



COMPORTAMENTO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS POLIFENOLOXIDASE (PPO), PEROXIDASE (PO), PECTINAMETILESTERASE (PME) NOS ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU (THEOBROMA CACAO L).

COMPORTAMIENTO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO), LA PEROXIDASA (PO) Y LA PECTINAMETILESTERASA (PME) EN LOS ENSAYOS DE FERMENTACIÓN DEL CACAO (THEOBROMA CACAO L).

BEHAVIOR OF POLYPHENOLOXIDASE (PPO), PEROXIDASE (PO), PECTINAMETHYLESTERASE (PME) ENZYME ACTIVITY IN COCOA (THEOBROMA CACAO L) FERMENTATION TRIALS.

Adriane Ferreira de Miranda¹; Maricely Uría Toro².

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0278>

RESUMO

O presente artigo apresenta o comportamento das enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (PO) e pectinametilesterase (PME) extraída de sementes de cacau durante o processo de fermentação convencional (f₁) com duração de sete dias, equivalente a 168 horas e uma projeção deste comportamento no teste da fermentação com inóculo start (f₂). As amostras de sementes retiradas da fermentação foram monitoradas através dos parâmetros como: temperatura (° C), pH e Sólidos Solúveis Totais (° Brix), os dados das análises foram plotados no programa R. A partir da prospecção da atividade enzimática na fermentação (f₂), pode-se inferir que ao atingir o pico de máxima temperatura para todas as enzimas, estas atividades permanecem constantes, no gráfico de absorbância e sólidos solúveis é possível observar uma projeção de uma área maior desta atividade para a enzima (PO), no gráfico para o pH e a ABS há um intervalo maior antes de iniciar o declínio da atividade para todas as enzimas analisadas.

Palavras-Chave: Cacau, Fermentação, Enzimas.

RESUMEN

En este trabajo se presenta el comportamiento de las enzimas polifenoloxidasa (PPO), peroxidasa (PO) y pectinametilesterasa (PME) extraídas de los granos de cacao durante el proceso de fermentación convencional (f₁) de siete días de duración, equivalente a 168 horas y una proyección de este comportamiento en el ensayo de fermentación con inicio de inóculo (f₂). Las muestras de semillas tomadas de la fermentación fueron monitoreadas a través de los parámetros como: temperatura (° C), pH y Sólidos Solubles Totales (° Brix), los datos de los análisis fueron graficados en el programa R. De la prospección de la actividad enzimática en la fermentación (f₂), se puede inferir que al alcanzar el pico de temperatura máxima para todas las enzimas, estas actividades se mantienen constantes, en la gráfica de absorbancia y sólidos solubles se puede observar una proyección de un área mayor de esta actividad para la enzima (PO), en la gráfica de pH y ABS hay un intervalo más largo antes de iniciar el descenso de la actividad para todas las enzimas analizadas.

Clave: Cacao, Fermentación, Enzimas

¹ Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado do Pará, adrianeferreiram@gmail.com

² Química Analítica, Universidade do Estado do Pará, maryuria12@hotmail.com

ABSTRACT

This paper presents the behavior of the enzymes polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (PO) and pectinamethylsterase (PME) extracted from cocoa beans during the process of conventional fermentation (f1) with a duration of seven days, equivalent to 168 hours and a projection of this behavior in the fermentation test with inoculum start (f2). The seed samples taken from the fermentation were monitored through parameters such as: temperature (° C), pH and Total Soluble Solids (° Brix), the analysis data were plotted in the R program. From the prospection of the enzymatic activity in fermentation (f2), it can be inferred that when reaching the peak of maximum temperature for all enzymes, these activities remain constant, in the graph of absorbance and soluble solids it is possible to observe a projection of a larger area of this activity for the enzyme (PO), in the graph for pH and ABS there is a longer interval before starting the decline of activity for all enzymes analyzed.

Keywords: Cocoa, Fermentation, Enzymes.

INTRODUÇÃO

Enzimas são também intituladas biocatalisadores, estes por sua vez, estão constituídos de unidades formadas por diversos aminoácidos interligados via cadeia longa, contendo um grupo amino básico e um grupo carboxílico ácido, o complexo enzimático (regenera) formando produto, a partir do substrato envolvido na reação, das ligações enzimáticas, as;; reações podem ser inibidas por ácido que possui estrutura semelhante ao substrato para competir pelo mesmo sítio ativo.

Essas enzimas são moléculas protéicas, entretanto, nem todas as matrizes protéicas são enzimas, são encontradas nos vegetais e microrganismos vivos e, possuem alta massa molecular uma vez que catalisam reações em sistemas biológicos, aumentando a velocidade de uma reação química, estão associadas a biomoléculas por conter elevado poder catalítico, atuando também como reagentes altamente especializadas, ou seja, participam da digestão, respiração, metabolismo e manutenção dos tecidos (BRASIL, 2011), (LIMA et al., 2001).

