±0,1  | 3,6±0,1 | 3,4±0,07 | 3,1±0,09 | 3,8 ± 0,1 | 4±0,07   | 4,2±0,1 | 4,4±0,1 |
| Acidez                 | 0,1±0,09 | 0,2±0,1 | 0,2±0,07 | 0,2±0,06 | 0,8±0,07  | 0,4±0,08 | 0,3±0,1 | 0,2±0,1 |

Fonte: Autora

Gráfico 1 – Controle Físico-químico da Fermentação Controle (FC)



Fonte: Autora

Nos gráficos 1 e 2, pode-se observar a diminuição dos °Brix e um aumento na acidez, sendo assim criando um ambiente adequado para o desenvolvimento de bactérias acéticas e lácticas em um meio aeróbio. Pode-se observar também o aumento da temperatura durante a fermentação e, segundo Lemus *et al.*, 2001 a temperatura é um indicador chave do estado de fermentação, que é gerado por reações hidrólise exotérmica de proteínas e carboidratos efetuada por enzimas proteolíticas e leveduras.

Segundo Thompson *et al.*, 2001 o aumento da temperatura e pela ação exotérmica que as leveduras apresentam no desenvolvimento e, principalmente, pela ação das bactérias acéticas que consomem o etanol e geram calor e CO<sub>2</sub>.

Na fermentação FI (CONTROLE) pode-se observar que o pico da fermentação se deu 5º dia quando a temperatura alcançou 35,5°C e com a diminuição de cerca de 50% dos °Brix e apresentando uma diminuição do pH até o quarto dia.

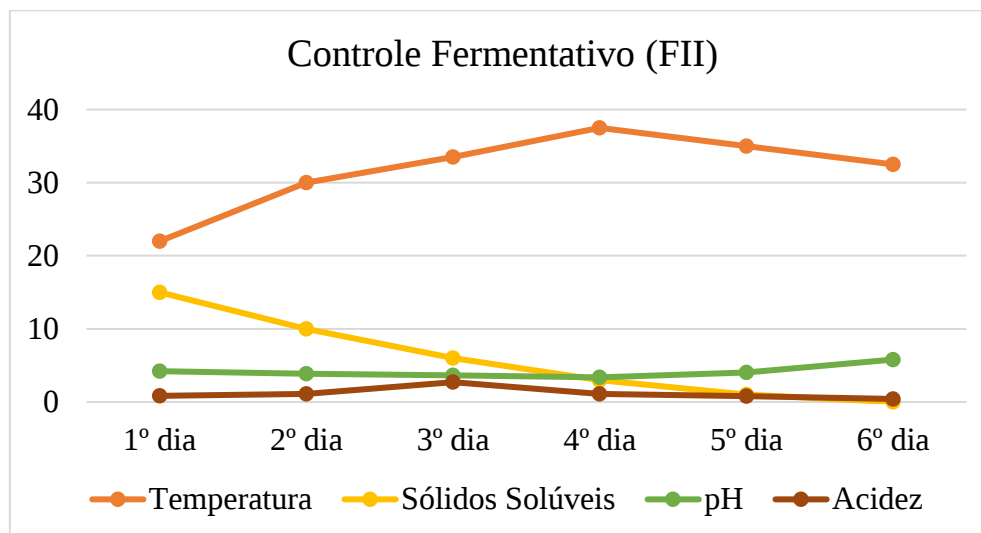
Na fermentação F2, tabela 3 pode-se observar que o pico da fermentação aconteceu o quarto dia 4º quando a temperatura alcançou 37,5°C e com a diminuição do 80% dos °Brix e apresentando uma diminuição do pH até o quarto dia. Pode-se observar que o pH na fermentação I e II tem seu menor valor perto do pico da fermentação o que proporciona condições favoráveis de pH para processo fermentativo.

Tabela 4 – Controle Fisico-quimico da Fermentação Com Adição de Polpa (FII)

| <b>Fermentação Com Adição de Açaí e Pinha</b> |           |             |          |          |            |           |
|-----------------------------------------------|-----------|-------------|----------|----------|------------|-----------|
|                                               | 1º dia    | 2º dia      | 3º dia   | 4º dia   | 5º dia     | 6º dia    |
| Temperatura                                   | 22        | 30          | 33,5     | 37,5     | 35         | 32,5      |
| Sólidos Solúveis                              | 15        | 10          | 6        | 3        | 1          | 0         |
| pH                                            | 4,2±0,1   | 3,85±0,08   | 3,66±0,1 | 3,37±0,1 | 4,06±0,07  | 5,8±0,09  |
| Acidez (meq NaOH n/g)                         | 0,84±0,09 | 1,1059±0,07 | 2,71±0,1 | 1,09±0,1 | 0,814±0,09 | 0,42±0,09 |

Fonte: Autora

Gráfico 2 – Controle Físico-químico da Fermentação Com Adição de Polpas (FII)



Fonte: Autora

Segundo Ferrão, 2008; Kostinek *et al.*, 2008 as bactérias lácticas crescem por volta de 36 horas após o início da fermentação mediante as condições favoráveis de pH proporcionadas pela fase anterior e prevalecem por um curto período de 16 a 24 horas. Este processo é observado também neste trabalho (Tabela 2 e 3)

A adição da polpa de açaí e pinha incrementam o teor de açúcares na fermentação, favorecendo a hidrólise, diminuindo os sólidos solúveis, pH e diminuindo o tempo da fermentação em um dia em relação a fermentação F1(controle) como pode observar-se nas tabelas 3 e 4.

## 5.2 TESTE DE CORTE

Na tabela 5 foram expressos, seguindo os padrões da Instrução Normativa nº38 de 24/06/2008 (Brasil, 2008), a qualidade das amêndoas após passar pelo seu processo fermentativo.

Tabela 5 – Classificação das amêndoas fermentadas e secas

| Amostras | Teste de Corte |         |         |       |
|----------|----------------|---------|---------|-------|
|          | BF* (%)        | PF* (%) | MF* (%) | D (%) |
| FI*      | 75,56          | 15,3    | 8,34    | 0,8   |
| FII*     | 71,28          | 17,47   | 10,24   | 1,01  |

Onde: FI refere-se à fermentação controle; FII trata-se da fermentação com adição de frutas.

BF- Bem fermentadas/ PF- Parcialmente Fermentadas/ MF- Mal Fermentadas/ D- Defeitos

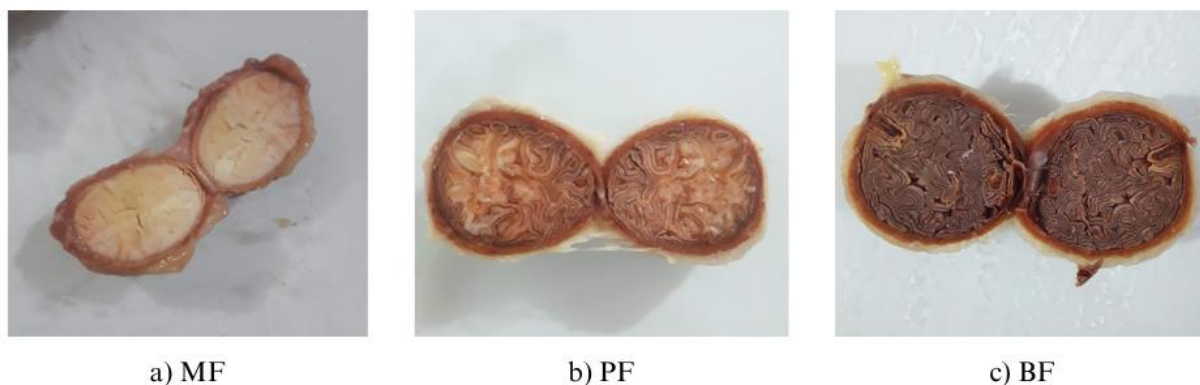
Fonte: Autora

Uma amêndoa de cupuaçu bem fermentada apresenta coloração marrom avermelhado no seu cotilédone, enquanto uma mal fermentada possui marrom claro/ esbranquiçado como sendo a cor da maior parte de sua extensão. Diferente das amêndoas de cacau que iniciam com coloração púrpura e mudam para o marro, no fim do processo fermentativo. Nas imagens 24 e 25 são mostradas as mudanças de coloração do cotilédone das amêndoas no início, durante e no final das fermentações (FC e FII).

