

ALINE APARECIDA POSSIGNOLO

**Perfil protéico de sementes de acessos de cacauero no desenvolvimento do
sabor de chocolate**

Piracicaba

2010

ALINE APARECIDA POSSIGNOLO

**Perfil protéico de sementes de acessos de cacauero no desenvolvimento do
sabor de chocolate**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de
Oliveira Figueira**

Piracicaba

2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Possignolo, Aline Aparecida

Perfil protéico de sementes de acessos de cacauzeiro no desenvolvimento do sabor de chocolate / Aline Aparecida Possignolo; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2010.

116 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise sensorial de alimentos 2. Biologia molecular vegetal 3. Cacau
4. Genótipos 5. Proteínas I. Título

CDU 633.74:581.134

*Aos meus pais José Mauro e Neusa e ao meu namorado Neto, pelo amor, paciência e pela
confiança depositada em mim*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e por toda a luz;

Ao prof. Dr. Antonio Figueira, pela orientação, pelos ensinamentos valiosos e crescimento científico proporcionado;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela oportunidade, pela confiança e por abrir as portas do seu laboratório;

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, por abrir as portas do seu laboratório;

A Dra. Adriana Franco Paes Leme do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, por ter me recebido em seu laboratório de Espectrometria de Massas;

Aos amigos Alexander de Andrade, Eder da Costa Santos e José Matheus Camargo Bonatto, parceiros durante essa caminhada. Obrigado por suas amizades e por me ajudarem nas dificuldades encontradas durante a elaboração desse trabalho;

Ao Dr. Renato Rodrigues Ferreira pela colaboração durante a elaboração desta dissertação;

Aos secretários da Pós-Graduação do CENA/USP: Cláudia Corrêa, Neuda Oliveira, Sônia de Campos e Fábio Oliveira; e a bibliotecária Marília Henyei;

Aos técnicos Wlamir Godoy, Eduardo Fonseca e Raquel Orsi pela amizade e cooperação;

A Fazenda Almirante, *Mars Center for Cocoa Studies* por disponibilizar os frutos de *Theobroma cacao*;

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de estudo;

Aos meus pais José Mauro e Neusa pelo carinho, amor e apoio em todos os momentos;

Ao meu namorado Angelo Schiavinato Neto, por tanto amor, compreensão, conforto e alegrias sempre;

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Cláudio, Danielle, Déborah, Eduardo B., Gildemberg (Jupará), Ilse, Juliana, João Felipe, João Fernando, Laís, Layanne, Lorena, Mariana, Mariele, Marielle, Paula, Raul, Onildo, Tais e Verusca;

Aos integrantes do Laboratório Max Feffer: Fernanda, Ilara, Juliana, Thiago, Luis Felipe, Felipe, David, Danielle, Ed, Mônica, Juliano, Lívia, Gabriela, Simone, Palmira, Ivan.

RESUMO

POSSIGNOLO, A. A. Perfil protéico de sementes de acessos de cacau no desenvolvimento do sabor de chocolate. 2010. 116f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

O típico sabor de chocolate é único, obtido somente de sementes fermentadas, secas e torradas de cacau, não podendo ser sintetizado artificialmente. O desenvolvimento desse sabor é influenciado pela constituição genética das sementes, processamento pós-colheita e manufatura. Proteínas dos cotilédones são potencialmente precursores do sabor e aroma de chocolate. O presente trabalho teve como objetivo analisar diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas de sementes de três genótipos de *Theobroma cacao* após a colheita e durante a fermentação, de forma a correlacionar estes resultados com diferenças na qualidade (sabor e aroma) obtidas por análise sensorial. Um dos desafios foi o isolamento de proteínas das sementes, evitando o alto teor de polifenóis e polissacarídeos que interferem na separação das proteínas e na análise do proteoma. A metodologia de extração composta por filtração em Miracloth, solubilização e precipitação em ácido ticloroacético (TCA) apresentou géis de maior resolução e repetibilidade, tendo sido escolhida como metodologia de extração protéica para estudo das alterações no proteoma das sementes de cacau durante a fermentação. Foi necessária também a utilização de kit comercial de purificação de proteínas e utilização de método de coloração com nitrato de prata para garantir géis com resolução dos *spots* e repetibilidade satisfatórias. Os *spots* foram isolados e após digestão trípica, submetidos ao sequenciamento por cromatografia líquida associado ao espectrômetro de massas. Os espectros foram analisados pelo programa MASCOT MS/MS *Ion Search*, utilizando bancos de dados do NCBI. Análises dos mapas 2-D mostraram variação no número de *spots* entre as variedades. Ao final da fermentação, as proteínas ainda presentes nas sementes das variedades SIAL 70 e Catongo eram ácidas, e o processo de degradação foi caracterizado pelo desaparecimento de quase todas as proteínas neutras ou básicas e também de algumas proteínas ácidas; as proteínas com massa molar acima de 35 kDa também foram todas degradadas. Na variedade CCN 51, não ocorreu o mesmo perfil degradativo, havendo proteínas até pI 6,5 e massa molar acima de 100 kDa. Dos cem *spots* submetidos ao sequenciamento, 89 foram identificados. As proteínas 21kDa e vicilina foram as proteínas mais abundantes nos cotilédones. Correlacionando os resultados da análise sensorial e a proteômica concluiu-se que existe correlação tanto quantitativa como qualitativa das proteínas dos cotilédones de cacau e possivelmente com as proteínas precursoras de sabor de chocolate.

Palavras-chave: Cacau. Precursores de sabor. Proteoma. Degradação protéica. Análise sensorial.

ABSTRACT

POSSIGNOLO, A. A. Proteic profile from different accessions of cocoa seeds on the chocolate flavor development. 2010. 116f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Typical chocolate flavor is unique, only obtained from fermented, dried and roasted cocoa seeds, and can not be synthesized artificially. The flavor development is influenced by the genetic constitution, post-harvest processing and manufactures. Cotyledons proteins are believed to be the precursors of the chocolate flavor. The aim of the present work was to analyze qualitative and quantitative protein differences in seeds of three cocoa genotypes after harvesting and during the fermentation and to correlate these results with differences in quality (flavor and aroma) obtained by sensorial evaluation. One of the challenges was the isolation of proteins from cocoa seeds, avoiding the high content of polyphenols and polysaccharides which disturb protein separation and proteome analysis. The methodology of extraction by filtration in Miracloth, solubilization and precipitation in trichloroacetic acid showed the highest gel resolution and reproductivity, and, thus, was chosen to be used in the analyses of the proteome of cocoa seeds during the fermentation. It was also necessary to use commercial kit for protein purification and a silver-based staining method with nitrate to guarantee gels with spots resolution and satisfactory reproducibility. Proteins were excised from de gels and after tryptic digestion, MS analysis was conducted by on line chromatography using a Cap-LC coupled to a mass spectrometer. The spectra were processed using MASCOT MS/MS Ion Search, and the sequences searched against NCBI databases. The 2-DE maps analysis of cocoa seeds showed significant variation of the spots number among the genotypes. At the end of fermentation, proteins still present in the Sial 70 and Catongo genotypes were acid and the degradation process was characterized by the disappearance of almost all the neutral or basic proteins and also some acid proteins. The genotype CCN 51 did not show the same degradation profile. Of the spots submitted to the mass spectrometer, 89 were identified. The 21kDa protein and vicilin were the most abundant proteins in the cocoa cotyledons. Correlating sensorial analysis and the proteomic results we could observe the existence of quantitative as qualitative correlation of proteins from cocoa cotyledons and possibly with the precursors proteins of chocolate flavor.

Key-words: Cocoa. Flavor precursors. Proteome. Protein degradation. Sensorial evaluation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AMBIC	Bicarbonato de amônio
BSA	Albumina de soro bovino
CHAPS	Chloroamidopropyl dimethylammonio propano sulfonate
dpi	Pontos por polegada (<i>dots per inch</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EST	Etiqueta de sequência expressa (<i>Expressed Sequence tag</i>)
HNO ₃	Ácido nítrico
HPAE-PAD	<i>High Performance Anion Exchange- Pulsed Amperometric Detection</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	Gradiente imobilizado de pH
kDa	kiloDaltons
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LTQ	Quadrupolo triplo linear
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption ionization</i>
MS	Espectrometria de massas
pI	Ponto isoeletrico
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
psi	Libra por polegada quadrada; unidade de pressão no sistema inglês/americano
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TOF	<i>Time-of-flight</i>

TFA	Ácido trifluoroacético
V.h	Volts hora
2-DE	Eletroforese bidimensional

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Importância econômica do gênero <i>Theobroma</i>	15
2.2 O cacaueteiro	15
2.2.1 Grupos genéticos	16
2.2.2 Composição das sementes	16
2.3 Desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate	19
2.4 Proteínas de sementes de <i>T. cacao</i>	21
2.5 Efeito denotípico no desenvolvimento de sabor	24
2.6 Análises de perfis de proteínas por abordagem proteômica	27
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material vegetal	29
4.2 Preparação das sementes para extração de proteínas	31
4.3 Extração das proteínas de semente	31
4.3.1 Metodologia 1: Precipitação em solução de ácido tricloroacético	32
4.3.2 Metodologia 2: Extração em tampão fenol e precipitação em acetato de amônio	32
4.4 Solubilização das proteínas extraídas e quantificação	33
4.5 Purificação utilizando kit comercial	33
4.6 Focalização isoeletrica (IEF)	33
4.7 Segunda Dimensão (SDS-PAGE)	34
4.8 Extração e resolução da proteína total em SDS-PAGE	35
4.9 Coloração com <i>Coomassie Brilliant Blue G 250</i>	35
4.10 Revelação com nitrato de prata	36
4.11 Obtenção e análises das imagens	36
4.12 Obtenção de extratos peptídicos	37
4.13 Fracionamento e análise dos peptídeos	37
4.14 Análise dos espectros de massa e Identificação de proteínas	38
4.15 Quantificação dos Flavonols	38
4.16 Análise sensorial	38

4.16.1: Preparação dos líquors	38
4.16.2: Análise sensorial	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Experimento de fermentação na Fazenda Almirante, <i>Mars Center for Cocoa Studies</i>	40
5.2 Seleção de metodologia de extração de proteínas de cotilédones de <i>Theobroma cacao</i> para utilização em sistemas de eletroforese bidimensional	41
5.3 Avaliação da degradação protéica por SDS-PAGE durante a fermentação	45
5.4 Variação no conteúdo de proteínas e caracterização dos mapas protéicos	46
5.4.1 Análise das proteínas totais das sementes dos genótipos de <i>T. cacao</i> durante a fermentação	47
5.4.1.1 SIAL 70	47
5.4.1.2 Catongo	50
5.4.1.3 CCN 51	53
5.4.2 Análise dos genótipos de <i>T. cacao</i> em cada momento da fermentação	56
5.4.2.1 Sementes frescas	56
5.4.2.2 Após 72 horas de fermentação	60
5.4.2.3 Após 120 horas de fermentação	64
5.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massas	68
5.5.1 Identificação das proteínas comuns aos três genótipos em sementes frescas	71
5.5.2 Identificação das proteínas exclusivas aos três genótipos em sementes frescas	75
5.5.2.1 Spots exclusivos de sementes de SIAL 70	75
5.5.2.2 Spots exclusivos de sementes de Catongo	88
5.5.2.3 Spots exclusivos de sementes de CCN 51	90
5.5.2.4 Spots exclusivos dos genótipos Catongo e CCN 51	92
5.6 Determinação de flavanols em sementes de <i>T. cacao</i> durante a fermentação	95
5.7 Análise sensorial	96
6. CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	102
ANEXOS	113

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Theobroma* é um dos mais importantes da família Malvaceae *sensu lato*, devido à relevância econômica do cacauero, *Theobroma cacao* L. As sementes do cacauero consistem na única fonte de manteiga de cacau e sólidos (líquor), matérias-primas fundamentais da indústria de chocolates, confeitos e cosméticos (MENEZES; CARMO-NETO, 1993). O cacau é uma importante *commodity*: mais de 20 milhões de pessoas dependem diretamente do cacau para a sua subsistência, e cerca de 90% da produção é exportada sob a forma de amêndoas ou derivados de cacau semimanufaturados para a Europa e Estados Unidos (FAO, 2010).

O típico sabor ou aroma de chocolate é único e exclusivo, obtido somente de sementes fermentadas, secas e torradas de *T. cacao*, não podendo ser sintetizado artificialmente. O desenvolvimento desse aroma é influenciado pela constituição genética das sementes, processamento pós-colheita (fermentação e secagem) e manufatura (torração). O sabor de chocolate é desenvolvido na etapa da fermentação e torração. As proteínas existentes nos cotilédones são supostamente um dos precursores do sabor de chocolate. As sementes de *T. cacao* apresentam de 15 a 20% de proteínas em peso seco (BIEHL; WEWETZER; PASSERN, 1982; SPENCER; HODGE, 1991). A fração albumina representa a maior porcentagem (52%), enquanto que a fração de globulina representa 43% (VOIGT; BIEHL; KAMARUDDIN, 1993).

Vários estudos têm sido conduzidos para identificar as proteínas de sementes de cacau, das quais derivam os precursores do aroma de chocolate. Este aroma foi obtido quando a classe vicilina (7S) da globulina foi degradada sucessivamente pela endoprotease aspártica e pela carboxipeptidase, e os produtos subsequentes resultantes da proteólise passaram pela etapa de torrefação, na presença de açúcares redutores e manteiga de cacau desodorizada (VOIGT; BIEHL, 1995; LERCETEAU et al., 1999).

O genótipo também influencia tanto a qualidade do sabor quanto a intensidade do chocolate, pois possivelmente determina a quantidade de precursores e atividade das enzimas proteolíticas e assim contribui para a formação do sabor (TAYLOR, 2002; LUNA et al., 2002; COUNET et al., 2004; TAYLOR; ROBERTS, 2004).

A proteômica é o estudo sistemático de um proteoma, ou seja o conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo numa condição biológica específica (WASINGER et al., 1995), que permite avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas que atuam no

metabolismo celular (PARK, 2004; CHEN; HARMON, 2006). Conseqüentemente, a identificação de proteínas expressas durante o desenvolvimento vegetal permite a caracterização de diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos das plantas (KORMUTAK et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo analisar diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas de sementes de três genótipos de *Theobroma cacao* após a colheita e durante a fermentação, de forma a correlacionar, por análise sensorial dos produtos, estes resultados com diferenças na qualidade do sabor e aroma de chocolate.

Os resultados gerados pela abordagem proteômica e pela análise sensorial poderão fornecer mais informações sobre o efeito genotípico nos precursores de sabor de chocolate. Portanto, a hipótese deste trabalho é que diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas de sementes de cacau influenciam no desenvolvimento dos precursores de sabor de chocolate, sendo conseqüentemente relacionadas ao perfil do sabor e aroma de chocolate.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância econômica do gênero *Theobroma*

Theobroma é um dos gêneros de maior importância da família Malvaceae *sensu lato* (BAYER et al., 1999), devido à relevância econômica do cacauzeiro, *Theobroma cacao* L. (PURSEGLOVE, 1968). O gênero possui 22 espécies (CUATRECASAS, 1964), sendo que *T. grandiflorum* (cupuaçu), *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. bicolor*, *T. cacao*, *T. glaucum* e *T. canumanense*, estão representadas no Brasil (CUATRECASAS, 1964; SILVA; FIGUEIRA, 2005). As espécies *T. grandiflorum* e *T. cacao* são as únicas cultivadas comercialmente (SILVA; FIGUEIRA; SOUZA, 2001). O cacau tem importância econômica no contexto internacional por ser um *commodity* de participação relevante no comércio mundial de produtos agrícolas, tanto em importações quanto exportações (GUYTON, 2003). As sementes do cacauzeiro constituem a única fonte de manteiga de cacau e de sólidos (líquor), matérias primas fundamentais da indústria de chocolates e confeitos, farmacêutica e cosmética (PIRES et al., 1998). Sua amêndoa é insubstituível na fabricação de produtos como chocolates e confeitos (SILVA; FIGUEIRA, 2005).

A produção de cacau no mundo é estimada para safra 2009/2010 de 3,6 milhões de toneladas (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2010), cultivadas por entre 3 a 4 milhões de agricultores. Nos últimos 100 anos, o aumento anual da demanda por cacau foi de 3% ao ano (WORLD COCOA FOUNDATION, 2009).

2.2 O cacauzeiro

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta nativa das matas equatoriais da região amazônica. O nome da planta é de origem asteca: *cacahuatl* (cacau) ou *cacahuaquahuitl* (cacauzeiro); o nome chocolate vem da bebida, *tchocoatl*, de origem maia, que já era consumida há mais de três mil anos (LAJUS, 1983; EFRAIM, 2004). A partir das flores pequenas, avermelhadas, inodoras, unidas ao tronco, se originam os frutos, que medem até 25cm de comprimento. Quando maduros, adquirem tonalidade alaranjada ou amarela (dependendo do genótipo). Os frutos (bagas) contêm até cinquenta sementes envoltas por uma polpa mucilaginosa. O cacauzeiro pode viver mais de cem anos, começando a frutificar com

três, produzindo abundantemente a partir do oitavo ano e mantendo a produção satisfatória até os trinta anos. Regiões com temperaturas médias anuais entre 24 e 28°C possuem as melhores condições para o cultivo. Temperaturas inferiores a 12°C impedem ou reduzem a frutificação (LAJUS, 1983; EFRAIM, 2004).

2. 2.1 Grupos genéticos

Tradicionalmente, os dois principais grupos genéticos, *Criollo* e *Forastero*, têm sido definidos dentro de cacau com base em características morfológicas e origens geográficas (CHEESMAN, 1944; MOTAMAYOR, et al., 2008). Um terceiro grupo, Trinitário tem sido reconhecido e consiste de um híbrido entre *Criollo* e *Forastero* (CHEESMAN, 1944; MOTAMAYOR et al., 2008). Em paralelo, os botânicos descreveram duas sub-espécies: cacau e *sphaeocarpaceum*, correspondentes a *Criollo* e *Forastero* (CUATRECASAS, 1964; DE-LA-CRUZ et al., 1995; MOTAMAYOR et al., 2008), os quais, de acordo com alguns autores, evoluíram nas Américas Central e do Sul, respectivamente. Para outros autores, *Criollo* e *Trinitario*, devem ser considerados como cultivares tradicionais, ao invés de dois grupos genéticos (MOTAMAYOR, et al, 2002). Dois outros cultivares tradicionais têm sido descritos: Nacional e Amelonado (MOTAMAYOR et al, 2003). No entanto, a classificação das populações de *Theobroma cacao* L., com base em dados genéticos, é falha para a criação e gestão de seus recursos genéticos. Motamayor et al., (2008) sugere uma nova classificação que reflete melhor a diversidade genética, ao invés da tradicional classificação relatada. Estes autores propõem a classificação do germoplasma de cacau em 10 grupos: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana, ao invés da classificação tradicional em *Criollo*, *Forastero* e *Trinitário*.

2.2.2 Composição das sementes

A casca (testa) representa 10-14% do peso seco da semente do cacau. O cotilédone, representa cerca de 86-90% (Tabela 1), confere sabores e aromas característicos do chocolate (ROHAN; STEWART, 1967; OSMAN et al., 2004; AFOAKWA et al., 2008), os mesófilos cotiledonares contêm células com reservas polissacarídes e lípide-proteicas (MARTINI et al., 2008a). A microscopia eletrônica de transmissão mostra a precipitação pouco densa das proteínas no vacúolo central das células jovens do mesófilo de *T. cacao*. Nas células maduras,

a proteína de reserva está densamente entremeada por glóbulos lipídicos; poucos grãos de amido ocorrem no mesofilo cotiledonar desta espécie. As células polifenólicas estão dispersas no mesofilo cotiledonar ou alinhadas próximas ao feixe vascular. As células imaturas demonstraram capacidade de síntese de todas as reservas, mas gradualmente as células predeterminadas, produzem principalmente reservas lípide-proteicas (MARTINI et al., 2008a).

Os polifenóis de sementes apresentam, juntamente com outros elementos de reserva, o sabor e a cor de chocolate (PORTER et al., 1991; MARTINI et al., 2008b) e representam de 12 % a 20 % do peso seco das sementes desengorduradas (KIM; KEENEY, 1984; WOLLGAST; ANKLAM, 2000; MARTINI et al., 2008b). Os polifenóis pigmentados conferem uma coloração púrpura aos cotilédones de *Forastero* e células lípide-proteicas, por outro lado, têm citoplasma bem embalado com múltiplos e pequenos vacúolos de proteínas e lipídios, além de outros componentes como grânulos de amido, os quais desempenham papéis importantes na definição do sabor de cacau e caracteres de aroma (KIM; KEENEY, 1984; NAZARUDDIN et al. 2001; AFOAKWA et al., 2008). Teores mais elevados de polifenóis proporcionar maior adstringência ao chocolate (MARTINI et al., 2008b).

Epicatequina, pró-antocianidinas e catequinas são os principais compostos fenólicos (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; MARTINI et al., 2008b).

Polifenóis de *Forastero* solúveis em gordura e secos isentos de gordura fresca formam de 15 a 20%, decaindo para aproximadamente 5% após a fermentação. O conteúdo de 10% ou mais é considerado sinal de baixa fermentação. Concentrações mais elevadas de polifenóis conduzem a um sabor muito adstringente no chocolate. Cacau *Criollo* tem aproximadamente dois terços deste conteúdo de polifenóis (HANSEN et al., 2000; AFOAKWA et al., 2008). Reações de polifenol oxidases com açúcar e aminoácidos contribuem com sabor e cor nas sementes de cacau, e alcalóides à amargura (AFOAKWA et al., 2008).

Tabela 1 - Composição de sementes não fermentadas de cacau (Forastero) do leste africano

Constituintes	Sementes secas (%)	Sementes sem gordura (%)
Cotilédones	89.60	-
Casca	9.63	-
Gérmen	0.77	-
Gordura	53.05	-
Água	3.65	-
Cinzas (Totais)	2.63	6.07
Nitrogênio		
Total nitrogenado	2.28	5.27
Proteína nitrogenada	1.50	3.46
Teobromina	1.71	3.95
Cafeína	0.085	0.196
Carboidratos		
Glicose	0.30	0.69
Sacarose	1.58	3.86
Amido	6.10	14.09
Pectinas	2.25	5.20
Fibras	2.09	4.83
Pentosanas	1.27	2.93
Mucilagens e gomas	0.38	0.88
Polifenóis	7.54	17.43
Ácidos		
Acético (livre)	0.014	0.032
Oxálico	0.29	0.67

Fonte: ROHAN, 1963; REINECCIUS et al., 1972; AFOAKWA et al., 2008.

Reineccius et al. (1972) relataram que sementes de cacau frescas e não fermentadas continham 15,8 mg/g de sacarose e traços de frutose, sorbose, manitol e inositol. Berbert (1979) encontrou um teor de sacarose de 24,8 mg/g em sementes não fermentadas, formando

cerca de 90% de açúcares totais (27,1 mg/g), com os açúcares redutores frutose e glicose formando cerca de 6% (0,9 e 0,7 mg/g, respectivamente) e outros (incluindo manitol e inositol) em concentração menor que 0,50 mg/g. As diferenças relatadas foram atribuídas ao método e hora da colheita, o tipo e a origem das sementes de cacau. Nas sementes, os componentes do tecido permanecem compartimentalizados, separando os componentes de sabor, que por sua vez, só podem interagir após a quebra ou rompimento das membranas e parede celular posteriormente a fermentação.

2.3 Desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate

O típico sabor e aroma de chocolate são obtidos exclusivamente de sementes fermentadas, secas e torradas de *T. cacao*, não podendo ser sintetizados artificialmente. No processamento das sementes (também conhecidas comercialmente como amêndoas de cacau), duas etapas são essenciais para o desenvolvimento da qualidade do sabor e aroma: (a) fermentação das sementes de cacau após a colheita e a subsequente secagem; e (b) a torração. O sabor de chocolate é desenvolvido na etapa da fermentação e torrefação, portanto os precursores essenciais do sabor são gerados durante o processo de fermentação (VOIGT; BIEHL, 1995).

Para melhor compreensão do que se passa no interior das sementes de cacau durante a fermentação e nas outras etapas subsequentes, torna-se importante examinar sua constituição e histologia. As sementes têm forma de amêndoas, sendo por esta razão denominadas amêndoas de cacau. Em geral, esta denominação é reservada às sementes que já perderam sua capacidade de germinação, o que ocorre durante a fermentação. A semente é composta de casca, membrana prateada ou endosperma, dois cotilédones e eixo embrionário. Possui, em geral, 2,5 cm de comprimento em média (LAJUS, 1983). Segundo Bradeau (1970), o tecido dos cotilédones é constituído por dois tipos de células: o primeiro apresenta pigmentos compostos de polifenóis e o segundo, são células de reserva, que contêm amido, gorduras, proteínas e enzimas (BECKETT, 1988). As matérias primas para a produção do chocolate (manteiga de cacau e *liquor*) são extraídas dos cotilédones, comercialmente chamados *nibs*. Antes da fermentação, apresentam coloração violácea e aspecto compacto; após a fermentação e secagem, devem apresentar coloração marrom, sulcos e muito friáveis (EFRAIM, 2004).

Durante a fermentação, a polpa envoltória das sementes é degradada pela ação sucessiva de microrganismos (leveduras e bactérias ácido-lácticas e ácido-acéticas) naturais do ambiente, com a elevação da temperatura para cerca de 50°C (LOPEZ, 1986). Esses microrganismos atuam nos açúcares e ácidos orgânicos da polpa, que são transformados em etanol, ácido, láctico e especialmente, o ácido acético (SCHWAN; WHEALS, 2004). Os ácidos orgânicos gerados penetram nas sementes, e juntamente com a elevação da temperatura causada pela fermentação aeróbica, causam a morte do embrião e acidificação no tecido armazenado. Com a morte do embrião, é perdida a permeabilidade seletiva de membranas, permitindo o contato entre enzimas e substratos, normalmente separados em tecidos vivos (LOPEZ, 1986).

A qualidade do cacau é fortemente dependente do grau e o tempo de curso de acidificação dos cotilédones durante o processo de fermentação. Embora a acidificação dos tecidos seja um pré-requisito para a formação dos precursores do aroma de cacau, uma acidificação excessiva (pH 4,5 - 4,0) resulta em lotes de cacau comerciais com potencial de sabor reduzido, as vezes com excesso de ácido láctico, considerado um elemento indesejável (LOPEZ, 1986). O alto potencial de sabor pode ser correlacionado com moderada acidificação (pH 5,5 - 5,0) durante a fermentação (VOIGT; BIEHL, 1995; AMIN et al., 2002).

Após a fermentação, as sementes passam pela secagem preferencialmente ao sol, com revolvimento regulares das sementes até um conteúdo de umidade menor que 8%, durando entre uma a quatro semanas. A próxima etapa é a torração das sementes por 5 a 120 minutos a uma temperatura de 120 a 150°C, dependendo da natureza das sementes e produto requerido, nesta etapa ocorre uma segunda série de reações químicas que dão origem ao sabor do chocolate (SCHWAN; WHEALS, 2004).

O sabor de chocolate deriva da interação de centenas de compostos (mais de 400 foram descritos), incluindo pirazinas, tiazóis, oxazóis, derivados de pirróis, piridinas e furanos, sendo que o desenvolvimento de métodos analíticos resulta num aumento de substâncias reconhecidamente associadas ao sabor de chocolate (BONVEHÍ, 2005). Nem todos os componentes individuais identificados devem ser considerados como componentes significativos de sabor e aroma, já que o impacto depende da concentração e da intensidade do odor (BONVEHÍ, 2005). Os substratos afetados durante a fermentação e secagem (açúcares reduzidos, aminoácidos e oligopeptídeos) geram precursores que durante a torração geram centenas de compostos voláteis (VOIGT; BIEHL, 1996). Os açúcares redutores

glicose e frutose derivam da hidrólise da sacarose do cotilédone e possivelmente internalizado a partir da polpa. Diversos oligopeptídeos e aminoácidos são produzidos durante a hidrólise por ácidos e ação das proteases das sementes durante a fermentação. Estes compostos passam por reações não enzimáticas durante a secagem e a torração. As reações de Maillard, com a formação de compostos Amadori e degradação Strecker de aminoácidos produzem um grande número de compostos químicos voláteis, dependendo das condições de secagem e torração, e essencialmente da composição de aminoácidos, oligopeptídeos e açúcares redutores provenientes da fermentação, gerando os compostos de sabor do cacau (VOIGT; BIEHL, 1996). As reações de Maillard são condensações entre grupos α -amino e aminoácidos, proteínas ou aminas e o grupo terminal carbonil de açúcares redutores (SCHWAN; WHEALS, 2004), e um das conseqüências principais da reação é produção do sabor (BONVEHÍ, 2005). Dentre todos os processos de geração do aroma, o da degradação de proteínas parece ser um dos mais importantes na formação do aroma e sabor do chocolate.

2.4 Proteínas de sementes de *T. cacao*

As sementes de cacau apresentam de 15 a 20% de proteínas em peso seco (BIEHL; WEWETZER; PASSERN, 1982; SPENCER; HODGE, 1992), onde a fração albumina representa a maior parte (52%) do total de proteínas na semente, enquanto que a fração de globulina representa 43% (VOIGT; BIEHL; KAMARUDDIN, 1993).

Em *T. cacao*, o gene codificador da principal proteína da fração albumina (o polipeptídeo inibidor de tripsina de 21 kDa) correspondente a 21% do total de proteínas das sementes) foi o primeiro gene a ser clonado e seqüenciado, e com alta similaridade com inibidores de tripsina tipo Kunitz, sugerindo tratar-se de um inibidor de proteases (SPENCER; HODGE, 1991; TAI et al., 1991, PAULILLO, 2004). Posteriormente, utilizando-se a proteína de 21 kDa das sementes de cacau purificada, confirmou-se tratarem-se realmente de um inibidor de tripsina com atividade inibitória duas vezes maior que o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (DODO et al., 1992; PAULILLO, 2004). A função natural desses inibidores é desconhecida, mas parecem atuar na digestão das proteínas de reserva da semente, por insetos e/ou funcionando como uma fonte de reserva de enxofre devido ao seu alto conteúdo de cisteína (SPENCER; HODGE, 1992; PAULILLO, 2004).