Dentre as aplicações industriais, envolvendo as enzimas, estas podem ser utilizadas na otimização de processos fermentativos, na modificação de alimentos e em outros processos industriais, possibilitando a obtenção de produtos com diferentes características físico-químicas e sensoriais (LIMA et al., 2001).

Nos alimentos, as enzimas poligalacturonase, ou desmetoxilação e pectinametilsterase (PME) catalisam reações que reduzem a consistência da polpa do cacau por despolimerização, as enzimas oxidativas, polifenoloxidase e peroxidase, degradam vitaminas e minerais que reduzem as propriedades vitamínicas das substâncias; A enzima ascórbico oxidase, atua quando o teor de vitamina C tende a diminuir durante o processo de estocagem de frutas e hortaliças minimamente processadas, devido ação das enzimas oxidantes (SKOOG et al., 2007).

O trabalho objetiva acompanhar o comportamento da atividade das enzimas

concomitante avaliação dos parâmetros de pH, sólidos solúveis e temperatura durante a fermentação do cacau convencional (f_1) e realizar uma projeção para a atividade enzimática na fermentação com inóculo prévio de leveduras (f_2) e com isso, identificar a existência de parâmetros ou melhores condições que contribuem para com uma ótima atividade enzimática.

REFERENCIAL TEÓRICO

As formas químicas de certos pigmentos são demasiadamente alteradas em condições que afetam a integridade estrutural do tecido destes antioxidantes naturais devido a fatores como: Exposição à luz, pH, Temperatura, Reações de oxidação (GAIO, 2016), (ANDRADE et al., 2018), (PALUDO; KRÜGER, 2011), (SANTI; BERGER; SILVA, 2014), (DOMINGUES, 2010).

“A produção de cacau do Pará é de 132 mil t/ano e atualmente é o maior produtor do Brasil” (“Líder nacional na produção de cacau, Pará ainda não é reconhecido pelo chocolate que produz | Pará | G1”, [s.d.]). “O termo *Theo* (Deus) *broma* (alimento) advém da lenda asteca que se refere ao fruto como um alimento dos deuses” (OETTERER; REGITANO-D’ARCE; SPOTO, 2006).

Os frutos de cacau fornecem a matéria prima para a elaboração do chocolate, produto altamente energético e mundialmente consumido Leite (2012); Cavalcante (2010); Maki (2006) o que faz deste fruto um dos mais ricos, dentre as inúmeras riquezas naturais da Amazônia.

O processo fermentativo aplicado nas sementes de cacau é antigo e tradicionalmente efetuado para produzir, conservar e/ou modificar o *flavor* desagradável, adstringente e amargo das amêndoas, característico da transformação tecnológica do cacau em chocolate e dos diversos outros produtos análogos do cacau (AMORIM, 2005), (PRADO et al., 2015), (SANTOS, 2010); (JUNIOR, 2016), (SERRA; MOUCHRECK; DARNET, 2016).

A degradação dos carboidratos que circunda a polpa mucilaginosa, inicialmente ocorre em anaerobiose, com a conversão da glicose em outros compostos orgânicos, expelindo subprodutos como álcool e CO_2 , pela ação incessante de microrganismos como leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas DIAZ (2016); LLERENA, 2016) (2016); (RAMÔA JÚNIOR (2011) acarretando inúmeras transformações bioquímicas, com o propósito de obtenção de energia na forma de ATP.

Entre os parâmetros que compõem e contribuem para o processo fermentativo está à temperatura, a acidez em que se encontram as sementes, o intervalo de tempo que desencadeia todo o processo e principalmente a capacidade de degradação das leveduras, juntamente com a microflora que constitui o ambiente em que o fruto é submetido (CRUZ, 2012).

O ambiente que favorece a fermentação está relacionado à presença de substratos formados pela contaminação com microrganismos endofíticos Maki (2006) contaminantes naturais da planta e fungos não causadores de danos ao hospedeiro (*Colletotrichum spp.*). Algumas espécies de microrganismos crescem e se proliferam, outras são mortas por conta da disputa por nutrientes, das condições ambientais do sistema o qual estão dispostas, do tipo de fermentação, e outros fatores como pH, temperatura, carboidratos, aeração, etc (MIGLIARI, 2001).

Durante todo o processo de beneficiamento das sementes, acontecem reações desejáveis para que ao final, as amêndoas desenvolvam o *flavor* convencional e peculiar do chocolate. Nas últimas etapas do processo estão a secagem e a torração, onde ocorre a reação de *Maillard* desencadeada pelas altas temperaturas.