Pode-se concluir através desta tabela que nos dois processos fermentativos (FI e FII) foram concluídos com mais de 70% de amêndoas bem fermentadas, sendo que, ao comparar com a quantidade de amêndoas mal fermentadas e/ou que apresentaram defeitos são mínimas. Em ambas as fermentações, as amêndoas fermentadas e secas, apresentaram aspecto externo com e aroma característico, sendo este livre de odores estranhos.

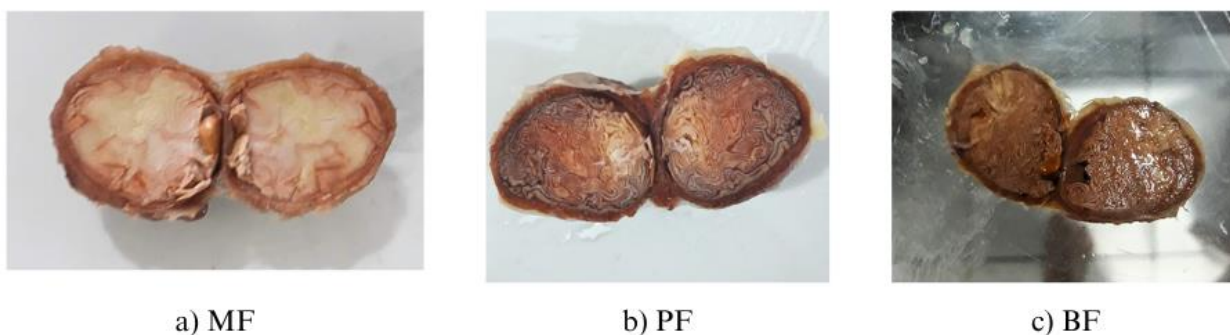
Os responsáveis pela coloração do cotilédone são os polifenóis, contidos nas células polifenólicas, sendo que 60% desses são flavonóis e procianidinas; dentro do cotilédone também se tem outros componentes, como o sistema enzimático que é responsável pelas transformações bioquímicas, de oxidação e complexação, na parte interna da amêndoa (Domingues, 2010; Efraim, 2010).

Imagem 26 – Processo de escurecimento interno da Amêndoa na FC



Fonte: Autora

Imagem 27 – Processo de escurecimento interno da Amêndoa na FII



Fonte: Autora

### 5.3 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS DO CUPULATE EM BARRA

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, o teor de umidade da amostra de cupulate ao leite, em ambas as fermentações, foram inferiores da amostra de cupulate 50%. Pode-se observar também, através da tabela acima que o teor de umidade das amostras, ao leite e 50%, da fermentação com adição de frutas, apresentaram uma maior quantidade do que as amostras da fermentação controle. De acordo com os estudos de Candia e Dias (2014), ao formularem um chocolate com adição de okara, obtiveram resultados semelhantes. Tal aumento de umidade apresentado na segunda fermentação, pode ser devido a quantidade de fibras, presentes nas frutas utilizadas, que contribuem para uma maior retenção de água.

Tabela 6 – Resultados das Análises Físico-Químicas no Cupulate em Barra

|                              | Fermentação Controle |              | Fermentação Com Adição de Polpas |              |
|------------------------------|----------------------|--------------|----------------------------------|--------------|
|                              | 50%                  | Ao Leite     | 50%                              | Ao Leite     |
| Umidade                      | 2,3 ± 0,1            | 1,841 ± 0,02 | 3,68 ± 0,08                      | 1,94 ± 0,03  |
| Cinzas                       | 1,87 ± 0,09          | 3,21 ± 0,09  | 2,93 ± 0,07                      | 3,25 ± 0,05  |
| pH                           | 0,39 ± 0,02          | 6,41 ± 0,05  | 6,08 ± 0,03                      | 6,38 ± 0,05  |
| Acidez                       | 9,85 ± 0,09          | 10,05 ± 0,04 | 13,62 ± 0,05                     | 13,05 ± 0,08 |
| Proteína                     | 7,56 ± 0,2           | 7,31 ± 0,1   | 7,12 ± 0,1                       | 7,24 ± 0,09  |
| Gordura (Soxhlet)            | 34,12 ± 0,1          | 43,15 ± 0,3  | 37,01 ± 0,4                      | 43,42 ± 0,2  |
| Gordura a Frio               | 32,87 ± 0,5          | 42,97 ± 0,4  | 34,90 ± 0,4                      | 40,29 ± 0,1  |
| Açúcares Redutores (DNS)     | 15,29 ± 0,02         | 32,55 ± 0,03 | 21,86 ± 0,05                     | 29,72 ± 0,07 |
| Açúcares Totais (DNS)        | 36,99 ± 0,2          | 40,28 ± 0,16 | 37,58 ± 0,09                     | 44,58 ± 0,1  |
| Açúcares Não Redutores (DNS) | 21,65 ± 0,1          | 8,12 ± 0,09  | 15,6872 ± 0,1                    | 14,86 ± 0,06 |
| Carboidratos (Soxhlet)*      | 54,15 ± 0,1          | 44,49 ± 0,1  | 49,26 ± 0,1                      | 44,15 ± 0,09 |
| Carboidratos (A Frio)*       | 55,4 ± 0,2           | 44,67 ± 0,1  | 51,37 ± 0,1                      | 47,28 ± 0,06 |

(\*): Foram realizadas duas extrações lipídicas, portanto os carboidratos foram expressos usando os dois dados

Fonte: Autora

Segundo os resultados das análises de cinzas, pode-se averiguar que as duas amostras (ao leite e 50%) da fermentação controle obtiveram valores inferiores quando comparadas às amostras da fermentação com adição de polpa de frutas. A adição das polpas de pinha e açaí contribuíram para que houvesse uma diferença de cerca de 1,05% e de 1,03%, entre as barras de cupulate ao leite e 50%, respectivamente. Para exemplificar Rebouças *et al.* (2020) mostraram que havia diferenças semelhantes ao produzirem cupulate com adição de okara, conforme adicionavam mais okara na formulação, maior era o valor de cinzas encontrado nas

amostras. Sendo a amostra tradicional com 0,46% com adição de 15% de okara obtiveram 1,07%, com adição de 30% obtiveram 1,36% de cinzas, e por fim, ao adicionarem 45% de okara averiguaram 1,62%, obtendo assim um maior percentual no teor de cinzas. Portanto pode-se entender que a diferença entre as duas fermentações é devido a adição das polpas de açaí e pinha, durante o processo fermentativo.

Os valores de pH obtidos neste trabalho, foram semelhantes aos encontrados no estudo de Tafurt *et al.* (2021) ao estudar o chocolate de cacau, que teve em média 6,63 pH. Sendo que nas amostras variaram de 6,08 a 6,41, no seu máximo. É importante sempre averiguar o valor do pH dos alimentos pois ele pode influenciar na palatabilidade ao consumi-lo, no desenvolvimento de microrganismos, na escolha da temperatura de armazenagem (Lavinias *et al.*, 2006).