Dos polipeptídeos mais abundantes das sementes de cacau revelados por análises SDS-PAGE mono-dimensional, quatro foram caracterizados bioquimicamente

(LERCETEAU et al., 1999). Bandas de 47, 31 e 14,5 kDa foram estudadas e mostraram-se ser componentes produzidos a partir de modificações pós-traducionais de uma proteína precursora de reserva do tipo vicilina (7S), o que também ocorre *in vivo* como um trímero de 139 kDa (LERCETEAU et al., 1999). Análises dos polipeptídeos e da seqüência do cDNA revelaram considerável homologia com outras classes de proteínas de reserva 7S, e em particular, uma α -globulina de sementes de algodão (SPENCER; HODGE, 1991; MCHENRY; FRITZ, 1992). O gene que codifica o precursor pertence a uma família multigênica (KIRCHHOFF; BIEHL; CRONE; 1989). Da fração globulina das proteínas de sementes, foi clonado o gene codificador dos polipeptídeos de aparente peso molecular de 31 e 47 kDa, a partir de uma proteína precursora de 62 kDa (SPENCER; HODGE, 1991; MCHENRY; FRITZ, 1992). Esses genes foram seqüenciados a partir de diversas espécies de *Theobroma* num estudo de filogenia do gênero (WHITLOCK; BAUM, 1999). Genes codificadores de outras proteínas de semente também já foram caracterizados e clonados a partir de *T. cacao*, como no caso do gene de um peptídeo de albumina 2S (KOCHHAR et al., 2001). Também, o cDNA de duas asparto-proteinases (*TcAP1* e *TcAP2*), possivelmente associadas com o desenvolvimento de precursores de sabor de chocolate, também foram clonados e caracterizados (LALOI et al., 2002).

Mohr et al. (1976) extraíram e fracionaram os precursores do aroma específico de chocolate de sementes fermentadas e secas, e relataram que o aroma foi obtido quando a fração oligopeptídica isolada das sementes de cacau passou pela torrefação na presença de aminoácidos livres e açúcares redutores, concluindo que estes precursores são formados por processos proteolíticos. Kirchhoff, Biehl e Crone, (1989) observaram que o acúmulo de aminoácidos livres nos *nibs* está correlacionado com a geração dos precursores de aroma essenciais. Estes autores concluíram também que os precursores do aroma de cacau são formados por processos proteolíticos dependentes do pH. Portanto, a geração dos precursores do aroma de cacau parece ser devido à proteólise ácido-induzida das proteínas das sementes de cacau pela ação de proteases endógenas, desde a acidificação dos *nibs*, não sendo essencial à participação de microorganismos para que este processo aconteça (VOIGT; BIEHL, 1995). A degradação de proteínas de sementes e a liberação de peptídeos e aminoácidos livres estão entre os processos mais importantes para a formação dos precursores de sabor (LERCETEAU et al., 1999).

A protease aspártica endógena é a predominante nas sementes maduras de cacau e não germinadas com atividade ótima por volta do pH 3,5 (PASSERN, 1979; BIEHL;

WEWETZER; PASSERN, 1982; BIEHL et al., 1993, 1994; VOIGT et al., 1994a; HEINRICH, 1995). Estudos imunológicos revelaram que a endoprotease é acumulada na fração globulina da classe vicilina (7S) durante o amadurecimento das sementes de cacau (VOIGT et al., 1993, 1994a). Quando os oligopeptídeos formados pela ação da endoprotease aspártica em pH 3,5 de sementes de cacau *acetone dry power* foram incubados na presença de carboxipeptidase A, foram detectados aminoácidos, e peptídeos hidrofóbicos foram transformados em hidrofílicos (VOIGT et al., 1993, 1994a). Essa mistura de peptídeos hidrofílicos e oligopeptídeos hidrofóbicos obtidos após tratamento com carboxipeptidase, revelaram que o sabor chocolate se eleva quando a torração é feita na presença de açúcares redutores e a manteiga de cacau desodorizada. Isto indicou que uma carboxipeptidase estaria envolvida na formação dos precursores do sabor de chocolate (VOIGT et al., 1993, 1994a).

A hipótese que os precursores específicos do aroma de chocolate seriam derivados da digestão de proteínas das sementes por ação cooperativa de uma endoprotease aspártica e da atividade da carboxipeptidase foi corroborada usando proteases purificadas e proteínas das sementes (VOIGT et al., 1994b). Precursores específicos do aroma de chocolate e/ou cacau não foram obtidos quando as proteínas das sementes de cacau foram degradadas somente por ação de endoproteases de diferentes origens e especificidades (VOIGT et al., 1994b; MACDONALD; MASTER; PETTIPHER, 1994; VOIGT; BIEHL, 1995). Estudos sobre a geração dos precursores do aroma específico de chocolate enfatizaram a formação de produtos de Amadori a partir dos aminoácidos livres durante o processo de secagem (ARNOLDI et al., 1988; HEINZLER; EICHNER, 1991; VOIGT; BIEHL, 1995). Porém, os típicos aromas de chocolate não foram obtidos quando misturas de aminoácidos livres sintéticos adaptados para o espectro de aminoácidos presentes na fermentação de sementes de cacau (ou extratos dos precursores de aroma) passaram pelo processo de torração na presença de açúcares redutores (VOIGT et al., 1993b, 1994a).

Outra indicação que corrobora com a hipótese de Mohr et al. (1976) seria que a adição de uma fração isolada de oligopeptídeos da fermentação e secagem das sementes de cacau aos aminoácidos livres é absolutamente requerida para se obter aroma de cacau e chocolate na torração (VOIGT; BIEHL, 1995). É reconhecido que depois de uma fermentação em ótimas condições, alguns polipeptídeos predominantes nas sementes de cacau são seletivamente degradados (BIEHL; WEWETZER; PASSERN, 1982). Esta seletividade na degradação dos polipeptídeos foi identificada nas subunidades polipeptídicas da classe vicilina (7S) da globulina nas sementes de cacau (VOIGT et al., 1993a, 1995).

Desde a obtenção dos precursores do aroma de chocolate e/ou cacau por autólise *in vitro* das proteínas (não fracionadas) de sementes de cacau (VOIGT et al., 1993b, 1994a), vários experimentos têm sido conduzidos para identificar as proteínas de sementes, das quais derivam os precursores do aroma específico de chocolate. Para esta finalidade, globulina da classe vicilina (7S) e a albumina predominante (21 kDa), as duas principais proteínas de sementes de *T. cacao* foram submetidas à proteólise por endoprotease aspártica e atividade da carboxipeptidase parcialmente purificada de sementes de cacau maduras e não germinadas. O aroma de chocolate foi obtido quando a classe vicilina (7S) da globulina foi degradada sucessivamente pela endoprotease aspártica e pela carboxipeptidase, e os produtos subsequentes resultantes da proteólise passaram pela etapa de torração, na presença de açúcares redutores e manteiga de cacau desodorizada. Não foram obtidos precursores do aroma de cacau quando a albumina 21 kDa foi degradada por algumas enzimas proteolíticas ou quando a globulina 7S (vicilina) foi somente digerida por endoprotease aspártica. Incubações da globulina 7S (vicilina) com endoprotease aspártica para sementes não germinadas de cacau resultaram num modelo complexo de oligopeptídeos hidrofóbicos. Estes peptídeos hidrofóbicos foram transformados em misturas de oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos hidrofóbicos livres parecidos com o modelo de produtos de proteólise encontrados nas sementes fermentadas de cacau (VOIGT; BIEHL, 1995; LERCETEAU et al., 1999).

2.5 Efeito genotípico no desenvolvimento de sabor

O genótipo influencia tanto a qualidade quanto a intensidade do sabor chocolate (TAYLOR, 2002, LUNA et al., 2002; COUNET et al., 2004; TAYLOR; ROBERTS, 2004), pois possivelmente determina a quantidade de precursores e atividade das enzimas envolvidas, e assim suas contribuições para o desenvolvimento do sabor. A falta de um método padronizado na avaliação do efeito genotípico restringia o progresso de estudos nesta área, pois requeria grandes quantidades de sementes de um único genótipo, necessárias para uma fermentação apropriada. Com o desenvolvimento de um procedimento onde pequenas quantidades podem ser utilizadas na fermentação, um único genótipo pode ser examinado quanto ao potencial do aroma (CLAPPERTON et al., 1994b). Como pioneiro nesta área, Clapperton (1994a) investigou a possibilidade dos efeitos genéticos no aroma do cacau e encontrou diferenças consistentes em atributos de aroma, especialmente intensidade do sabor

e aroma de chocolate, acidez, amargor e adstringência entre as variedades Amelonado (AML), quatro clones de *Forastero* Amazonas (IMC67, NA 33, PA 7 e Scavina 12) e um *Trinitario* (UIT1) crescidos em Sabah, Malásia. O aroma de UIT1 foi diferente dos padrões africanos, sendo caracterizado pelo intenso amargor e adstringência associados com cafeína e polifenóis, e maior acidez. Os resultados demonstraram uma significativa contribuição do genótipo para o aroma em adição a os efeitos do processamento. O desenvolvimento do aroma foi independente da composição e da fermentação da polpa (CLAPPERTON et al., 1994b). Comparações diretas de aromas de genitores e progênie mostraram que características de aroma são hereditárias (CLAPPERTON et al., 1993).

Figueira et al. (1997) confirmou a similaridade do sabor e aroma de cacau de sementes fermentadas de genótipos de cacaueiro provenientes do Brasil e da Malásia, corroborando a hipótese de uma forte contribuição genética para o aroma. Neste estudo, perfis similares de aroma foram desenvolvidos de cacau dos mesmos genótipos cultivados no Brasil e Malásia e sujeitos as mesmas condições de processamento pós-colheita. Efeitos genéticos são historicamente reconhecidos em termos de diferenças no aroma entre cacau finos (cacau do Equador do tipo Nacional, ou certos tipos de *Trinitários* e *Criollos*) e comerciais (*bulk*) disponíveis no mercado convencional, e pelo fato que certas qualidades são classificadas pela origem, com material vegetal específico e atributos de aroma.

Os quatro principais tipos de cacau: *Forastero* (sabor básico), *Criollo* (sabor fino), *Trinitário* (sabor fino) e Nacional, produtor das sementes Arriba com distintas notas de sabor florais e picantes (sabor fino), demonstraram uma ampla variação no sabor final (BECKETT, 2000; AWUA, 2002; AMOYE, 2006). Variedades básicas predominam misturas enquanto graus finos, utilizados em menor quantidade, são selecionados para fazer específicas contribuições para o perfil global de sabor (AFOAKWA et al., 2008). Cacau básico normalmente mostra fortes caracteres de sabor, cacau fino é percebido como suave ou aromático (KATTENBERG E KEMMING, 1993; JINAP et al., 1995, LUNA et al., 2002).

2.6 Análises de perfis de proteínas por abordagem proteômica

A proteômica é o estudo sistemático de um proteoma, ou seja um conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo numa determinada condição biológica ou ontogenética (WASINGER et al., 1995), que permite avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas que atuam no metabolismo celular naquela situação (PARK, 2004; CHEN;

HARMON, 2006). Consequentemente, a identificação de proteínas expressas durante o desenvolvimento vegetal permite a caracterização de diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos das plantas (KORMUTAK et al., 2006). Em geral, a proteômica possui diversas aplicações como: a) estudo da expressão diferencial de proteínas; b) estudo de modificações pós-traducionais; c) estudos de interação proteína-proteína; d) estudo estrutural; e e) estudo da função das proteínas (DIAS et al., 2007). Com os recentes avanços nas técnicas de eletroforese bidimensional (2-DE), como o aumento da reprodutibilidade pelo uso de gradientes imobilizados de pH, a visualização de imagens e aumento de sensibilidade de detecção; e nas análises por espectrometria de massas, como o aumento de sensibilidade, resolução e velocidade de aquisição de dados, a proteômica tem se tornado uma estratégia alternativa no estabelecimento de marcadores bioquímicos e uma das mais utilizadas para análises metabólicas e de expressão gênica global (SHEORAN et al., 2005; PAWLOWSKI, 2007).

A 2-DE foi desenvolvida no início da década de 1970 e ainda é uma das técnicas mais utilizadas para o fracionamento protéico (CHEN; HARMON, 2006), permitindo a separação, detecção e quantificação de centenas de proteínas simultaneamente presentes em uma amostra biológica complexa. A primeira etapa do processo consiste na separação das proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pIs), pela focalização isoelétrica (IEF) e, posteriormente, de acordo com suas massas moleculares relativas (Mr), pela eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Esta situação permite o fracionamento de milhares de proteínas, além da obtenção de informações físico-químicas das mesmas (CHEN; HARMON, 2006).

O uso da espectrometria de massas por muito tempo ficou restrito a um pequeno número de moléculas capazes de resistir ao método de ionização e ao processo de análise, sendo um obstáculo no estudo de biomoléculas como as proteínas. No final dos anos 1980, com o desenvolvimento de dois novos métodos de ionização, o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) e o ESI (*Electrospray Ionization*) houve uma revolução na análise de biomoléculas. No início dos anos 1990, as novas técnicas de ionização branda, associadas com o desenvolvimento de novos algoritmos computacionais, permitiram correlacionar dados obtidos de um espectro de massas de biomoléculas com seqüências existentes em bancos de dados. Este evento marcou a transformação da MS no estudo em larga escala e das técnicas usadas na genômica funcional (MANN; WILM, 1995; MANN; HENDRICKSON, 2001; ANDRADE et al., 2006). O sucesso dos métodos de ionização

MALDI e ESI, e o desenvolvimento de analisadores de massa em seqüência (*tandem*) levaram a um grande aumento na resolução e sensibilidade do método, tornando-o uma ferramenta obrigatória nas análises estruturais e químicas de peptídeos e proteínas. Os espectrômetros de massa atuais permitem selecionar uma só molécula ionizada, fragmentá-la por colisão com um gás inerte e, através da análise das massas dos fragmentos, conhecer a molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a seqüência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração química específica em algum resíduo de aminoácido (PIMENTA, 2003; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003; STEEN; MANN, 2004; ANDRADE et al., 2006). Normalmente, o MALDI-TOF-MS é usado primeiramente para determinar a massa da proteína e após a sua digestão com tripsina, seus peptídeos são separados, normalmente por cromatografia líquida acoplada diretamente no espectrômetro de massas (ESI-TOF-MS/MS) e seqüenciados (GIORGIANNI, 2003).

Os programas utilizados na busca de dados baseiam-se na comparação entre o padrão de fragmentação teórico de uma proteína e o espectro de fragmentação obtido experimentalmente. A estratégia de identificação por MS/MS, que permite a determinação precisa da seqüência experimental de aminoácidos, é mais precisa do que a identificação de proteínas baseada somente na comparação entre as massas dos fragmentos trípticos, chamada de *peptide mass fingerprinting* (PMF) (CHEN; HARMON, 2006). Alternativamente, os espectros do tipo MS/MS também permitem buscas por similaridade de seqüências entre organismos próximos, através da reconstrução da seqüência de aminoácidos manual ou automaticamente. Essa estratégia é muito interessante quando o organismo estudado possui baixa representatividade nos bancos de dados (CHEN; HARMON, 2006).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo analisar diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas de sementes de três genótipos de *Theobroma cacao* após a colheita e durante a fermentação, de forma a correlacionar estes resultados com diferenças na qualidade (sabor e aroma) obtidas por análise sensorial dos produtos obtidos. Foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecimento de uma metodologia de extração de proteínas cotiledonares, focalização isoeletrica e coloração de géis bidimensionais compatíveis com a proteômica.
- Estudo dos perfis protéicos de três genótipos de *Theobroma cacao* após a colheita, numa fase intermediária e final da fermentação;
- Identificação por meio da espectrometria de massas as proteínas comuns e diferenciais dos genótipos;
- Realização de análises sensoriais dos produtos obtidos com estas sementes e comparação destes resultados com os resultados da proteômica;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em conjunto com o Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, com o Laboratório de Microbiologia do Solo (ESALQ/USP) e com a Fazenda Almirante, *Mars Center for Cocoa Studies*, Itabuna, BA. Foram estudados os perfis protéicos das três genótipos de *T. cacao*, após a colheita e durante a fermentação e realizadas análises sensoriais a partir dos líquidos obtidos dos mesmos genótipos.

4.1 Material Vegetal

Foi montado um experimento na Fazenda Almirante, *Mars Center for Cocoa Studies*, Itabuna, BA. Os frutos maduros (160 a 180 dias após a polinização) foram colhidos e partidos no dia seguinte a colheita para iniciar a etapa de fermentação, realizada em caixa de madeira de 60 cm³, permitindo a fermentação de em média, 50 Kg de sementes com polpa por cinco dias (Figura 1). As fermentações foram realizadas na sede da fazenda em triplicata. Devido a disponibilidade de frutos, os genótipos empregados foram:

SIAL 70 (da variedade *Forastero*, derivado de seleção nas populações de cacau “Comum da Bahia”;

Catongo: um mutante albino identificado na fazenda Catongo derivado de cacau “Comum da Bahia”;

CCN51: (um híbrido entre diversos materiais que envolvem *Trinitario*, é um clone muito cultivado recentemente, devido a sua alta produção e tolerância a enfermidade vassoura-de-bruxa, mas conhecido comercialmente por possuir baixo potencial de sabor. Aparentemente, trata-se de uma seleção feita numa família derivada de cruzamento entre planta híbrida de IMC 67 x ICS 95 com uma variedade equatoriana, denominada “Canellos” (também denominado CCN 1) (INTERNATIONAL COCOA GERMPLASM DATABASE, 2010).

As sementes dos três genótipos utilizados ficaram separadas por meio de redes (em triplicata), mas dentro das caixas de fermentação, junto com as demais sementes de material Comum (Figura 2). Após 48 horas de fermentação, as sementes contidas nas caixas de fermentação foram revolvidas diariamente bem como as sementes contidas dentro das redes.

As redes contendo as amostras dos genótipos após 48 horas de fermentação, também foram trocadas de posição diariamente para que pudessem representar todos os pontos de fermentação (fundo, meio, lateral e topo da caixa de fermentação).



Figura 1 - (A) Caixas de madeira utilizada na fermentação e (B) as redes contendo as sementes das variedades testadas



Figura 2 - Amostras dos genótipos separadas por redes

Cerca de 50 gramas de amostra das sementes de cada triplicata foram coletadas antes do início da fermentação, durante a fermentação a cada 24 h até o quinto dia, representando os tempos, 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. As sementes foram então armazenadas a -80°C . Após o término da fermentação, as sementes foram secas em barçaca por três dias (Figura 3) e depois em estufa a 35°C até alcançarem umidade entre 7 e 8%. Neste ponto, mais uma amostragem

foi realizada e então as sementes foram armazenadas em local apropriado, onde foi dada a continuidade com a fabricação dos lúquors e análises sensoriais dos três genótipos.



Figura 3 - Processo de secagem individual das sementes separadas por genótipo, nas barcaças para cada genótipo

4.2 Preparação das sementes para extração de proteínas:

As sementes estocadas a -80°C foram parcialmente descongeladas para retirada da testa e foram liofilizadas por 48 h. Posteriormente, foram transferidas para as instalações do CENA/USP, onde foram maceradas na presença de nitrogênio (N) líquido e 1% de polivinil-polipirrolidona (PVPP) em almofariz e pistilo, obtendo-se uma “farinha” homogênea, a qual foi armazenada em tubos de centrífuga de 50 mL em freezer a -80°C . Após a maceração, as amostras foram tratadas com éter de petróleo (3:1) sob agitação em temperatura ambiente (TA) para a remoção de gorduras por 20 min, e cada amostra foi posteriormente centrifugada a 10.000 g durante 15 min sob TA. O éter de petróleo foi descartado apropriadamente, e o precipitado foi macerado e tratado novamente nas mesmas condições por pelo menos mais duas vezes. Para finalizar, as amostras foram liofilizadas para retirada de qualquer resíduo de éter de petróleo.

4.3 Extração das proteínas de semente:

As amostras anteriormente preparadas foram pesadas, e 1g de cada extrato protéico foi empregada na extração de proteínas, avaliando dois métodos de extração.

4.3.1 Metodologia 1: Precipitação em solução de ácido tricloroacético (Extração ácida).

Essa metodologia foi baseada naquela descrita por DAMERVAL et al. (1986), com pequenas modificações. As amostras foram maceradas em almofariz por cerca de 2 min a TA utilizando-se tampão de extração [200 mM NaCl pH 7,0; 175 mM Tris-HCl pH 8,8; 2 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); 5% SDS; 15% glicerol (v/v); 300 mM DTE; 1% (p/v) PVPP]. Em seguida, a solução foi filtrada em Miracloth (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) para retirada de polissacarídeos. O filtrado foi usado para a extração ácida, onde para cada 1 mL do filtrado foram adicionados 6 mL de solução 7% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol em acetona a -20°C . As amostras foram homogeneizadas em vortex por 5 min e mantidas a -20°C por 12h, e em seguida centrifugadas a 16.000 g a 4°C por 15 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados com acetona contendo 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol a -20°C . Após 1 h a -20°C , os materiais foram centrifugados a 16.000 g por 20 min e os sobrenadantes descartados. O processo de lavagem foi repetido duas vezes. Os *pellets* resultantes foram submetidos à secagem em dissecador de sílica a 4°C por 24 h.

4.3.2 Metodologia 2: Extração em tampão fenol e precipitação em acetato de amônio.

Essa metodologia foi realizada como descrito por CARPENTIER et al. (2005). Amostras de sementes contendo manteiga de cacau (gordura) e sem manteiga, foram testadas. Para tal procedimento, utilizou-se 1 g de material vegetal macerado em nitrogênio líquido, adicionando-se 15 mL de solução de extração (0,7 M sacarose; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M KCl; 50 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); 1 mM PMSF; 1% p/v PVPP; 2% v/v 3-mercaptoetanol) pH 7,5 a 4°C . Depois de homogeneizar as amostras em *vortex* por 30 min, adicionou-se 15 mL de tampão Tris-fenol (pH 8,0; GE Healthcare), e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 g por 30 min a 4°C . Após centrifugação, coletou-se o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se novamente 15 mL de solução de extração. Após repetir o procedimento acima por duas vezes, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 30 min a 4°C . O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e posteriormente, acrescentou-se cinco volumes de 0,1 M de acetato de amônio em solução de metanol. A solução foi mantida por 12 h a -20°C , e em seguida centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4°C .

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante, lavado com metanol (100% v/v). Após centrifugação a 16.000 g por 30 min, o *pellet* foi submetido a secagem em dissecador a 4°C por 24 h.

4.4 Solubilização das proteínas extraídas e quantificação:

Os *pellets* secos extraídos nas duas metodologias foram ressuspensos em uma solução contendo 7 M Uréia; 2 M Tiouréia e 4% CHAPS, e armazenadas a -80°C até o momento da focalização. A quantificação das proteínas em ambos os métodos foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se um kit comercial de quantificação de proteínas (*Protein Assay* - BioRad, Hercules, EUA). Alíquotas de 5 a 10 µL de amostra, juntamente com 3,5 mL do corante diluído (3:1), foram incubadas por 10 minutos à TA, tendo suas absorvâncias determinadas a 595 nm em espectrofotômetro. As concentrações das proteínas foram calculadas através da comparação com uma curva-padrão de albumina de soro bovino (BSA).

4.5 Purificação utilizando kit comercial:

Os extratos protéicos foram purificados utilizando-se o kit *2-D Clean-Up* (GE Healthcare, Little Chalfort, England) conforme especificações do fabricante. Após a purificação os extratos foram novamente quantificados como descrito anteriormente.

4.6 Focalização isoeletrica (IEF):

Às amostras descongeladas, foram adicionados 100 mM ditiotretol (DTT) e 1% IPG - Buffer. As proteínas foram primeiramente separadas por IEF, usando o sistema *IPGphor Strip Holder* (*Immobilized pH Gradient strips* – Amersham Biosciences). As amostras foram separadas utilizando-se fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 3-10 linear ou 4-7 (GE Healthcare). As fitas IPG foram reidratadas passivamente durante 10 h a 20°C no aparato de focalização isoeletrica com 350 µL de tampão (7 M Uréia; 2 M Tiouréia; 100 mM DTT; 4% (v/v) CHAPS; 1,0 % anfólitos e 0,005% (p/v) azul de bromofenol) contendo 600 µg de proteína solubilizada para coloração com *Coomassie Brilliant Blue G 250* ou 150 µg de

proteína para a revelação com nitrato de prata. Sobre as fitas IPG, acrescentou-se 1,2 mL de óleo mineral (*Fluid Cover*, Amersham Biosciences).

Na focalização isoeletrica, quando as fitas foram carregadas com 600 µg de proteínas, foram realizadas as seguintes condições: 20°C e 50 µA, reidratação ativa de 30 V por 12 h; 200 V por 1 h; 500 V por 1 h; 1.000 V por uma h; e 5.000 V até atingir 75 kV h⁻¹. Após a focalização, as fitas foram lavadas com água Milli-Q e armazenadas a -80°C. Para a focalização isoeletrica, onde a quantidade de proteínas carregada foi de 150 µg, foram utilizadas as seguintes condições: 20°C e 50 µA, reidratação passiva = 10 h, S1 = 0 – 250 V por 1 h (gradiente); S2 = 150 V por 2 h (*step-n-hold*); S3 = 150 - 250 V por 1 h (gradiente); S4 = 250 - 1200 V por 4 h (gradiente); S5 = 1200 V por 1,5 h (*step-n-hold*), S6 = 1200 – 3500 V por 6 h (gradiente); S7 = 3500 V até voltagem acumulada 40 kV h⁻¹. Após a focalização, as fitas foram retiradas do aparato, lavadas com água destilada e armazenadas a -80°C.

4.7 Segunda Dimensão (SDS-PAGE):

Antes de iniciar a segunda dimensão, as proteínas foram reduzidas utilizando-se o tampão [50 mM Tris-HCl pH 8,4; 6 M Uréia; 30% Glicerol; 2% SDS e 2% DTT]. As fitas ficaram em contato com este tampão por 30 min e depois foram transferidas para o tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,4; 6 M Uréia; 30% Glicerol; 2% SDS; 3.0% iodoacetamida (IAA) e 70 µL de 0.5% azul de bromofenol, para alquilação onde ficaram incubadas por 30 min. Após o equilíbrio das fitas, as extremidades foram cortadas e as fitas colocadas nos géis verticais de 2D-PAGE.

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel vertical (180 x 160 x 0,75 mm) homogêneo de 12,5% (p/v) de acrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As tiras foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida [25 mM Tris-HCl; 192 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS]. A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 10°C, em uma cuba modelo *PROTEIN II XI 2-D Cell* (BioRad). No primeiro estágio utilizou-se uma corrente fixa de 16 mA por gel por 30 min e no segundo estágio, utilizou-se uma corrente fixa de 24 mA por gel durante aproximadamente 5 h. Após a eletroforese, os géis foram lavados com água Milli-Q e corados com solução de coloração *Coomassie Brilliant Blue G 250*, realizada segundo o protocolo de Candiano et al. (2004) ou nitrato de prata de acordo com Blum et al., (1987).

4.8 Extração e Resolução da Proteína Total em SDS-PAGE:

As sementes liofilizadas e armazenadas a -80°C foram maceradas na presença de nitrogênio (N) líquido e 1% p/v de PVPP em almofariz e pistilo, obtendo-se uma “farinha” homogênea, a qual foi armazenada em tubos de centrifuga de 50 mL em freezer a -80°C . Pesou-se 200 mg desta “farinha” para cada amostra, as quais foram colocadas em tubos. Para extração das proteínas totais, adicionou-se em cada tubo 500 μl do tampão (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 18% de glicerol; 20% de SDS e 0,6 M de β -mercaptoetanol). Os tubos foram agitados por 5 min e centrifugados a 12.000 g por 10 min, e os sobrenadantes foram retirados e transferidos para novos tubos. Uma alíquota foi retirada para a quantificação destas proteínas realizadas como descrito anteriormente. Foi calculado o volume de sobrenadantes necessário para 6 μg de proteína em cada amostra, e após alíquotagem, o mesmo volume do tampão de dissociação (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 18% de glicerol; 20% de SDS; 0,6 M de β -mercaptoetanol e 0,05% de azul de bromofenol) foi adicionado em cada tubo. As amostras foram então fervidas por 1 min e aplicadas nos géis SDS-PAGE (12,5%), montado com os seguintes reagentes: solução Acrilamida e Bis-acrilamida (30:1); 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; Persulfato de amônio; TEMED; e H_2O Milli-Q, e o gel 4% (*stacking*) com os seguintes reagentes: Acrilamida e Bis-acrilamida (30:1); 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; Persulfato de amônio; TEMED; e H_2O Milli-Q. As amostras correram em cuba vertical, em sistema de tampão descontínuo e desnaturante, utilizando-se mini-gel no tamanho de 8,3 x 10,2 cm (*mini-Protean II* - BioRad). A corrida foi realizada em corrente fixa inicial de 50 V e após 30 min a corrente foi alterada para 70 V por placa por aproximadamente 4 h, quando foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G 250*, conforme o protocolo de Candiano et al., (2004).

4.9 Coloração com *Coomassie Brilliant Blue G 250*:

As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, conforme descrito a seguir. Os géis foram submetidos por 60 min a uma solução fixadora [40% (v/v) etanol; 10% (v/v) ácido acético], lavados duas vezes com água Milli-Q e mantidos por 24 h em solução de coloração [0,1% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue G 250*; 10% (v/v) ácido orto-fosfórico; 10% (p/v) sulfato de amônio; 20% (v/v) metanol]. Depois de corados, os géis foram lavados em água Milli-Q até a completa remoção excedente do corante.

4.10 Revelação com Nitrato de prata:

As proteínas foram visualizadas pela coloração com nitrato de prata conforme Blum et al., (1987), com algumas modificações. Inicialmente, os géis foram fixados por 1 h em solução de fixação contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético. Após uma lavagem por 15 min em solução de 30% de etanol, os géis foram incubados por 2 min em solução de 0,02% de tiosulfato de sódio e, posteriormente, lavados em água. Em seguida, os géis foram incubados por 25 min em solução de 0,2% de nitrato de prata e 0,08% de formaldeído. Após lavagem em água, a revelação foi realizada durante 5 min pela incubação dos géis em solução de 6% de carbonato de sódio, 0,16% de tiosulfato de sódio e 0,05% de formaldeído e interrompida utilizando uma solução de 10% de ácido acético. Após os géis foram mantidos em câmara fria em solução com 15% de metanol.