A reação de *Maillard* é uma reação química de escurecimento não enzimático que envolvem várias etapas, e que tem início com a reação do amino grupo de aminoácidos, peptídeos ou proteínas com o grupo hidroxila envolvido na ligação glicosídica de açúcares redutores como glicose, maltose e lactose, e termina com a formação de pigmentos marrons chamados de melanoidinas. As melanoidinas são polímeros nitrogenados marrons de baixo peso molecular responsáveis pelo gosto, cor e aroma dos alimentos (NESPOLO et al., 2015).

Os efeitos do monitoramento preferencial na atividade enzimática com este estudo para as enzimas (PME), (PPO) e (PO) foram testados após leitura no espectrofotômetro onde, os resultados finais estiveram associados a certa atenuação para com os parâmetro ótimos das enzimas, nos ensaios da fermentação sem (f_1) e a projeção no ensaio com inóculo *start* (f_2), através da comparação das temperaturas, pH e SST durante o tempo medido nos dois ensaios, objetivando identificar na etapa do processo de fermentação do cacau quando as condições são mais favoráveis à atividade das enzimas.

METODOLOGIA

O trabalho apresenta análises quantitativas para a atividade enzimática quando monitorada em amostras de cacau. As sementes de cacau que serviram de amostras foram coletadas durante o intervalo do tempo de 7 dias, totalizando 168 horas de ensaio para a fermentação com inóculo (f_2) e sem inóculo *start* (f_1). As enzimas analisadas foram: polifenoxidase (PPO), pectinametilsterase (PME) e peroxidase (PO). O experimento e as análises foram realizadas no laboratório de Químicas na Universidade do Estado do Pará (UEPA).

Seleção dos frutos do cacau

Os frutos foram obtidos no mercado aberto, ver-o-peso, para seguir posteriormente com a higienização desses e dar início a fermentação e posterior preparo das soluções extratoras para seguir com as análises da atividade enzimática do cacau.

Caracterização da atividade enzimática

A atividade enzimática foi quantificada a partir dos extratos obtidos de amostras (polpa e sementes de cacau), anteriormente cominuídas, filtradas para iniciar o preparo das soluções analíticas extratoras, estas foram determinadas no início da fermentação (tempo zero), a cada 24 h (1º dia), 48 h (2º dia), 72 h (3º dia), 96 h (4º dia), 120 h (5º dia), 144 h (6º dia) e 168 h (7º dia) e comparadas com os parâmetros como: pH, realizado segundo métodos descritos por Lutz (2008) a concentração desses íons H⁺ mensurada é expressa através da leitura direta em pHmetro digital (QUIMIX), SST Sólidos Solúveis Totais (° Brix) efetuada em refratômetro de bancada Abbe, conforme normas da AOAC (2005) e temperatura mensurada com auxílio do (Digital Thermometer MINIPA MT - 450).

A extração prévia nas amostras das sementes de cacau ocorreram após filtração o vácuo, seguiram para a centrifugação dessa solução extratora e posteriormente as alíquotas desta solução são submetidas a leituras das absorvâncias requeridas por cada enzima específica em equipamento espectrofotômetro marca (METASH) (“ANÁLISES BIOQUÍMICAS Atividade Enzimática – Pectinmethylesterase (PME) Espectrofotometro”, [s.d.]).

Fermentações em fermentador sustentável

A fermentação das sementes do cacau foi realizada em um fermentador, composto de material isolante, folha de compensado e que contém um compartimento central, removível, com orifícios, preparado mediante a técnica do filetador em garrafas PETs para captar o exsudado do cacau resultante do processo fermentativo das amêndoas para que este subproduto da fermentação seja reaproveitado.

O processo fermentativo teve início com 1,835 kg de sementes, acondicionadas no fermentador, e essa etapa do beneficiamento do cacau seguiu sendo monitorado durante sete dias, realizando revolvimentos nos intervalos, seqüenciais: -0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 horas em que ocorreu a etapa.

Diariamente foram realizadas análises para o monitoramento da atividade enzimática concomitante a aferição da temperatura (°C), pH e sólidos solúveis totais (SST).

Enzima Pectina-Metilesterase (PME)

Solução extratora

Foram necessárias 10 g das amostras (polpa e sementes de cacau), cominuídas e filtradas à vácuo e, submetê-las como solução em erlenmeyer contendo 50 mL de cloreto de sódio NaCl a 8,8 %. Segue com a homogeneização desse extrato em agitador magnético, durante 1 hora em banho de gelo a temperatura mínima 4 °C (*ANÁLISES BIOQUÍMICAS Atividade Enzimática – Pectin Methylesterase (PME) Espectrofotômetro, n.d.*).