Os resultados de acidez foram similares ao serem comparadas ao estudo feito por Salvi *et al.* (2018), em chocolates tradicionais, cujo seus valores variaram entre 3,83% e 6,62%; assim como os resultados expressos na tabela, que as amostras apresentaram 5,85 e 6,05 na FI; e 6,62 e 6,05 na FII. Sugerindo então, em conjunto com os resultados de pH, que durante a etapa da conchagem, houve uma boa volatilização dos ácidos formados que são formados durante o processo fermentativo.

Com relação a quantidade de proteína, não houve grande diferença entre as amostras das duas fermentações. Nos estudos de Rebouças *et al.* (2020) foram encontrado cerca de 6,86% de proteína, para a formulação com chocolate sem adição de okara; e 26,38% de proteína no chocolate com adição de 45% de okara na sua formulação. Mostrando, portanto, um comportamento similar entre as duas formulações, onde a menor quantidade de proteína foi da barra de cupulate ao leite da FI (6,31%), que além de não ter tido adição de açaí e pinha, possui menos quantidade de amêndoas em sua formulação; já a amostra com maior valor proteico foi a barra de cupulate 50% da FII (10,72%).

Nos estudos de Barbosa *et al.* (2020), foram encontrados valores 24,13% a 41,93% e 82,72% a 92,27% de açúcares totais, nas amostras de barras de chocolate 70% e ao leite respectivamente, similares aos descritos na tabela 36,99% (FI) e 37,58% (FII) para cupulate 50% e 40,28% (FI) e 44,58% (FII) para cupulate em barra ao leite. Não existe uma legislação vigente que determine um padrão de teor de açúcares totais para o chocolate, apenas faz-se necessário ser incluso na rotulagem ao comercializar o cupulate (Lobanco *et al.*, 2009).

#### 5.4 ANÁLISE QUALITATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS

Os resultados do estudo qualitativo de metabólitos secundários nas amêndoas secas e torradas encontram-se no quadro 2.

Ao utilizar a água como solvente, todas as amostras, de ambas as fermentações, indicaram a presença de flavononóis, taninos flobafênicos, catequinas e flavonas.

Ao usar o etanol 80% como solvente, indicou a presença de taninos flobafênicos, flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis, leucoantonocianidinas, catequinas e flavononas; e na amostra torrada flavononóis; sendo que as leucoantonocianidinas, xantonas e flavononas estavam presentes apenas nas amostras secas (SAF e SS), de ambos os processos fermentativos.

Conforme é indicado na tabela, ao utilizar o metanol 80% foi indicado a presença de flavononóis, catequinas, flavonas, flavonóis e taninos flobafênicos em todas as amostras, das duas fermentações (FI e FII); e apenas nas amostras secas apresentaram: chalconas, auronas, flavononas e leucoantonocianidinas.

Nos extratos feitos com Acetona na proporção de 70:30 (solvente:água), os compostos encontrados apenas nas amêndoas secas foram: auronas e flavononas; e nas demais amostras (tanto da FI, quanto da FII) foram verificados a presença de taninos flobafênicos, flavononóis, catequinas e flavonóis.

Conforme apresentado no estudo de Gomes e Nascimento (2019), obtiveram como presentes os metabólicos secundários: flavonóis, tanto nas amostras secas quanto nas torradas. Assim como, os resultados obtidos pelos testes fitoquímicos realizados por Lessa (2012) foram semelhantes no que se refere a presença de taninos, catequina, flavonóis e flavonoides nas amêndoas.

Os resultados da análise qualitativa dos metabólitos secundários mostram que os melhores resultados obtidos foram dos extratos metanólicos, na proporção de 80:20, para metanol e água, respectivamente; tal avaliação foi feita pela intensidade da coloração que o extrato apresentou em cada reação, como é mostrado na tabela. Pode-se averiguar através dos resultados que o extrato que não houve nenhuma reação foi usando o hexano como solvente.

Quadro 2 - Análise qualitativa de metabólitos secundários nas amêndoas secas e torradas

| Metabólitos Secundários | Fermentação controle |     |      |     |     |     |     |     | Fermentação com Adição de Frutas |      |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------|----------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                         | ALAF                 | ALS | 50AF | 50S | SAF | SS  | TAF | TS  | ALS                              | 50AF | 50S | SAF | SS  | TAF | TS  | TS  |
| Extrato Aquoso          |                      |     |      |     |     |     |     |     |                                  |      |     |     |     |     |     |     |
| Taninos Flobafênicos    | +                    | +   | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +                                | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +++ |
| Flavononóis             | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | +                                | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +++ |
| Catequinas e Flavonas   | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +                                | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +++ |
| Extrato Hidroalcoólicos |                      |     |      |     |     |     |     |     |                                  |      |     |     |     |     |     |     |
| Taninos Flobafênicos    | +                    | +   | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +                                | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +++ |
| Flavonas                | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Xantonas                | -                    | -   | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -                                | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -   |
| Flavononóis             | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | +                                | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | ++  |
| Leucoantonocianidinas   | -                    | -   | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -                                | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -   |
| Catequinas              | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Flavonóis               | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Flavononas              | -                    | -   | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -                                | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -   |
| Extrato Metanólico      |                      |     |      |     |     |     |     |     |                                  |      |     |     |     |     |     |     |
| Chalconas               | -                    | -   | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -                                | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -   |
| Auronas                 | -                    | -   | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -                                | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -   |
| Flavononóis             | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Catequinas              | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Flavonas                | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Flavonóis               | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Flavononas              | -                    | -   | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -                                | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -   |
| Leucoantonocianidinas   | -                    | -   | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -                                | -    | -   | +++ | +++ | -   | -   | -   |
| Taninos Flobafênicos    | +                    | +   | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Extrato com Acetona     |                      |     |      |     |     |     |     |     |                                  |      |     |     |     |     |     |     |
| Taninos Flobafênicos    | +                    | +   | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +                                | +    | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +++ |
| Auronas                 | -                    | -   | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -                                | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -   |
| Flavononóis             | +                    | +   | +    | +   | ++  | ++  | ++  | ++  | +                                | +    | +   | +++ | +++ | ++  | ++  | ++  |
| Catequinas              | +                    | +   | +    | +   | +   | +   | +   | +   | +                                | +    | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Flavonóis               | +                    | +   | +    | +   | +   | +   | +   | +   | +                                | +    | +   | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  |
| Flavononas              | -                    | -   | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -                                | -    | -   | ++  | ++  | -   | -   | -   |
| Extrato com Hexano      |                      |     |      |     |     |     |     |     |                                  |      |     |     |     |     |     |     |
|                         |                      |     |      |     |     |     |     |     |                                  |      |     |     |     |     |     |     |

Onde: (+++): alta pigmentação, (++) : média pigmentação, (+): pouca pigmentação, (-): ausência de mudança de cor. (ALAF): Cupulate ao leite extraído a frio, (ALS): cupulate ao leite extraído no soxhlet, (50AF): cupulate 50% extraído a frio, (50S): cupulate 50% extraído no soxhlet, (TAF): amêndoa torrada extraída a frio, (TS): amêndoa torrada extraída no soxhlet, (SAF): amêndoa seca extraída a frio, (SS): amêndoa seca extraída no soxhlet.