4.11 Obtenção e Análise das Imagens:

Os géis de poliacrilamida bidimensionais corados triplicados foram digitalizados com resolução de 200dpi com auxílio do programa LabScan versão 6.0 (GE Healthcare). Os parâmetros adotados para a obtenção das imagens foram constantes para todos os géis referentes às amostras dos três genótipos e dos três tempos de amostragem durante a fermentação.

Posteriormente, as imagens foram analisadas pelo programa Image Master Platinum 7.0 (GE Healthcare). Os parâmetros para detecção automatizada de *spots* foram otimizados por meio de análise em diferentes regiões dos géis 2-D. O contorno de cada *spot* foi avaliado manualmente para isolamento, remoção ou adição dos mesmos, quando necessário. Para a caracterização dos géis, mapas 2-D foram obtidos, contendo apenas os *spots* detectados em todas as repetições. Para tanto, os géis analisados foram alinhados visando atribuir identidades comuns entre os *spots* das diferentes repetições. Os mapas criados foram utilizados na caracterização do perfil eletroforético das proteínas detectadas.

4.12 Obtenção de extratos peptídicos:

A digestão de proteínas foi realizada *in gel* conforme o protocolo de Shevchenko et al., (2006), com algumas modificações. Para tanto, *spots* selecionados foram isolados dos géis 2-D, cortados em pequenos fragmentos, e em seguida tiveram o SDS removido e descorados por meio da adição de solução com 50% metanol e 2,5% ácido acético, e incubação por 2 h à TA. A solução foi então descartada e adicionada novamente com incubação por mais 1 h à TA. Posteriormente, as amostras foram desidratados por meio de adição de acetonitrila (ACN) por 5 min. Em seguida, as proteínas foram reduzidas e alquiladas em soluções de 100 mM de bicarbonato de amônio, contendo 10 mM de DTT por 30 min à TA, e 50 mM de IAA por 30 min à TA no escuro, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram lavadas com solução de 100 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC), desidratados por meio de adição de ACN por 5 min, e reidratados com solução de 100 mM de AMBIC. A digestão enzimática foi realizada pela adição de 20 ng L⁻¹ de tripsina (grau de sequenciamento, Promega, Madison, EUA). Os fragmentos foram reidratados na solução contendo tripsina por 30 min em banho de gelo e após, à 37°C por 16 h. Finalmente, os peptídeos foram extraídos em solução contendo 5% de ácido fórmico por uma vez, e 5% de ácido fórmico mais 50% ACN por 10 min à TA por duas vezes. Os sobrenadantes foram coletados e adicionados no mesmo tubo, sendo secos, e os peptídeos ressuspensos em 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA).

4.13 Fracionamento e análise dos peptídeos:

As misturas peptídicas resultantes do processo de digestão foram solubilizadas em 1% de ácido fórmico, e transferidas para tubos específicos para realização da espectrometria de massas. O sequenciamento das proteínas foi conduzido em plataforma LC-MS/MS em espectrômetro de massas com fonte de ionização por ESI e analisador de massas híbrido Q-TOF Ultima API (Waters, Micromass, Massachusetts, EUA), acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar CapLC XE Pump (Waters). Os peptídeos resultantes da digestão *in-gel* foram separados por coluna Symmetry C18 em tampão A (0,1% de ácido fórmico; 5% ACN em água Milli-Q) com um gradiente linear de 90 min com 0-80% do tampão B (0,1% de ácido fórmico; 5% ACN em água Milli-Q). A ionização por ESI foi realizada com a voltagem da fonte ajustada para 3,0 KV e temperatura do cone igual a 90°C, na presença de 5 psi de

Nitrogênio. A energia de colisão por gás Argônio foi mantida em 15 psi. Todos os parâmetros foram definidos através do programa MassLynx 4.1 SCN662.

4.14 Análise dos espectros de massa e identificação de proteínas:

Os espectros MS/MS gerados pelo sequenciamento dos peptídeos obtidos em cada ciclo de análise foram convertidos em um único arquivo tipo .mgf e processados pelo programa MASCOT MS/MS Íon Search (Matrix Science, Londres, Reino Unido), Este programa calcula uma pontuação para cada proteína encontrada a partir da probabilidade daquela identificação ser um evento aleatório. As buscas foram realizadas nos bancos de dados NCBI através do programa MASCOT v.2.2 (Matrix Science) instalado nos servidores locais. As configurações de busca foram: 50 ppm para tolerância de massas do íon precursor e 0,2 Da para os fragmentos. Foi permitido uma falha na fragmentação e carbamidometilação da cisteína e oxidação de metionina foram adicionadas como modificações variáveis.

4.15 Quantificação dos Flavanols:

A quantificação dos flavanols foi realizada pela mesma empresa (Mars Incorporated) onde a fermentação para este experimento foi conduzida. O procedimento foi realizado conforme o protocolo desenvolvido por Kelm et al., (2006) em HPLC d fase normal e espectrômetro de massas.

4.16 Análise sensorial:

4.16.1: Preparação dos líquors (realizada na Fazenda Almirante, *Mars Center for Cocoa Studies*, Itabuna, BA) :

As amêndoas fermentadas e secas dos diferentes clones foram separadamente quebradas em pequenos fragmentos (*nibs*) em moinho apropriado. Posteriormente foram separados testa, germe e cotilédones, por diferença de densidade, com auxílio de coluna de ar e por peneiragem. Os *nibs* obtidos foram torrados e moídos (triturados) em moinho apropriado e refinados para a obtenção dos líquors de cacau.

4.16.2: Análise sensorial:

A análise sensorial foi realizada por um provador perito (*expert assessor* Ed Seguíne) da empresa *Mars Incorporated* (EUA), sendo este um provador qualificado com um alto grau de sensibilidade sensorial e experiência na metodologia de análise sensorial, capaz de realizar ensaios consistentes e repetíveis em chocolates, tendo desenvolvido uma tabela (mostrado nos resultados) com os atributos a serem testados para qualidade do sabor de chocolate. Os líquidos foram identificados por meio de códigos de três dígitos numéricos aleatórios, apresentados de forma monádica seqüencial e segundo um delineamento de blocos incompletos casualizados totalizando 5 repetições de prova para cada amostra (MEILGAARD *et al*, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento de fermentação na Fazenda Almirante, *Mars Center for Cocoa Studies*:

Em outubro de 2008, foi montado um experimento na Fazenda Almirante (Barro Preto, BA), pertencente ao *Mars Center for Cocoa Studies*, onde foi realizado o processo de fermentação e as amostragens necessárias. Os genótipos foram escolhidos baseados na disponibilidade de frutos em quantidades suficientes para realizar as fermentações. Esses genótipos supostamente contrastam para qualidade do sabor e aroma de chocolate em análises conduzidas pela empresa previamente, sendo SIAL 70 com os melhores atributos para qualidade e sabor e aroma de chocolate, o Catongo com atributos intermediários, e o clone CCN 51 com valores inferiores quanto à qualidade do sabor e aroma de chocolate.

As sementes dos três genótipos foram fermentadas por cinco dias (120 h), o processo de fermentação ocorreu de forma normal, com elevação de temperatura nos dias esperados. Em relação à mudança de cor, as sementes indicam que a fermentação ocorreu normalmente com as alterações esperadas. As sementes violáceas de SIAL 70 e CCN 51 (Figuras 4 e 6) se tornaram marrons, enquanto que a de Catongo (brancas; Figura 5) se tornaram marron mais claro. A intensificação da coloração marrom com a fermentação e secagem devem-se às reações de oxidação que ocorrem nestas etapas.



Figura 4 - Amostras de sementes da variedade SIAL 70 liofilizadas e sem testa. Sem fermentação (0h); 24; 48; 72; 96; 120 h de fermentação e sementes após a secagem

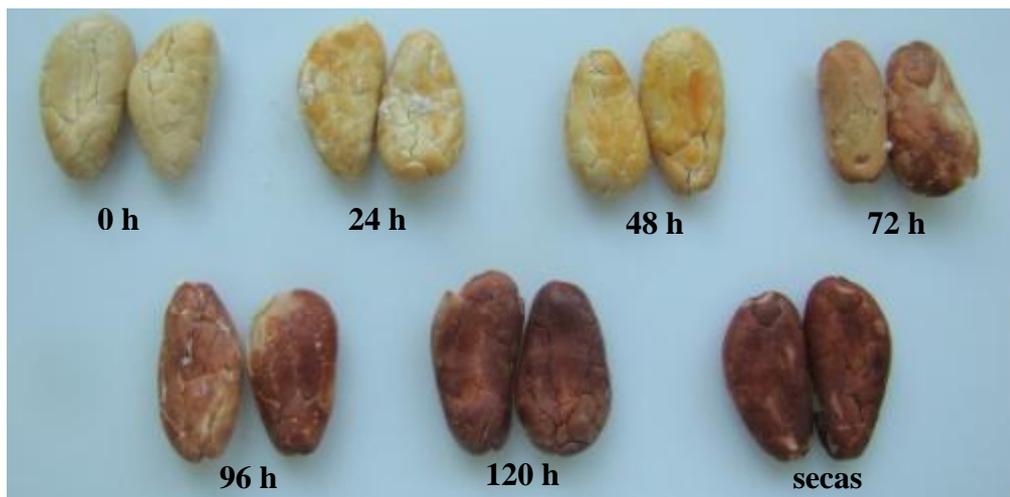


Figura 5 - Amostras de sementes da variedade Catongo liofilizadas e sem testa. Sem fermentação (0h); 24; 48; 72; 96; 120 h de fermentação e sementes após a secagem



Figura 6 - Amostras de sementes da variedade CCN 51 liofilizadas e sem testa. Sem fermentação (0h); 24; 48; 72; 96; 120 h de fermentação e sementes após a secagem

5.2 Seleção de metodologia de extração de proteínas de cotilédones de *Theobroma cacao* e sistema de eletroforese bidimensional:

Em trabalho anterior do nosso grupo (dados não publicados), foi desenvolvido um método de extração de proteínas baseado na extração ácida com TCA descrita por Damerval et al., 1986, com algumas modificações. Esse protocolo foi então testado para as novas amostras de *T. cacao*, mas se revelaram com um perfil protéico de qualidade inferior ao

esperado, com uma quantidade de *spots* menor e com menor resolução do que as já analisadas (Anexo A). Proteínas, lipídios e amido são as principais fontes de reserva de energia em sementes, sendo sintetizadas em abundância durante o desenvolvimento dos cotilédones (YANG et al., 2007). Carboidratos, como o amido, podem bloquear os poros dos géis de acrilamida, causando precipitação, aumento no tempo de focalização, rastros e perda de proteínas durante a focalização isoeétrica (CARPENTIER et al., 2005).

Segundo Alfenas et al., (1998), um dos problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas de plantas é a presença de compostos fenólicos liberados durante a maceração do tecido. Tais fenóis, quando descompartimentalizados, são prontamente oxidados a quinonas por enzimas da própria planta (polifenoloxidasas e peroxidases). Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas, e inativam as enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas, o que resulta em artefatos no gel. Em estudos com cacau, Pirovani et al., 2008, também relataram problemas para definir boas condições na preparação de proteínas antes do IEF ou gel 2-DE gel, pois os polissacarídeos interferiam nas análises contaminando o extrato de proteínas. Para superar este problema, desenvolveram um novo protocolo de extração de proteínas de cacau que tentavam minimizar a presença de tais compostos, o protocolo desenvolvido permitiu a extração de proteínas de cacau sob condições de desnaturação usando fenol em combinação com uma etapa de sonicação.

Estudos comparativos do proteoma de um organismo por 2-DE requerem a maximização no número de *spots* detectados e a obtenção de géis reprodutíveis. Existem vários protocolos de extração de proteínas de plantas publicados, e quase sempre estes são adaptados conforme o tecido analisado, a espécie e a proteína de interesse. As recomendações são que o método tenha como princípio básico: ser o mais simples possível, com reprodutibilidade, e as modificações durante o preparo da amostra devem ser minimizadas, pois podem resultar em artefatos no gel bidimensional (DUNN, 1993; GORG et al., 2004).

Vários protocolos publicados para analisar tecidos de plantas recalcitrantes, contendo altos níveis de compostos interferentes, foram testados anteriormente e não demonstraram ser eficazes em extratos de sementes de cacau. Então, duas metodologias de extração de proteínas de cotilédones de *T. cacao* foram analisadas: a) solubilização e precipitação em ácido tricloroacético (TCA) (Damerval et al., 1986), que já estava sendo realizada, mas algumas modificações foram incorporadas e; b) extração bifásica em fenol, seguido de precipitação em acetato de amônio CARPENTIER et al. (2005).

Amostras de sementes não fermentadas de Catongo foram então utilizadas para extração pelo método da extração ácida onde é usado TCA (ANEXO B – painel A) e na fenólica (Anexo B – painel B), e testadas por meio de gel bidimensional.

Embora não tenham sido verificados diferentes padrões de distribuição da massa molar (Mm) e pI entre as metodologias de extração avaliadas (Anexo B), houve variação no número total de *spots*. Além disso, foram verificadas diferentes quantidades de *spots* específicos, indicando que tais variações podem refletir a heterogeneidade físico-química das proteínas, e as distintas propriedades de solubilização das metodologias testadas. O fenômeno de comigração de *spots*, ou padrão similar de distribuição eletroforética, é comum em análises bidimensionais de amostras protéicas complexas, e pode resultar em géis 2-D de baixa resolução. Tal fato, associado às impurezas e rastros presentes nos géis, podem interferir na visualização e detecção dos mesmos, gerando mapas 2-D com baixo número de *spots*.

Os resultados mostrados no Anexo B confirmaram melhor eficiência na extração de proteínas pelo método da extração ácida onde é usado TCA, pois com esta metodologia a presença de rastros foi menor do que a encontrada pelo método da extração fenólica e também a resolução dos *spots* se mostrou melhor. Esta ausência de rastros é de extrema importância para a análise dos *spots* pelo programa Image Master 7.0 onde cada *spot* deve ser identificado para PM e pI, e onde também é determinado seu volume, sendo assim a presença destes rastros influenciaria na determinação destes resultados. A minimização dos rastros é importante também para a retirada dos *spots* e posterior digestão com tripsina para o sequenciamento das proteínas através da espectrometria de massas. Portanto, optou-se então pela extração de proteínas de reserva pelo método da extração ácida.

Apesar da melhoria na eficiência na eliminação de compostos interferentes, que geram os rastros durante a segunda dimensão, a quantidade e resolução dos *spots*, e reprodutibilidade dos géis continuavam sendo insuficientes. Para tentar resolver estes problemas, foram estudadas novas concentrações de reagentes, utilização de *kit* comercial de limpeza de proteínas, e outras condições de focalização das fitas e coloração dos géis. Para melhorar a solubilização e visualização das proteínas focalizadas nas fitas, o tempo de exposição dos extratos proteicos na solução de redução antes de ser transferida para a segunda dimensão foi aumentado de 15 min para 30 min. Houve uma melhora significativa na resolução dos *spots* (Anexo C), mas ainda não foi satisfatória para a sequência das análises. A separação das proteínas totais pela focalização isoelétrica, revelou que a faixa de pH muito ampla diminui a eficiência de separação dos *spots*, além de prejudicar o sequenciamento, uma vez que mais de

uma proteína poderia ser encontrada por *spot*. Pode ser observado (Anexo C) que o maior número de *spots* bem corados localizam-se entre os pHs 4 e 8. Portanto, fitas que abrangiam somente a região de pH 4-7 foram testadas para separação das proteínas, o que melhorou a separação dos *spots*.

As condições necessárias para coloração dos géis com *Coomassie Brilliant Blue G-250* não foram satisfatórias para identificação de um número expressivo de *spots*, reprodutibilidade e repetibilidade dos géis, assim sendo, para aumentar a sensibilidade do método, foi utilizada a coloração com prata que é mais sensível, requerendo uma menor quantidade de proteína durante a focalização. A coloração utilizando o método que contém nitrato de prata mostrou-se superior aos géis corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Anexo D).

Estas novas condições de separação e coloração ainda revelaram a presença de rastros verticais, possivelmente devido ainda à presença de compostos fenólicos e/ou polissacarídeos contaminantes ainda presentes nas amostras. Para minimizar estes interferentes, as amostras passaram por um processo de limpeza com a utilização do kit *2D- Clean-up* (GE Healthcare). Após este processo, ainda foram observados (como visualizados no Anexo E) a presença de rastros, que poderiam ser devidos à um choque eletrosmótico provocado pela ausência de compostos anteriormente presentes nas amostras, que interferiam na migração das proteínas durante a focalização. Assim uma diminuição gradativa da voltagem total acumulada de 62 kV h⁻¹ foi testada. Com o resultado obtido (Anexo F), onde a voltagem acumulada de 40 kV h⁻¹ foi considerada satisfatória, já que os géis não apresentavam mais rastros e a resolução dos *spots* estava adequada. As análises foram então conduzidas em triplicata biológica para cada um dos genótipos e nos três momentos escolhidos para o estudo, a figura 7 exemplifica uma das triplicatas obtidas, neste exemplo, a triplicata obtida para o genótipo SIAL 70 antes do início da fermentação.

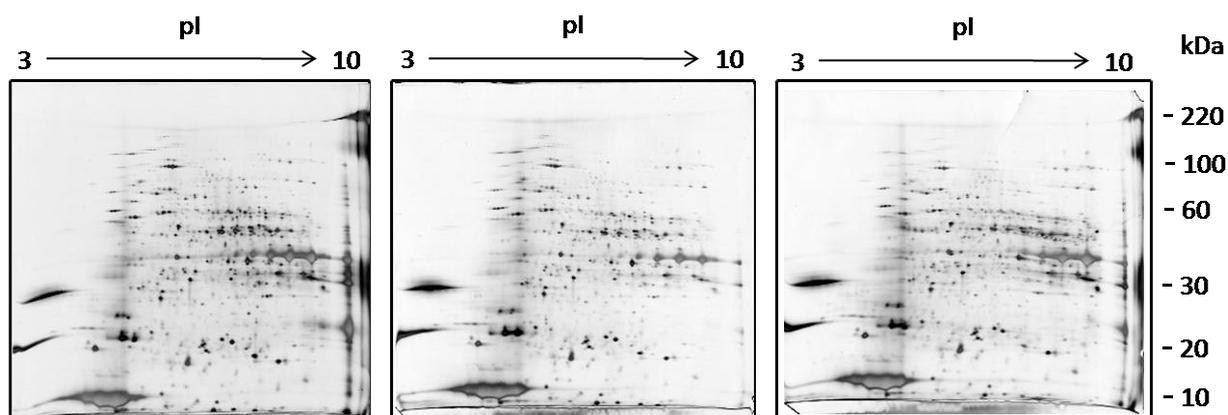


Figura 7 - Géis bidimensionais (em triplicata) de proteínas totais de sementes de cacau SIAL 70 sem fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

5.3 Avaliação da degradação protéica por SDS-PAGE durante a fermentação:

Após otimizações dos protocolos de extração de proteínas, IEF e segunda dimensão para as sementes de Catongo antes da fermentação, foram realizadas extrações das proteínas totais dos três genótipos (SIAL 70, Catongo e CCN 51) em todos os tempos de amostragem (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h), como também das sementes secas pós-fermentação. Os perfis protéicos totais foram visualizados em SDS-PAGE (Figura 8) para que o momento inicial da degradação protéica pudesse ser observado e então analisado por gel bidimensional. As análises das proteínas totais de sementes das três variedades indicaram que a fermentação foi concluída ao final de 120 h (Figura 8), com uma típica degradação total de proteínas. Nas três variedades estudadas, as proteínas totais de peso molecular acima de 20 kDa foram aparentemente degradadas após 120 h de fermentação, enquanto que proteínas menores que 15 kDa e/ou oligopeptídeos resultantes da digestão permaneceram. A maior degradação das proteínas foi detectada após 72 h de fermentação, o mesmo período descrito por Amin et al. (1997). Diferentemente, Biehl, Wewetzer e Passern (1982) relataram a ocorrência de proteólise na fermentação das sementes de cacau após 48 horas. Estas diferenças de tempo podem derivar de variações nas práticas de fermentação, tais como o regime de revolvimento das sementes e/ou fatores de pré-fermentação, como o tempo de colheita e grau de maturidade das sementes (BIEHL; WEWETZER; PASSERN, 1982; AMIN et al., 1997). Durante a fermentação, as proteínas de reserva da classe vicilina entre 42 e 56 kDa aparentemente foram degradadas após 96 h (Figura 8), similarmente ao observado por Spencer & Hodge (1991), que relataram a degradação das proteínas de 40 e 55 kDa neste mesmo período de

fermentação. Particularmente, a albumina inibidora de tripsina tipo Kunitz de 21 kDa, caracterizada por Spencer & Hodge (1992), foi mais resistente à proteólise, corroborando com o relatado anteriormente por AMIN et al. (1997). As proteínas começaram a ser degradadas com 72 horas de fermentação (Figura 8), sendo então o tempo escolhido na fase intermediária da fermentação para análises em géis bidimensionais.

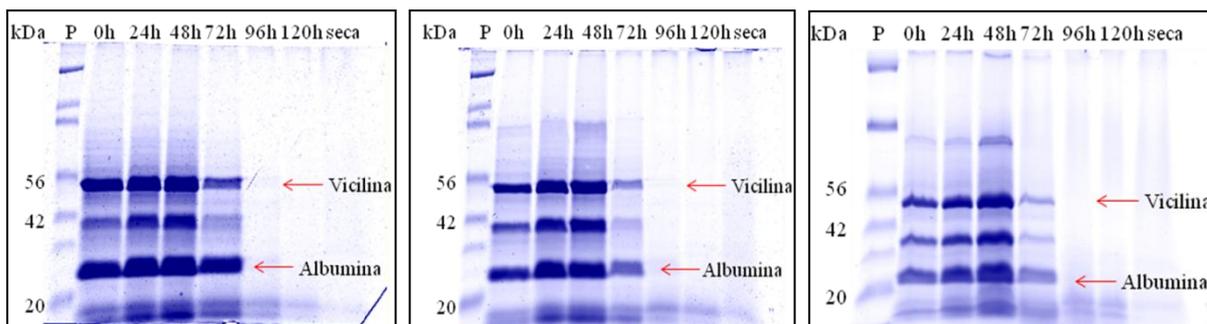


Figura 8 - Análise de gel SDS-PAGE de proteínas totais de sementes de cacauero indicando a evolução da degradação protéica durante a fermentação e secagem das sementes dos genótipos SIAL 70 (A), Catongo (B) e CCN 51 (C). Linhas representam: peso molecular padrão (P); amostras coletadas (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h durante a fermentação) e após a secagem. Como referência foi usada uma classe de proteínas com peso molecular similar a uma vicilina (47 kDa) e uma albumina (21 kDa)

5.4 Variação no conteúdo de proteínas e caracterização dos mapas protéicos:

Foram conduzidas as análises dos géis bidimensionais com pH 4-7 L em triplicata biológica para proteínas de sementes dos três genótipos amostrados antes do início da fermentação, com 72 e 120 h do processo de fermentação. Os géis foram analisados pelo programa Image Master 2D 7.0 Platinum. As áreas extremas dos géis que possuíam apenas rastros ou *streaking* foram recortadas pelo programa para facilitar nas análises das imagens, evitando-se assim a detecção de falsos *spots*. Antes da detecção automática, a intensidade, volume e saliência dos *spots* (grande, pequeno, intenso, fraco) foram observados em área delimitada do gel (*prevêem modo*), e os parâmetros foram modificados para melhor visualização dos *spots*, antes de sua detecção final (numero de *smooths*, 2-3, *saliência* em torno de 10-30 e *maximum minimal area*). Foi realizada também uma edição manual, com remoção dos *spots* que não apresentaram repetibilidade e adição de *spots* que não foram identificados pelo programa. Para a determinação da quantidade relativa de cada *spot* foi

utilizada a ferramenta de normalização do volume, quando cada *spot* normalizado representa a porcentagem que a proteína ocupa no gel, e o volume de cada *spot* foi dividido pelo volume total de todos os *spots* no gel e multiplicado por um fator constante de valor 100, que produz uma porcentagem de volume de cada *spot*. Pelo programa foram estimados as massas moleculares e os pontos isoelétricos. Em todos os géis analisados, os parâmetros do programa aplicados no ajuste da análise foram mantidos constantes.

A comparação entre géis foi feita de forma automática, após o estabelecimento de um gel de referência, e depois de identificar vários pontos de referência nos géis. Nessa ferramenta do programa, o gel de referência se sobrepõe aos outros géis, alinhando os *spots*, mas algumas correções manuais nesta etapa também foram necessárias em decorrência das deformidades intrínsecas de cada gel. O *software* permitiu localizar, quantificar e fazer *matching* dos *spots* de proteínas entre os géis.

Para processamento, foi gerada uma lista de todos os *spots* visualizados contendo dados como intensidade normalizada (% de cada *spot*), *background* e os valores experimentais do pI da primeira dimensão e massa molecular da segunda dimensão de todos os *spots* (pI e PM teóricos), permitindo a comparação dos dados obtidos entre os géis e identificação dos *spots* diferenciais e comuns.

5.4.1 Análise das proteínas totais das sementes dos genótipos de *T. cacao* durante a fermentação:

5.4.1.1 SIAL 70:

As análises dos mapas 2-D das proteínas de sementes de SIAL 70 antes da fermentação das sementes (0 h) mostra a presença de um grande número de proteínas, com cerca de 698 *spots* (Figura 9). Após 72 h de fermentação, foram detectados 86 *spots*, representando uma redução de 87,6 % no número total de *spots* (Figura 10), e com 120 h de fermentação foram detectados 30 *spots* (Figura 11), representando uma redução de 95,7 % quando comparado com o início da fermentação, e de 31,2 % quando comparado com 72 h de fermentação, com uma grande redução de *spots*, mais acentuada até as 72 h de fermentação. O diagrama de Venn (Figura 12), ilustra a relação dos *spots* comuns entre os períodos de amostragem. Pelo diagrama, nota-se que dos *spots* encontrados durante todo o período de fermentação, 12 *spots* são comuns aos três períodos analisados, estes *spots* estão presentes somente nas faixas mais ácidas de pH

(até 5) e com pesos moleculares entre 15 e 25 kDa, indicando portanto a presença da albumina de 21 kDa até o final da fermentação, 623 são exclusivos do início do processo (0h), 24 *spots* somente aparecem com 72 h de fermentação e 5, somente com 120 h (Figura 12). O fato de alguns *spots* estarem presentes somente com 72 e 120 h de fermentação deve-se provavelmente ao fato da degradação protéica que ocorre durante a fermentação, gerando subprodutos (oligopeptídeos) com pI e peso molecular distintos.