Preparo do substrato – Ativar as enzimas

A solução para ativar as enzimas Pectinametilesterase (PME) utilizada é o azul de Bromotimol a 0,01 % e, a solução de 0,5 g de pectina em 100 mL de água destilada.

Determinação da atividade da Pectina-Metilesterase (PME)

Em triplicata, utilizando tubos de ensaios grandes foram adicionados 0,16 mL do extrato prévio (cacau e tampão), mais 1,0 mL de pectina cítrica a 0,5 %, mais 0,3 mL da solução de azul de bromotimol a 0,01 % e 0,4 mL de NaCl (cloreto de sódio) a 1 M.

Em seguida realizou-se o aquecimento dos tubos com o substrato acondicionando estes em um Becker grande sob chapa aquecedora a temperatura 80 ° C durante o tempo 1 min, os tubos seguiram para o repouso por 9 min e alíquotas foram direcionadas em cubetas para iniciar as leituras das absorbância no comprimento de onda em 620 nm (*ANÁLISES BIOQUÍMICAS Atividade Enzimática – Pectinmethylestearase (PME) Espectrofotometro, n.d.*).

Polifenoloxidase (ppo) e Peroxidase (po)

Solução extratora

As enzimas foram extraídas de acordo com os métodos descritos por LIMA et al., (2001) com modificações, para isso foi preciso pesar 10 g das amostras e acondicioná-las em erlenmeyer contendo 40 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,0.

O extrato preparado foi direcionado a centrífuga durante 40 min, retira-se o suspenso para realizar a leitura no espectro OKTAY et al, e LIMA (1995, 1999 apoud (PAZ, 2010), (“ANÁLISES BIOQUÍMICAS Atividade Enzimática – Pectinmethylestearase (PME) Espectrofotometro”, [s.d.]).

Preparo do substrato (PPO) – Ativar as enzimas

O método para o meio de reação que ocorre entre enzima/substrato (E/S) inicia após inserir nos tubos de ensaio, em triplicata, 1,7 mL de solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 6, mais 1,2 mL do catecol 0,4 % e 0,1 mL de extrato contendo a enzima em volume final de máximo 3,0 mL.

Determinação da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO)

Os tubos de ensaio contendo o substrato para as enzimas são direcionados a um agitador magnético seguido da estabilização desses para iniciar a introdução desta solução nas cubetas para iniciar com a leitura no equipamento.

O branco é constituído por uma solução contendo 2,9 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0, mais 0,1 mL do extrato. A atividade da enzima (PPO) foi determinada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S50) medindo-se o aumento da absorbância a 420 nm.

Preparo do substrato (PO) – Ativar as enzimas

Em um tubo de ensaio grande foi adicionado 1,5 mL de guaiacol a 1 %, mais 1,2 mL de solução tampão fosfato 0,1 M com pH 6,0, mais 0,1 mL do extrato previamente preparado e 0,4 mL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) a 0,4 %.

Determinação da atividade da enzima peroxidase (PO)

A atividade enzimática para a (PO) foi medida com leituras espectrofotométricas de absorbâncias em 470 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 de absorbância por minuto por grama de amostra (LIMA et al., 2001).

A solução branco utilizada nesta é constituída da mesma forma que o preparo do extrato, no entanto, não contém peróxido. A atividade da (PO) foi determinada medindo-se o aumento da absorbância a 470 nm. O cálculo abaixo foi utilizado para a atividade enzimática.

$$\frac{U}{mL} = A \times FD \times 1000 \div E \times Ve \times T$$

Onde A é a absorbância, FD o Fator de Diluição, E é a absorbância das enzimas (PPO = 26.9/ PO = 26.6), Ve é o volume utilizado e T o tempo de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividades enzimáticas na Fermentação do cacau

As enzimas são consideradas moléculas biológicas, porque atuam na catálise de reações para digerir alimentos, enviar sinais nervosos ou contrair músculos que não ocorrem na velocidade adequada sem catálise enzimática (NELSON; COX, 2014).

As Tabelas 01 e 02 apresentam os resultados dos parâmetros para a temperatura, o pH e para os sólidos solúveis totais °Brix monitorados durante as duas fermentações do cacau. Através destas tabelas pode-se inferir que na tabela 02 há um pico no aumento da temperatura logo com 24 horas de fermentação para a fermentação (f₂) com relação a tabela 01 que apresenta o pico de temperatura apenas após 48 horas.

Tabela 01: Parâmetros monitorados durante a fermentação (f₁).