Fonte: Autora

## 5.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS CUPULATES EM BARRA E DAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS

Na tabela 7 e no gráfico 3 abaixo são apresentados os resultados dos compostos fenólicos nas amostras de cupulate (ao leite e 50%) e amêndoas fermentadas secas e torradas, em ambos os processos fermentativos; e na tabela 8 e no gráfico 4 estão os resultados da análise da capacidade antioxidante. Todas as amostras foram desengorduradas por dois métodos, sendo estes através do Soxhlet e a frio.

Segundo os resultados obtidos por Ferreira & Janette (2020), os resultados alcançados para amêndoas torradas foram de 127,24 mg/100g de amostra, sendo este, um valor inferior ao ser comparado ao da presente pesquisa, que variou, para amêndoa fermentada torrada, de 1192,37 a 1294,79 mgEq/100g de amostra na FI e de 1492,13 a 1661,91mgEq/100g de amostras, na FII. Já no estudo de Pugliese (2010), os valores apresentados das amostras de amêndoa fermentada seca, torrada e do cupulate, foram similares aos expressos na tabela.

É perceptível também que há uma diminuição na quantidade expressada na tabela, de compostos fenólicos, das amostras torradas, secas, cupulate em barra 50% e ao leite. Indicando assim que as temperaturas usadas nos processos, tanto de secagem, torragem e na obtenção do cupulate em barra, influenciaram no escurecimento do cotilédono da amêndoa, ocasionando uma diminuição considerável dos compostos fenólicos.

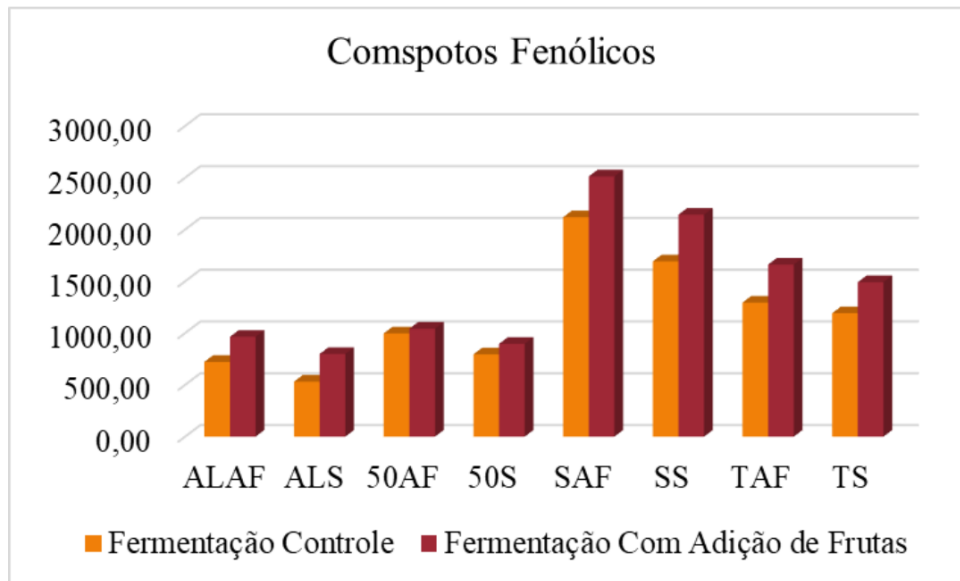
Tabela 7 – Determinação de Compostos Fenólicos

| Amostras | Compostos Fenólicos         |                                         |
|----------|-----------------------------|-----------------------------------------|
|          | CF (mEq/100g amostra)       | CF (mEq/100g amostra)                   |
|          | <b>Fermentação Controle</b> | <b>Fermentação Com Adição de Frutas</b> |
| ALAF     | 722,05 ± 0,01               | 964,25 ± 0,02                           |
| ALS      | 531,47 ± 0,02               | 798,41 ± 0,03                           |
| 50AF     | 996,91 ± 0,02               | 1042,36 ± 0,01                          |
| 50S      | 794,95 ± 0,01               | 895,85 ± 0,02                           |
| SAF      | 2118,96 ± 0,03              | 2512,95 ± 0,02                          |
| SS       | 1692,31 ± 0,01              | 2143,82 ± 0,01                          |
| TAF      | 1294,79 ± 0,02              | 1661,91 ± 0,01                          |
| TS       | 1192,37 ± 0,03              | 1492,13 ± 0,01                          |

Onde: (ALAF): Cupulate ao leite extraído a frio, (ALS): cupulate ao leite extraído no soxhlet, (50AF): cupulate 50% extraído a frio, (50S): cupulate 50% extraído no soxhlet, (TAF): amêndoa torrada extraída a frio, (TS): amêndoa torrada extraída no soxhlet, (SAF): amêndoa seca extraída a frio, (SS): amêndoa seca extraída no soxhlet.

Fonte: Autora

Gráfico 3 – Compostos Fenólicos (mEq/100g de amostra)



Fonte: Autora

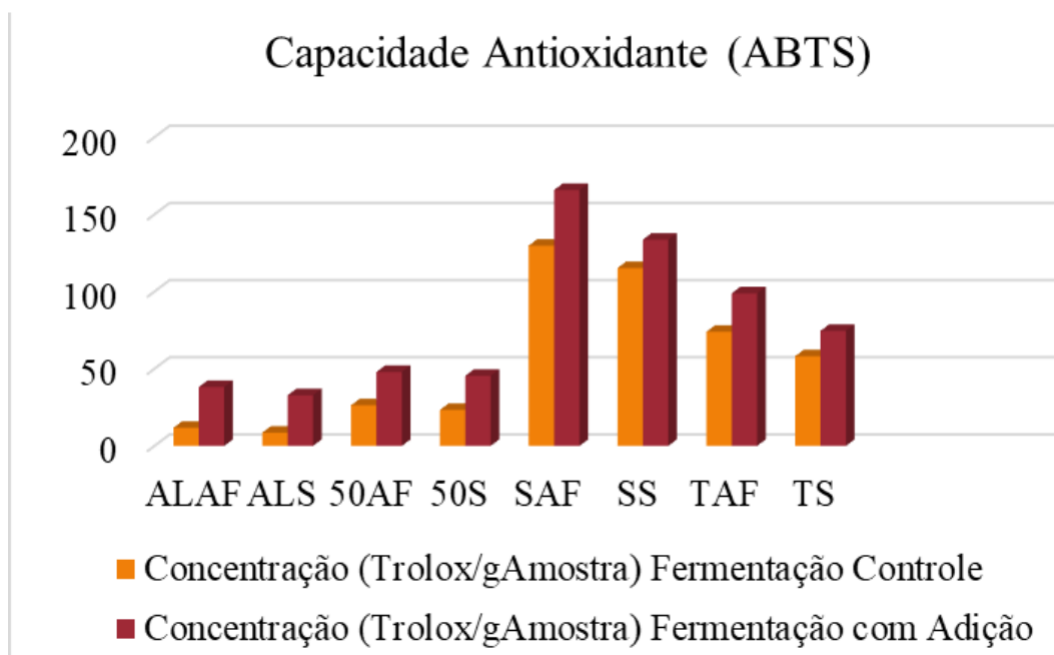
Tabela 8 – Capacidade Antioxidante ( $\mu$ MTrolox/gAmostra)

|      | Concentração ( $\mu$ MTrolox/gAmostra) |                        |
|------|----------------------------------------|------------------------|
|      | Fermentação Controle                   | Fermentação com Adição |
| ALAF | 11,73 $\pm$ 0,02                       | 38,19 $\pm$ 0,01       |
| ALS  | 8,62 $\pm$ 0,01                        | 32,85 $\pm$ 0,02       |
| 50AF | 26,34 $\pm$ 0,01                       | 47,93 $\pm$ 0,03       |
| 50S  | 23,32 $\pm$ 0,03                       | 45,47 $\pm$ 0,01       |
| SAF  | 129,77 $\pm$ 0,02                      | 165,80 $\pm$ 0,03      |
| SS   | 115,25 $\pm$ 0,01                      | 133,64 $\pm$ 0,02      |
| TAF  | 73,94 $\pm$ 0,01                       | 98,91 $\pm$ 0,01       |
| TS   | 58,10 $\pm$ 0,03                       | 74,55 $\pm$ 0,01       |

Onde: (ALAF): Cupulate ao leite extraído a frio, (ALS): cupulate ao leite extraído no soxhlet, (50AF): cupulate 50% extraído a frio, (50S): cupulate 50% extraído no soxhlet, (TAF): amêndoa torrada extraída a frio, (TS): amêndoa torrada extraída no soxhlet, (SAF): amêndoa seca extraída a frio, (SS): amêndoa seca extraída no soxhlet.