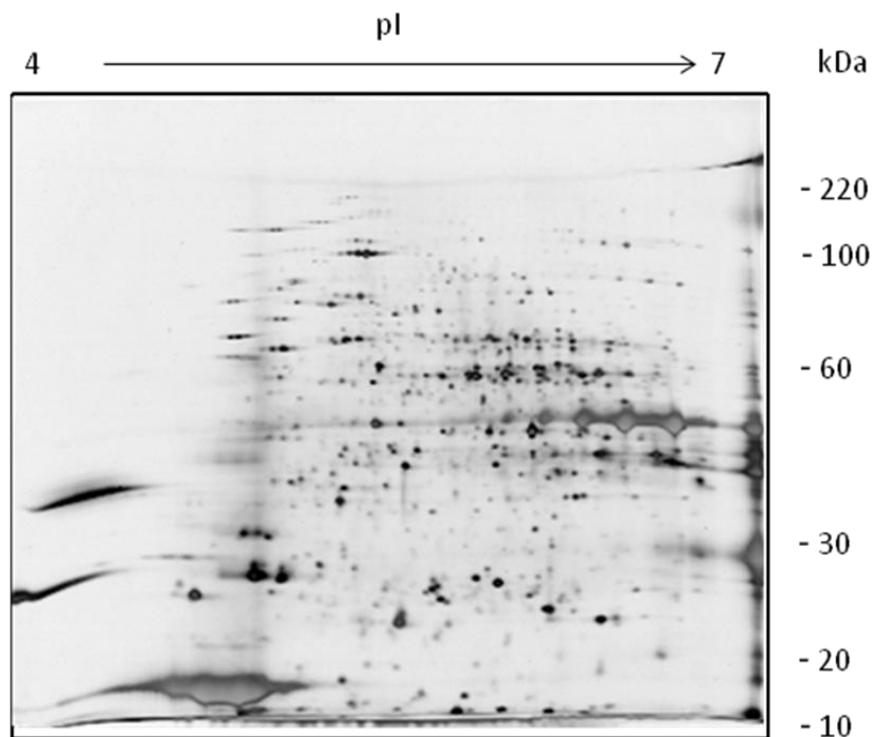


Figura 9 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero SIAL 70 sem fermentação, analisadas 150 μ g de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

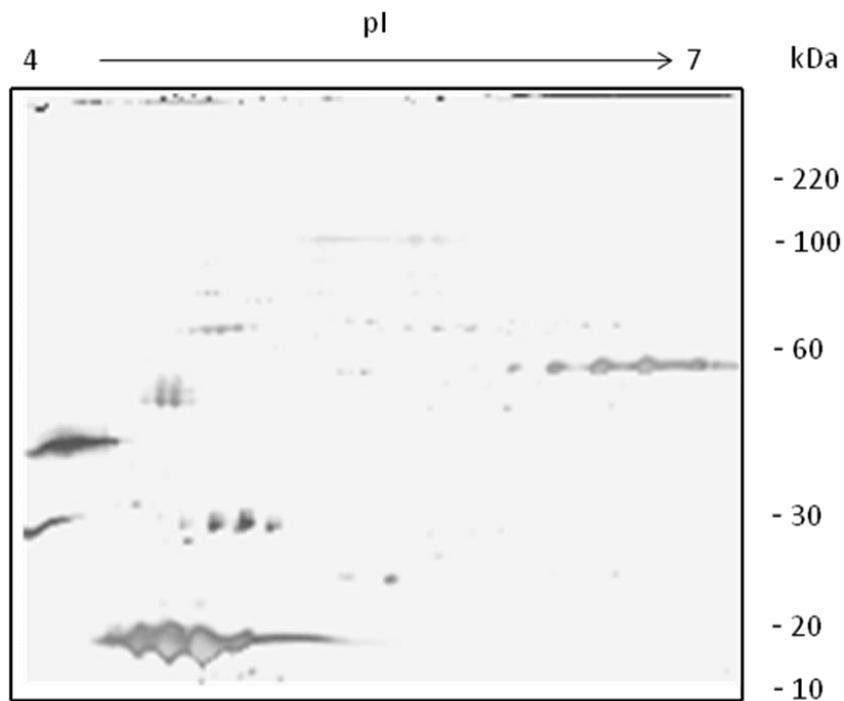


Figura 10 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero SIAL 70 com 72 horas de fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

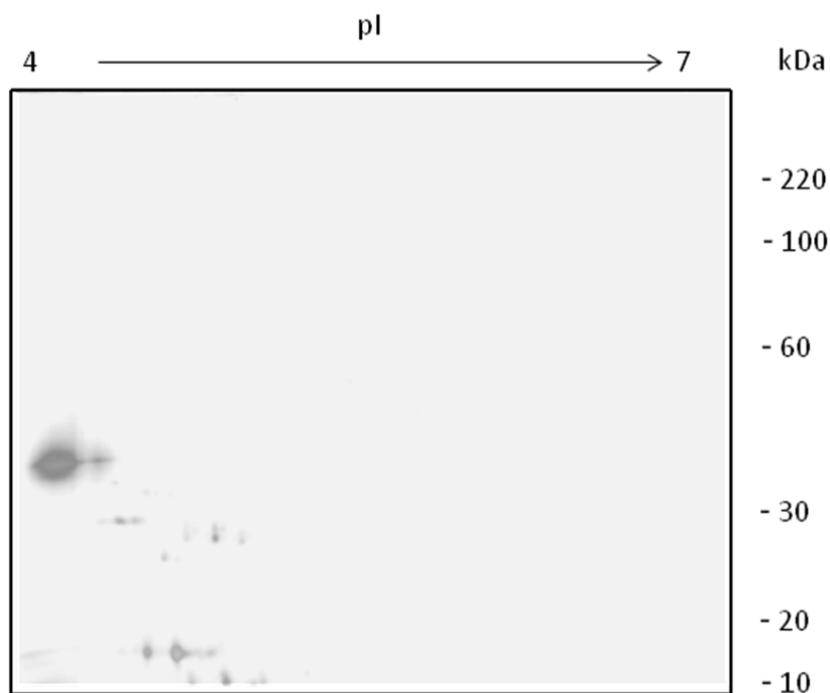


Figura 11 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero SIAL 70 com 120 horas de fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

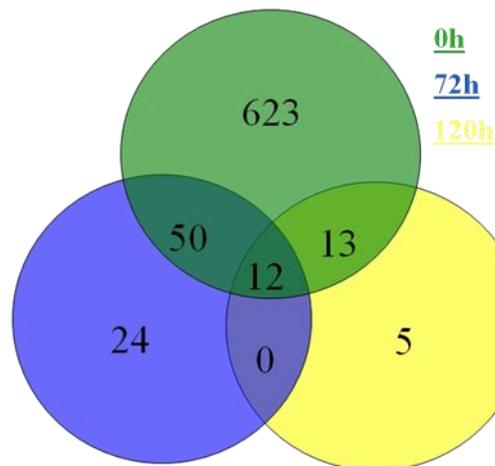


Figura 12 - Diagrama de Venn de *T. cacao* da variedade SIAL 70 entre os períodos de amostragem durante a fermentação (0, 72 e 120 h)

5.4.1.2 Catongo:

As análises de imagens dos perfis protéicos das sementes nos cotilédones de Catongo antes da fermentação das sementes (0 h) mostraram a presença de cerca de 589 *spots* (Figura 13). Após 72 horas de fermentação, foram detectados apenas 90 *spots*, representando uma redução de 84,7 % no número total de *spots* (Figura 14), e com 120 h de fermentação, foram detectados 34 *spots* (Figura 15) representando uma redução de 94,2 % quando comparado com o início da fermentação e de 37,7 % quando comparado com 72 h de fermentação, semelhante à encontrada para a variedade Sial 70. O diagrama de Venn (Figura 16) representa a relação dos *spots* durante a fermentação, 17 *spots* são comuns aos três períodos analisados e estão na mesma localização dos *spots* encontrados em SIAL 70, 407 pertencem ao início do processo de fermentação (0h), 8 *spots* somente aparecem com 72 h de fermentação e 7, somente com 120 h.

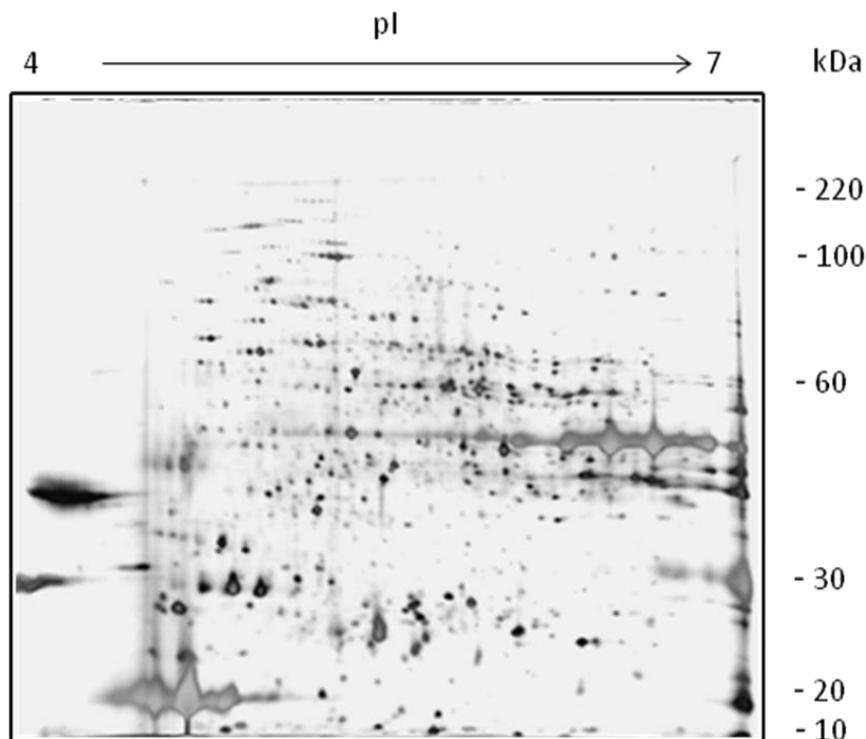


Figura 13 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero Catongo sem fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

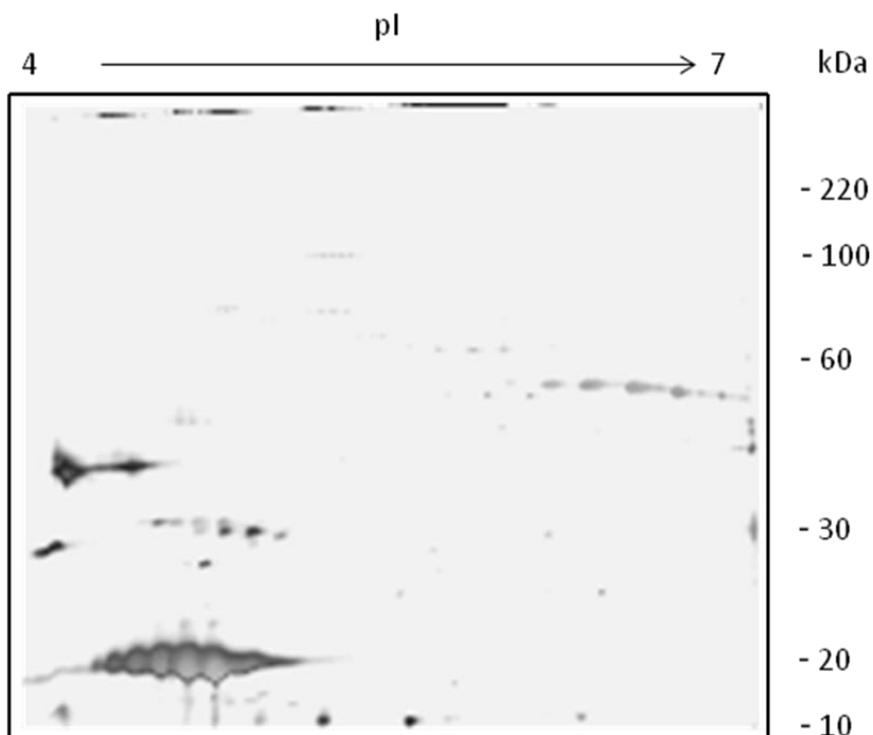


Figura 14 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero Catongo com 72 horas de fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

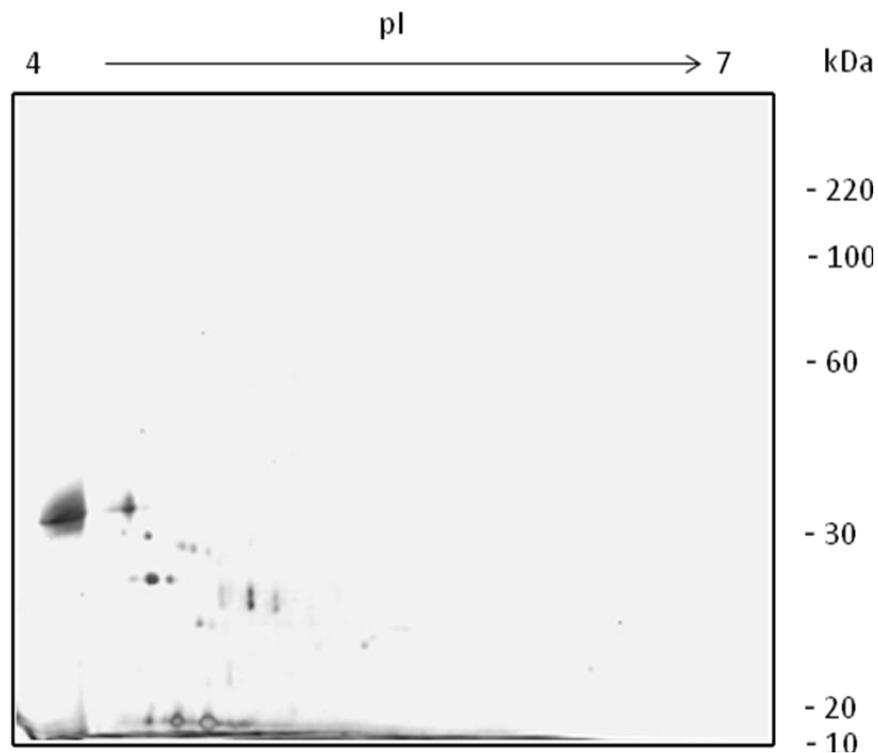


Figura 15 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero Catongo com 120 horas de fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

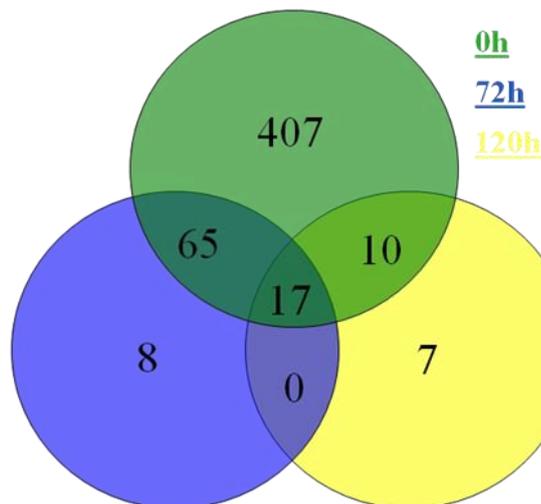


Figura 16 - Diagrama de Venn de *T. cacao* da variedade Catongo entre os períodos de amostragem durante a fermentação (0, 72 e 120 h)

5.4.1.3 CCN 51:

Os mapas 2-D das sementes dos cotilédones de CCN 51 antes da fermentação das sementes (0 h) revelaram a presença de 373 *spots* (Figura 17). Após 72 h de fermentação, foram detectados 226 *spots*, 39, 4 % menor que o número total de *spots* (Figura 18), e com 120 h de fermentação foram detectados 178 *spots*, 47,7 % menor comparado com o início da fermentação e 78,7 % quando comparado com 72 h de fermentação (Figura 19), mostrando redução no número *spots*, mas não tanto grande quando comparado com as outros dois genótipos analisados. Nesta variedade, o diagrama de Venn (Figura 20) ilustra a presença de 47 *spots* comuns aos três períodos analisados; 174 pertencem exclusivamente ao início do processo de fermentação (0 h); 62 *spots* estão presentes somente com 72 h de fermentação; e 94, somente com 120 h. O genótipo CCN 51 foi o que apresentou maior variação na relação de *spots* durante o processo de fermentação. Alguns dos *spots* que estão presentes somente com 72 e 120 h de fermentação são possivelmente consequências do processo degradativo que ocorre com as proteínas durante a fermentação.

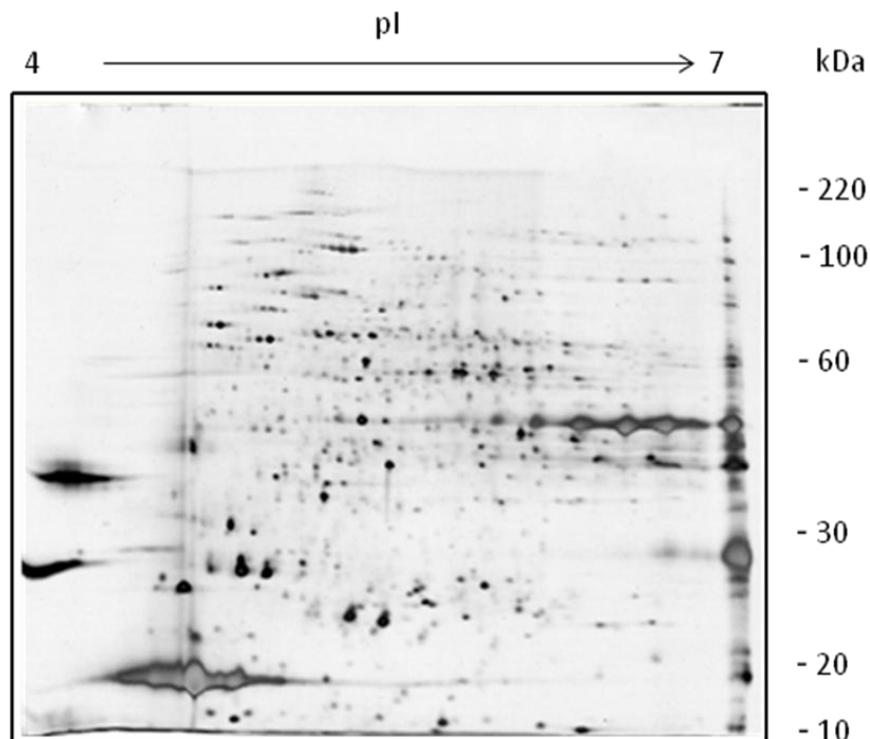


Figura 17 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero CCN 51 sem fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

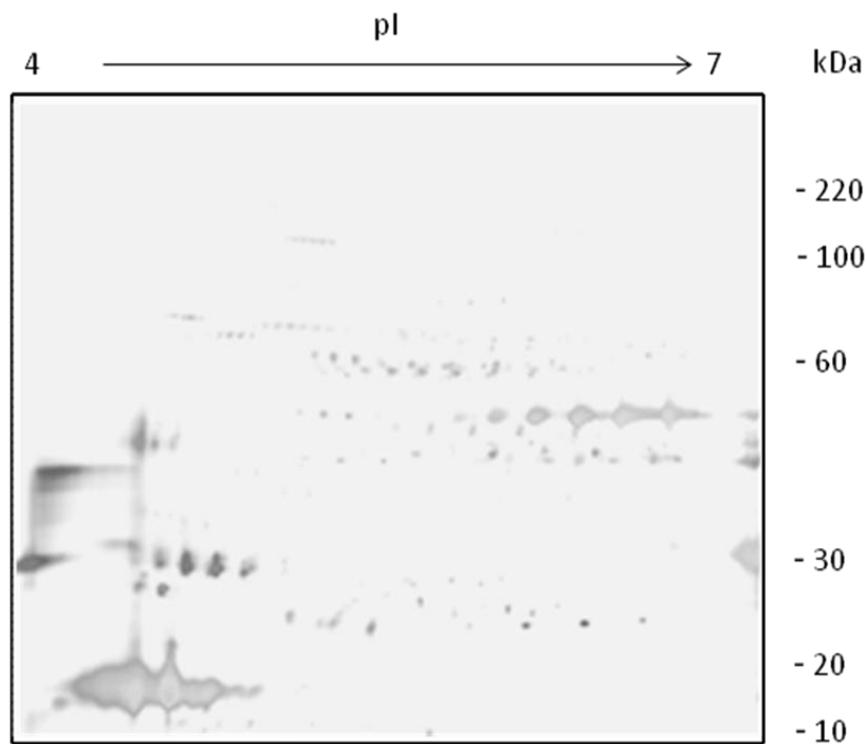


Figura 18 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero CCN 51 com 72 horas de fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

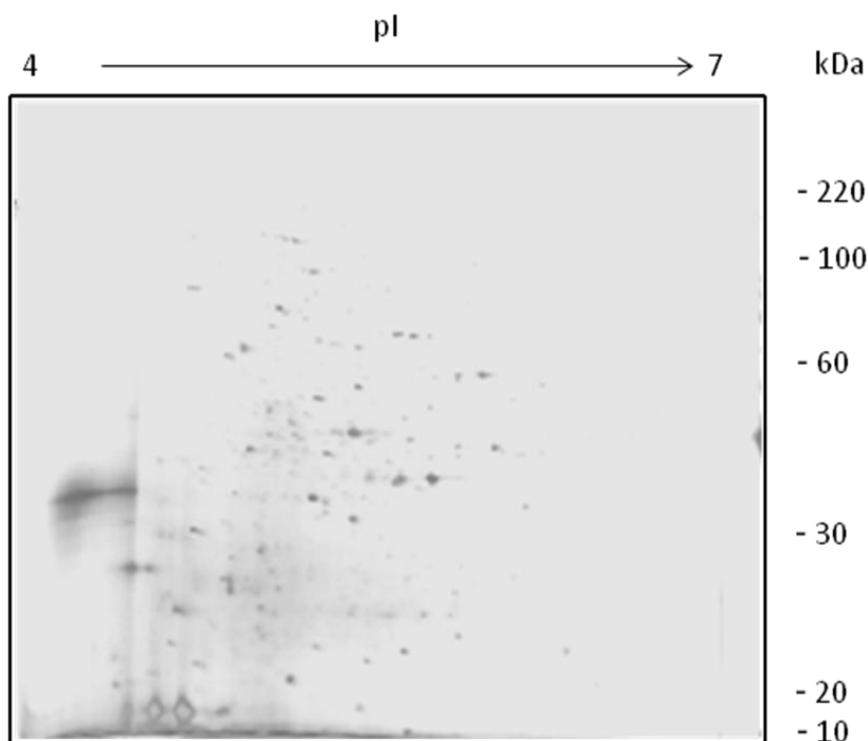


Figura 19 - Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero CCN 51 com 120 horas de fermentação, analisadas 150 µg de proteína em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração com nitrato de prata

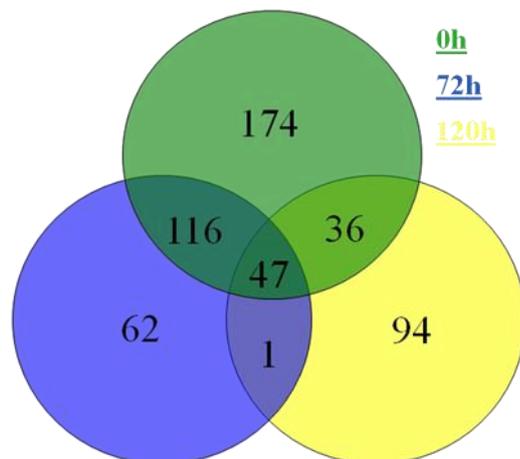


Figura 20 - Diagrama de Veen de *T. cacao* da variedade CCN 51 entre os períodos de amostragem durante a fermentação (0, 72 e 120 h)

Durante a fermentação das sementes dos três genótipos estudados houve redução importante no número de *spots*, sendo mais acentuada nas variedades SIAL 70 e Catongo. A evolução dos mapas 2D-PAGE demonstram que algumas proteínas são protegidas contra a proteólise, particularmente aquelas com pI ácido. Biehl et al. (1982) forneceram evidências de que a proteína de 21 kDa inibidora de tripsina não seria degradada durante a fermentação. Os resultados presentes sugerem que a proteólise da proteína ocorre, mas apenas de forma limitada. Inúmeros fatores podem contribuir para produzir uma proteção contra a proteólise, incluindo as propriedades moleculares e funções da proteína, a sua localização celular e a influência do pH ou reações de escurecimento enzimático. No caso dos inibidores de protease, estes são geralmente conhecidos por serem resistentes a pH extremos e enzimas proteolíticas (RICHARDSON, 1991; LERCERTEAU, 1999). Inibidores de tripsina do tipo Kunitz geralmente têm sido descritos como sensíveis ao calor (VOGEL et al., 1968; LERCERTEAU, 1999), mas podem resistir à temperatura de fermentação.

Localização espacial pode explicar o rápido desaparecimento dos componentes das proteínas de reserva localizadas próximas a epiderme e possivelmente, a proteção de outras que podem estar localizadas no centro da semente (BIEHL et al., 1982). A proteólise que ocorre durante a fermentação depende do estado de biossíntese celular e dos aparelhos catabólicos. Opiniões divergem quanto ao início deste processo, que pode começar a ocorrer antes morte do embrião (BAREL e VINCENT, 1983; LERCERTEAU, 1999) ou somente após (BIRCH, 1941; FORSYTH et al., 1958). O início de fermentação está associado com o aumento da temperatura e acidez. Foi relatado que são necessárias de 24 a 36 horas de

fermentação para atingir uma temperatura de 45°C (BIEHL e PASSERN, 1982). A produção dos ácidos láctico e acético ocorre durante os primeiros 2 e 3 dias de fermentação da polpa (ROELOFSEN, 1958; LERCERTEAU, 1999), e estes ácidos são subseqüentemente absorvidos pelas sementes. Isto está associado a uma fase de desagregação celular, perda de compartimentalização e absorção de água, que são esperados facilitar a quebra de proteínas por proteases. O processo de descompartimentalização, no entanto, tem também sido relatado na liberação de compostos polifenólicos, tornando possíveis reações entre os compostos e proteínas, tornando insolúvel o último por escurecimento fenólico (ZAK e KEENEY, 1976; LERCERTEAU, 1999). Um processo bifásico é assim sugerido durante o qual o início da degradação celular é seguido por uma estabilização de certas proteínas devido ao fenômeno de escurecimento.

5.4.2 Análise dos genótipos de *T. cacao* em cada momento da fermentação:

5.4.2.1 Sementes frescas:

A 2-DE permite a detecção de propriedades físico-químicas das proteínas fracionadas, como por exemplo a massa molecular relativa (Mr) (CHEN e HARMON, 2006). Antes da fermentação houve diferenças entre o número de *spots* detectados, mas os perfis de distribuição dos *spots* não diferiram para o peso molecular entre os genótipos.

As análises 2-D antes da fermentação (0 h) mostram variação no número total de *spots* detectados entre genótipos, SIAL 70, Catongo e CCN 51. O SIAL 70 foi o que apresentou o maior número de *spots* detectados (698 *spots*), enquanto que Catongo apresentou 589 e CCN 51 apenas 373 *spots*. Esta variação no número de *spots* ocorreu dentro de cada genótipo em todas triplicatas, mostrando que não houve problemas com o processo de fermentação na degradação de proteínas.

Pela análise de imagens, antes do início da fermentação foram detectados 296 *spots* (42,4 %) comuns aos três genótipos (Figura 21, *spots* em verde). As proteínas totais de sementes de SIAL 70 demonstraram 291 *spots* exclusivos (Figura 22, *spots* em verde), enquanto que Catongo apresentou 96 exclusivos (Figura 23, *spots* em verde), e CCN 51 apresentou apenas 25 *spots* exclusivos (Figura 24, *spots* em verde). O diagrama de Venn (Figura 25) ilustra a relação dos *spots* exclusivos e comuns entre os genótipos antes do início da fermentação.

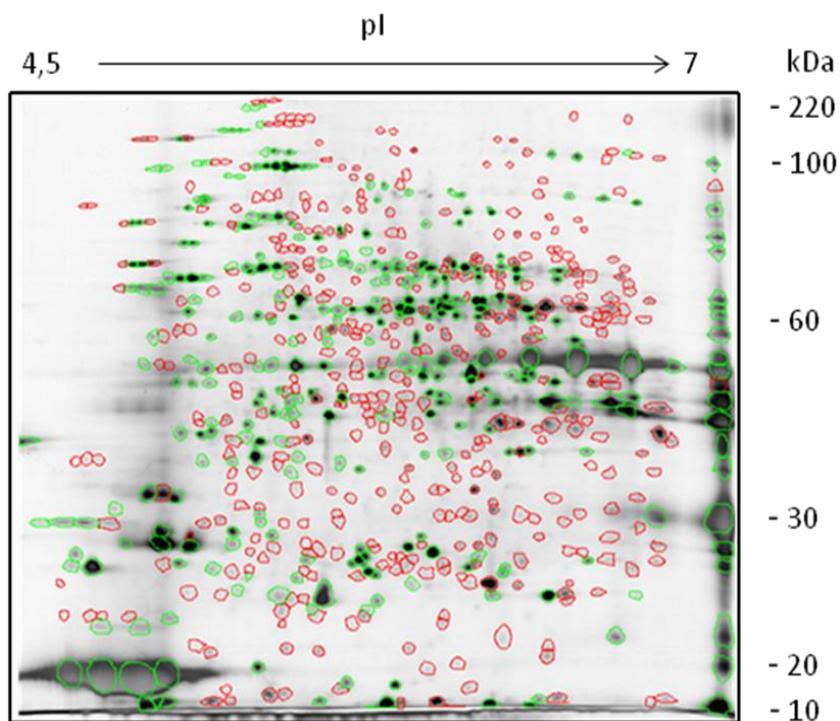


Figura 21 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* comuns (em verde) aos três genótipos para três genótipos, baseada na imagem de SIAL 70 antes do início da fermentação

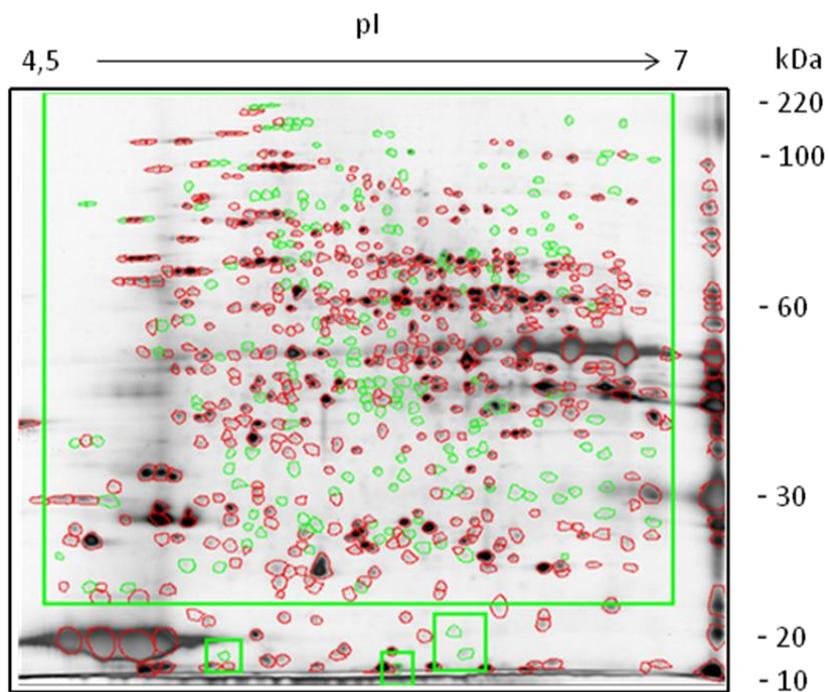


Figura 22 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos de SIAL 70 (em verde), baseada na imagem de SIAL 70 antes do início da fermentação

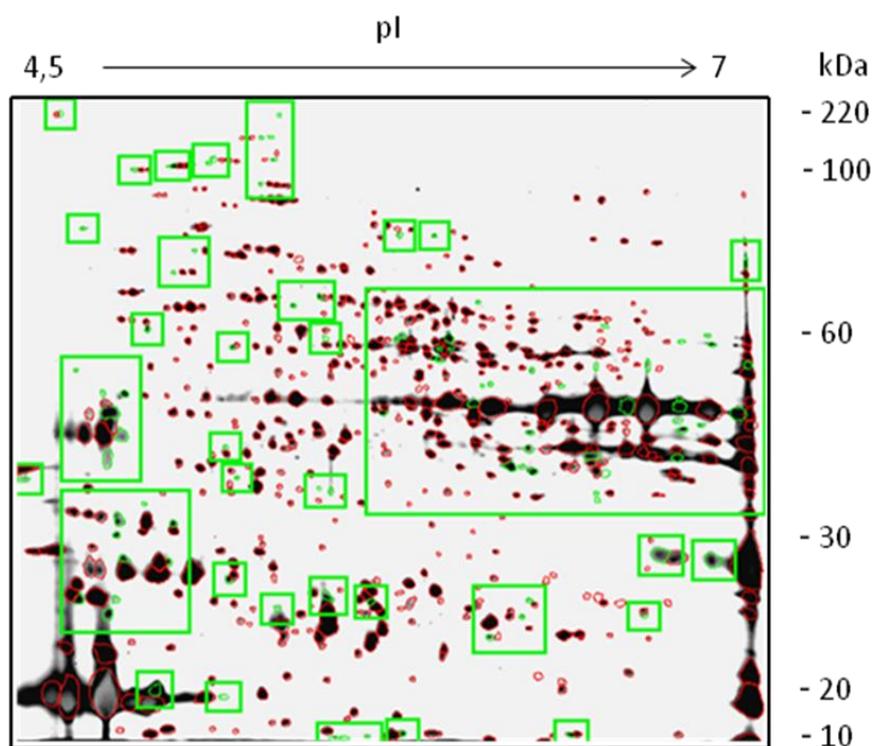


Figura 23 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em Catongo antes do início da fermentação

