



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**ANA JÚLIA MOTA DE LIMA**

**INFLUÊNCIA DO FUNGO *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* NO ÍNDICE  
DE QUALIDADE E PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS DE CUPUAÇU  
(*Theobroma grandiflorum* SCHUM)**

BELÉM - PA

2021

**ANA JÚLIA MOTA DE LIMA**

**INFLUÊNCIA DO FUNGO CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES NO  
ÍNDICE DE QUALIDADE E PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS DE  
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* SCHUM)**

Dissertação de Mestrado IV apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dra. Alessandra Santos Lopes

Avaliada em: 14/12/2021

Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dra. Alessandra Santos Lopes (PPGCTA/ITEC/UFPA)

---

Dra. Brenda de Nazaré do Carmo Brito (Usina da Paz/Programa Pará Profissional)

---

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira (PPGCTA/ITEC/UFPA)

---

Profa. Dra. Eloisa Helena de Aguiar Andrade (PPGBIONORTE/MPEG)

---

Prof. Dra. Luiza Helena da Silva Martins (ISPA/UFRA)

---

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena (PPGCTA/ITEC/UFPA)

D2781 de Lima, Ana Júlia.

INFLUÊNCIA DO FUNGO CLADOSPORIUM  
CLADOSPORIOIDES NO ÍNDICE DE QUALIDADE  
E PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS DE  
CUPUAÇU (*Theobroma  
grandiflorum* SCHUM) / Ana Júlia de Lima. — 2021.  
105 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Alessandra Santos Lopes  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
do Pará,  
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2021.

1. fermentação. 2. cupuaçu. 3. microbiologia. 4.  
compostos voláteis. I. Título.

CDD 664.8

---

*Dedico a conclusão desse sonho aos meus pais Jorge e Angélica que foram, são e sempre serão as pedras angulares do meu caminho, os braços seguros que me abraçam, as vozes ternas que me encorajam e o meu “lar”, pois de nada serviria os títulos e louros se não pudesse compartilhar com vocês que sempre me ensinaram o verdadeiro valor da vida! Nunca foi apenas por mim! Nós daqui até o fim!*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu Deus que me sustentou e me guardou todos os dias, não deixou que nenhum obstáculo fosse grande o suficiente para atrapalhar os meus sonhos! Deus é bom o tempo todo!*

*À minha mãe, minha maior incentivadora de todos os tempos, acreditou em mim e me segurou em cada crise de ansiedade e desespero que eu passava. Você disse que valeria a pena, e valeu!*

*Ao meu pai, meu porto seguro e meu herói, dedicou boa parte da sua vida para que eu pudesse seguir em frente sem NUNCA me faltar nada! Essa vitória é nossa!*

*Ao meu irmão, motivo de me fazer querer ser melhor a cada dia e te incentivar a alcançar voos mais altos. Eu por você e você por mim, sempre!*

*À professora Alessandra, minha grande mentora e inspiração, sou eternamente grata por toda paciência, confiança, oportunidades e ensinamentos que levarei para a vida pessoal e profissional. Minha eterna gratidão!*

*À professora Brenda, por todas as palavras de carinho, de motivação, por ter me acalmado tantas vezes e me auxiliado sempre que necessário, principalmente na escrita com qualidade desse trabalho.*

*À professora e mentora Profa. Luiza Martins, carinhosamente chamada de Lu, por todas as horas dedicadas a contribuir na correção do trabalho, sugestões, conselhos e afagos. Que orgulho aprender com você!*

*Aos amigos do LABIOTEC, que tornaram a jornada mais alegre, mesmo que a pandemia tenha dificultado o convívio, em especial ao Gilson, Mayumi e Yasmin por toda a prestatividade, paciência e ensinamentos. Vocês foram fundamentais! Esse trabalho só foi possível porque vocês me inspiraram.*

*Ao meu amigos Willen, que bom que eu encontrei você nessa jornada, muito feliz em aprender com você e dividir as dores e delícias da pesquisa. Que possamos seguir sempre amigos.*

*Aos queridos amigos da turma de 2019, em especial ao Vinícius que compartilhou comigo tantos aprendizados, parcerias, alguns litros de café e choros também.*

*Aos professores do PPGCTA pelo cuidado em nos ensinar com tanto comprometimento, em especial ao Prof. Renan Chisté e Prof. Nelson Rosa que se fizeram presentes na realização desse trabalho, seja em ensinamentos, seja em disponibilidade de empréstimos de equipamentos e reagentes, SEMPRE muito prestativos, pacientes e gentis. Que honra conviver com vocês!*