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	pH	SST* (° Brix)
0	29	4,2	20
1	30	3,89	6
2	39	4,56	3
3	38	3,91	2
4	38	4,11	2
5	38	4,58	2
6	31	4,66	2
7	31	5,26	1

Legenda: *Sólidos Solúveis Totais. **Fonte:** Própria (2021).

Ao final da fermentação as sementes alcançaram o valor de pH alto, entretanto, com relação aos resultados das tabelas, as sementes do ensaio (f₂) obteve o maior pH. Quanto aos valores para sólidos solúveis totais, houve rápido consumo destes açúcares em ambos ensaios (f₁) e (f₂).

Tabela 02: Parâmetros monitorados durante a fermentação (f₂).

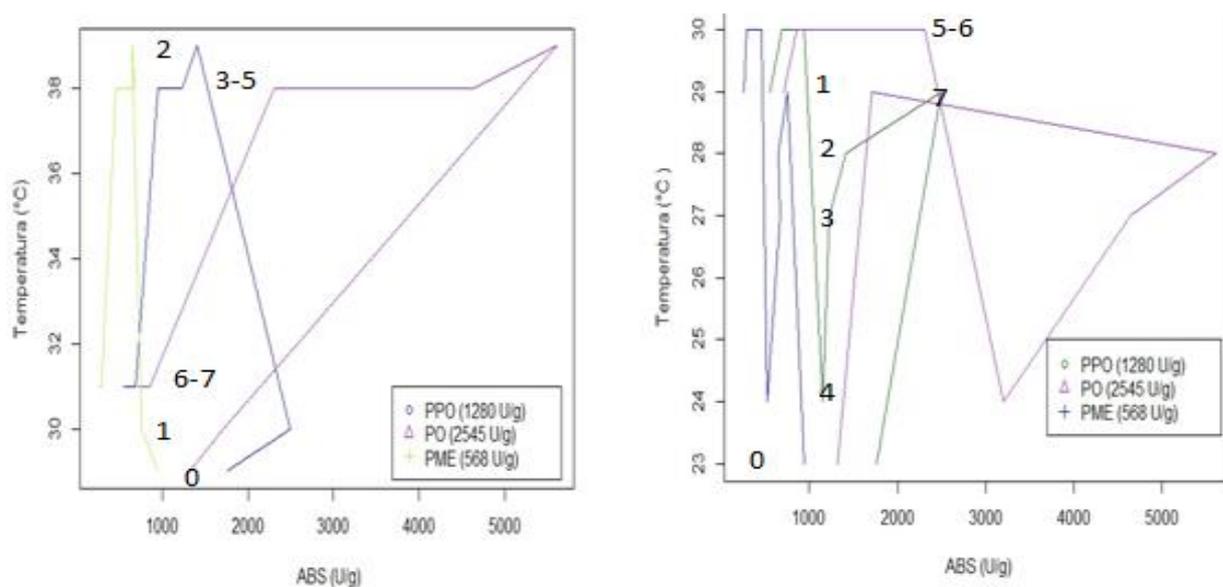
Tempo (dias)	Temperatura (°C)	pH	SST* (° Brix)
0	23	5,02	16
1	29	4,71	10
2	28	5,42	2,5
3	27	4,70	1
4	24	5,32	1
5	30	5,30	0
6	30	5,19	0
7	29	6,30	0

Legenda: *Sólidos Solúveis Totais. **Fonte:** Própria (2021).

A atividade enzimática foi determinada quantitativamente apenas no ensaio da fermentação (f_1) as figuras que expressam os resultados para a atividade enzimática na fermentação (f_2) é apenas uma projeção a partir dos parâmetros monitorados durante o ensaio, de forma a simular o possível comportamento da atividade destas enzimas para a fermentação utilizando inóculo leveduriformes.

De acordo com os resultados descritos na figura 01 abaixo, a respeito do efeito da temperatura monitorada nos ensaios das fermentações sem inóculo (f_1), e com inóculo start (f_2), respectivamente, há atividade para todas as enzimas analisadas desde o estágio inicial da fermentação, onde o pico máximo foi no terceiro dia quando a temperatura atingiu 39 °C no ensaio (f_1) e no quinto dia quando a temperatura atingiu 30 °C no ensaio (f_2).

Figura 01 – Temperatura e ABS (absorbância) da atividade enzimática no ensaio monitorado da fermentação (f_1) e (f_2).



Fonte: Própria (2021).