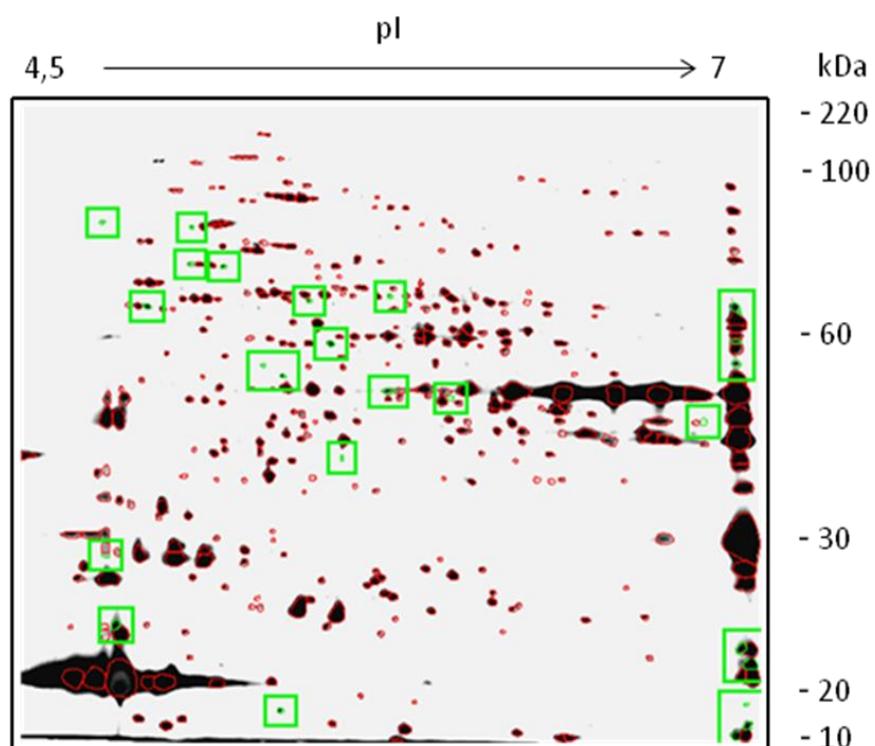


Figura 24 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em CCN 51 antes do início da fermentação

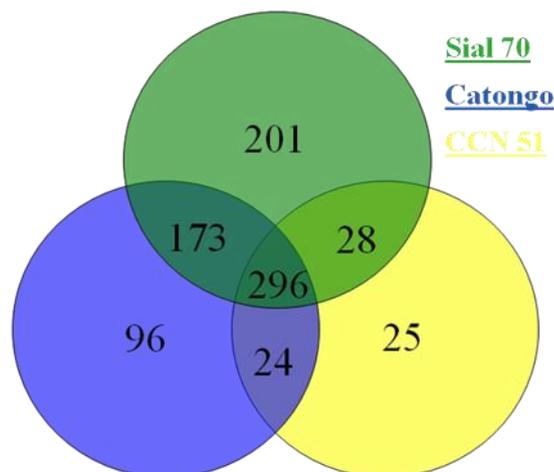


Figura 25 - Diagrama de Venn indicando o número de spots de proteínas de sementes de cacauero comuns e/ou exclusivas aos três genótipos de *T. cacao* antes do início da fermentação

As sementes de *T. cacao* contém duas frações proeminentes de proteínas de sementes (VOIGT, 1993). A primeira, a fração albumina, com uma aparente componente principal de massa molecular de 21 kDa . O gene codificador da principal proteína da fração albumina (o polipeptídeo inibidor de tripsina de 21 kDa) correspondente a 21% do total de proteínas das sementes) foi o primeiro gene a ser clonado e seqüenciado, e com alta similaridade com inibidores de tripsina tipo Kunitz, sugerindo tratar-se de um inibidor de proteases (SPENCER; HODGE, 1991; TAI et al., 1991, PAULILLO, 2004). Posteriormente, utilizando-se a proteína de 21 kDa das sementes de cacau purificada, confirmou-se tratarem-se realmente de um inibidor de tripsina com atividade inibitória duas vezes maior que o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (DODO et al., 1992; PAULILLO, 2004). Inibidores de proteases estão presentes em sementes de muitas espécies de plantas, onde possam atuar como compostos anti-herbívoro, como armazenamento de enxofre; como reguladores de proteases endógenas, ou qualquer combinação destas funções (BAEK et al. 1994, HAMMOND et al. , 1984; SILVA et al., 2005). Os inibidores serina-proteinase são uma classe bem caracterizada de inibidores, que podem ser classificados em pelo menos 16 famílias com base no mecanismo de ligação à proteína-alvo e na seqüência de similaridade (BODE; HUBER, 1992; SILVA et al., 2005). Entre os inibidores serino-proteinase, os inibidores da soja Bowman-Birk e inibidores de tripsina Kunitz são dois dos melhores caracterizados (RYAN, 1990; SILVA et al., 2005). De acordo com o Dodo et al. (1994), existem entre 5-7 cópias do gene inibidor de tripsina em *T. cacao* detectados pela análise *Southern*. Os genes codificadores do inibidor de tripsina do tipo são codificados por uma pequena família gênica em outras espécies de plantas

(GARCIA-OMELDO et al. 1987; JOFUKU; GOLDBERG, 1989; RYAN, 1990; SILVA et al., 2005). Silva et al., (2005) encontrou múltiplos alinhamentos de presumida sequência de aminoácidos de um presumível inibidor de tripsina em espécies de *Theobroma* e *Herrania* e que demonstraram uma alta similaridade entre estas seqüências, com as de *T. cacao*. A seqüência de nucleotídeos do clone obtido neste estudo de cacau foi idêntico ao anteriormente caracterizado cDNA, validando a abordagem para identificar o gene inibidor de tripsina de seqüências de outras espécies. Nenhuma das seqüências nucleotídicas apresentou introns, como descrito para o gene de *T. cacao* (SPENCER; HODGE 1991; TAI et al. 1991) e outros genes de vegetais do inibidor de tripsina (ISHIKAWA et al. 1994; JOFUKU E GOLDBERG, 1989; SILVA et al., 2005).

A fração globulina é composta principalmente por proteínas do tipo vicilina, que contém duas subunidades, com aparentes massas moleculares de 47 e 31 kDa e pequenos constituintes com aparente massa molecular entre 15 e 14.5 kDa. Todos esses polipeptídeos são gerados por processos proteolíticos do precursor de 66 kDa (KRATZER et al, 2009). Whitlock et al., (1999) concluiu que a falta de diversidade intra-individuais em seqüências da vicilina sugerem que esta é codificada por uma única seqüência gênica o que corrobora com a observação de Spencer; Hodge (1991) de que apenas uma única banda é detectada pela hibridação de análise *Southern* de DNA genômico de *T. cacao* com uma sonda vicilina.

Similarmente ao encontrado na literatura, foi observado uma grande quantidade de *spots* nas faixas de massa molecular descritas previamente. Também foi possível notar diferenças nos volumes dos *spots* em duas faixas de PM (47 e 31 kDa) onde os estudos mostram ser da proteína vicilina responsável pelos precursores de aroma de chocolate, evidenciando assim diferenças nas quantidades da proteína vicilina entre os genótipos. Os genótipos SIAL 70 e Catongo possuem volumes mais próximos nestas duas faixas de pH enquanto que em CCN 51 este volume foi consideravelmente menor e com ausência de alguns *spots* desta região identificados nas outras duas variedades.

5.4.2.1 Após 72 horas de fermentação:

Após 72 horas de fermentação, as análises das proteínas totais em gel bidimensional mostraram que as sementes oriundas de SIAL 70 e Catongo apresentaram o mesmo número de *spots* detectados, 86. Já CCN 51 apresentou 214 *spots* revelando importante variação do número de *spots* quando comparada as outras duas variedades.

Após 72 horas de fermentação, foram detectados 52 *spots* comuns as sementes dos três genótipos (Figura 26, *spots* em verde), representando 16,5% de *spots* comuns. SIAL 70 apresentou 15 *spots* exclusivos (Figura 27, *spots* em verde); Catongo apresentou 28 *spots* exclusivos (Figura 28, *spots* em verde), enquanto que CCN 51 apresentou 143 *spots* exclusivos (Figura 29, *spots* em verde). O diagrama de Venn (figura 30) ilustra a relação dos *spots* comuns ou exclusivos entre genótipos. Quando são comparadas, apenas as sementes de SIAL 70 e Catongo possuem um maior percentual (31,9 %) de *spots* comuns com 72 horas de fermentação, demonstrando uma similaridade maior quanto a degradação de proteínas nesta etapa da fermentação. Houve grande redução no volume de de proteínas maiores do que 25 kDa, sendo esta redução mais acentuada nos genótipos SIAL 70 e Catongo na faixa onde estão as globulinas entre 40 e 55 kDa (SPENCER; HODGE, 1992). Para CCN 51, esta redução dos *spots* foi menor quando comparado aos outros dois genótipos estudados.

Há um grande número de *spots* (214) presentes na variedade CCN 51 nesta etapa da fermentação sugerindo diferenças importantes entre o potencial de degradação das proteínas de sementes entre os genótipos. Essa diferenças foram acentuadas e poderiam estar associadas ao desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate.

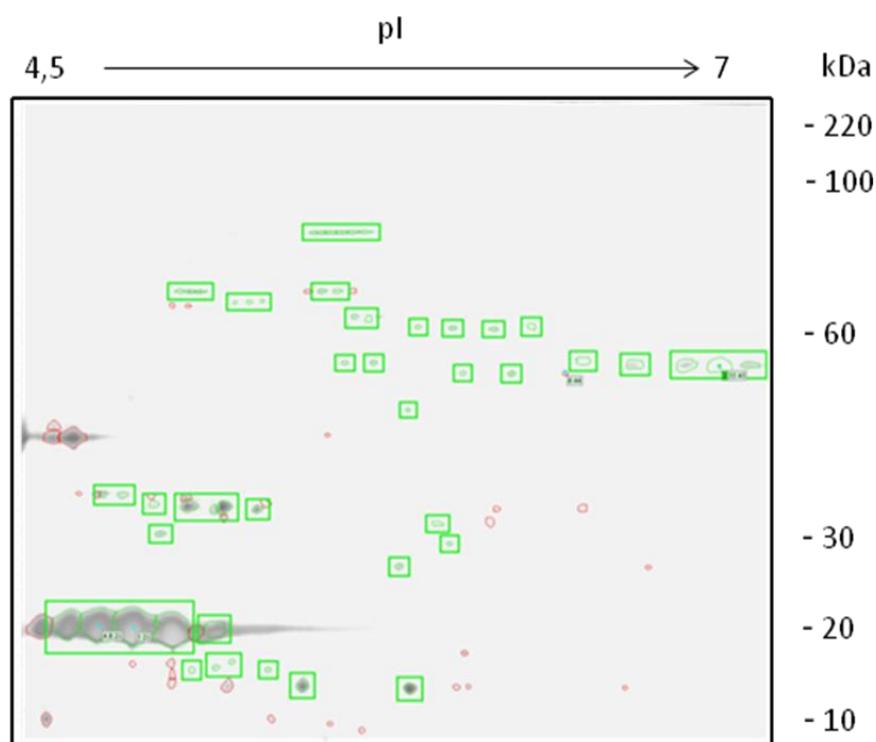


Figura 26 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* comuns (em verde) para as três variedades de *T. cacao* estudadas baseada na imagem de SIAL 70 antes do início da fermentação

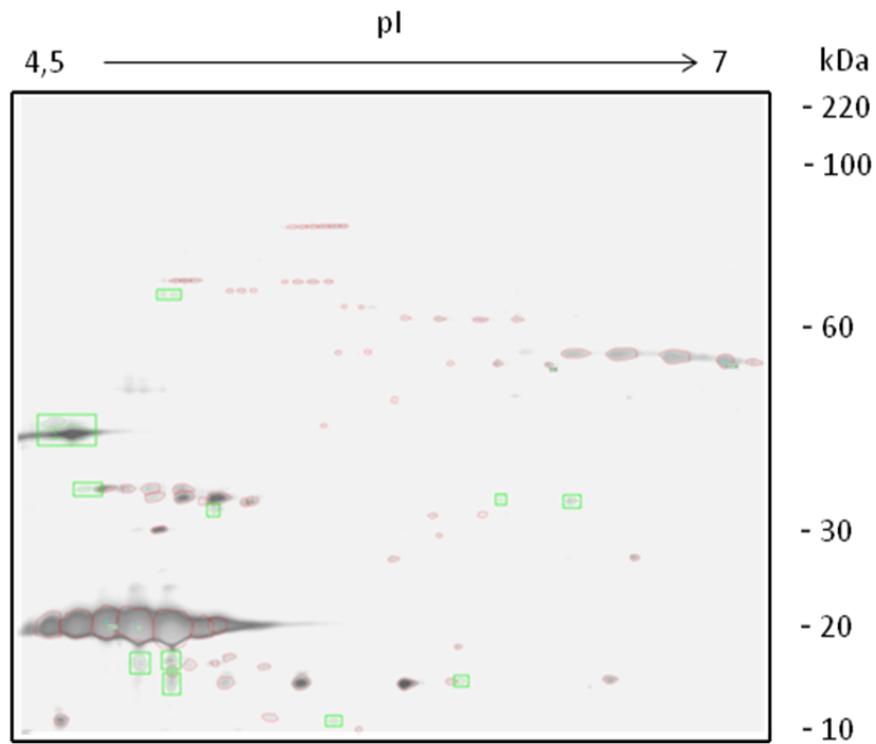


Figura 27 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em SIAL 70 com 72 h de fermentação

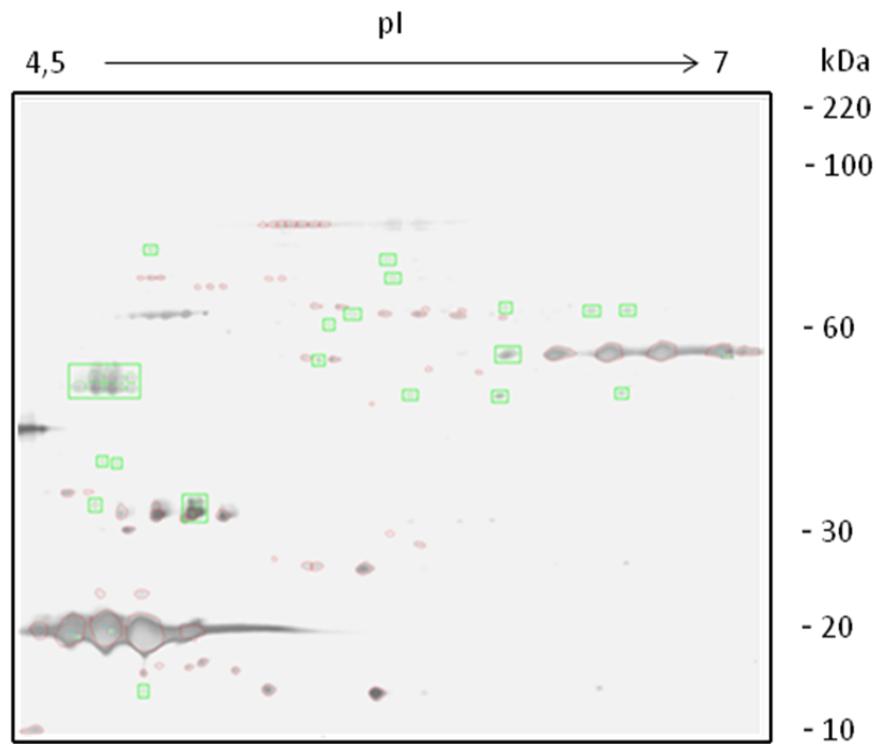


Figura 28 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em Catongo com 72 h de fermentação

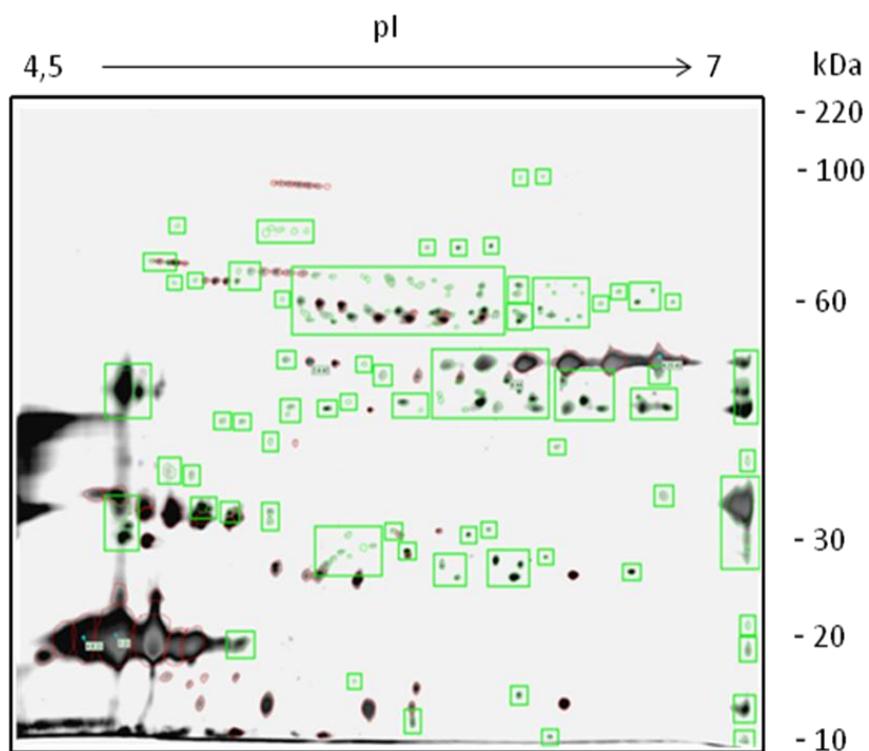


Figura 29 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em CCN 51 com 72 h de fermentação

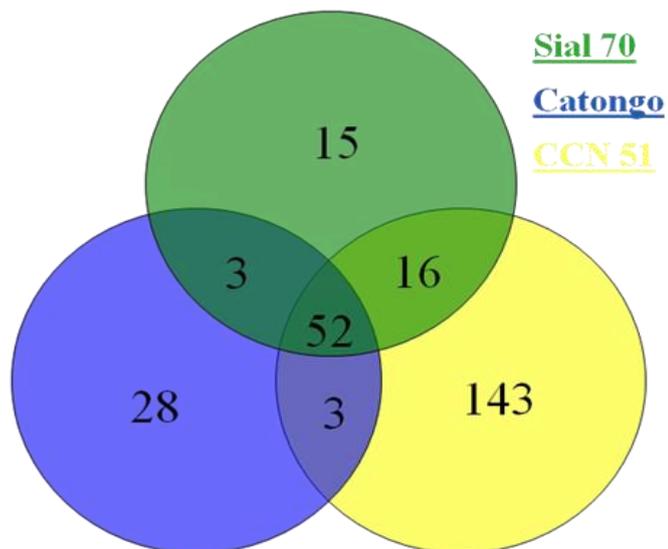


Figura 30 - Diagrama de Venn para as variedades de *T. cacao* com 72 horas de fermentação

5.4.2.1 Após 120h de fermentação:

As análises das imagens dos géis bidimensionais das proteínas totais de sementes após 120 horas de fermentação demonstram variação no número de *spots* detectados entre os três genótipos. Foram detectados 30 *spots* para SIAL 70, 34 *spots* em Catongo e 178 *spots* foram detectados em CCN 51.

Após 120 horas de fermentação, foram detectados 16 *spots* comuns aos três genótipos (Figura 31, *spots* em verde),. As sementes fermentadas por 120 h de SIAL 70 apresentou 8 *spots* exclusivos (Figura 32; *spots* em verde), Catongo possuía 10 *spots* exclusivos (Figura 33; *spots* em verde), enquanto que CCN 51 apresentou 158 *spots* exclusivos (Figura 34; *spots* em verde). O diagrama de Venn (figura 35) ilustra a distribuição de *spots* comuns entre genótipos ou exclusivos. A variação no número de *spots* entre os genótipos e a variação do número destes durante os momentos de fermentação estudados estão exemplificados (Figura 36) e ressaltam as evidências já descritas anteriormente.

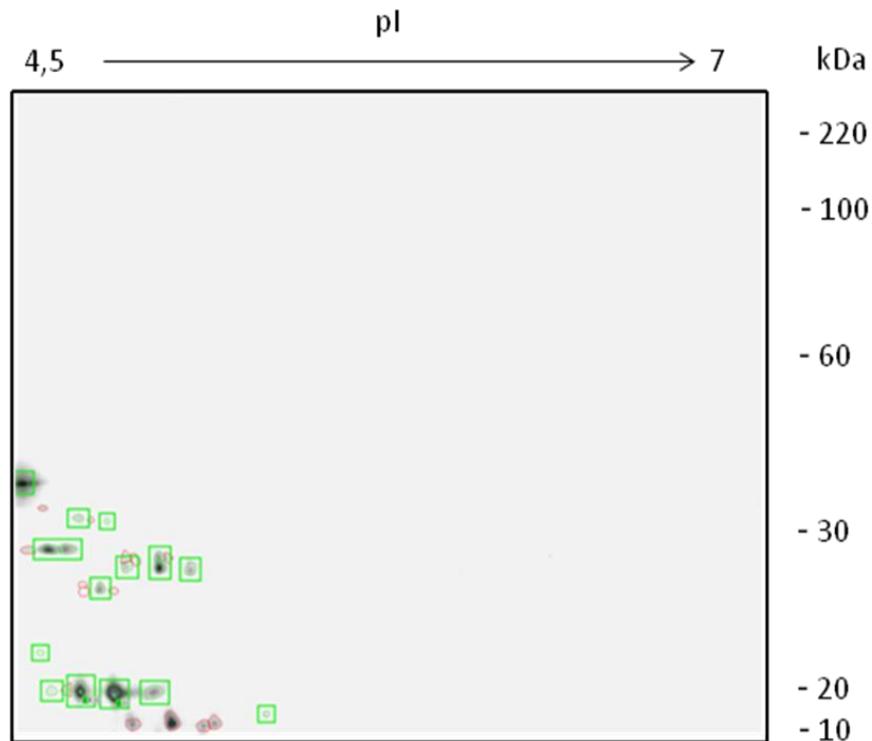


Figura 31 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* comuns (em verde) para as três variedades de *T. cacao* estudadas baseada na imagem de SIAL 70 com 120 h de fermentação

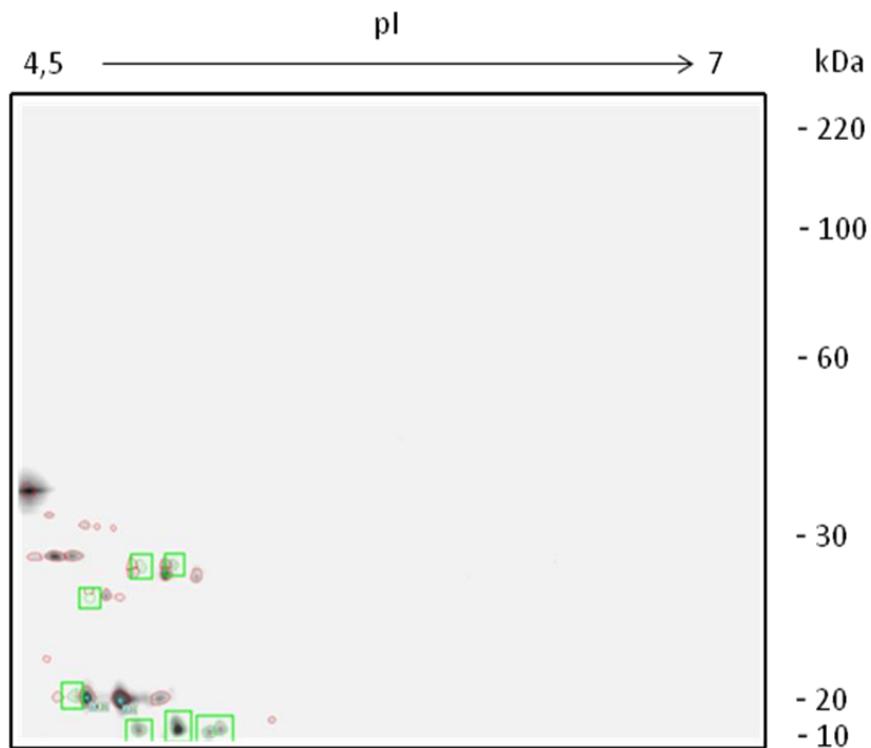


Figura 32- Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em SIAL 70 com 120 h de fermentação

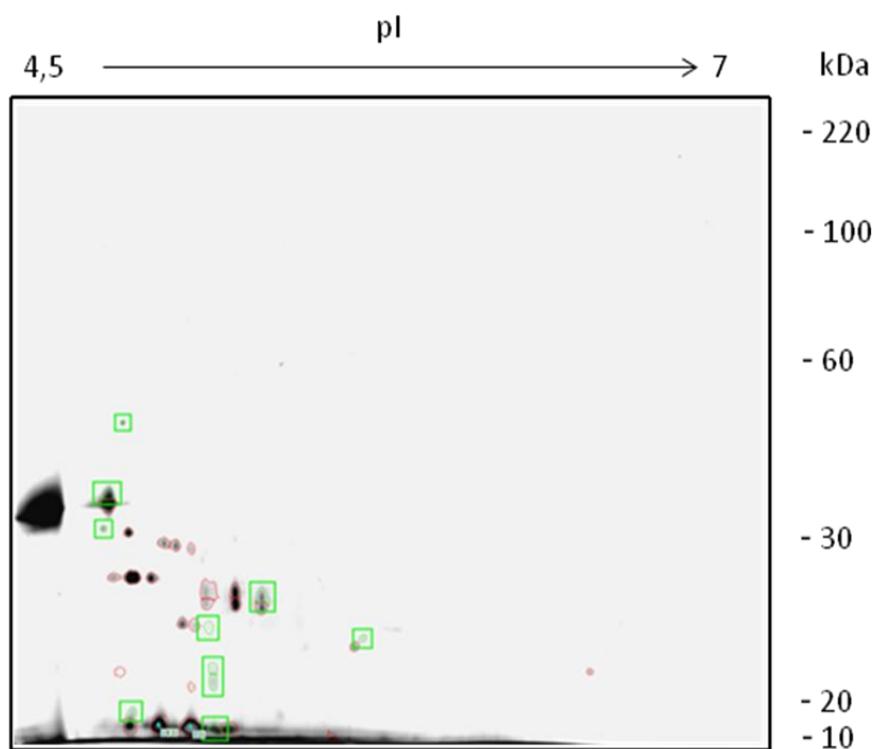


Figura 33- Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em Catongo com 120 h de fermentação

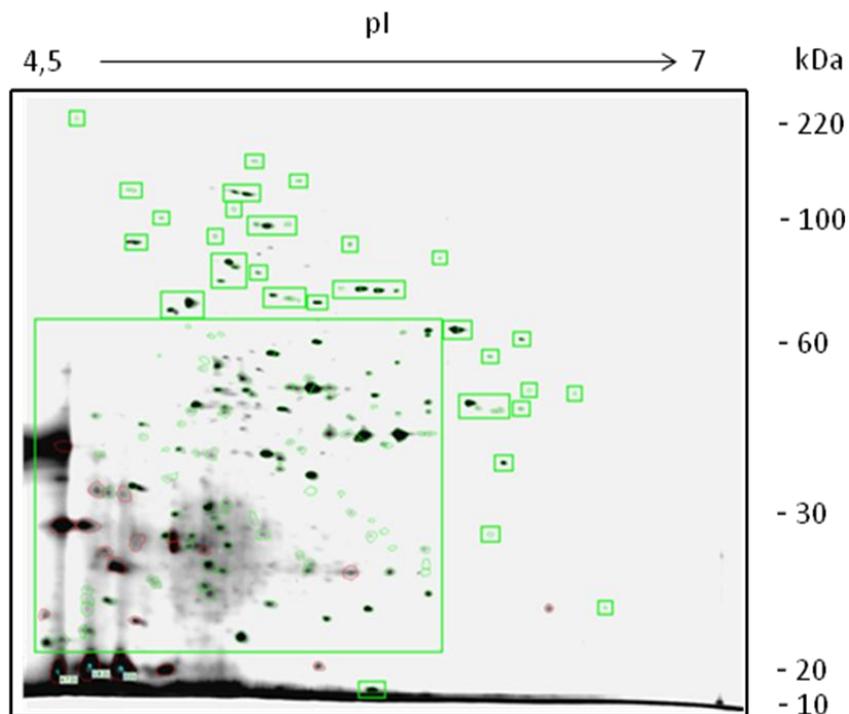


Figura 34 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero, indicando a detecção de *spots* exclusivos (em verde) em CCN 51 com 120 h de fermentação

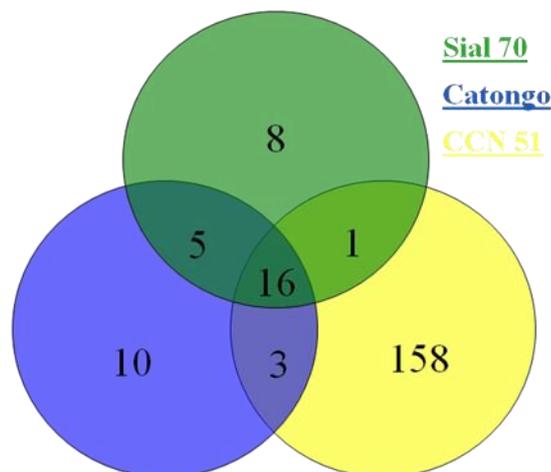


Figura 35- Diagrama de Venn para as variedades de *T. cacao* com 120 horas de fermentação

Durante a fermentação, as proteínas de reserva da classe vicilina (para os genótipos SIAL 70 e Catongo) aparentemente foram degradadas após 120 h (Figuras 32 e 33), similarmente ao observado por Spencer & Hodge (1992), que relataram a degradação destas proteínas. Particularmente, a albumina inibidora de tripsina tipo Kunitz de 21 kDa, caracterizada por Spencer & Hodge (1992), foi mais resistente à proteólise, corroborando com o relatado anteriormente por AMIN et al. (1997).