*Ao Senhor Morais, da Amazon Oil, pela doação das sementes de cupuaçu possibilitando a realização desse trabalho com louvor.*

*A professora Eloisa Helena que desde o início contribui de forma positiva em cada etapa da construção desse trabalho. Ao professor Pablo Figueiredo que me auxiliou na realização das análises de compostos voláteis com toda a paciência e disponibilidade.*

*Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de desenvolvimento profissional.*

*A todos os meus amigos, colegas e familiares que, direta ou indiretamente, torceram por mim e mandaram energias positivas!*

**MUITO OBRIGADA!**

*Ana Júlia M. de Lima*

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação” Simone de Beauvoir*

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Temperatura de fermentação, análises físico-químicas de pH, acidez total titulável, compostos fenólicos e contagem microbiana .....	72
<b>Tabela 2.</b> Composição centesimal das sementes de cupuaçu in natura .....	77
<b>Tabela 3.</b> Valores médios dos açúcares redutores expressos em g/100g.....	81
<b>Tabela 4.</b> Perfil aromático das sementes de cupuaçu.....	87



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.</b> Fruto do cupuaçu.....	22
<b>Figura 2.</b> Cocho de fermentação.....	25
<b>Figura 3.</b> Reações enzimáticas primárias ocorridas na fermentação do cupuaçu.....	27
<b>Figura 4.</b> Evolução do processo fermentativo .....	29

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1.</b> Teores médios de fenólicos totais (mg CAT/g) totais durante a fermentação .....	79
<b>Figura 2.</b> Análise de PCA e HCA nas sementes fermentadas controle .....	93
<b>Figura 3.</b> Análise de PCA e HCA nas sementes fermentadas com inóculo .....	95

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	12
OBJETIVOS DO ESTUDO .....	14
GERAL.....	14
ESPECÍFICOS .....	14
CAPÍTULO 1 - PROCESSAMENTO DE SEMENTES DO CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ): PROCESSOS FERMENTATIVOS, DIVERSIDADE MICROBIANA E FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS, UMA REVISÃO.....	15
RESUMO .....	16
ABSTRACT.....	17
1INTRODUÇÃO.....	18
2 GÊNERO THEOBROMA: DIVERSIDADE E DISPERSÃO NA AMAZÔNIA.....	19
2.1 <i>Theobroma grandiflorum</i> Schum.....	20
3 PROCESSO FERMENTATIVO DAS SEMENTES DO CUPUAÇU .....	24
4 METÁBOLITOS SECUNDÁRIOS FORMADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	30
5 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO.....	33
5.1 LEVEDURAS .....	33
5.2 BACTÉRIAS LÁTICAS .....	35
5.3 BACTÉRIAS ACÉTICAS .....	37
5.4 FUNGOS FILAMENTOSOS.....	38
5.4.1 <i>CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES</i> .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO FUNGO <i>Cladosporium cladosporioides</i> NO ÍNDICE DE QUALIDADE E PERFIL AROMÁTICAS DAS AMÊNDOAS DE CUPUAÇU ( <i>Theobroma grandiflorum</i> SCHUM).....	62
RESUMO .....	62
ABSTRACT.....	63
1 INTRODUÇÃO.....	64
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1 MATERIAL .....	65
2.2 PRODUÇÃO DO INÓCULO FÚNGICO.....	65
2.3 FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CUPUAÇU.....	66
2.4 CONTAGEM DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS ACÉTICAS.....	67
2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA.....	67
2.6 FENÓLICOS TOTAIS .....	68
2.7 QUANTIFICAÇÃO DE AÇUCARES REDUTORES(DNS).....	68
2.8 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS .....	69
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
3.1 ANÁLISE FÍSICO QUÍMICA.....	70
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	79
3.3 AÇÚCARES REDUTORES .....	80
3.4 CONTAGEM DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS ACÉTICAS .....	82
3.5 PERFIL AROMÁTICO.....	85
3.6 PCA E HCA .....	92

4CONCLUSÃO.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

## RESUMO GERAL

Conforme a similaridade entre os frutos do cacau e cupuaçu, e os processos de fermentação e torração de suas sementes, é possível desenvolver compostos de aroma e sabor análogos aos formados durante esses processos para o cacau. A semente do cupuaçu ainda é usada para extração de gordura ou descartada como resíduo, mesmo com um cenário de alta demanda para produção de análogo ao chocolate oriundo do cupuaçu. Há poucos relatos na literatura sobre a microflora fermentativa nas sementes de cupuaçu, e nada foi encontrado sobre a adição de inóculos com vistas à melhoria e padronização da qualidade de seu processo fermentativo.