Fonte: Autora

Gráfico 4 – Capacidade Antioxidante ( $\mu\text{MTrolox/gAmostra}$ )



Fonte: Autora

Ao se comparado, os resultados expressos na tabela, foram superiores aos encontrados no estudo realizado por Ferreira & Janette (2020), que obtiveram para amêndoas fermentadas secas  $24,22 \mu\text{MTrolox/g}$  e  $22,63 \mu\text{MTrolox/g}$  para torradas. Assim como também se mostrou superior, ao se comparado com os resultados obtidos de Tafurt *et al.* (2021) que averiguou  $0,39 \mu\text{MTrolox/g}$  para chocolate em barra, e já nos expressos na tabela foram obtidos valores entre  $11,73$  e  $8,62 \mu\text{MTrolox/g}$ ;  $26,34$  e  $23,31 \mu\text{MTrolox/g}$ , para as amostras de cupulate ao leite e 50% da FI, respectivamente; e  $38,2$  a  $32,84 \mu\text{MTrolox/g}$ ;  $47,9$  a  $45,47 \mu\text{MTrolox/g}$ , para as de cupulate 50%.

Todas as amostras, de ambas fermentações que foram extraídas a frio, obtiveram resultados maiores em comparação às amostras extraídas por soxhlet. Além disso, foi destacado, por meio das leituras, que as amostras da fermentação com Adição de polpas de frutas (FII), ao serem relacionadas com as da Fermentação Controle (FI), alcançaram resultados bem superiores, provando que a adição das frutas teve quantidade de compostos fenólicos satisfatórios e uma maior capacidade antioxidante.

A torragem e, secundariamente, as outras etapas que fazem uso de temperaturas moderas (como o refino, conchamento e temperagem) foram colocadas como etapas que podem

diminuir a concentração no teor de compostos fenólicos das amêndoas e afetar a capacidade antioxidante (Kealey et al., 1998). Nos estudos de Kealey *et al.* (1998) foi averiguado que, devido ao aumento da temperatura, principalmente na torragem, há uma diminuição na quantidade de oligômeros. Esta diminuição se dá, por conta das elevadas temperaturas, contato com o oxigênio e o alto poder redutor dos polifenóis. E como consequência, ocorre a oxidação adicional dos compostos fenólicos presentes nas amêndoas (Wollgast & Anklam, 2000; Misnawi *et al.*, 2004). Podendo explicar assim a queda entre os resultados obtidos das amêndoas fermentadas secas para as torradas, demonstradas na tabela.

A diferença no teor de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante presentes nas amostras de cupulate ao leite e 50%, pode ser devido à simples diluição dos fenólicos das amêndoas com os demais ingredientes adicionados na sua formulação (açúcar, manteiga de cupuaçu, leite em pó, lecitina e baunilha). A alcalinização, concheamento e fermentação são etapas que contribuem nas características sensoriais do cupulate, entretanto também comprometem a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. O chocolate ao leite, apesar de ser o mais consumido, apresenta um baixo percentual de amêndoas na sua formulação, assim como uma maior quantidade de açúcar adicionado, faz com que tenha uma diminuição nos efeitos benéficos à saúde do consumidor (Cooper et al., 2008).

## 5.6 DETERMINAÇÃO DE HIDROXIMETILFURFURAL NAS AMÊNDOAS SECAS E TORRADAS E NAS BARRAS DE CUPULATE

Ao analisar o gráfico 5 e a tabela 8, pode-se perceber um aumento na quantidade de hidroximetilfurfural formado, da amostra seca, para a torrada, cupulate 50% e o ao leite, sendo confirmado pela mudança de coloração entre as amêndoas e intensidade da coloração das barras de cupulate produzidas.

Durante o processo de torra das amêndoas, os açúcares em conjunto com os aminoácidos e peptídeos estão envolvidos na formação do “*flavor*” e coloração é resultado da formação de quinonas, resultantes da Reação de Maillard, responsáveis pelos compostos básicos do aroma característico (Biehl & Passern, 1982).

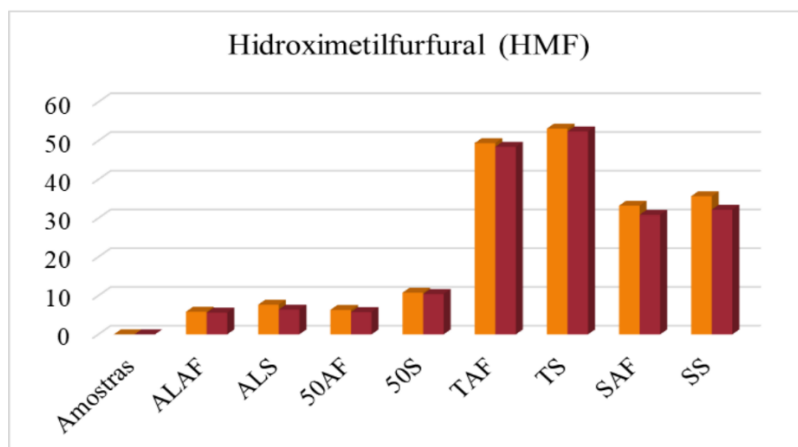
Tabela 9 – Resultados De HMF (mg/KG de amostra)

| Amostras | Hidrometilfurfural (mg/Kg de amostra) |                |
|----------|---------------------------------------|----------------|
|          | Fermentação I                         | Fermentação II |
| ALAF     | 5,84 ± 0,09                           | 5,61 ± 0,06    |
| ALS      | 7,66 ± 0,05                           | 6,39 ± 0,07    |
| 50AF     | 6,31 ± 0,03                           | 5,76 ± 0,06    |
| 50S      | 10,76 ± 0,07                          | 10,41 ± 0,05   |
| TAF      | 49,37 ± 0,04                          | 48,41 ± 0,06   |
| TS       | 53,11 ± 0,03                          | 52,38 ± 0,09   |
| SAF      | 33,21 ± 0,07                          | 30,86 ± 0,09   |
| SS       | 35,66 ± 0,07                          | 32,18 ± 0,07   |

Fonte: Autora

Onde: (ALAF): Cupulate ao leite extraído a frio, (ALS): cupulate ao leite extraído no soxhlet, (50AF): cupulate 50% extraído a frio, (50S): cupulate 50% extraído no soxhlet, (TAF): amêndoa torrada extraída a frio, (TS): amêndoa torrada extraída no soxhlet, (SAF): amêndoa seca extraída a frio, (SS): amêndoa seca extraída no soxhlet.