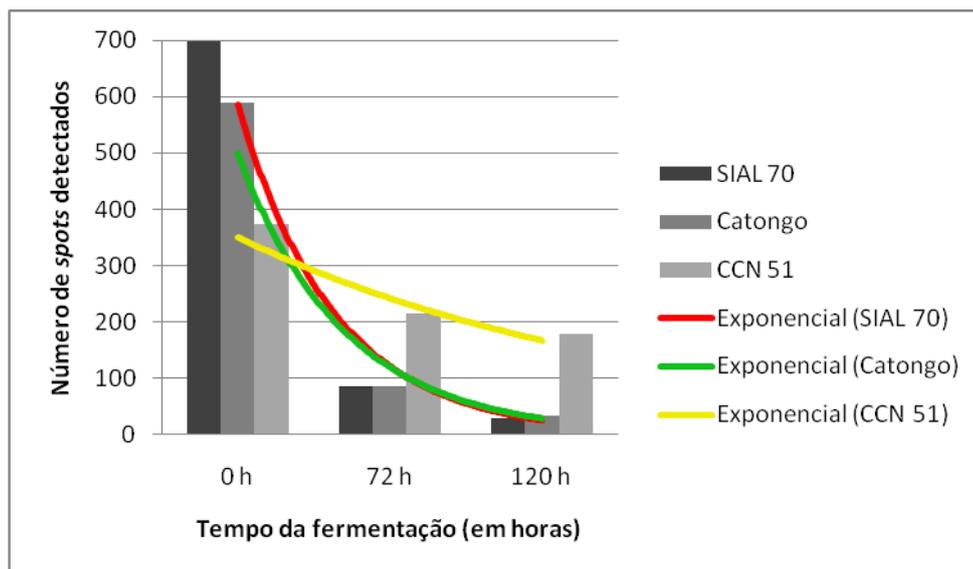


Figura 36 - Gráfico do comportamento do número de *spots* entre os genótipos e em relação aos tempos de fermentação (0, 72 e 120 h)

Quando são comparadas apenas as proteínas das sementes dos genótipos SIAL 70 e Catongo em termos de percentagem de *spots* comuns no final da fermentação, houve um aumento (32,8 %), demonstrando uma maior similaridade quanto a degradação de proteínas durante a fermentação nesses genótipos. Houve uma maior quantidade de *spots* restantes na variedade CCN 51 no final da fermentação. As proteínas ainda presentes nas variedades SIAL 70 e Catongo tendem a ser mais ácidas, com a degradação caracterizada pelo desaparecimento de quase todas as proteínas neutras ou básicas ($pI > 5.5$), e também das poucas proteínas ácidas. Na variedade CCN 51 não ocorre o mesmo perfil de degradação, havendo proteínas na faixa de pI 6,5.

Esta menor degradação proteica pode estar relacionada com uma menor atividade enzimática de proteases nas sementes do genótipo CCN51 durante o processo de degradação. Outra possibilidade pode ser devido às características da testa, afetando o tempo de entrada dos ácidos orgânicos formados durante a fermentação, e em consequência retardar, a ativação de enzimas, como por exemplo a endoprotease aspártica que tem seu pH ótimo a 3,5. Em um estudo sobre diferenças na atividade enzimática entre alguns genótipos de *T. cacao*, Hansen et al. (2000) concluíram que existem diferenças significativas nas atividades enzimáticas em certos genótipos. Entretanto, não foi estabelecida uma relação geral entre o potencial de sabor de um genótipo e níveis de enzimas-chaves em sementes não fermentadas. Estes mesmos autores também concluíram que em geral o nível de atividade enzimática presente em sementes não fermentadas não é um fator limitante para uma ótima formação dos precursores

de aroma durante a fermentação. Outros fatores, como a sequência e acessibilidade das proteínas de reserva, destruição da compartimentalização celular, mobilização enzimática e mudanças na polpa e testa durante a fermentação podem desempenhar significantes papéis na formação dos precursores de aroma.

5.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massas:

Devido a limitação de acesso ao equipamento espectrômetro de massa, foi necessário restringir as análises de identificação de proteínas a cem amostras. Para tal, optou-se por selecionar os *spots* mais abundantes em percentual de volume e intensidade dos mapas 2-D, e também, a partir de dados sobre degradação proteica durante a fermentação. Visando a identificação de *spots* comuns e diferencialmente expressos nos três genótipos de *T. cacao* antes do início da fermentação, dos 296 *spots* comuns presentes, 70 *spots* foram selecionados (Figura 37). Para a identificação dos *spots* diferencialmente expressos foram selecionados 12 *spots* exclusivos de SIAL 70 (Figura 38), 2 *spots* de CCN 51 (Figura 39), 6 *spots* de Catongo (Figura 40) e 10 *spots* presentes em Catongo e CCN 51 (Figura 41). Os *spots* correspondentes nos géis 2-D foram excisados, digeridos e analisados em espectrômetro de massas. Dos *spots* selecionados, 89 % tiveram sua identidade estabelecidas em buscas pelo programa MASCOT. A estratégia adotada mostrou-se bem sucedida.

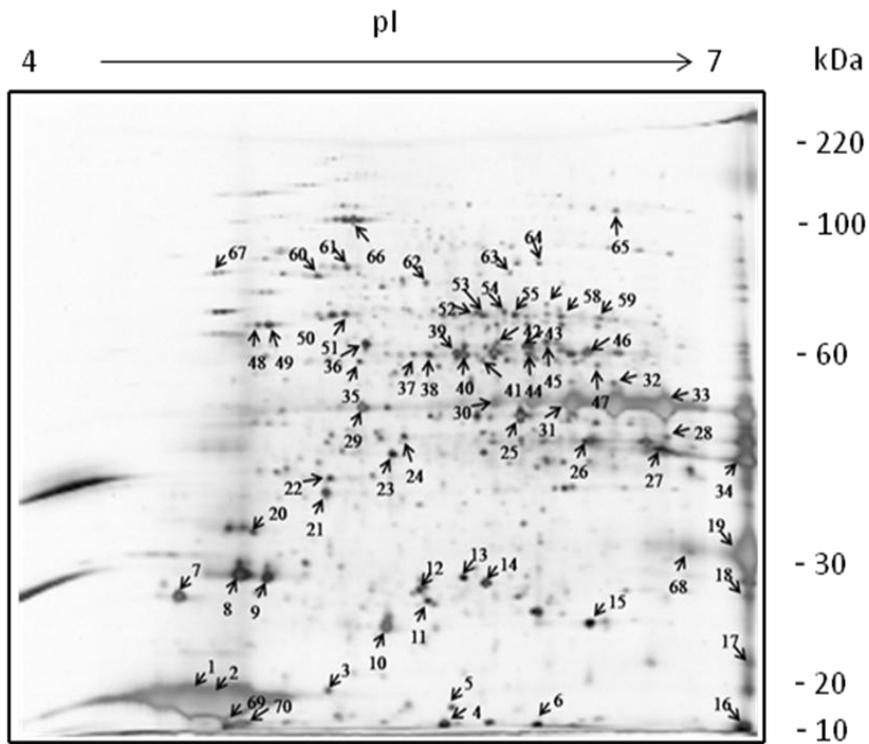


Figura 37- Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero Sial 70, os *spots* sequenciados estão indicados com setas e referem-se as proteínas comuns dos três genótipos e estão descritas na Tabela 2

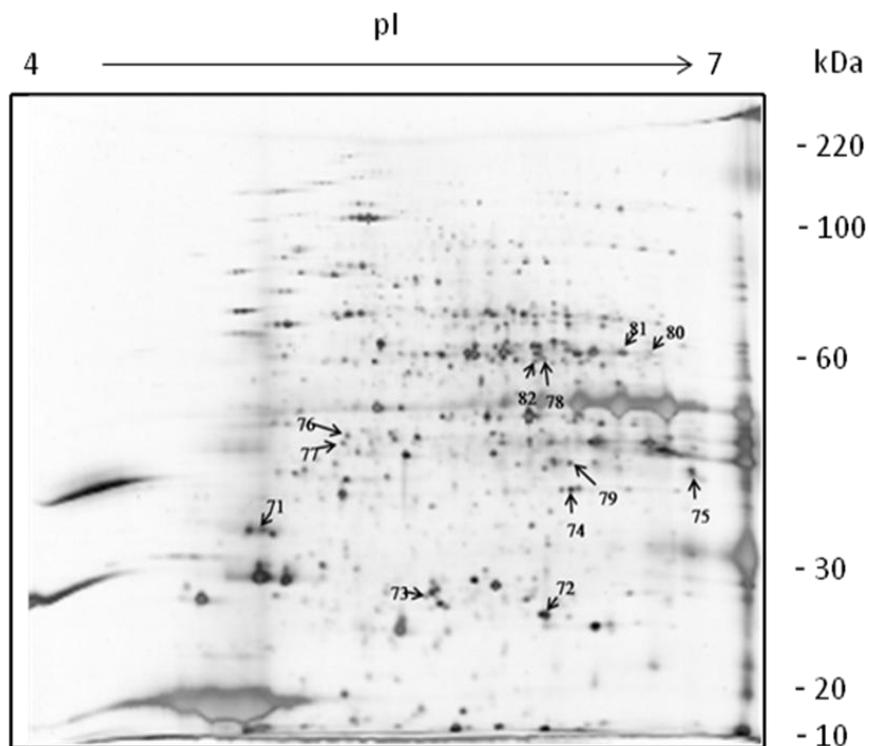


Figura 38 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero Sial 70, os *spots* sequenciados estão indicados com setas, são exclusivos deste genótipo e referem-se as proteínas descritas na Tabela 6

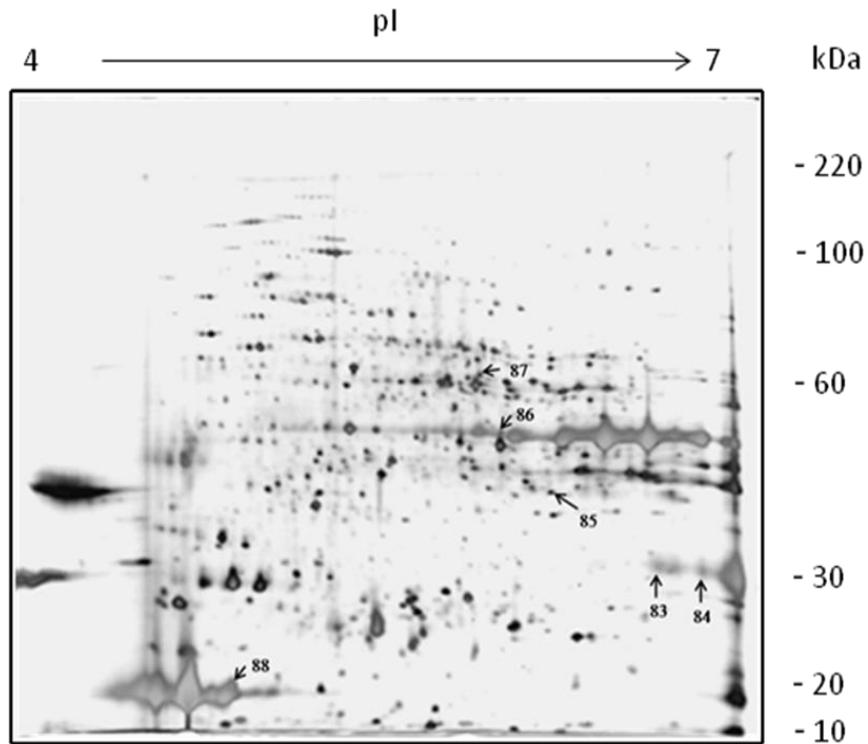


Figura 39 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero Catongo, os *spots* sequenciados estão indicados com setas, são exclusivos deste genótipo e referem-se as proteínas descritas na Tabela 7

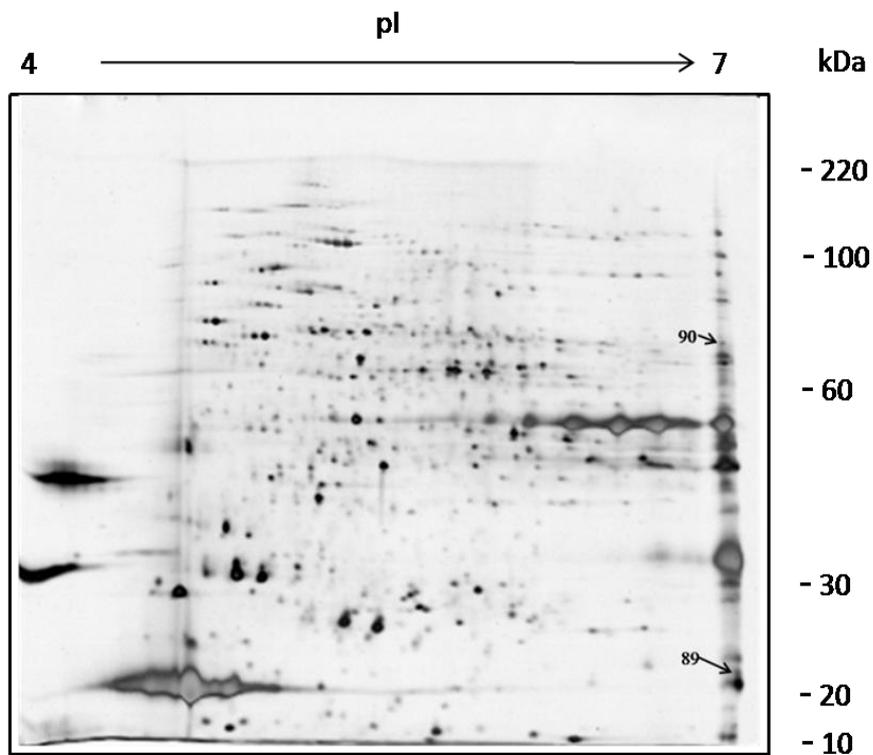


Figura 40 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero CCN 51, os *spots* sequenciados estão indicados com setas, são exclusivos do genótipo e referem-se as proteínas descritas na Tabela 8

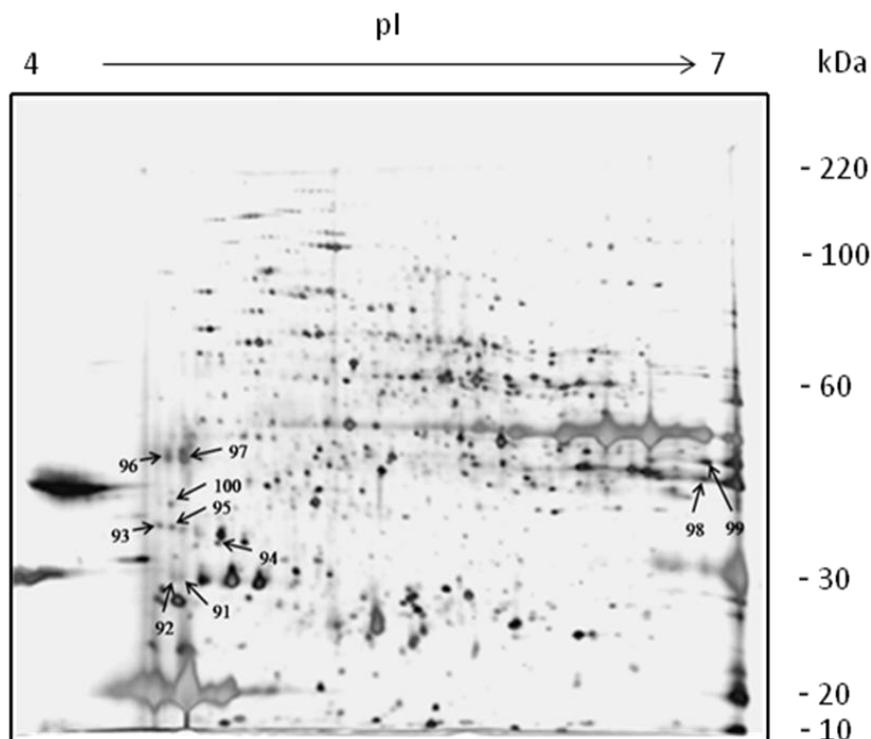


Figura 41 - Análise de gel bidimensional de proteínas totais de sementes de cacauero Catongo, os *spots* sequenciados estão indicados com setas e referem-se as proteínas descritas na Tabela 9

5.5.1 Identificação das proteínas comuns aos tres genótipos em sementes frescas:

Dos 70 *spots* comuns analisados, foram obtidas identificações para 64, representando 23 classes de proteínas. Entre elas foram encontradas 21kDa, vicilina, asparto proteinase; ascorbato peroxidase, cafeína sintase, entre outras (Tabela 2).

Algumas proteínas, como vicilina e 21 kDa foram identificadas em vários *spots*. Esse comportamento protéico é relatado por vários trabalhos que utilizam a eletroforese bidimensional para o sequenciamento de proteínas. Mathesius et al. (2001), em análise proteômica de raiz de *Medicago truncatula*, identificaram uma mesma proteína em vários *spots*. No proteoma de *Pinus*, 40% das proteínas identificadas foram encontradas em mais de um *spot* (GION et al., 2005). A enzima S-adenosilmetionina Sintetase, por exemplo, apresentou similaridade a 14 *spots* (GION et al., 2005).

As espécies de eucariotos superiores utilizam mecanismos de edição de RNA, *splicing* alternativo, promotores alternativos e modificações pós-traducionais (PTM) para produzir múltiplas isoformas de proteínas de um mesmo gene (GODOVAC-ZIMMERMANN et al., 2005). Esses mecanismos ou até mesmo degradação das proteínas pela manipulação das

amostras (HERBERT et al., 2001), podem ser apontados como possíveis causadores da presença de múltiplos *spots* de uma mesma proteína (JORGE et al., 2005).

Os mecanismos de PTM como a fosforilação, acetilação, alquilação, metilação dentre outras, adicionam grupos funcionais que alteram a atividade, conformação e interações de um grande número de proteínas (MANN e JENSEN, 2003). Mais de 300 sítios de fosforilação foram encontrados no proteoma de membrana de *Arabidopsis* (CHEN e HARMON, 2006). No *splicing* alternativo, o mRNA pode ser seletivamente processado e traduzido em proteínas com diferenças estruturais e funcionais (MACKNIGHT et al., 2002). Evidências mostram que a maior parte dos genes podem sofrer essas variações e resultam em múltiplas isoformas (ROBERTS et al., 2002).

A grande variedade de isoformas transcricionais e pós-traducionais podem desempenhar diferentes funções e, ainda, a expressão de diferentes isoformas de uma mesma proteína pela célula, um mecanismo central de controle. A expressão de isoformas é o maior mecanismo de regulação celular (GODOVAC-ZIMMERMANN et al., 2005).

Tabela 2: Lista de proteínas identificadas dos *spots* comuns nas três variedades de *T. cacao*.

Spots Comuns ^a	Proteína	Mascot		Escore ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	PM (kDa)		pI	
		Acesso ^b	Espécie				Teórico	Observado	Teórico	Observado
1	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	3058	66	57	24	21	5,7	4,8
2	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	2003	32	44	24	21	5,7	5,0
3	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	640	15	48	24	21	5,7	5,3
4	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	97	3	4	61	20	6,6	5,7
5	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	97	3	4	61	21	6,6	5,7
6	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	300	9	8	24	20	5,0	6,0
7	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	193	6	36	24	26	5,7	4,7
8	aspartico proteinase	Q8L6A8	<i>T. cacao</i>	60	1	4	56	28	5,3	5,0
9	aspartico proteinase	Q8L6A8	<i>T. cacao</i>	1120	31	28	56	28	5,3	5,1
10	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	20	1	5	24	24	5,7	5,5
11	Presumível celulose sintase	Q3Y9V8	<i>T. cacao</i>	20	1	10	17	26	9,1	5,6
12	Como triosefosfato isomerase	Q3HRV9	<i>S. tuberosum</i>	235	4	19	27	26	5,9	5,6
13	ascorbato peroxidase	A6YH86	<i>T. cacao</i>	282	9	37	27	27	5,5	5,7
14	Como triosefosfato isomerase	Q3HRV9	<i>S. tuberosum</i>	265	5	19	27	27	5,9	5,8

Continua

Continuação

Spots Comuns ^a	Proteína	Mascot		Escore ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	PM (kDa)		pI	
		Acesso ^b	Espécie				Teórico	Observado	Teórico	Observado
15	<i>manganese superoxide dismutase</i>	AAC78469.1	<i>G. hirsutum</i>	194	4	19	22	25	8,5	6,2
16	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	762	19	30	66	21	6,2	6,7
17	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	446	14	19	61	23	6,6	6,8
18	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	97	3	4	61	26	6,6	6,8
19	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	2796	66	37	24	30	5,7	6,7
20	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	AAB81441.1	<i>T. cacao</i>	989	37	39	53	31	5,8	5,0
21	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	21	1	8	24	35	5,7	5,3
22	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	514	18	28	66	35	6,2	6,5
23	<i>NBS/LRR resistance protein-like protein</i>	Q93VG7	<i>T. cacao</i>	15	1	2	19	39	9,0	5,5
24	<i>caffeine synthase</i>	Q2HXL8	<i>T. cacao</i>	55	2	4	41	41	5,5	5,5
25	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	1338	28	44	66	44	6,2	6,0
26	aspartico proteinase	Q8L6A8	<i>T. cacao</i>	36	1	4	56	41	5,3	6,2
27	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	61	3	6	61	40	6,6	6,5
28	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	309	11	20	61	41	6,6	6,5

Continuação

Spots Comuns ^a	Proteína	Mascot		Escore ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	PM (kDa)		pI	
		Acesso ^b	Espécie				Teórico	Observado	Teórico	Observado
29	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	372	13	21	66	45	5,2	5,4
30	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	1473	33	53	66	46	6,2	5,9
31	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	1501	44	57	66	47	6,2	6,2
32	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	290	12	24	66	51	6,2	6,3
33	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	4112	91	59	66	45	6,2	6,5
34	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	319	9	16	61	38	6,6	6,7
35	NI							57		5,3
36	<i>H(+)-transporting ATP synthase</i>	CAB44284. 1	<i>T. cacao</i>	61	1	2	52	62	5,2	5,4
37	<i>enolase</i>	CAB75428. 1	<i>L. luteus</i>	119	3	7	47	59	5,1	5,6
38	NI							57		5,3
39	<i>putative UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i>	Q1HPA6	<i>T. cacao</i>	22	1	30	13	60	8,7	5,7
40	<i>putative UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i>	Q1HPA6	<i>T. cacao</i>	757	29	34	13	59	8,7	5,7
41	NI							59		5,8
42	<i>F1-ATPase alpha subunit</i>	AAB02741. 1	<i>C. usitatus</i>	127	3	7	45	62	7,8	5,9

Continuação

Spots Comuns ^a	Proteína	Mascot		Score ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	PM (kDa)		pI	
		Acesso ^b	Espécie				Teórico	Observado	Teórico	Observado
43	NI							61		6,0
44	NI							59		6,0
45	NI							62		6,1
46	aspartico proteinase	Q8L6A8	<i>T. cacao</i>	208	4	7	56	60	5,3	6,2
47	vicilin	Q43358	<i>T. cacao</i>	34	1	1	61	56	6,6	6,3
48	<i>ATPDIL1 (PDI-like 1-1); protein disulfide isomerase</i>	NP_849696.1	<i>A. thaliana</i>	136	2	4	54	25	4,9	6,2
49	<i>disease resistance protein</i>	Q941G0	<i>T. cacao</i>	14	1	3	15	66	5,9	5,1
50	<i>Putative rubisco subunit binding-protein beta subunit</i>	XP_002523404.1	<i>R. communis</i>	816	17	25	63	69	5,6	5,3
51	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	AAB81441.1	<i>T. cacao</i>	14	1	2	53	69	5,8	5,3
52	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	93	4	6	61	70	6,2	5,8
53	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	28	1	1	61	69	6,6	5,8
54	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	27	1	1	61	70	6,6	5,9
55	<i>Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase</i>	ABD32662.1	<i>M. truncatula</i>	215	4	7	62	69	5,7	5,9

Spots Comuns ^a	Proteína	Mascot		Escore ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	PM (kDa)		Conclusão	
		Acesso ^b	Espécie				Teórico	Observado	Teórico	Observado
56	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	14	1	1	71	66	6,6	5,9
57	<i>2-isopropylmalate synthase</i>	ACB59195. 1	<i>B. oleracea</i>	93	2	3	73	71	6,2	6,1
58	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	39	1	1	61	68	6,6	6,2
59	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	312	6	36	24	68	5,0	6,3
60	NI							79		5,2
62	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	AAB81441. 1	<i>T. cacao</i>	96	4	15	53	82	5,8	5,3
63	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	28	1	1	61	80	6,6	6,0
64	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	24	1	1	61	83	6,6	6,1
65	Fator de alongação 2	Q1HPA9	<i>T. cacao</i>	51	4	20	86	100	8,9	6,4
66	<i>NBS/LRR resistance protein-like protein</i>	Q93VG7	<i>T. cacao</i>	15	1	5	19	97	6,1	5,4
67	<i>chloroplast heat shock protein 70-2</i>	B1010	<i>I. nil</i>	293	6	10	74	80	5,3	5,0
68	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	599	15	24	66	21	6,2	5,0
69	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	451	12	38	24	20	5,7	5,0
70	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	805	18	26	61	30	6,6	6,6

NI: proteína não identificada

a: números correspondem aqueles identificados na figura 37

b: número de acesso no Swiss-Prot/TrEMBL

c: escore total inferido por probabilidade MOWSE pelo MASCOT

d: número de sequências peptídicas únicas identificadas pelo MASCOT

e: porcentagem de cobertura prevista pelo MASCOT

Dos polipeptídeos de sementes de cacau mais abundantes revelados por análises de SDS-PAGE, quatro foram caracterizados bioquimicamente (LERCETEAU et al., 1999). Bandas predominantes que ocorrem em 47, 31 e cerca de 14,5 kDa foram mostradas por serem componentes produzidos a partir de modificações pós-traducionais de uma proteína de 66 kDa, precursora da vicilina do tipo (7S), que também ocorre *in vivo* como um trímero de 139 kDa (BIEHL et al., 1982; LERCETEAU et al., 1999; MACDONALD et al., 1994). Análises de polipeptídeos e seqüência de cDNA revelaram considerável homologia com outras proteínas de reserva 7S, e em particular, a uma α -globulina de sementes de algodão (MCHENRY e FRITZ, 1992; SPENCER e HODGE, 1992; LERCETEAU et al., 1999). O gene que codifica o precursor pertence a uma família multigênica (MCHENRY e FRITZ, 1992; FRITZ et al., 1992; LERCETEAU et al., 1999).

Neste trabalho a proteína vicilina, foi encontrada em 26 *spots* (Tabela 3), com alguns *spots* variando quanto ao pI e PM. Estes *spots* variaram quanto ao pI entre 5,8 e 6,6 e entre 21 e 80 kDa em relação ao PM. Também houveram algumas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) quanto ao volume encontrado entre os genótipos SIAL 70 e CCN 51, o primeiro genótipo apresentou 6 *spots* com volume estatisticamente maior desta proteína (Tabela 3). O programa Image Master também permitiu uma visualização tridimensional dos *spots* analisados, a Figura 42, mostra o volume dos *spots* da faixa de PM de 47 kDa onde aparecem alinhados *spots* de diferentes pIs e onde foram identificados dois *spots* (31 e 33 da tabela 3) como sendo da proteína vicilina, o genótipo SIAL 70 foi o que apresentou os maiores volumes quando comparados com os outros genótipos.

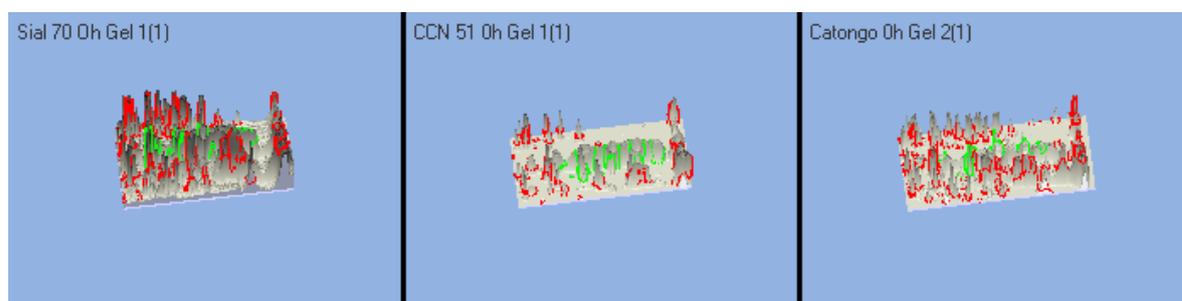


Figura 42 - Volume tridimensional dos *spots* das variedades de T. cacao gerados pelo programa Image Master

Tabela 3: Lista de proteínas identificadas como vicilina dos *spots* comuns nas três variedades de *T. cacao*.