A fermentação é um processo decisivo para o desenvolvimento dos precursores de aroma e sabor por meio de inúmeras reações químicas e bioquímicas e atividade metabólica dos microrganismos fermentativos envolvidos (Beckett, 1994; Afoakwa et al., 2008; Kongor et al., 2016).

As leveduras compõem os microrganismos com maior atividade metabólica no início do processo fermentativo, convertendo os açúcares em etanol, gás carbônico e ácido cítrico (Fowler, 2016). A oxigenação da massa fermentativa após os primeiros dias de fermentação favorece o crescimento de bactérias lácticas e acéticas dando origem ao ácido láctico e ácido acético, respectivamente (Schwan and Wheals, 2004; Kongor et al., 2016; Ramos et al., 2020; Chagas Júnior et al., 2020).

O *Cladosporium cladosporioides* tem sido associado com a qualidade dos grãos de café fermentados, atuando no solo, nas folhas e nos grãos e pode ser encontrado nas diferentes etapas de processamento do café (Pasin et al., 2011; Pereira et al., 2005). Entre outras ações, a presença do fungo é responsável por produzir enzimas pectinolíticas que atuam na degradação das substâncias pectinas presentes nas sementes (Bastos et al.,

2013). Tal comportamento observado na fermentação de café propõe a hipótese deste estudo para a melhoria da fermentação de sementes de cupuaçu.

Este trabalho apresenta no Capítulo 1 a Revisão de Literatura, abordando os principais tópicos sobre a botânica do fruto, sua diversidade e dispersão pela Amazônia, bem como as características do processo fermentativo, classes de microrganismos envolvidos e os compostos gerados responsáveis pela formação do perfil de aroma e sabor do produto final.

Em seguida, o Capítulo 2 compreende a pesquisa experimental realizada, os Resultados e Discussão pertinentes aos parâmetros de qualidade das amêndoas de cupuaçu fermentadas com o inóculo fúngico, além dos perfis microbiológico e aromático das amêndoas e a influência do *Cladosporium cladosporioides* no ambiente fermentativo.

Foi possível concluir que as amêndoas fermentadas na presença do inóculo apresentaram uma interessante formação de compostos aromáticos quando comparados com as sementes controle. Além disso, a análise de PCA evidenciou a formação dos mesmos grupos para ambas as fermentações e esses resultados mostram que nas condições estudadas o uso do inóculo de *Cladosporium cladosporioides* reduziu a temperatura de fermentação, produziu amêndoas com maior acidez e fenólicos totais por sua ação inibitória e/ou competitiva em relação às leveduras fermentativas, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*. Desse modo, essa pesquisa introdutória revelou a possibilidade do uso de inóculos fúngicos para a melhoria de parâmetros de qualidade no processo fermentativo de sementes de cupuaçu.

As palavras chaves usadas nessa pesquisa foram: fermentação, cupuaçu, compostos voláteis, microbiologia e fungos filamentosos e *Cladosporium cladosporioides*.

## OBJETIVOS DO ESTUDO

### GERAL

Avaliar a influência do fungo *Cladosporium cladosporioides* no índice de qualidade, perfil microbiológico, físico-químico e aromático das amêndoas de cupuaçu fermentadas.

### ESPECÍFICOS

Estudar o processo fermentativo das amêndoas de cupuaçu conduzido com o inóculo fúngico em relação ao grupo controle;

Avaliar o efeito do inóculo fúngico nos parâmetros microbiológicos, físico-químico e no perfil aromático das sementes de cupuaçu fermentadas.

## CAPÍTULO 1

### REVIEW

#### **PROCESSAMENTO DE SEMENTES DO CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*): FERMENTAÇÃO, DIVERSIDADE MICROBIANA E FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS, UMA REVISÃO**

#### **RESUMO**

O cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum] é uma fruta nativa da região amazônica, produzida em larga escala no estado do Pará. A partir do beneficiamento das sementes pós-colheita é possível obter um produto de alta qualidade nutricional e sensorial análogo ao chocolate. O objetivo deste artigo é apresentar uma revisão atualizada sobre o fruto e suas peculiaridades, detalhar as características do processo fermentativo e a diversidade microbiana presente no ambiente responsável por alterações em diversos compostos químicos e voláteis, que compõe a expressão do aroma e sabor do produto final, uma vez que existem apenas 1480 artigos na literatura que retratam de maneira geral a fermentação. As palavras-chave usadas para essa revisão foram: fermentação, cupuaçu, cupulate, microbiologia, fungos filamentosos e *Cladosporium cladosporioides*.

