



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

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

**CRISTIANO TIAGO SILVA DE SANTANA**

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

**CRISTIANO TIAGO SILVA DE SANTANA**

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

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

Área de concentração: Biotecnologia  
e Genômica

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

CRISTIANO TIAGO SILVA DE SANTANA

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

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

Área de concentração: Biotecnologia  
e Genômica

APROVADO: 31 de janeiro de 2013.

Profa. Dra. Carla Cristina Romano  
UESC

Prof. Dr. Marco Gilberto Cardoso Costa  
UESC

Profa. Dra. Carolina Schaper Bizzotto  
Centro Mars de Ciência do Cacau

Profa. Dra. Rachel Rezende Passos  
Orientadora - UESC

S232

Santana, Cristiano Tiago Silva de.

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

79f. : il. ; anexos.

Orientadora: Rachel Rezende Passos.

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

Referências: f. 55-66.

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

CDD 634.6

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

**DEDICO**

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

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os momentos da minha vida.

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

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Raquel Passos Rezende, pelos valiosos momentos de ensinamentos.

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

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

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

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

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

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

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

## EXTRATO

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

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

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



## EXTRACT

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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

## LISTA DE TABELAS

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

## LISTA DE ANEXOS

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

## ÍNDICE

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

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