Spots Comuns ^a	Proteína	Volumes encontrados			PM (kDa)		pI	
		Sial 70	Catongo	CCN 51	Teórico	Observado	Teórico	Observado
4	vicilina	3,537	2,606	2,289	66	20	6,6	5,7
5	vicilina	1,222	0,815	1,197	66	21	6,6	5,7
16	vicilina	8,535	5,103	2,731	66	21	6,6	6,7
17	vicilina	4,214	3,503	0,433	66	23	6,6	6,8
18	vicilina	5,207	11,877	1,398	66	26	6,6	6,8
19	vicilina	9,418	5,742	8,594	66	30	6,6	6,7
22	vicilina	1,573	1,150	0,524	66	35	6,6	6,5
25	vicilina	5,091	2,463	2,981	66	44	6,6	6,0
27	vicilina	3,296	2,016	0,774	66	40	6,6	6,5
28	vicilina	0,644	0,861	0,273	66	41	6,6	6,5
29	vicilina	3,802	2,808	2,218	66	45	6,6	5,4
30	vicilina	1,513	1,438	1,594	66	46	6,6	5,9
31	vicilina	1,976	4,608	9,957	66	47	6,6	6,2

contiuna

conclusão

Spots Comuns ^a	Proteína	Volumes encontrados			PM (kDa)		pI	
		Sial 70	Catongo	CCN 51	Teórico	Observado	Teórico	Observado
32	vicilina	0,926	1,031	0,090	66	51	6,6	6,3
33	vicilina	6,422	2,896	4,759	66	45	6,2	6,5
34	vicilina	2,659	6,004	4,597	61	38	6,6	6,7
47	vicilina	0,796	1,227	0,053	61	56	6,6	6,3
52	vicilina	1,102	0,485	0,083	61	70	6,2	5,8
53	vicilina	1,643	0,431	0,200	61	69	6,6	5,8
54	vicilina	1,127	0,881	0,415	61	70	6,6	5,9
56	vicilina	0,626	0,233	0,136	61	66	6,6	5,9
58	vicilina	1,312	0,123	0,384	61	68	6,6	6,2
63	vicilina	1,271	0,532	0,381	61	80	6,6	6,0
64	vicilina	0,465	0,573	0,078	61	83	6,6	6,1
68	vicilina	0,738	1,170	1,676	66	21	6,2	5,0
70	vicilina	0,990	0,959	0,443	61	30	6,6	6,6

a: números correspondem aqueles identificados na figura 37

Outra proteína abundante de 21kDa foi caracterizada como uma albumina do tipo Kunitz inibidora de tripsina, codificada por uma sequência de 920 pares de base (DODO e FURKER, 1994; FRITZ et al., 1992; LERCETEAU et al., 1999). Esta proteína de 21 kDa foi identificada em 10 *spots* (Tabela 4) neste trabalho, alguns *spots* variaram quanto ao pI entre 4,8 e 6,3 e entre 20 e 68 kDa em relação ao PM. O programa Image Master permitiu visualizar tridimensionalmente os *spots* analisados, a Figura 43, mostra o volume dos *spots* da faixa de PM de 21 kDa onde aparecem alinhados *spots* de diferentes pIs e onde foram identificados dois *spots* (2 e 3 da tabela 4) como sendo da proteína 21 kDa, o genótipo Catongo apresentou dois *spots* (2 e 3) com volumes estatisticamente maiores quando comparados com SIAL 70.

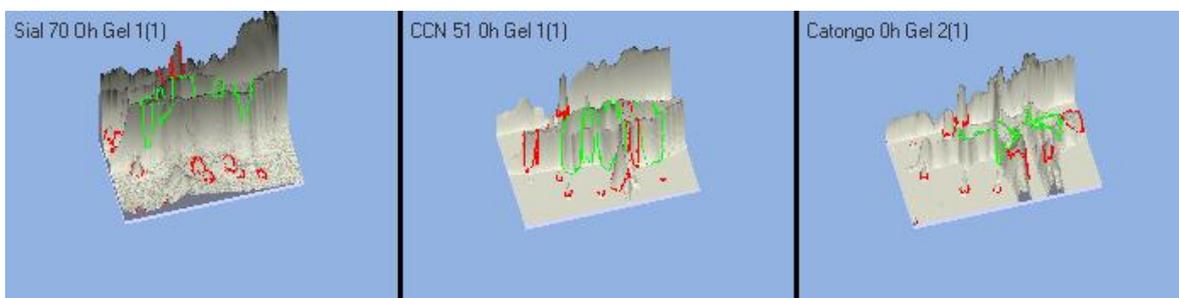


Figura 43 - Volume tridimensional dos *spots* das variedades de *T. cacao* gerados pelo programa Image Master

A proteína aspartico proteinase foi identificada em quatro *spots* (Tabela 5), algumas dessas proteínas apresentaram diferenças na massa molecular e no ponto isoelétrico. A proteína de número 46 (Tabela 5) variou estatisticamente ($p < 0,05$) quanto ao volume quando são comparados os genótipos SIAL 70 e CCN 51, o volume desta proteína em SIAL 70 foi 3,6 vezes maior que em CCN 51, mostrando que este genótipo apresentou menos aspartico proteinase que o genótipo CCN 51. A figura 44 ilustra a o volume tridimensional da região onde estão localizados os *spots* 8 e 9 (tabela 5) identificados como aspartico proteinase.

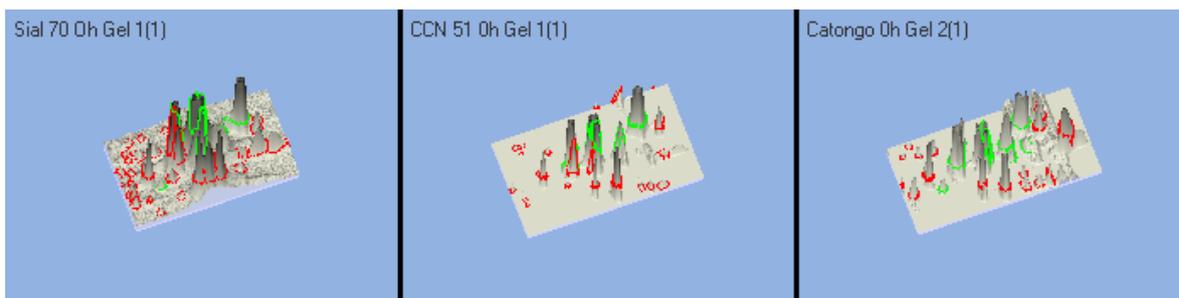


Figura 44 - Volume tridimensional dos *spots* das variedades de *T. cacao* gerados pelo programa Image Master

Tabela 4: Lista de proteínas identificadas como 21 kDa dos *spots* comuns nas três variedades de *T. cacao*.

Spots Comuns ^a	Proteína	Volumes encontrados			PM (kDa)		pI	
		SIAL 70	Catongo	CCN 51	Teórico	Observado	Teórico	Observado
1	21 kDa	4,338	4,220	3,222	24	21	5,7	4,8
2	21 kDa	3,770	12,537	5,987	24	21	5,7	5,0
3	21 kDa	1,368	0,387	1,225	24	21	5,7	5,3
6	21 kDa	2,591	1,606	0,806	24	20	5,7	6,0
7	21 kDa	5,318	4,750	4,471	24	26	5,7	4,7
10	21 kDa	6,600	4,385	7,821	24	24	5,7	5,5
21	21 kDa	2,789	1,624	1,940	24	35	5,7	5,3
59	21 kDa	1,271	0,021	0,084	24	68	5,7	6,3
69	21 kDa	1,806	0,894	0,279	24	20	5,7	5,0

a: números correspondem aqueles identificados na figura 37

Tabela 5: Lista de proteínas identificadas como aspartico proteinase dos *spots* comuns nas três variedades de *T. cacao*.

Spots Comuns ^a	Proteína	Volumes encontrados			PM (kDa)		pI	
		Sial 70	Catongo	CCN 51	Teórico	Observado	Teórico	Observado
8	aspartico proteinase	6,207	3,143	5,316	56	28	5,3	5,0
9	aspartico proteinase	5,190	6,520	6,551	56	28	5,3	5,1
26	aspartico proteinase	4,045	3,608	2,424	56	41	5,3	6,2
46	aspartico proteinase	1,948	1,205	0,536	56	60	5,3	6,2

a: números correspondem aqueles identificados na figura 37

Segundo Barel et al. (1983), a fermentação dá origem a polipeptídeos de baixo peso molecular e peptídeos que são os precursores essenciais do aroma do cacau. Voigt e Biehl. (1995) consideraram que o mais importante grupo de oligopeptídeos hidrofílicos e aminoácidos hidrofóbicos são produzidos por proteólise especificamente de globulinas da classe vicilina, e que a proteólise é uma ação seqüencial de duas proteases dependentes do pH das sementes de cacau, uma aspártico endopeptidase e uma serina exopeptidase.

No presente trabalho a proteína a aspártico proteinase foi identificada em 4 *spots* (Tabela 5), e em outros estudos imunológicos revelaram que a endoprotease aspártica é coordenadamente acumulada com a globulina da classe vicilina (7S) durante o amadurecimento das sementes de cacau (VOIGT et al., 1995). Durante a germinação, a atividade desta enzima em particular permanece quase constante e tem um sensível diminuição após a completa degradação das proteínas globulares de estoque (VOIGT et al., 1995).

5.5.2 Identificação das proteínas exclusivas aos três genótipos em sementes frescas:

5.5.2.1 Spots exclusivos de SIAL 70:

Dos 12 *spots* exclusivos selecionados para análise, sete proteínas foram identificadas (Tabela 6), e destas, duas proteínas são vicilina e uma aspártico proteinase.

Tabela 6: Lista de proteínas identificadas dos *spots* exclusivos da variedade Sial 70 de *T. cacao*.

Spots Sial 70 ^a	Proteína	Acesso ^b	Mascot				PM (kDa)		pI		continua	
			Espécie	Score. ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	Volume Encontrado	% do volume	Teórico	Observado	Teórico	Observado
71	aspartico proteinase	Q8L6A8	<i>T. cacao</i>	147	5	7	2,480	0,603	56	32	5,3	5,1
72	caleosina	ABV72237.1	<i>F. pumila</i>	193	3	9	3,854	0,937	27	25	5,3	6,0
73	Proteína responsável pelo turgor	ABF56173	<i>T. cacao</i>	22	2	26	0,587	0,143	88	26	5,0	5,6
74	amidofosforibo siltransferase	ABF56179	<i>T. cacao</i>	29	1	29	1,458	0,354		35		6,1
75	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	27	1	1	2,283	0,555	61	37	6,6	6,6
76	NI						0,730	0,177		41		5,3
77	adenosina kinase	Q1HPB8	<i>T. cacao</i>	127	2	16	0,718	0,174	13	40	5,1	5,2
78	NI						1,004	0,244		58		6,0
79	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	41	3	8	0,246	0,060	61	38	6,6	6,2

Spots Sial 70 ^a	Proteína	Acesso ^b	Espécie	Mascot					PM (kDa)		conclusão pI	
				Escore. ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	Volume Encontrado	% do volume	Teórico	Observado	Teórico	Observado
80	NI						0,040	0,009		59		6,5
81	NI						0,253	0,061		59		6,4
82	NI						0,860	0,196		57		6,0

NI: proteína não identificada

a: números correspondem aqueles identificados na figura 38

b: número de acesso no Swiss-Prot/TrEMBL

c: escore total inferido por probabilidade MOWSE pelo MASCOT

d: número de sequências peptídicas únicas identificadas pelo MASCOT

e: porcentagem de cobertura prevista pelo MASCOT

5.5.2.2 Spots exclusivos de sementes de Catongo:

Foram selecionados 6 *spots* para sequenciamento e destes todos foram identificados, 5 *spots* representam a proteína vicilina e 1 *spot* representa a albumina de 21kDa (Tabela 7). Os *spots* identificados como vicilina não diferiram quanto ao pI e PM encontrados no genótipo SIAL 70 e nos *spots* comuns aos três clones.

Tabela 7: Lista de proteínas identificadas dos *spots* exclusivos da variedade Catongo de *T. cacao*.

Spots Catongo ^a	Proteína	Acesso ^b	Mascot		Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	Volume Encontrado	% do volume	PM (kDa)		pI	
			Espécie	Escore. ^c					Teórico	Observado	Teórico	Observado
83	Vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	767	19	24	0,375	0,119	61	30	6,6	6,6
84	Vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	690	18	22	0,716	0,227	61	30	6,6	6,7
85	Vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	129	5	11	0,767	0,243	61	38	6,6	6,2
86	Vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	1014	22	33	0,703	0,223	66	45	6,6	6,0
87	Vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	29	1	1	0,698	0,221	61	60	6,6	6,0
88	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	1908	34	45	1,219	0,385	24	21	5,7	5,1

a: números correspondem aqueles identificados na figura 39

b: número de acesso no Swiss-Prot/TrEMBL

c: escore total inferido por probabilidade MOWSE pelo MASCOT

d: número de sequências peptídicas únicas identificadas pelo MASCOT

e: porcentagem de cobertura prevista pelo MASCOT

5.5.2.3 Spots exclusivos de sementes de CCN 51:

Foram selecionados 2 *spots* diferenciais os quais foram identificados como sendo uma proteína vicilina e a outra albumina de 21kDa (Tabela 8). Os PMs e Pis também são semelhantes aos já encontrados.

Tabela 8: Lista de proteínas identificadas dos *spots* exclusivos da variedade CCN 51 de *T. cacao*.

Spots CCN 51 ^a	Proteína	Acesso ^b	Espécie	Mascot				PM (kDa)		pI		
				Escore. ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	Volume Encontrado	% do volume	Teórico	Observado	Teórico	Observado
89	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	440	11	14	1,398	0,548	24	22	5,7	6,8
90	vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	78	6	12	0,314	0,123	61	66	6,6	6,8

a: números correspondem aqueles identificados na figura 40

b: número de acesso no Swiss-Prot/TrEMBL

c: escore total inferido por probabilidade MOWSE pelo MASCOT

d: número de sequências peptídicas únicas identificadas pelo MASCOT

e: porcentagem de cobertura prevista pelo MASCOT

5.5.2.4 Spots exclusivos dos genótipos Catongo e CCN 51:

Dos 10 *spots* sequenciados todos foram identificados, e destes 6 *spots* representam a albumina de 21kDa, dois *spots* representam a vicilina, um *spot* uma oxidoreductase e uma alpha-L-arabinofuronosidase (Tabela 9). Algumas proteínas identificadas como 21 kDa apresentaram-se em PMs distintos (entre 30 e 42 kDa) e em regiões mais ácidas. Estes 6 *spots* identificados como a 21 kDa inibidor de tripsina, encontrados somente em Catongo e CCN 51, representam um volume importante (somatória dos volumes *spots*, 11,213, Tabela 9) no perfil protéico das duas variedades (Figura 40). Apesar da identificação como albumina de 21 kDa, estes *spots* estão acima do peso molecular estimado, mas com pI próximo a 5 e podem representar outro tipo de albumina não encontrada na variedade SIAL 70. Pelos perfis bidimensionais, identifica-se que estes *spots* ou pelo menos a maior parte deles são degradados durante a fermentação, podendo estar relacionado com as diferenças de intensidade de sabor de chocolate, amargor, adstringência e *off flavors* encontradas nas análises sensoriais, que serão discutidas na sequência.

Tabela 9: Lista de proteínas identificadas dos *spots* presentes nas variedades Catongo e CCN 51 de *T. cacao*.

Spots Catongo e CCN 51 ^a	Mascot								PM (kDa)		pI	
	Proteína	Acesso ^b	Espécie	Score. ^c	Peptídeos únicos ^d	Cobertura (%) ^e	Volume Encontrado	% do volume	Teórico	Observado	Teórico	Observado
91	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	992	22	48	0,722	0,225	24	29	5,7	5,0
92	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	170	5	25	0,494	0,154	24	29	5,7	5,0
93	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	121	2	11	0,534	0,188	24	34	5,7	4,8
94	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	37	2	10	0,523	0,163	24	32	5,7	5,1
95	oxidoreduc tase	NP_641034.1	<i>X. axonopodis</i>	582	11	37	0,427	0,133	38	34	6,0	4,9
96	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	922	21	52	1,937	0,606	24	42	5,0	4,9
97	21 kDa	P32765	<i>T. cacao</i>	1140	29	55	3,193	0,999	24	42	5,7	5,0
98	Vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	265	10	18	0,888	0,277	66	39	6,2	6,7
99	Vicilina	Q43358	<i>T. cacao</i>	246	19	23	1,976	0,618	54	41	6,0	6,7
100	alpha-L- arabinofur onosidase	BAE02565.1	<i>T. maritima</i>	74	1	2	0,519	0,159	55	36	5,2	4,9

a: números correspondem aqueles identificados na figura 41

b: número de acesso no Swiss-Prot/TrEMBL

c: escore total inferido por probabilidade MOWSE pelo MASCOT

d: número de sequências peptídicas únicas identificadas pelo MASCOT

e: porcentagem de cobertura prevista pelo MASCOT

5.6 Determinação de flavanols em sementes de *T. cacao* durante a fermentação:

As concentrações de flavonols foram estimadas das amostras de sementes durante a fermentação (Figura 45). Houve decréscimo na concentração total de flavanols durante a fermentação. As sementes frescas de SIAL 70 possuíam 235,4 mg/g do peso das sementes desengorduradas de flavanols, Catongo continha 295,3 mg/g, e CCN 51 possuía 312,2 mg/g. No final da fermentação, as sementes de SIAL 70 possuíam 113,86 mg/g, Catongo 146,8, e CCN 51 186,0 mg/g. As sementes dos genótipos tiveram uma redução na quantidade de flavanols de 51,8, 50,3 e 40,4%, respectivamente. Os genótipos estudados apresentaram quantidades iniciais de flavanols similares, sendo que a variedade CCN 51 possuía a maior quantidade, e a redução de flavanols foi semelhante para SIAL 70 e Catongo, sendo menos acentuada na CCN 51.

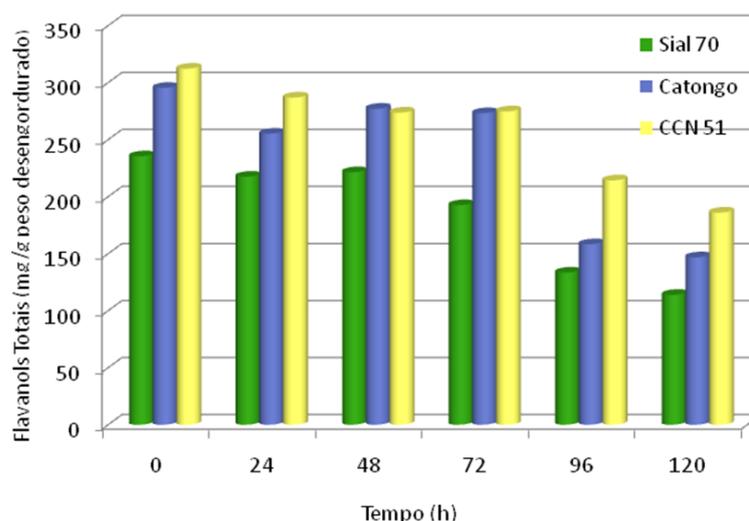


Figura 45 - Efeito da fermentação nos flavanols das sementes de cacau

O conteúdo de polifenóis na semente de cacau pode variar dependendo da região onde é cultivado, da diversidade de cultivo e das práticas após a colheita, e outras características como o tipo de solo, safra e práticas de manufaturamento também irão influir no conteúdo de polifenóis (OLIVEIRA, 2005). Segundo Kattenberg e Willensen (1993), a semente de cacau possui, dependendo da variedade e da região onde é cultivada, aproximadamente 10% de polifenóis da fração seca da semente sem a gordura. Os polifenóis solúveis encontrados nas sementes frescas, secas e livre de gordura estão em torno de 15-20% (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; EFRAIM, 2004).

Sanbongi et al. (1998) encontraram que há uma perda de aproximadamente 50% de polifenóis totais, 85% de catequinas e 90% de epicatequinas durante a fermentação das sementes de cacau. Segundo Brito (2000) o teor de fenóis totais diminui cerca de 70% na etapa de fermentação, sendo que a (-)-epicatequina sofre redução de 90% em sua concentração inicial. Isso tem ligação com a formação do sabor desejável do chocolate; ou seja, a degradação dos compostos fenólicos, seja por complexação com as proteínas, ou por modificação bioquímica é uma das responsáveis pelo desenvolvimento do sabor desejável do chocolate, sendo, portanto, precursora de sabor no pré-processamento do chocolate.

Os polifenóis se combinam com as proteínas por complexação reversível por meio de pontes de hidrogênio e da oxidação irreversível dos polifenóis a quinonas, que por sua vez sofrem condensação covalente com os grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras. Ao longo da fermentação, o teor de antocianinas decresce chegando a 7% do valor inicial, sendo que a maior parte dessa destruição ocorre entre o primeiro e o terceiro dias (BRITO, 2000; CROSS et al., 1982; EFRAIM, 2004).

Ainda durante esta etapa, o teor de fenóis totais diminui cerca de 70%, sendo que a degradação da (-)-epicatequina, principal substrato da polifenoloxidase existente, provoca diminuição de 90% em sua concentração.

5.7 Análise sensorial:

Foi realizada por um provador treinado análise sensorial, a partir das triplicatas dos líquors das mesmas três variedades estudadas por abordagem proteômica (SIAL 70, Catongo e CCN 51). Foram conduzidas cinco repetições de prova para cada amostra.

Na avaliação do provador (Tabela 10), a variedade SIAL 70 possui uma acidez moderada característica, mais ácido cítrico/ascórbico, sendo o caráter ácido ascórbico mais pronunciado que a intensidade normalmente observada. O sabor de chocolate é muito modesto, a uma intensidade de aproximadamente 4 (Tabela 10). O provador comparando estes líquors com outros, notou que a intensidade de sabor de chocolate desta variedade é incomumente baixa e a adstringência é muito mais alta.

Há uma gama de notas de fruta em todas as amostras, que incluem frutas cítricas, vermelhas, tropicais e também notas de frutas torradas. Há um baixo nível de notas florais (flores com traços herbais) em todas as repetições, às vezes sentido, às vezes não, percebido muito tarde no gosto quando percebido e não pronunciado. Algumas repetições parecem ter

um pouco de características de peles de noz, que levam a uma adstringência que é modestamente alta.

Os líquors de Catongo são mais claros devidos as suas sementes brancas, e estes líquors têm uma falta notável de chocolate/sabor de cacau. Os líquors têm sabores pronunciados de caramelo e açúcar dourado/cozido. A adstringência é notavelmente alta e fora de equilíbrio em todos os líquors, têm um fundo de sabor de fruta semelhante com uma notável fruta tropical que é a casca de banana verde (que também contribui à adstringência). Uma nota de pele de noz também contribui à adstringência ou a alta adstringência contribui a uma impressão de pele de noz.

O liquor CCN 51 tem maior amargor e acidez, que são associados com um teor mais elevado de *off flavors*. Globalmente, estas amostras são típicas dos problemas presentes em CCN 51 no mundo comercial, acidez acentuada que é mineral em caráter com notáveis notas de *off flavors* dirigidos por isto. Existem algumas trocas internas nas características de frutas, mas não são significantes no esquema principal.

Tabela 10: Médias das notas de intensidade dos atributos avaliados por análise sensorial.

(continua)

Intensidade dos atributos ^a (média das repetições)				
Atributo	Sial 70	Catongo	CCN 51	Controle
Cacau	3,7	1,3	2,7	3,8
Acidez total	30	2,8	4,8	4,2
Acidez - acidez frutada	2,4	2,5	2	2,4
Acidez - acética	0,6	0,2	1,7	1,8
Acidez - láctica	0	0	0	0
Acidez - mineral	0	0	1	0
Amargor	3,4	3,0	3,6	4,4
Adstringência	6,6	7	8,3	7,4
Torrado				
Flavor torrado	3,7	2,5	3,5	4
Caramelo/Açúcar torrado	0	0	0	0
Grau de torração: 0 = cru; 10 = queimado	4	3	3,7	4

(continuação)

Intensidade dos atributos^a (média das repetições)				
Atributo	Sial 70	Catongo	CCN 51	Controle
Florais				
Floral - amadeirado	0	0	0	0
Floral - gramínea (grama verde)	0	0	0	0
Floral - vegetal verde	0	0	0	0
Floral - terroso	0	0	0	0
Floral - herbal	0,2	0	0	0
Floral - cogumelos	0,1	0	0	0
Floral - flor de laranjeira	0	0	0	0
Floral - flores	0,7	0	0	0
Floral - perfume	0	0	0	0
Floral – casca de madeira	0,1	0,1	0,5	0
Floral – madeira clara	0	0	0	0
Floral – madeira escura	0	0	0	0
Floral – resina de madeira	0	0	0	0
Floral - tabaco	0	0	0	0
Floral - apimentado (tipo pimenta preta)	0	0	0	0
Floral – outras especiarias	0	0	0	0
Frutados				
Frutas - vermelhas	0	0	0	0
Frutas - cítricas	1	0,8	1,2	1
Frutas – vermelhas escuras (como cerejas)	1,3	0	0,4	0,6
Frutas - tropicais (amarelas)	1	1,7	1,6	0,8
Frutas - frutas secas	0,2	0,4	0,1	0,8
Frutas - frutas secas torradas	1	0,1	1	1,4
Frutas – frutas muito maduras	0,3	0,1	0,5	1
Amendoado	0,6	2,5	0	2,2
Outros sabores positivos	0	3,1	0	0

(conclusão)

Atributo	Intensidade dos atributos ^a (média das repetições)			
	Sial 70	Catongo	CCN 51	Controle
OFF FLAVORS				
Fumaça	0	0	0	0
Mofado	0	0	0	0
Cru	0	0	0	0
Couro	0	0	0	0
Muito fermentado – fruta podre	0	0	0,1	0,4
Muito fermentado - pútrido	0	0	0	0
Muito fermentado - estrume	0	0	0	0
Sujo	0	0	1,4	0,4

a: Intensidade: 1-2 = Fraco; 3-4 = Moderadamente fraco; 5-6 = Moderado; 7-8 = Pronunciado; 9-10= Forte.

O liquor de SIAL 70 apresentou, apesar de baixo, mais intensidade quanto ao sabor de cacau quando comparada as outras duas variedades. Em Catongo foi encontrado alguns *flavors* positivos (não especificados na tabela 10) e um sabor mais amendoado, não encontrado ou com menor intensidade nas outras duas variedades. A variedade CCN 51 revelou os problemas comercialmente encontrados como maior acidez e amargor devido a presença de *off flavors*.

Comparando os dados da análise sensorial com os resultados da proteômica observou-se que a variedade SIAL 70 teve maior intensidade de sabor de cacau, acidez e amargor intermediários, menor quantidade de flavanols, maior número de *spots* e identificação de algumas proteínas não encontradas nas outras duas variedades. A variedade Catongo teve a mais baixa intensidade de sabor de cacau, acidez e amargor, quantidade intermediária de flavanols e número de *spots* nas análises dos géis bidimensionais, e um maior número de *spots* (6) identificados como a proteína de 21 kDa, encontrados somente nas variedades Catongo e CCN 51 podendo estar relacionado com a diferença de sabor de chocolate encontrada entre as variedades estudadas, estas proteínas podem estar associadas há um desenvolvimento de *off flavors* nestas variedades. A variedade CCN 51 apresentou uma intensidade intermediária de sabor de cacau, e foi a variedade que apresentou as maiores intensidades de acidez, amargor e adstringência, a variedade apresentou a maior quantidade de flavanols e menor redução destes durante a fermentação (40,42 %), este fato pode estar

associado às maiores intensidades encontradas nos atributos amargor e adstringência, estes sabores são devidos aos polihidroxi-fenóis como catequinas, flavan-3-óis, antocianinas e proantocianidinas presentes nas sementes de cacau que são responsáveis por parte destes atributos encontrados no chocolate. A variedade também teve o menor número de *spots* encontrados antes da fermentação e menor redução deste número durante o processo de fermentação, o que demonstra deficiência na degradação de proteínas responsáveis pelos precursores do sabor de chocolate.

Reineccius (2006) concluiu que diferenças varietais eram principalmente devido às diferenças de quantidade (em oposição à qualidade) nos precursores de sabor e conteúdo de polifenóis. Os teores de açúcares e as quebras enzimáticas dos polissacarídeos formam uma importante fonte de precursores. No entanto, processos pós-colheita (fermentação e secagem), e torração têm uma forte influência no sabor final (CLAPPERTON et al., 1994; KATTENBERG E KEMMING, 1993; LUNA et al., 2002; COUNET E COLLIN, 2003).

Clapperton et al. (1994) observaram diferenças consistentes nos atributos de sabor, especificamente intensidade global do sabor de cacau, acidez, amargura, e adstringência. As origens das sementes incluem o Oeste Africano variedade Amelonado (AML), quatro clones da Alta Amazônia [Iquitos Misturadas Calabacillo 67 (IMC67), Nanay 33 (NA33), Parinari 7 (PA7), e Scavina 12 (SCA12) e *Unidentified Trinitario* (UIT1) crescido em Sabah, na Malásia. Caracteres de sabor diferiram entre UIT1 e o Oeste Africano Amelonado, caracterizado por um intenso amargor e adstringência associado com cafeína e o conteúdo de polifenóis. Sementes fermentadas do sudeste asiático e do Pacífico Sul são caracterizadas por uma maior acidez (mais ácidos láctico e acético) que as sementes do oeste africano (Clapperton et al. 1994), devido as diferenças varietais, caixas de fermentação e rápida secagem artificial.

Counet et al. (2004) relataram variedades finas com curtos processos de fermentação com altos teores de procianidinas, enquanto sementes de Trinatário da Nova Guiné e *Forastero* foram especificamente maiores no aroma total. Compostos de aroma formados durante a torração foram encontrados por variar diretamente na quantidade com o tempo de fermentação e inversamente com o teor de procianidinas de líquidos de cacau.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi caracterizado o proteoma de sementes de variedades de *T. cacao*. As características deste sistema vegetal, associado ao número limitado de estudos com esse material exigiram a adequação de metodologias iniciais. Sementes de *T. cacao* são ricas em polissacarídeos, gorduras e compostos fenólicos, os quais podem bloquear os poros dos géis de acrilamida, causando precipitação, aumento no tempo de focalização, rastros e perda de proteínas interferindo na obtenção de géis reprodutíveis e da alta resolução. Portanto, foi necessária a seleção da metodologia de extração ideal de proteínas para análises em eletroforese bidimensional. Dentre as condições avaliadas, a extração de proteínas em solução Tris-HCl, filtragem; precipitação em solução ácida (TCA), resultou em melhor fracionamento protéico. A utilização de kit comercial de limpeza e modificações nas condições de focalização isoeletrica, tempo de redução e alquilação e método de coloração, ajudaram na obtenção de géis bidimensionais (2-D) com maior resolução e maior número de *spots*.

O banco de dados disponível no NCBI específico para proteínas de *T. cacao* colaborou com a maior parte das proteínas identificadas, as proteínas que não foram identificadas no banco de cacau tiveram a busca feita principalmente na homologia com outras espécies vegetais, pelo fato de *T. cacao* ser uma espécie cujo genoma ainda não é conhecido. A utilização da técnica de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas permitiu a identificação de 89 *spots*, correspondendo a 28 proteínas diferentes. A maior parte dos *spots* identificados correspondem as proteínas de reserva 21kDa e a vicilina, sendo esta última a responsável pelos precursores do sabor de chocolate.