**Palavras-chave:** compostos voláteis, fermentação, microbiologia, sementes de cupuaçu.

## ABSTRACT

Cupuassu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum] is a native fruit to the Amazon region, produced on a large scale in the state of Pará. From post-harvest seed processing, it's possible to obtain a product with a high nutritional and sensory quality similar to chocolate. The objective of this article is to present an updated review of this fruit and it's peculiarities, detail the characteristics of the fermentation process and the microbial diversity present in the environment responsible for changes in various chemical and volatile compounds, that composes the expression of the aroma and flavor of the final product, there are only 1480 articles in the literature that generally fermentation. The keywords used for this review were: fermentation, cupuassu, cupulate, microbiology, filamentous fungi and *Cladosporium cladosporioides*.

**Keywords:** cupuassu seeds, fermentation, microbiology, volatile compounds.



## 1 INTRODUÇÃO

A semente de cupuaçu ainda é pouco explorada comercialmente, tendo potencial para ser aplicada como insumo na indústria de alimentos. A importância econômica destas sementes, faz-se relevante o desenvolvimento de pesquisas mais consolidadas para conhecer a diversidade microbiana atuante na fermentação do cupuaçu para a produção do cupulate, bem como entender quais as mudanças físicas e químicas que ocorrem durante este processo, além disso, é importante ter a compreensão acerca do desenvolvimento dos precursores de aroma e sabor por meio de inúmeras reações químicas e bioquímicas oriundas da atividade metabólica dos microrganismos durante o processo fermentativo.

O cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum] se destaca como um importante produto agrícola de exportação com ampla perspectiva de mercado devido à aceitação que sua polpa desfruta entre os consumidores, no entanto, suas sementes ainda não apresentam a mesma importância econômica que o cacau, apesar do conhecimento técnico-científico de sua adequação para um produto análogo ao chocolate reportados por diversos autores como Lannes et al. (2002) e Rebouças et al. (2020).

Para se obter um produto de qualidade a partir das sementes de cupuaçu, deve-se considerar que fatores como: etapas de pós-colheita, fermentação e secagem, sejam conduzidas de maneira adequada, deste modo, é possível fornecer ao consumidor um produto final com elevada qualidade sensorial (Efraim et al., 2011).

Tais fatores são de vital importância, e nenhum outro processamento posterior pode ser capaz de corrigir as eventuais falhas ocorridas durante estas etapas, que devem ser conduzidas baseadas em parâmetros de qualidade física, química, microbiológica e sensorial.

Diante do exposto, a presente pesquisa visou realizar uma revisão bibliográfica sobre o gênero *Theobroma* e suas peculiaridades, além de aspectos gerais do cupuaçu, bem como as etapas de pré-processamento e a diversidade microbiana atuante na fermentação das sementes deste fruto.

## **2 GÊNERO *THEOBROMA*: DIVERSIDADE E DISPERSÃO EVOLUTIVA**

O gênero *Theobroma* é representado por árvores nativas das florestas tropicais e neotropicais que se estendem por toda a bacia amazônica até o sul do México. Baseado em aspectos vegetativos, morfológicos e hipótese evolutiva, o gênero é organizado em 22 espécies subdivididas em 6 seções, que são: *Andropelatum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus*, *Telmatocarpus* e *Theobroma* (Cuatrecasas, 1964; Whitlock et al., 2001, Silva e Figueira, 2005).

Anteriormente, o gênero *Theobroma* fazia parte da família Sterculiaceae, no entanto estudos filogenéticos moleculares foram capazes de determinar a circunscrição deste gênero na família Malvaceae e na subfamília Byttnerioideae Burnett, uma das nove subfamílias reconhecidas da Malvaceae. A maioria das subfamílias possui distribuição majoritariamente tropical nas florestas da América do Sul e América Central e são denominadas polifiléticas (Whitlock et al., 2001; Richardson et al., 2015).

O gênero *Herrania* foi descrito como morfológicamente semelhante ao gênero *Theobroma*, apresentando traços de parentesco nas folhas e flores e distribuição geográfica semelhante. A estreita relação entre ambos os gêneros é sustentada pela compatibilidade cruzada e viabilidade das sementes entre as espécies *H. mariae* e outras espécies de *Theobroma*, incluindo *T. cacao*, além da adaptação evolutiva ao longo dos anos e das mudanças de temperatura do planeta (Cuatrecasas, 1964, Richardson et al., 2015).