Gráfico 5 – HMF das Amostras (mg/Kg de amostra)



Fonte: Autora

Os resultados expressos na tabela as amêndoas torradas obtiveram em média 49,37 (extraído a frio) e 53,11 (extraído por soxhlet) na FI; e 48,41 (extraído a frio) e 52,38 (extraído por soxhlet) da FII; que se mostrou superior ao serem comparados com os apresentados nos

estudos de Ferreira & Janette (2020) que foi de 33,87 mg/Kg de amostra. Podendo-se concluir que, em ambas as fermentações, todas as amostras extraídas por soxhlet apresentaram valores maiores de HMF do que as que foram extraídas a frio. Portanto, pode-se compreender que o método escolhido de extração lipídica para as amostras, que possuem elevada temperatura no ao longo do seu processo influencia na quantidade final de HMF. Visto que o HMF gerado em temperaturas elevadas, que é o caso da extração por meio do aparelho Soxhlet.

## 5.7 ANÁLISE MICROBIOLOGIA DOS CUPILATES EM BARRA AO LEITE E MEIO AMARGO

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) propõe padrões para a avaliação microbiológica de produtos comercializados como chocolates. Onde os valores limites aceitos de bolores e leveduras é de 103 UFC/g. Portanto, os resultados obtidos das análises de bolores e leveduras expressas na tabela mostram-se dentro do limite exige pela legislação (Brasil, 2019).

Os estudos feitos por Cedeño (2019) tiveram em média  $1,4 \times 10^3$  na análise de bactérias mesófilas, resultados semelhantes aos apresentados no gráfico. As bactérias mesófilas, coliformes totais e fecais, são usados como indicadores de higiene durante o seu preparo, transporte, processamento e também sua estocagem (Tejada *et al.*, 2012)

Os cupulates elaborados neste estudo não apresentaram presença de microrganismos patógenos (Tabela 10) preconizados pela Legislação da RDC 331/2019 de Normativa nº60 de 23 de dezembro de 2019, revelando, portanto, boas práticas de fabricação.

Tabela 10 – Resultados das Análises Microbiológicas dos Tabletes de Cupulate

|                            | Fermentação I            |                          | Fermentação II           |                          |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                            | Ao Leite                 | 50%                      | Ao Leite                 | 50%                      |
| Coliformes totais          | < 3                      | < 3                      | < 3                      | < 3                      |
| Coliformes Termotolerantes | < 3                      | < 3                      | < 3                      | < 3                      |
| Mesófilos                  | $2 \times 10^3$ UFC/g    | $1,42 \times 10^3$ UFC/g | $1,43 \times 10^3$ UFC/g | $2,01 \times 10^3$ UFC/g |
| Bolores/Leveduras          | $1,01 \times 10^3$ UFC/g | $1,02 \times 10^3$ UFC/g | $1,03 \times 10^3$ UFC/g | $1 \times 10^3$ UFC/g    |
| <i>Salmonella sp</i>       | -                        | -                        | -                        | -                        |

(-): Ausência

Fonte: Autor

## 6. CONCLUSÃO

As amêndoas, após os processos de secagem, passaram por uma classificação de qualidade, e pode-se concluir que a sua maior parte atingiu uma boa fermentação, possibilitando um melhor desenvolvimento do aroma característico do cupulate.

No que se refere aos testes fitoquímicos realizados nas amêndoas secas e torradas, as extrações feitas com etanol 80% e metanol 80% foram os mais eficientes, comparando com a literatura. Através do estudo fitoquímico das sementes de cupuaçu se verificou a presença de compostos bioativos.

Verificou-se através dos resultados apresentados e discutidos que a adição polpas de açaí e pinha no processo fermentativo, e contribuíram para o aumento do teor de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante, tanto nas amêndoas torradas e secas quanto nos cupulates em tabletes (ao leite e 50%).

Com base neste presente trabalho foi possível analisar os processos bioquímicos da fermentação das amêndoas do cupuaçu, realizado de 2 maneiras diferentes, e fazer uma comparação entre os dois (uma fermentação controle e outra com adição de polpas de açaí e pinha). Podendo-se constatar, que a FII foi a melhor, tratando-se do tempo fermentativo, que foi menor em comparação a FC, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, cujo seus valores foram superiores quando relacionadas a FC.

## REFERÊNCIA

- ABECIA S., L. A. **Estudo do valor nutritivo e da fração albumina dos extratos de proteína solúvel de amendoas de cacau (*Theobroma cacao* L) em função do grau de torração.** 1999. 127p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/175731>. Acesso em: 02/03/2023
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução CNNPA nº 12, de 1978.** Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1978/res0012\\_30\\_03\\_1978.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1978/res0012_30_03_1978.html). Acesso em: 15/11/2023
- AFOAKWA, E. O. *et al.* Matrix effects on flavor volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. **Food Chemistry**, 113:208–215, 2009.
- AFOAKWA, E. O. *et al.* Relationship between rheological, textural and melting properties of dark chocolate as influenced by particle size distribution and composition. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 1215-1223, 2008.
- ALVES, S. D. M; JENNINGS, W. Volatile Composition of Certain Amazonian Fruits. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1263 - 1265, 2003.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 18, de 30 de abril de 1999**, atualizado em julho de 2008. IX – “Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas”. Disponível em [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_18\\_1999\\_COMP.pdf/b23dbb1-c0e4-4999-8edf-c152aeb3956f](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_18_1999_COMP.pdf/b23dbb1-c0e4-4999-8edf-c152aeb3956f). Acesso em: 17/11/2023.
- AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. **Journal Science Food Agricultural**, v.76, p.123-128, 1998.
- ARUOMA, O.I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v.9-20, p.523-524, 2003.
- BARBOSA, G. O. *et al.* Análise bromatológica e de rotulagem de chocolate ao leite e chocolate 70%. **JAPHAC–Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 42-52, 2020.
- BAREL, M. Dd'écabossage. Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. **Café cacao Thé**, vol. XXXI, nº2, abril-junho, 1987.
- BASTOS, D. H. M.; *et al.* Produtos da Reação de Maillard em alimentos. **Journal of Brazilian Society of Food Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 63-78, 2011.
- BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use.** John Wiley & Sons, 720 p. 2011.
- BEVILAQUA, G.A.P; SCHIEDECKG.; SCHWENGBER, J. E. Identificação e Tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. **Circular Técnica 61.** Embrapa. Pelotas, RS. 2007
- BOBBIO P. A., BOBBIO F. O. **Introdução à Química de Alimentos.** 2ª ed. São Paulo: Varela; 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 57, de 12 de nov. de 2008. **Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau**. Diário Oficial da União, 13 nov. 2008.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; ADDO, S. K.; TAKRAMA, J. S.; BERNAERT, H.; and DE VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.2288-2297, 2008b.

CANDIA, A. D. S.; DIAS, I. P. **Formulação, caracterização e análise sensorial de chocolate com adição de okara**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

CARLOS, S. A. V. *et al.* Elaboração de sorvete de cupuaçu utilizando fibra de casca de maracujá como substituto de gordura. **Evidência**, v. 19, n. 1, p. 23-44, 2019.

CARNEIRO, N. S. P. *et al.* **Avaliação da enzima peroxidase e dos compostos fenólicos durante etapas de fermentação de *Theobroma cacao***. 2020. Disponível em: <https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/201102206.pdf>

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p.986-993, 2008.

CEDENO, M.; MONSERRATE, E. **Obtención de barra de chocolate enriquecida con snack de cáscaras de naranja y mandarina**. 2019. Dissertação de Mestrado. Calceta: ESPAM MFL.

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Cartilha melhoria da qualidade de cacau**. 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/outras-publicacoes/cartilha-do-cacaueiro-com-ficha-catalografica.pdf/view>. Acesso em: 02/03/2023

COHEN, K. O.; SOUSA, M. V.; JACKIX, M. N. H. Parâmetros físicos e aceitabilidade sensorial de chocolate ao leite e de produtos análogos elaborados com liquor e gordura de cupuaçu. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 17-23, 2005.