A tabela 03 apresenta os resultados para a atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase analisadas após extração das amostras coletadas durante os sete dias de fermentação, para a polifenoloxidase (PPO) a maior atividade (2497 U/g) ocorreu no primeiro dia, com a temperatura a 30° C, a enzima (PO) alcançou absorbância máxima no segundo dia de fermentação, atingiu (5608 U/g), quando o pH das sementes estavam a 4.5 FLURKEY; JEN (1978) apresentou atividade polifenoloxidase (900 U/g) na semente de cacau SAKHAROV; ARDILA (1999) relataram que a amêndoa e a casca de cacau apresentaram atividade da Peroxidase de (5.700 U/g).

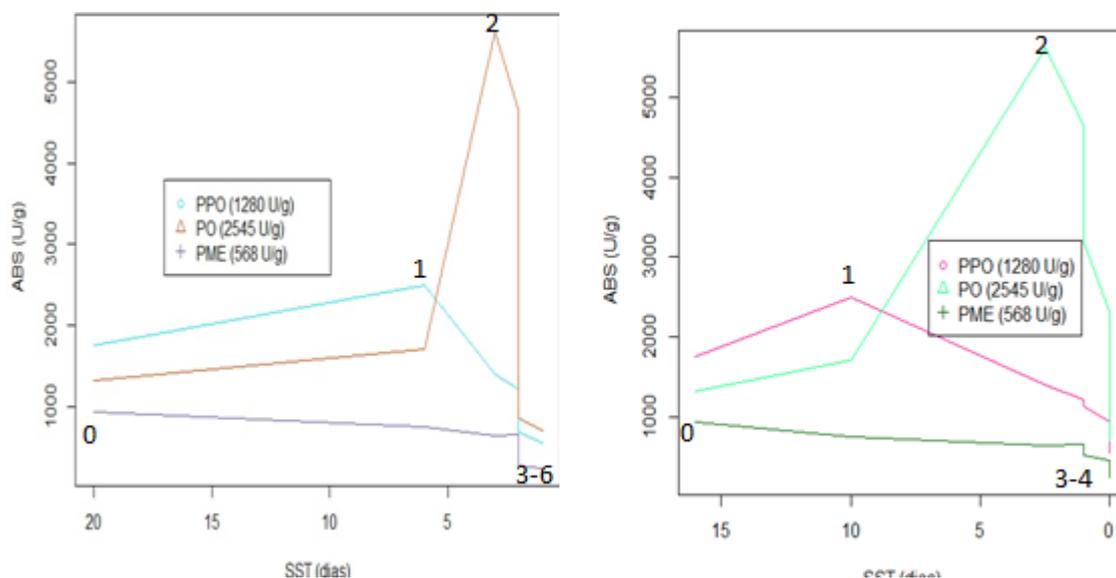
Tabela 03: Análise Quantitativa das Enzimas (PPO), (PO) e (PME) durante o ensaio da Fermentação (f_1)

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	pH	PPO (U/g)	PO (U/g)	PME (U/g)
0	29	4,2	1765	1322	946
1	30	3,8	2497	1708	756
2	39	4,5	1412	5608	646
3	38	3,9	1228	4639	673
4	38	4,1	1151	3198	526
5	38	4,5	945	2312	459
6	31	4,6	692	860	287
7	31	5,2	554	716	256

Fonte: Própria (2021).

A figura 02 abaixo apresenta a relação da atividade enzimática e a quantidade de sólidos solúveis das sementes que iniciam com 20 e 16° Brix, respectivamente, chegando ao final do processo com 1 e 0° Brix, onde as enzimas pectinases hidrolisam ligações glicosídicas ao longo da cadeia de pectina, sendo este o principal carboidrato contido na polpa que possui características de mucilagem que envolve as sementes de cacau produzindo ácidos monogalacturônicos (DOMINGUES, 2010).

Figura 02 – Relação dos SST e a ABS da atividade enzimática no ensaio da fermentação (f_1) e (f_2).



Fonte: Própria (2021).

A atividade máxima para pectina-metilesterase durante a etapa da fermentação, foi no primeiro dia (946,0 U/g), a partir do quarto dia, a atividade dessas enzimas reduziram pois estas enzimas atuam na desintegração desta massa de cacau, tornando-se pegajosa, por isso a atividade da enzima (PME) tende a decair logo após 48 horas de fermentação pois a consistência da massa das sementes já não é a mesma que iniciou o processo de degradação.