A Colômbia é a região mais rica nas espécies do gênero *Theobroma*, caracterizando essa região de grande interesse biogeográfico para compreender as mudanças causadas nesse gênero devido atividades geológicas ao longo dos anos (Whitlock et al., 2001; Richardson et al., 2015).

De todas as espécies do gênero *Theobroma* catalogadas, apenas 6 estão restritas à Bacia Amazônica, incluindo o *T. grandiflorum* e o *T. cacao*. E a importância deste gênero deve-se, principalmente, à expressão econômica do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), e o impacto causado pela diversidade genética e complexidade dos cultivares de cacau também possibilitou o sequenciamento do genoma do fruto (Argout et al., 2011; Fouet et al., 2011; Argout et al., 2017). Argout (et al., 2011) e Fouet (et al., 2011) identificaram dezenas de genes específicos para biossíntese de lipídeos e terpenóides, importantes informações para o melhoramento da cultura com características sensoriais desejadas para o produto final.

Estudos de Sukha (et al., 2014) também permitiram avaliar parâmetros relevantes para aplicação industrial, focada em cultivares de cacau resistentes a pragas e com alto rendimento, características agrônômicas de grande importância para a indústria.

As sementes do gênero *Theobroma* apresentam um comportamento recalcitrante (devido à complexidade de estruturas que compõe a parede celular do vegetal), ou seja, são sensíveis a desidratação com curto período de viabilidade, além de necessitarem alto teor de umidade e temperatura para germinação (Pammenter & Berjak, 2000).

### **2.1 *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum**

Além do cacau, a outra espécie do gênero cultivada comercialmente é o cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.], que apresenta semelhanças genéticas com o cacau (Alves et al., 2007; Borrone et al., 2007) e apresenta uma emergente procura comercial nos últimos anos baseado, principalmente, na apreciação da

polpa do fruto e recente incentivo ao uso das sementes para aplicação na indústria alimentícia e cosmética.

O nome cupuaçu deriva da língua Tupi e significa *kupu: semelhante ao cacau e açu: grande*, destaca-se como o maior fruto do gênero e o segundo mais rentável economicamente. Também é popularmente conhecido na região como “copoasu, cupu-assu, cupuaçuzeiro, copoaçu” e nas regiões do México e Colômbia pode ser encontrado como bacau e cacau blanco (Souza et al., 2002; Santos et al., 2016).

Nativo da Amazônia brasileira, sua distribuição majoritária se encontra na região Norte do país, sendo os estados do Amazonas (34,8%) e Pará (27,7%) recordes de produção segundo o IBGE (2017). Segundo a Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Pesca (SEDAP/PA), em 2020 foram produzidas, aproximadamente, 29 mil toneladas do fruto em uma área plantada de 8.900 hectares, consolidando o estado do Pará como o principal produtor nacional, com destaque para os municípios de Acará, Tome-açu e Moju.

À medida que a espécie se desenvolve e cresce na Amazônia, trabalhos surgem com o objetivo de encontrar as origens e a domesticação do cupuaçu, por meio de análises genéticas e comparação com banco de dados de outras espécies nativas (Clement et al., 2010). A inserção da cupuaçuzeiro em uma cultura manejada possibilita a expansão para outras regiões do Brasil e demais países com condições climáticas tropicais, consolidando o fruto como uma espécie economicamente ativa.

O fruto do cupuaçu apresenta três principais variedades, cupuaçu redondo, cupuaçu mamorana e cupuaçu mamau. Na região Norte é mais comum encontrar o cupuaçu redondo com as extremidades bem características, peso aproximado de 1,5kg e casca com espessura de 6 a 7mm (Figura 1), o cupuaçu mamorana possui extremidades

mais compridas e maior quantidade de massa aderida as sementes e o cupuaçu mamau não apresenta sementes no seu interior (Calzavara, 1984; Souza et al., 2002).



**Figura 1.** Fruto do cupuaçu.

**Fonte:** Autor (2021).

O cupuaçuzeiro pode atingir até 15 metros de altura, com uma copa de 6 a 8 metros de diâmetro, possui bom desenvolvimento em solo firme e, também, regiões de várzea, bastante comuns no território amazônico (Toxopeus et al., 2001; Jean-Marie et al., 2022).