COOPER, K. A. *et al.* Cocoa and health: a decade of research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 1-11, 2008

CORZINI, S. C. S. **Cristalização da manteiga de cacau e seus substitutos no chocolate**. 2017. 51 p. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia de alimentos, Campinas, SP. 2017.

COUCEIRO, E.M. Pinha, fruto do conde ou ata, sua cultura e origem. **Publicação da CEASA**, Recife, v.1, n.8, p.1973.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAVRIEUX, F.; *et al.* **Determinação do nível de fermentação e dos teores em flavan-3-ols do cacau comercial por espectrometria próxima infra-vermelha**. In: CONFERÊNCIA

INTERNACIONAL DE PESQUISAS EM CACAU. São José, Costa Rica. Memorial. Ed. CEPLAC, p.95, 2006.

DA SILVA, ASS; FARIAS LF. 2018. Elaboração da farinha à base da amêndoa do cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v.1, p.36-42, 2018.

DOMINGUES, E. S. **Seleção de linhagens de leveduras pectinolíticas para fermentação de sementes de cacau (Theobromacacao)**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DOS SANTOS, T. G. *et al.* Diversidade genética entre acessos de cupuaçuzeiro da região sudeste do Pará, através de caracteres foliares. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 23., 2019, Belém, PA. Anais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2019, 2019. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1113414/1/PIBIC2019195201.pdf>>. Acesso em: 19/10/2023.

DEL BOCA, C. Cocoa beans: Quality requirements and methods of assessment. **Review International Chocolaterie**, v.17, p.218-221, 1962.

DIMICK, P. S.; and HOSKIN, J. C. **The Chemistry of Flavour Development in Chocolate. In Industrial Chocolate manufacture and use**. S. T. Beckett. Blackwell Science, Oxford, v.3, p.137-152, 1999.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**; 35(1):5-22. 2000.

DROUDEN, M. Technology for Sweet: Chocolate (Drouden & Fabry), vol.1, p.27-29, 1996

EFRAIM, P. **Contribuição a melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes a vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. 208 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: [https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP-30\\_7466cef778a7cf3dc01305c4a053abab](https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP-30_7466cef778a7cf3dc01305c4a053abab). Acesso em: 02/03/2023.

EFRAIM, P.; *et al.* Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 142-150, 2010.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D.C.P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n.3, p. 181-201, julho. 2011.

EMBRAPA. **Processamento tecnológico das amêndoas de cacau e de cupuaçu**. Belém-PA, 2003. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/406024/processamento-tecnologico-das-amendoas-de-cacau-e-de-cupuacu>. Acesso em: 04/02/2023

FADINI, A.L. **Coparação da eficiência do processo convencional de torração do cacau frente ao processo por micro-ondas** 1998. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Ferrão JM A, (2007) morte da semente: sua importância na tecnologia pós-colheita do cacau. **Revista de Ciências Agrárias**, 31: 265 -270.

FEENEY, R.E. *et al.* Advances in Protein. **Chemistry**, v. 29, p.136 – 204, 1975.

FENNEMA O.R.; DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed editora, 5º Edição, 2018.

FERRÃO, J. E. M. Cacau: **Tecnologia pós-colheita**. Ligalu edições: Lisboa. p.303, 2002.

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

FRANCO, M. R. B; SHIBAMOTO, T. Y. Volatile Composition of Some Brazilian Fruits: Umbu-cajá (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263–1265, 2000.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. (2000). The problem of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925 - 1941.

FRAUENDORFER, F.; SCHIEBERLE, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 56, n. 21, p. 10244-10251, 2008.

GARCIA, I. P. **Enzimas produzidas durante os diferentes estágios de fermentação das sementes de cupuaçu (*theobroma grandiflorum* (willdenow ex sprengel) schumann)**. Dissertação (programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos) - Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006

GOMES, L. S.; NASCIMENTO, V. Extração de Gorduras Totais de Chocolates por Soxhlet e Avaliação Qualitativa da Capacidade Antioxidante. **Revista Virtual de Química**. Niterói-RJ, vol. 11, n.4, p. 1239-1248, julho-agosto, 2019.

GORDON, A. *et al.* Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 256–263, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.150>.

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

HAMINIUK, C. W. I. MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012

HUANG, Y.; BARRINGER, S. A. Alkylpyrazines and Other Volatiles in Cocoa Liquors at pH 5 to 8, by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**, v 75, n 1, 2010.

ICCO - International Cocoa Organization. Disponível em: [www.icco.org](http://www.icco.org). Acesso: 07/08/2023

IMBERT, R. M. **Estudo da secagem artificial de amêndoas de cacau visando ao aproveitamento na indústria de chocolate**: otimização estrutural do processo e eficiência

energética. 2017. 28p. Tese (Mestrado)- Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2017.

JESUS, A. L. T. de; LEITE, T. S.; CRISTIANINI, M. High isostatic pressure and thermal processing of açai fruit (*Euterpe oleracea* Martius): Effect on pulp color and inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase. **Food Research International**, v. 105, n. September 2017, p. 853–862, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.013>

JONFIA-ESSIEN, W. A. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1155-1159, 2008.

KAVATI, R. Melhoramento em fruta-do-conde. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; MORAIS, O.M.; REBOUÇAS, T.N.H. **Anonáceas-Produção e mercado**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia: Vitória da Conquista, 1997. p.47-54.

KEALEY, K.S. *et al.* **Cocoa components, edible products having Enhanced polyphenol contented, methods of making same and medical uses**. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 98/09533, Mars Incorporate, USA, 1998.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13 n. 4, p. 345-351, 2002.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos - Teoria e Aplicações Práticas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2013.

KOSTINEK, M.; *et al.* Diversity of Predominant Lactic Acid Bacteria Associated with Cocoa Fermentation in Nigeria. **Current Microbiology**, jun/out, p. 307-314, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; *et al.* Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**; 24(4):691-693. 2004.

LESSA, O. A. **Estudo da fermentação do farelo de cacau por *Penicillium roqueforti* e avaliação da composição química e atividade antioxidante**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB. Itapetinga/BA, p. 70, 2012.

LIAO, M.L.; LIU, M.S.; YANG, J.S. Respiration measurement of some important fruits in Taiwan. **Acta Horticulturae**, v. 138, p. 227-246, 1983.

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

LIMA, M. C. F. de. **Caracterização de substâncias fenólicas e alcaloides dos resíduos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd. Ex spreng.) Schum)**. 2013. 132f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

LOBANCO, C.M; *et al.* Fidedignidade de rótulos de alimentos comercializados no município de São Paulo, SP. **Rev. Saúde Pública**. 2009, vol.43, n.3, p.499-505.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função do processamento**. Tese de PhD, Universidade Federal de Campinas.2000.

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gordura de cupuaçu alternativa a manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. 2001. 188p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2001.

LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; and BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.12, p.3527-3532, 2002

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

MARTÍNEZ-FLÓREZ S.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M; TUÑÓN, M.J. Los Flavonóides: Propiedades Y Acciones Antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**;17(6):271-278, 2002.

MARTINS, R. Processamento de chocolate. Rio de Janeiro, 2007. 33f. Dossiê Técnico – Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, REDETEC.

MASCAROS, A. Las propiedades sensoriales del cacao. Origen, desarrollo y evaluacion. **Alimentaria**, n. 244, p. 85-89, 1993.

MINIFIE, Bernard. **Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology**. Springer Science & Business Media, 2012.