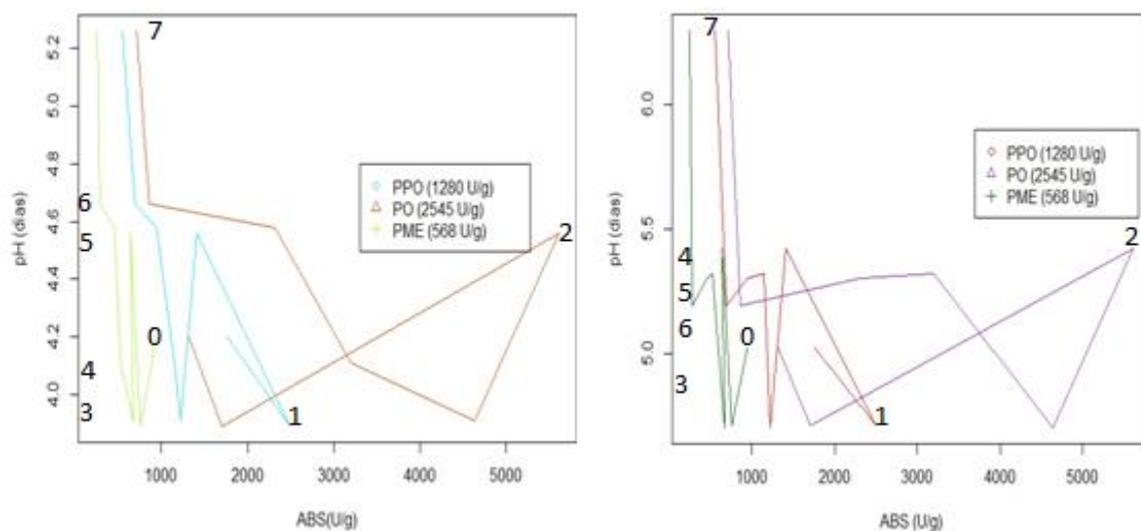
O resultado quantitativo apresentado para esta enzima foi maior que o exposto por

PINTO et al., (2013) que encontrou o valor máximo para (PME) no 30º dia de armazenamento para os mamões foi de (365,42 U/mL).

A enzima (PPO) está envolvida na descoloração das antocianinas (Aa), atuam na presença de O-difenol e O₂ oxidando as antocianinas. Durante a fermentação do cacau as amêndoas de estão submetidas a esse efeito ocasionado pelas enzimas (PO) e (PPO), onde estas aceleram o processo de pigmentação das sementes, acentuando a coloração marrom das amêndoas e conseqüentemente havendo oscilação do pH das sementes como mostra a figura 03.

As sementes apresentaram oscilações no pH durante a fermentação (f₁), onde o menor valor de 3,8 foi encontrado no primeiro dia de fermentação e o maior 5,2 no último, na fermentação (f₂) o menor valor para o pH 4,70 foi no terceiro dia e o maior 6,30 no último dia.

Figura 3 – Relação do pH e a ABS das atividades enzimáticas no ensaio com a fermentação (f₁) e (f₂).



Fonte: Própria (2021).

A enzima peroxidase (PO) está relacionada com o aparecimento de sabores estranhos nos alimentos, sendo que a atividade ótima desta enzima se encontra em pH 4,5 (ARAÚJO, 1999). Após o terceiro dia a massa das sementes do cacau apresentam odor intenso de ácidos, resultante da decomposição dos carboidratos envolvidos na composição química da polpa das sementes e ação das enzimas (PPO) e (PO).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados para a temperatura na atividade enzimática durante a etapa de fermentação (f₁) e (f₂) indicam que as enzimas permanecem com sua atividade por mais tempo na (f₂) ao atingir o pico de máxima temperatura, portanto, pode-se inferir que a fase estacionária dessas

enzimas na fermentação start (f_2) é maior que na fermentação convencional (f_1).

No gráfico para sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix) percebe-se uma área mais pronunciada no ensaio para a fermentação (f_2) para a atividade da enzima peroxidase e, não houve diferença perceptível para a atividade enzimática com relação ao pH nos dois ensaios para a fermentação do cacau.