As folhas são simples, com ápice acuminado, borda lisa e base obtusa, apresenta uma superfície rosácea quando jovem, mas torna-se verde escuro ao longo do processo de maturação e, devido a barreiras morfológicas, a reprodução acontece de forma sexuada, levando à dependência de insetos polinizadores (Souza et al., 2002).

O fruto do cupuaçu apresenta forma ovalóide que pode atingir até 25cm de comprimento, 12cm de diâmetro e peso médio de 1,2kg. A casca (epicarpo) é coberta por um envoltório ferrugíneo que, quando raspado, ainda apresenta uma fina camada clorofilada. O endocarpo, polpa

que envolve as sementes, é macio, fino, claro e, normalmente, cada fruto apresenta cerca de 36 sementes dispostas em torno de um eixo central, o talo (Souza et al., 2008; Vriesmann, 2009).

A polpa que envolve as sementes do fruto possui uma polpa mucilaginoso-ácida e bastante aromática de coloração branca-amarelada, fortemente aderida às sementes por fibras, representando 35% da composição do fruto (Gondim et al., 2001; Souza et al., 2011). Quando fisiologicamente maduro, o fruto se desprende dos galhos e cai no solo, devendo ser coletado o mais rápido possível, uma vez que o tempo transcorrido entre a queda, a colheita e o beneficiamento, é um dos fatores determinantes na qualidade do cupuaçu. Quanto maior for o tempo de exposição ao solo, ao sol, à chuva e a possível contaminação por insetos, maior será a chance de ocorrências de reações de degradação da polpa (Souza et al., 2007; Pereira et al., 2017).

O fruto é adaptado ao clima tropical com condições de temperatura média entre 21° C e 27° C, umidade relativa do ar anual de 77% a 88% e o regime pluviométrico na faixa de 1.900 a 3.100 mm. Durante os meses de maior incidência solar (Julho à Setembro) ocorre a floração do fruto e nos primeiros 3 meses do ano é possível observar o pico de frutificação coincidindo com o período chuvoso da região (Souza, 2007; Jean-Marie et al., 2022).

O incomparável valor econômico do fruto está baseado na industrialização e comercialização da polpa na forma de produtos de alto valor agregado na indústria alimentícia ou cosmética, no entanto existe uma crescente demanda sob o uso e valorização das sementes do cupuaçu, ricas em lipídeos, fibras totais e carboidratos (Souza et al., 2020).

A manteiga do cupuaçu é composta por triacilgliceróis formados principalmente pelos ácidos palmítico, linoleico, araquídico, esteárico e oleico (Quast et al., 2011). O ácido palmítico, ácido graxo saturado presente em gorduras vegetais e animais, está presente em quantidades muito menores (7,8%) na manteiga de cupuaçu em relação a manteiga de cacau (26,1%). Por outro lado, o ácido oléico, importante ácido com

propriedades emolientes, apresenta-se em maior quantidade na manteiga de cupuaçu (3,5%) (Sato, 2001; Lanne & Gioelli, 2004).

O perfil de triacilgliceróis também reflete na ponto de fusão da manteiga de cupuaçu. Esta gordura apresenta um ponto de fusão de 50,4°C, uma temperatura maior quando comparado a outros óleos vegetais, como gordura de muru-muru (31,7°C) e óleo de pracaxi (18,5°C) (Ilman, 2008). Dessa forma, a manteiga de cupuaçu possui uma resiliência maior ao calor e tem sido utilizado como substituto da manteiga de cacau em uma variedade de produtos na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (De Oliveira e Genovese, 2013).

Outrossim, a alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados, em especial o ácido oleico, torna a manteiga do cupuaçu mais macia, dessa forma é viável a incorporação de até 25% desta gordura na temperagem da manteiga de cacau, sem alterar a textura e os valores de *snapp* na fabricação de produtos alimentícios, especialmente o chocolate (Quast et al, 2007).

A farinha desengordurada, o concentrado e isolado proteico obtidos da semente de cupuaçu também foram produzidos, e considerados boas fontes de aminoácidos, a citar os aminoácidos sulfurados, ácido glutâmico e aspártico, além de que esses produtos apresentaram 27,7%, 31,2% e 64,3% de proteínas totais, respectivamente (Carvalho et al., 2009).