A análise sensorial evidenciou diferenças nos atributos de sabor de cacau, amargor, acidez e adstringência nos três genótipos.

Correlacionando as análises sensorial e a proteômica concluiu-se que existe correlação tanto quantitativa como qualitativa das proteínas dos cotilédones de cacau e possivelmente com as proteínas precursoras de sabor e aroma de chocolate.

REFERÊNCIAS

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, A.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 9, p. 840-857, 2008.

ALFENAS, A. O. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos, Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

AMOYE, S. Cocoa Sourcing, World Economics and Supply. **The Manufacturing Confectioner**, Princeton, v. 86, n. 1, p. 81- 85, 2006.

AWUA, P. K. **Cocoa processing and chocolate manufacture in Ghana**. Essex, U.K.: David Jamieson and Associates Press, 2002.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; HARIKRISNA, K.; BIEHL, B. Analysis of vicilin (7S)-class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 28-732, 2002.

ANDRADE, A. de; CELEDÓN, P. A. F.; LABATE, C. A. O proteoma da madeira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 36, p. 10-17, 2006.

ARNOLDI, A.; ARNOLDI, C.; BALDI, O.; GRIFFINI, A. Flavor components in the Maillard reaction of different amino acids with fructose in cocoa butter-water. Qualitative and quantitative analysis of pyrazines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Barking, v. 36, p. 988-992, 1998.

ARGOUT, X. et al. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 1-45, 2008.

BAEK, J. et al. Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoinhibitors. **Biosci. Biotech. Bioch.** v. 58, p. 843-846, 1994.

BAIROCH, A. et al. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, London, v. 1, n. 33, p. 154-9, 2005.

BAREL, M.; GUYOT, B.; VINCENT, J. C. Les fractions protéiques du cacao avant et après torréfaction. Influence de la fermentation. **Café, Cacao Thé**, Paris, v. 27, n. 2, p. 127-144, 1983.

BAYER, C. et al. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid atpB and rbcL DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 129, p. 267–303, 1999.

BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Tradução de Mariano González Alonso. 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 423 p.

BECKETT, S. T. **The science of chocolate**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 196 p. Disponível em:

http://books.google.com/books?id=ny9oVf4usz8C&printsec=frontcover&dq=BECKETT,+S.+T.+The+science+of+chocolate&source=bl&ots=NnfFgQ5Dkk&sig=brKh-DDgiL5pQ1MoaEJ8KTBWh6o&hl=en&ei=EajpS-2lOoWRuAfe-OGocw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6&ved=0CD0Q6AEwBQ#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 12 set. 2009.

BERBERT, P. R. F. Contribuição para o conhecimento dos açúcares componentes da amêndoa e do mel de cacau. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 9, p. 55-61, 1979.

BIEHL, B.; PASSERN, D. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, p. 1280-1290, 1982.

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

BIEHL, B. et al. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. **Angewandte Botanik**, Göttingen, v. 67, n. 1-2, p. 59-65, 1993.

BIEHL, B.; VOIGT, J. Biochemistry of chocolate flavor precursors. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 13., 2000, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 2000. 1 CD-ROM.

BIRCH, H. F. Changes in the nitrogenous components of Forastero cocoa during fermentation. In: ANNAUL REPORT ON COCOA RESEARCH, 10., 1941, Trinidad. Trinidad, 1941. p. 22-23.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93-99, 1987.

BODE W.; HUBER R. Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. **European Journal of Biochemistry**. v. 204, p. 433-451, 1992.

BONVEHÍ, J. S. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 221, p. 19-29, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUDEAU, J. **El cacao: técnicas agrícolas y producciones tropicales**. Barcelona: Ed. Blume, 1970. 297 p.

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. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CARR, J. G.; DAVIES, P. A.; DOUGAN, J. **Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia II**. Bristol: University of Bristol Research Station, Long Ashton, 1979.

CARPENTIER, S. C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CHEN, S. X.; HARMON, A. O. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CHEESMAN, E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationship of cocoa populations. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 21, p.144-159, 1944.

CLAPPERTON, J. F. Assessment of cocoa flavour and fat content, In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CONSERVATION, CHARACTERIZATION, AND UTILIZATION OF COCOA GENETIC RESOURCES IN THE 21ST CENTURY, CRU, 1993, Trinidad. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 2000.

CLAPPERTON, J. F. et al. The contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour, **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 71, n. 4, p. 303-308, 1994a.

CLAPPERTON, J. F. et al. Effects of planting materials on flavour, **Cocoa Growers' Bulletin**, London, v. 48, p. 47-63, 1994b.

COE, S. D.; COE, M. D. **The true history of chocolate**. London: Thames and Hudson, 1996.

COUNET, C.; COLLIN, S. Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 6816-6822, 2003.

COUNET, C. et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 6243-6249, 2004.

CROSS, E; VILLENEUVE, F.; VINCENT J. C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. **Café, Cacao Thé**, Paris, v. 16, n. 2, p. 109-113, 1982.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**, Washington, v. 35, p. 379-614, 1964.

DAMERVAL, C. et al. Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 7, p. 52-54, 1986.

DE LA CRUZ, M. et al. Origins of cacao cultivation. **Science**, Washington, v. 375, p. 542-543, 1995.

DIAS, L. L. C. et al. Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 135, p. 2002-2008, 2007.

DIMICK, P. S.; HOSKIN, J. C. The chemistry of flavour development in chocolate. In: BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. p. 137-152.

DODO, H. W.; FURTEK, D. B. Cloning and sequencing of a gene encoding a 21kDa trypsin inhibitor from *Theobroma cacao* L. **Café, Cacao Thé**, Paris, v. 38, p. 113-118, 1994.

DODO, H. W.; FRITZ, P. J.; FURTEK, D. B. A cocoa 21-kDa seed protein has trypsin inhibitory activity. **Café, Cacao Thé**, Paris, v. 36, p. 4, 1992.

DUNN, M. J. **Proteins**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 407 p.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. 110 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 26 jan. 2010.

FIGUEIRA, A. et al. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. from Brazil and Malasya. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 74, n. 2, p. 132-139, 1997.

FRITZ, P.J. et al. Characterization: a requirement of conservation and utilization of cocoa genetic resources for the 21st century. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CONSERVATION, CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF COCOA GENETIC RESOURCES IN THE 21ST CENTURY, 1992, Port-of-Spain, Trinidad. St. Augustine: The Cocoa Research Unit, The University of the West Indies, 1992. p. 69-76.

FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V. C.; ROBERTS, J. B. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 9, p. 181-184, 1958.

GARCIA-OLMEDO, F. et al. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and alpha-amylases. *Oxford Surv. Plant Molecular. Cell Biology*. v. 4, p. 275-334, 1987.

GION, J. M. et al. The proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 3731-3751, 2005.

GIORGIANNI, S. B. Proteoma analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; KLEINER, O.; BROWN, L.R.; DRUKIER, A.K. Perspectives in spicing up proteomics with splicing. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 699-709, 2005.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.3665-3685, 2004.

GUILLOTEAU, M. et al. Oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and characterization of cDNA encoding the 15.8 and 16.9 kDa oleosins. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, n. 4, p. 597-606, 2002.

GUYTON, B. **Commodities** – Cocoa Review. Issues, trends and performance of the chocolate and confectionery industries. Washington: World Cocoa Foundation, 2003. 40 p.

HAMMOND, R. W.; FOARD, D. E., LARKINS, B. A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. *Journal of Biology Chemistry*. v. 259, p. 9883-9890, 1984.

HANSEN, C. E. et al. Comparison of enzyme activities involved in flavour precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 1193-1198, 2000.

HEINRICHS, H. **Identifizierung der proteasen der kakaosamen (*Theobroma cacao* L.)**. Thesis - Naturwissenschaftliche Fakult, Technical University Braunschweig, Braunschweig Germany, 1995.

HEINZLER, M.; EICHNER, K. Verhalten von Amadori-verbindungen während der kakaoverarbeitung. 1. Bildung und abbau von Amadoriverbindungen. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, Berlin, v. 192, p. 24–29, 1991.

HERBERT, B. et al. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when and how?. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 2046-2057, 2001.

INTERNATIONAL COCOA GERMPLASM DATABASE. Disponível em: <<http://www.icgd.rdg.ac.uk/>>, Acesso em 05 de maio 2010.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.icco.org>>, Acesso em: 05 maio 2010.

ISHIKAWA, A. et al. A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors - structural comparisons and differential expression. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 35, p. 303-312, 1994.

JINAP, S.; DIMICK, P. S.; HOLLENDER, R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. **Food Control**, Guildford, v. 6, n. 2, p. 105-110, 1995.

JOFUKU, K. D.; GOLDBERG, R. B. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 1, p. 1079-1093, 1989.

JORGE, I. et al. The holm oak leaf proteome. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 222-234, 2005.

KATTENBERG, H.; KEMMING, A. The flavor of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. In: CHARALAMBOUS, G. **Food flavors, ingredients and composition**. Amsterdam: Elsevier Science, 1993. p. 1-22.

KIM, H.; KEENEY, P. G. Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 49, p. 1090-1092, 1984.

KIRCHHOFF, P. M.; BIEHL, B.; CRONE G. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. **Food Chemistry**, Barking, v. 31 p. 295-311, 1989.

KOCHHAR, S. et al. Isolation and characterization of 2S cocoa seed albumin storage polypeptide and the corresponding cDNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4470-4477, 2001.

KORMUTAK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVA, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. **Biologia**, Bratislava, v. 61, p. 479-486, 2006.

KRATZER, U. et al. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. **Food Chemistry**, Barking, v. 113, p. 903-913, 2009.

LAJUS, B.; COLOMBO, A. J. Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 119-146, 1983.

LALOI, M. et al. Molecular and biochemical characterization of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 754-762, 2002.

LERCETEAU, E. et al. Evolution of cacao beans proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 619-625, 1999.

LIPPERT, D. et al. Conifer defense against insects: proteome analysis of Stika spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobi*). **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 248-270, 2007.

LISKA, A. J. et al. Homology-based functional proteomics by mass spectrometry: Application to the *Xenopus* microtubule-associated proteome. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 2707-2721. 2004.

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

LOPEZ, A. S. Chemical changes occurring during the processing of cacao. In: SYMPOSIUM CACAO BIOTECHNOLOGY, 1986, Pennsylvania. **Proceedings...** University Park: The Pennsylvania State University, 1986. p. 19-54.

- LUNA, F. et al. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3527-3532, 2002.
- MACDONALD, H. M.; MASTER, K. E.; PETTIPHER, G. L. Partial purification of cocoa seed proteins and studies into the degradation of cocoa storage protein. **Café, Cacao Thé**, Paris, v. 38, p. 119-124, 1994.
- MACKNIGHT, R. et al. Functional significance of the alternative transcript processing of the Arabidopsis floral promoter FCA. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 877-888, 2002.
- MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotechnology**, London, v. 21, p. 255-261, 2003.
- MANN, M.; WILM, M. Electrospray mass spectrometry for protein characterization. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 6, p. 219-224, 1995.
- MANN, M.; HENDRICKSON, R. O. A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 437-473, 2001.
- MARTINI, M. H. et al. Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. **Revista Brasil. Bot.**, v. 31, n. 1, p. 147-154, 2008a.
- MARTINI, M. H. et al. Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). **Revista Brasil. Bot.**, v. 31, n. 3, p. 425-431, 2008b.
- MATHESIUS, U. et al. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. **Proteomics**, Weinheim, v. 1, p. 1424-1440, 2001.
- MATTIETO, R. A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).** 2001. 164 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- MCHENRY, L.; FRITZ, P. J. Comparison of the structure and nucleotide sequence of vicilin genes of cocoa and cotton raise questions about vicilin evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 1173-1176, 1992.
- MENEZES, J. A. S.; CARMO-NETO, D. A modernização do agrobusiness cacau. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1993.
- MOHR, W.; RÖHRLE, M.; SEVERIN, T. On the formation of cocoa aroma from its precursors. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, Leinfelden-Echterdingen, v. 73, p. 515-521, 1971.
- MOHR, W.; LANDSCHREIBER, E.; SEVERIN, T. On the specificity of cocoa aroma. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, Leinfelden-Echterdingen, v. 78, n. 2, p. 88-95, 1976.

- MOTAMAYOR, J. C. et al. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, London, v. 89, p. 380-386, 2003.
- MOTAMAYOR, J. C. et al. Cacao domestication II: progenitor germoplasm of the Trinitario cacao cultivar. **Heredity**, London, v. 85, p. 156-159, 1988.
- MOTAMAYOR, J. C. et al. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). **PloS ONE**, Chicago, v. 3, n. 10, p. 1-8, 2008.
- NAZARUDDIN, R. et al. HPLC Determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. **Malaysian Journal Analytical Science**, Selangor, v. 7, n. 2, p. 377-386, 2001.
- OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma Cacao*)**. 2005. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- OSMAN, H.; NAZARUDDIN, R.; LEE, S. L. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. **Food Chemistry**, Barking, v. 86, p. 41-45, 2004.
- PARK, O. K. Proteomics studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 37, p. 133-138, 2004.
- PARKER, K. C. et al. Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 1920-1932, 1998.
- PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, London, v. 33, p. 311-323, 2003.
- PAWLOWSKI, T. A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: Influence of abscisic and gibberellic acids. **Proteomics**, Weinheim, v.7, p. 2246-2257, 2007.
- PIMENTA, A. M. C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 192, p. 16-22, 2003.
- PIROVANI, C, P. et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, Weinheim v. 29, p. 2391-2401, 2008.
- PORTER, L.J., MA, Z.; CHAN, B.G. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, New York, v. 30, p.1657-1663, 1991.
- PURSEGLOVE, J. W. Tropical crops-dicotyledons. **Longman Green**, London, v. 1, p. 332, 1968.
- REINECCIUS, G. A. et al. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 20, p. 199-202, 1972.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: ROGERS, L. J. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. v. 5: Amino acids, proteins and nucleic acids. New York: Academic Press, 1991. p. 259-305.

ROELOFSEN, P. A. Fermentation, drying and storage of cacao beans. **Advances in Food Research**, New York, v. 8, p. 225-289, 1958.

ROBERTS, G. O.; SMITH, C. W. Alternative splicing: combinatorial output from the genome. **Current Opinion Chemical Biology**, London, v. 6, p. 375-383, 2002.

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

ROMANCZYK, L. J. et al. **Cocoa extract compounds and methods for making and using the same**. McLean, VA: Mars Incorporated, 1997. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/36497.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

SANBONGI, C. et al. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n. 4, p. 205-221, 2004.

SHEORAN, I. S. et al. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 3752-3764, 2005.

SILVA, C. R. S. **Caracterização de seqüências gênicas expressas (EST) durante o desenvolvimento de sementes de *Theobroma cacao* L. com ênfase na biossíntese de ácidos graxos e triglicérides**. 2005. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. V. O. Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 250, p. 93-104, 2005.

SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; SOUZA, C. A. S. Diversidade no gênero *Theobroma*. In: DIAS, L. A. S. (Org.). **Melhoramento genético do cacauero**. 1. ed. Goiânia: FUNAPE, 2001. v. 1, p. 49-80.

SPENCER, M. E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao* – identification of the protein as a member of the Kunitz protease inhibitor family. **Planta**, Berlin, v. 183, p. 528-535, 1991.

SPENCER, M. E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. **Planta**, Berlin, v. 186, p. 567-576, 1992.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing. **Nature Reviews**, London, v. 5, p. 699-771, 2004.

TAI, H. et al. Nucleic acid sequence of a 21 KDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 16, p. 913-915, 1991.

TAYLOR, A. J. **Food flavour technology**. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, 2002.

TAYLOR, A. J.; ROBERTS, D. D. **Flavour perception**. Oxford Blackwell Publishing, 2004.

VOGEL, R.; TRAUTSCHOLD, I.; WERLE, E. Plant inhibitors. In: _____. **Natural proteinase inhibitors**. New York: Academic Press, 1968. p. 9-41.

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

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

VOIGT, J. et al. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 50, p. 177-184, 1994b.

VOIGT, J.; BIEHL, B. Precursors of the Cocoa-Specific Aroma Components are derived from the Vicilin-Class (7S) Globulin of the Cocoa seeds by Proteolytic Processing. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 108 p. 283-289, 1995.

VOIGT, J. et al. Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* L. seeds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, p. 299-307, 1995.

VOIGT, J.; BIEHL, B. Biochemistry of chocolate flavour. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 2000.

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

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes - *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WARINDEL, P. et al. Sequence similarity-driven proteomics in organisms with unknown genomes by LC-MS/MS and automated de novo sequencing. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2318-2329, 2007.

WHITLOCK, B. A.; BAUM, D. A. Phylogenetic relationships of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae) based on sequences of the nuclear gene Vicilin. **Systematic Botany**, Kent, v. 24, n. 2, p. 128-138, 1999.

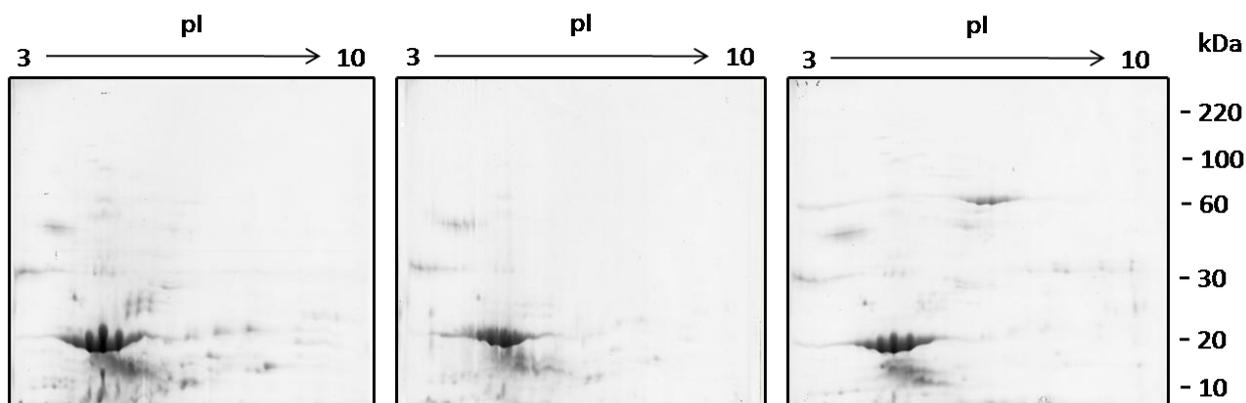
WOLLGAST, J., ANKLAN, E. Review in polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, n. 33, p. 423-447, 2000.

WORLD COCOA FOUNDATION. Disponível em: <<http://www.worldcocoaafoundation.org>>. Acesso em: 10 abr. 2010.

YANG, P. et al. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 3358-3368, 2007.

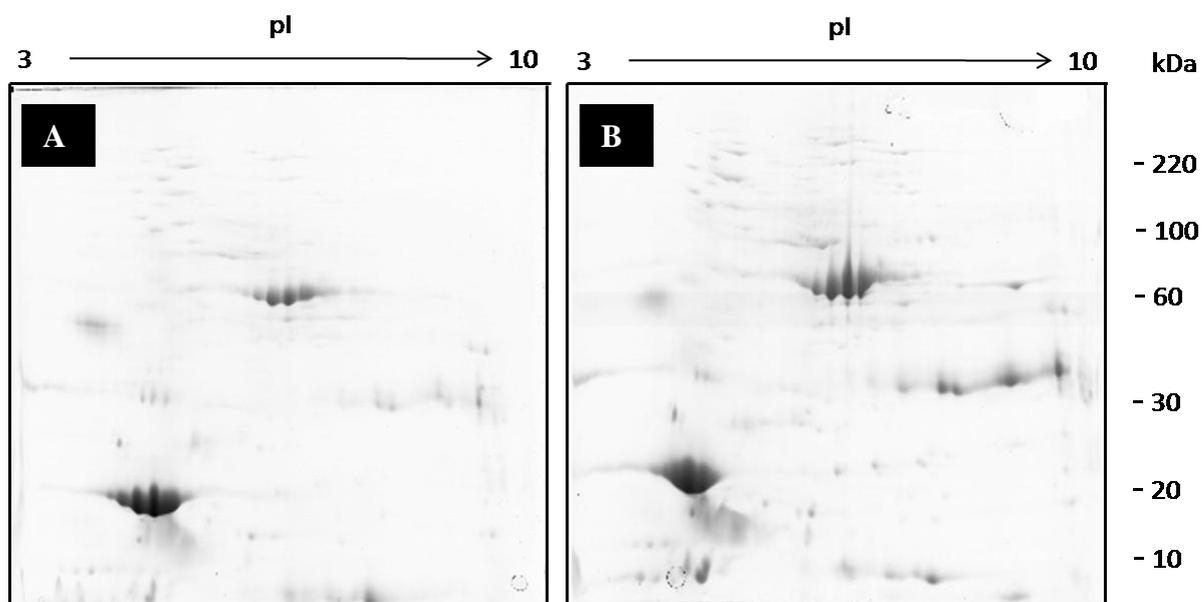
Anexos

Anexo A:



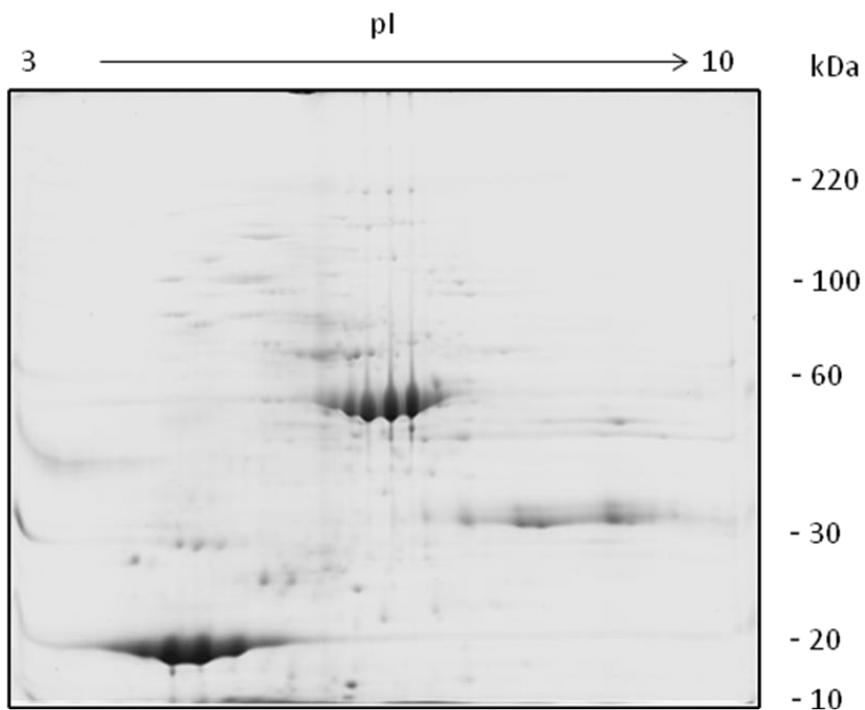
Anexo A: Géis bidimensionais de proteínas totais de sementes de cacauero SIAL 70, Catongo e CCN 51 (respectivamente) sem fermentação (600 µg) analisados em IEF pH 3-10 linear, resolvidos em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

Anexo B:



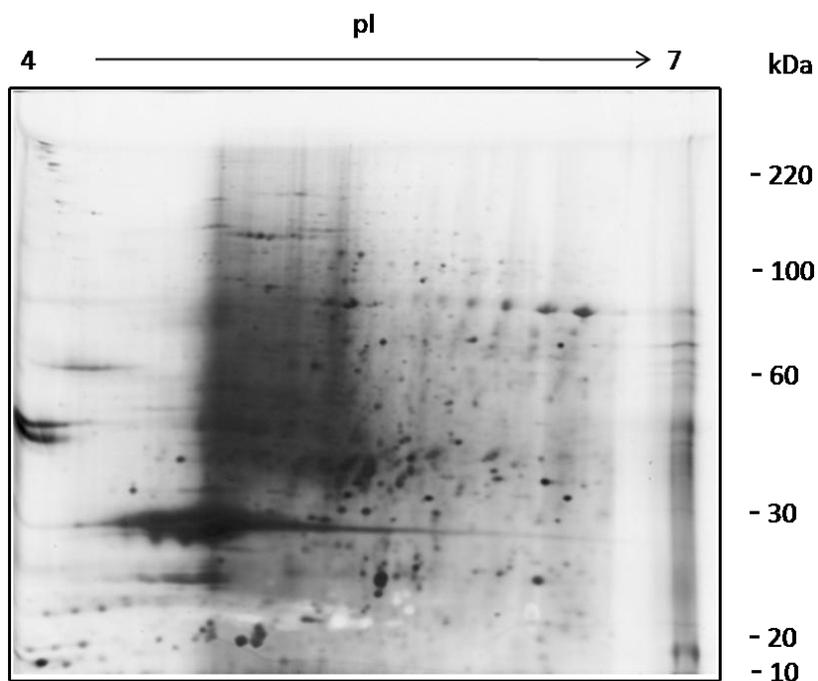
Anexo B. Géis bidimensionais de proteínas totais de sementes de Catongo sem fermentação (600 µg) analisados em IEF pH 3-10 linear, resolvidos em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração *Coomassie Brilliant Blue G-250*, (A) método da extração ácida, (B) método da extração fenólica com a semente desengordurada.

Anexo C:



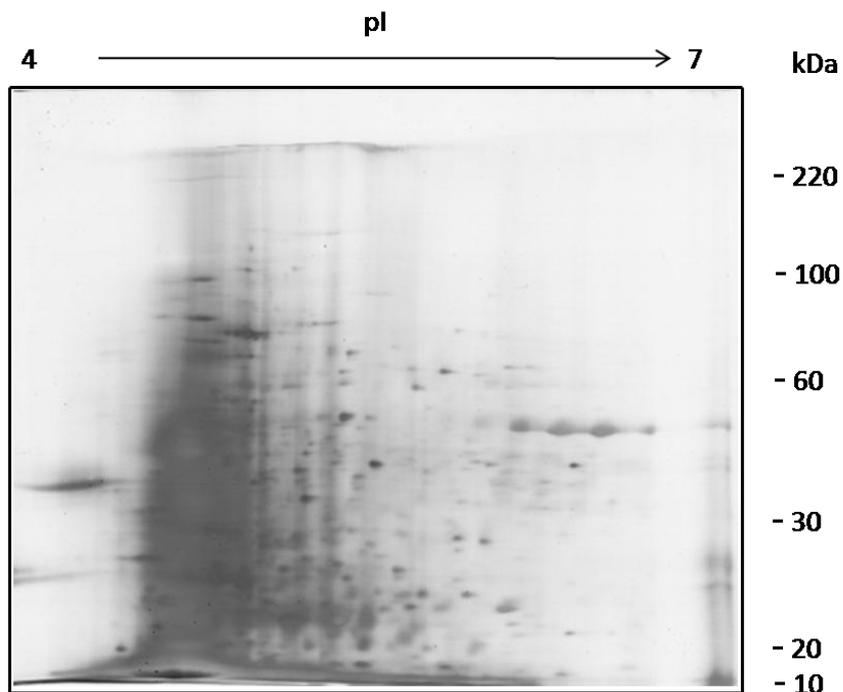
Anexo C: Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de Catongo sem fermentação (600µg) analisado em IEF pH 3-10 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

Anexo D:



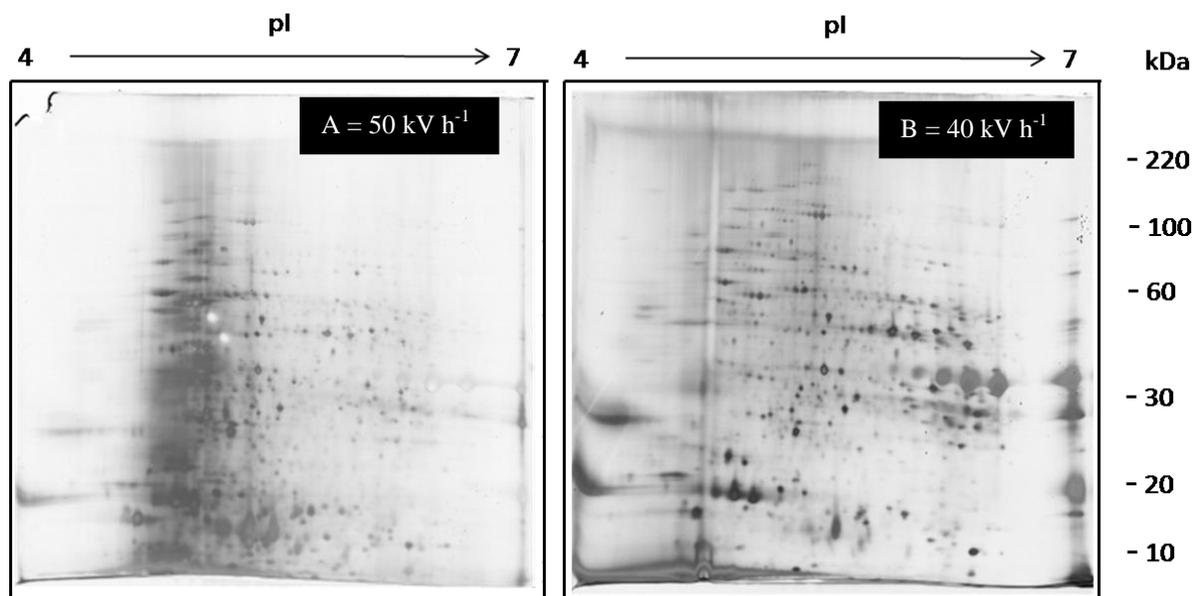
Anexo D: Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de Catongo sem fermentação (150 µg) analisado em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração nitrato de prata.

Anexo E:



Anexo E: Gel bidimensional de proteínas totais de sementes de Catongo sem fermentação (150 μg) analisado em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração nitrato de prata.

Anexo F:



Anexo F: Géis bidimensionais de proteínas totais de sementes de Catongo sem fermentação (150 μg) analisado em IEF pH 4-7 linear, resolvido em 2D-PAGE (12,5%), seguido de coloração nitrato de prata.