MISNAWI, C.; *et al.* Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. **Food Qual Prefer**. v.15, p.403-409, 2004.

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

MISNAWI, J.S.; NAZAMID, S.; JAMILAH, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. **Food Chemistry**. 2002, 78, 407–417.

MUÑOZ, D. A. F; LÓPEZ, D.; SALOME, D. Método de fermentación y secado para el beneficio de la obtención del chocolate blanco a partir del cacao criollo (*Theobroma cacao* L.), ecuatoriano. **Universidad y Sociedad**, v. 14, n. S2, p. 323-329, 2022.

NAZARÉ, R. F R.; BARBOSA, W. C; VIEGAS, R. M. F. Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate. Embrapa Amazônia Oriental: v. 108, p. 38, 1990.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, n.3, p. 6971, 1998.

NOGUEIRA, B.L **Processamento do cacau: avaliação do teor nutricional do chocolate e dos outros derivados do cacau**. 2015. (Monografia em engenharia bioquímica) -Universidade de São Paulo, Lorena 2015

OLIVEIRA, T. B.; GENOVESE, M. I. Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 929–935, 2013.

PAPALEXANDRATOU, Z. *et al.* *Hanseniaspora opuntia* e, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. **Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 73-85, 2013.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v.9, p.534-540, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p. 791 - 800.

MALDONADE, Iriani R.; DE CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, Nathalie A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. 2013.

MILLER, H. E. Simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.48, n.2, p.91, 1971.

PEZOA-GARCÍA, N. H. **Contribution a l'étude d'un capteur pour contrôler en continu le processus de torréfaction**. 170p. 1989. These (Docteur) –Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, 1989

PINTO, E. G *et al.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisas e Avanços*. Vol. 2. **Agron Food Academy**. RN, 2022.

PIROUZIAN, H. R.; *et al.* Recrystallization process in chocolate: Mechanism, importance and novel aspects. **Food Chemistry**, 321. Ago. 2020

PORTER, L. J.; M. A, Z.; and CHAN, B. G. Cacao Procyanidins: Major Flavanoids and of Some Minor Metabolites Identification. **Phytochemistry**, v.30, n.5, p.1657-1663, 1991.

PUGLIESE, A. G. Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: Composição e possíveis benefícios. **Universidade de São Paulo**, 2010.

PUGLIESE, A. G.; *et al.* Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2720-2728, 2013.

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, p. 2, 1999.

RAMLI, N *et al.* Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. **Journal of food processing and preservation**, v. 30, n. 3, p. 280-298, 2006.

RAMOS, S. D. N. M. **Influência dos microrganismos envolvidos no processo de fermentação de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) na formação do sabor= Influence of the microorganisms involved in the process of cupuassu fermentation (*Theobroma grandiflorum* Schum) on the flavor formation**. 2015. Tese de Doutorado. [sn].

REBOUÇAS, A. M *et al.* Aproveitamento tecnológico das sementes de cupuaçu e de okara na obtenção de cupulate. **Desafios-Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 7, n. Especial, p. 59-64, 2020.

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

RUFINO, M. S. M. *et al.* (2007). **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa, 2007. (Comunicado Técnico).

SALVI, L. d. F *et al.* **Avaliação sensorial e físico-química de chocolates tipos tradicional e diet**. Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, p. 45, 2018.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S. OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SARMENTO, L. A. V. **Obtenção e separação de polifenóis de sementes de cacau por extração supercrítica associada a membranas**. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.103, 2007.

SAKHAROV, I.Y.; ARDILA, G. B. Variations of Peroxidase Activity in Cacao (*Theobroma cacao* L.) Beans During their Ripening, Fermentation and Drying. **Food Chemistry**, Vol.65, Issue1, p.51-54, 1999.

SCHWAN, R.F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and environmental microbiology*, v.64, p.1477-1483. 1998.

SHARIF, S. **Effect of alkalization and quality of cocoa liquor from diferente origins**. Tese de Doutorado. MSc thesis, Pennsylvania State University Park, State College, 1997.

SILVA, M.S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do Cacau**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SILVA, N *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILWAR, R.R. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of cocoa flavor, quantitative determination of steam volatile aroma constituents. **Café Cococa Thé**. Vol.32, P. 243-250, 1988

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

SOUZA, A. A. de *et al.* CARACTERÍSTICAS DO CUPUAÇU E POTENCIAL NUTRICIONAL E FUNCIONAL DAS SEMENTES PARA A AGROINDÚSTRIA. RN: Agron Food Academy, 2022, p. 388-398. Disponível em: <https://agronfoodacademy.com/9786599539664-1/>. Acesso em: 11/11/23

SOUZA, A. G. C.; *et al.* **Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007

SOUZA, A. d. G. *et al.* Boas práticas na colheita e pós-colheita do cupuaçu. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**. Manaus-AM, 2011. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/917130/1/CircTec36.pdf>>. Acesso: 20/11/2019.

SOUZA, C.S. **Efeito da substituição parcial de manteiga de cacau por gordura cbe no perfil de compostos voláteis de chocolate meio amargo**. 2017. 95 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017

SOUZA, J. M.L. *et al.* Monitoring and Optimization of Cupuaçu Seed Fermentation, Drying and Storage Processes. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1314, 2020.

SOUZA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; DE TOLEDO, F. F. **Enciclopédia agrícola brasileira: AB**. Edusp, p. 396, 1995.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 2, p. 215-223, 2003.

SUMMA, C. *et al.* Effect of roasting on the radical scavenging activity of cocoa beans. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 3-4, p. 368-375, 2006.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. Ed. Campinas: NEPA- UNICAMP. p. 161, 2011.

TAFURT, G. *et al.* Capacidad antioxidante de un chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar. **Revista digital de pos grado**, v. 10, n. 1, p. e280-e280, 2021.

TAYLOR, A. J. **Food Flavour Technology**. 2ªEd. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK. 2002.

TEJADA, T. S.; *et al.* Micro-organismos patogênicos e deteriorantes em chocolate artesanal ao leite **Rev Inst Adolfo Lutz**.; 71:178-81, 2012.

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

VINSON, J. *et al.* Chocolate is a Powerful Ex Vivo And In Vivo Antioxidant, an Antiatherosclerotic Agent in an Animal Model and a Significant Contributor to Antioxidants in the European and American Diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 8071-8076, 2006

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, Documento 316, p.10, novembro 2010.

VAINSTEIN, A.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E.; WEISS, D. Floral fragrance.New inroads into an old commodity. **Plant Physiology**, 127:1383-1389, 2001

VOIGT, J. et al. (1994a). In vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aromarelated peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. **Food Chemistry**, 49:173 - 180

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v.33, p. 423-447, 2000.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. *et al.* Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055>

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 361–422, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x>

YOSHIYAMA, M.; ITO, Y. Decrease of adstringency of cacao beans by an enzymatic treatment. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, Minato, v.43, n.2, p.124-129,1996.

ZAMALLOA, C. W. A. **Caracterização físico-química e avaliação de metil pirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (Theobroma cacao L) produzidos no Estado de São Paulo. 1994, 121p.** 1994. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

ZELENSKY, A. N. *et al.* Caffeine suppresses homologous recombination through interference with RAD51-mediated joint molecule formation. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 13, p. 6475-6489, 2013.

ZENEBON, O; PASCUET, N, S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** In: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 2005. p. 1018-1018.



Universidade do Estado do Pará  
Centro de Ciências Naturais e Tecnologia  
Curso de Tecnologia de Alimentos  
Travessa Enéas Pinheiro, 2626 – Marco  
66095-490. Belém – PA  
[www.uepa.br](http://www.uepa.br)