### **3 PROCESSO FERMENTATIVO DAS SEMENTES DO CUPUAÇU**

Assim como acontece com o cacau, a fermentação das sementes do cupuaçu possui diversas finalidades bem esclarecidas por Vuyst & Weckx (2016), onde ocorre a remoção completa da polpa ao redor da semente, formação de compostos precursores do aroma e sabor (aminoácidos livres e açúcares redutores), reações químicas e enzimáticas (hidrolíticas e oxidativas), e conseqüente redução do amargor e a adstringência da semente.

Conforme as práticas de cada produto rural, as sementes de cupuaçu, previamente despulpadas, são dispostas em pilhas, cestos ou cochos de madeira (Schwan & Wheals, 2004) (Figura 2) cobertos com sacos de aniagem e folhas de bananeira, que tem como finalidade manter a temperatura gerada pelo metabolismo microbiano. Como ocorre com o cacau, a polpa residual obtida como resíduo do despulpamento das sementes, é a principal fonte de substratos para o desenvolvimento dos microrganismos essenciais para o processo (Guehi et al, 2010; Ramos et al, 2020).



**Figura 2.** Cocho de fermentação.

**Fonte:** Autor (2021).

Embora na composição da polpa do cupuaçu existam uma diversidade de compostos aromáticos (apresentados no tópico 4.1), o despulpamento industrial das sementes é essencial para o desenvolvimento do processo fermentativo, pois o uso de sementes totalmente cobertas de polpa prolongaria o tempo de fermentação, afetaria a liquefação da polpa e o aumento de temperatura necessária para ocorrência da sucessão microbiana fermentativa, e causaria a ocorrência de microrganismos putrefativos (Ramos et al., 2020).

A fermentação é uma sucessão de ações microbianas na semente, e ocorre de forma natural no meio ambiente, como acontece nas sementes de cacau, estas ações ocorrem sendo guiadas por microrganismos sensíveis, como: bactérias ácido acéticas



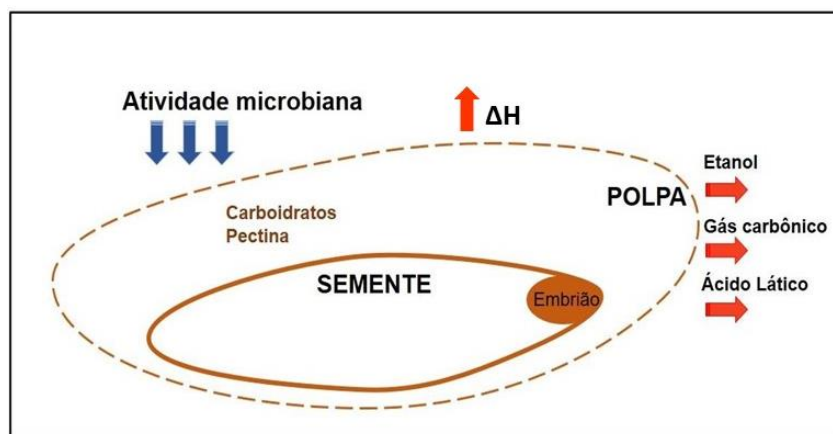
(AAB) que utilizam os açúcares em etanol transformando-o em ácido acético; as bactérias lácticas (LAB) na fermentação, metabolizam o ácido cítrico em ácido lático, resultando em uma acidez não volátil, podendo ser um ponto negativo no produto final, assim como podem ser responsáveis pela produção do composto 3-metilbutanal (reação de Strecker), que irá contribuir sensorialmente ao produto final com notas de chocolate (Ayda et al., 2001; Schwan & Wheals, 2004; Ramos et al., 2016; Agostini et al., 2021).

Tais reações metabólicas são exotérmicas e ocasionam o aumento de temperatura pela liberação de energia, que é um dos parâmetros de monitoramento da fermentação (Abdullahi et al., 2018; Figueroa-Hernández et al., 2019), caracterizando a primeira fase do processo fermentativo das sementes de cacau (Figura 3).

A microflora identificada em processos fermentativos de cacau e possivelmente em cupuaçu também, em diversos lugares, afirma ser possível encontrar diferenças quanto às espécies identificadas na fermentação de cada país, sugerindo que fatores como manipulação, temperatura local, umidade, solo e fatores abióticos podem alterar a microbiota local (Papalexandratou et al., 2011; Illegheems et al., 2012).

A superfície das folhas de bananeira, a microbiota presente nas mãos e utensílios dos trabalhadores, utensílios, solo, formato e material das caixas de fermentação e a própria variedade do fruto e fatores ambientais são importantes para proporcionar a contaminação espontânea do ambiente de fermentação e contribuir para um processo mais eficiente (Schwan & Wheals, 2004; Ramos et al., 2020).