A partir dos resultados apresentados com este estudo, sugere-se realizar a atividade enzimática em extratos provindos dos ensaios na fermentação com adição de inóculo start para confirmar que há o melhoramento no desempenho da atividade enzimática na fermentação melhorada com relação à fermentação convencional.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. DE. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba: [s.n.]. Análises BIOQUÍMICAS Atividade Enzimática – Pectinmethylesterase (PME) Espectrofotômetro, 2005.
- ANDRADE, A. S. A. DE et al. Estudo Da Produção De Enzimas Pectinolíticas E Celulolíticas Por Fermentação Em Estado Sólido a Partir Do Study of Production of Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes By Solid State Fermentation Using As Substrate Caja Bagasse. REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA ONLINE, v. 7, p. 457–472, 2018.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18. ed. USA: [s.n.], 2005.
- ARAÚJO, J. M. DE A. Química de alimentos: teoria e prática. 2. ed. Viçosa: [s.n.], 1999.
- BRASIL, F. I. Enzimas: natureza e ação nos alimentos. www.revista-fi.com, v. 11, p. 26–37, 2011.
- CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis na Amazônia. 7. ed. Belém, PA: Museu Paraense Emílio Goeldi: [s.n.].
- CRUZ, J. Caracterização das sementes de variedades de cacau Theobroma cacao L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. [s.l.] Universidade federal da bahia faculdade, 2012.
- DIAZ, A. M. Sucessão microbiana durante a fermentação espontânea do cacau para caracterização e isolamento de linhagem starter. [s.l.] Universidade estadual de santa cruz, 2016.
- DOMINGUES, E. S. Seleção de linhagens de leveduras pectinolíticas para fermentação de sementes de cacau (Theobroma cacao). [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.
- FLURKEY, W. H.; JEN, J. J. Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities in Developing Peaches. Journal of Food Science, v. 43, n. 6, p. 1826–1828, 1978.
- GAIO, I. Avaliação da atividade e estabilidade de pectinases comerciais imobilizadas e

submetidas ao tratamento com gás liquefeito de petróleo. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

JUNIOR, G. C. A. C. Isolamento e identificação molecular de populações de leveduras presentes na fermentação do cacau da Amazônia brasileira. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2016.

LEITE, P. B. Caracterização de chocolates provenientes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L resistentes à vassoura de bruxa. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2012.

Líder nacional na produção de cacau, Pará ainda não é reconhecido pelo chocolate que produz | Pará | G1. Disponível em: <<https://g1.globo.com/pa/para/noticia/2019/04/20/lider-nacional-na-producao-de-cacau-para-ainda-nao-e-reconhecido-pelo-chocolate-que-produz.ghtml>>. Acesso em: 9 maio. 2021.

LIMA, E. D. P. D. A. et al. Obtenção e utilização da enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) Madura no melhoramento do sabor do cacau (*Theobroma cacao* L.). Revista Brasileira de Fruticultura, v. 23, n. 3, p. 709–713, 2001.

LLERENA, W. F. T. Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao: (*Theobroma cacao* L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51. [s.l: s.n.], 2016.

LUTZ, I. A. Métodos físico-químicos para análise de Alimentos. IV Edição ed. São Paulo: [s.n.], 2008.

MAKI, C. S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). [s.l.] Universidade de São Paulo Escola, 2006.

MIGLIARI, P. C. Classificação das cepas de leveduras dominantes de processos fermentativos utilizando parâmetros fermentativos e taxonomia numérica. [s.l.] Universidade estadual de Campinas, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª ed. [s.l: s.n.], 2014.

NESPOLO, C. R. et al. Práticas em Tecnologia de Alimentos. 1ª ed. Porto Alegre: [s.n.], 2015.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO. Fundamentos de Ciências e Tecnologia de Alimentos. 1º ed. [s.l: s.n.], 2006.

PALUDO, M. C.; KRÜGER, R. L. Ação Da Enzima Pectinase Na Extração Do Suco De Jaboticaba. Arquivos de ciências da saúde da UNIPAR, v. 15, n. 3, p. 279–86, 2011.

PAZ, J. C. S. N. Caracterização bioquímica da polifenoloxidase e da peroxidase de ameixa rubimel, polpa de cacau e estudo do efeito de agentes anti-escurecimento. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2010.

PINTO, L. K. D. A. et al. Avaliação da atividade das enzimas pectina metilesterase e β -galactosidase em mamões cv. Golden armazenados sob diferentes concentrações de oxigênio 1 activity of pectin methylesterase and β -galactosidase enzymes in “golden” papaya stored under different. Revista Brasileira de Fruticultura, n. 1, p. 015–022, mar. 2013.

PRADO, F. C. et al. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, v. 12, p. 489–497, 1 jan. 2015.

RAMÔA JÚNIOR, A. G. A. Polifenólicos E Enzimas Oxidativas Na Fermentação. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2011.

SAKHAROV, I. Y.; ARDILA, G. B. Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. *Food Chemistry*, v. 65, p. 51–54, 1999.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. DA. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Caderno pedagógico*, n. 1, p. 130–139, 2014.

SANTOS, D. S. Inoculação de leveduras starters na fermentação do cacau para melhoria do flavor. [s.l.] Universidade estadual de santa cruz, 2010.

SERRA, J. L.; MOUCHRECK, A. N.; DARNET, S. Quantificação de leveduras associadas à fermentação de cacau no estado do Pará. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos Alimentação: a árvore que sustenta a vida. X CIGR Section IV International Technical Symposium Food: the three that sustains life, p. 6, 2016.

SKOOG, D. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8^o ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2007.