No que diz respeito ao tempo de fermentação do cacau, pode variar de acordo com cada região, produtor, ou ainda, variedade do fruto utilizada, sendo entre 5 e 7 dias (Chagas Júnior et al., 2020, Lima et al., 2011) e o prolongamento representa um risco para a qualidade do produto final pela obtenção de amêndoas com sabores estranhos (*off-flavors*). O mesmo pode ser aplicada para as sementes de cupuaçu segundo relatos de Alvarez et al. (2017) e Ramos et al. (2020).



**Figura 3:** Reações químicas e bioquímicas na fermentação do cupuaçu.  
**Fonte:** Adaptado de Schwan & Wheals, 2004 e De Vuyst & Weckx, 2016.

A presença de ácido cítrico no início da fermentação, funciona como co-substrato para que as LAB possam produzir ácido lático ou compostos, como acetoina e diacetil, aumentando o pH e permitindo o crescimento bacteriano necessário para a continuidade do processo (Papalexandratou et al., 2011; De Vuyst & Weckx, 2016).

O processo fermentativo do cacau e suas peculiaridades vem sendo estudado ao longo dos anos por diversos pesquisadores ao redor do mundo (Rodriguez-Campos et al., 2012; Romero-Cortes et al., 2012; Miguel et al., 2017) e, também, com destaque para recentes trabalhos com o cacau amazônico (Chagas Júnior et al., 2020). No entanto, no que diz respeito ao processo fermentativo de cupuaçu utilizando um inóculo fúngico, este estudo é de caráter inédito para a região amazônica.

Leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* e *Kluyveromyces marxianus*, produzem algumas enzimas pectinolíticas que são capazes de quebrar a pectina, tal enzima é responsável pela viscosidade da polpa do cupuaçu, permitindo a degradação da polpa e a formação de espaços para a circulação de ar (Schwan & Wheals, 2004; De Vuyst & Weckx, 2016). Leveduras também são capazes de sintetizar invertases que atuam na degradação de polissacarídeos presentes na parede celular dos vegetais, nesse caso, das sementes de cacau e cupuaçu ao longo do processo fermentativo (Chagas Júnior et al., 2020; Ramos et al., 2020).

A entrada de ar na massa fermentativa e o ligeiro crescimento do pH, favorecem o crescimento de AAB que oxidam o etanol presente nos cotilédones das sementes em ácido acético, impulsionando o aumento de temperatura e morte do embrião em decorrência da ruptura de membranas internas e células polissacarídicas, lipídeo-proteicas e polifenólicas presentes nos cotilédones por meio de reações altamente exotérmicas (Moreira et al, 2017; do Carmo Brito et al, 2017)

A testa da semente funciona como uma barreira endógena auxiliando na cinética da fermentação, retenção da gordura da semente e proteção contra microrganismos putrefativos e deterioradores. Embora a presença do ácido acético e o calor sejam apontados como fatores relevantes para a morte do embrião, o etanol também pode ser responsável pela ativação de enzimas que degradam o embrião (Schwan & Wheals, 2004; De Vuyst & Weckx, 2016).

A alta temperatura e o baixo pH são necessários para a hidrólise de proteínas e, conseqüente liberação de aminoácidos livres, importante precursor de aromas e sabores, além de fonte de aminas bioativas (Hernández-Hernández et al, 2016). Os aminoácidos livres juntamente com os açúcares redutores são os responsáveis pela reação de Maillard, onde, durante a torração, são formados uma gama de compostos responsáveis pelo aroma e sabor, como aldeídos, pirazinas, cetonas, ésteres e álcoois (Figuerola-Hernández et al, 2019).

Em fermentação espontânea das sementes de cupuaçu despulpadas, Cohen & Jackix (2005) registraram temperaturas máximas entre 47 e 49°C, enquanto Ramos e colaboradores (2020) obtiveram temperaturas máximas de fermentação próximas ao 43°C nas mesmas condições do trabalho anterior, no entanto utilizando caixas de isopor para a fermentação.

Variações de temperaturas podem ser explicadas pela quantidade de sementes usadas no processo, quantidades de massa maiores são diretamente proporcionais aos valores de temperatura (Ramos et al, 2020). Para fins comparativos, em relação a

fermentação de cacau, Chagas Junior (2020) documentou uma temperatura máxima de 45°C no terceiro dia de fermentação espontânea seguido de um declínio até o final do processo (Souza et al., 2020).



**Figura 4:** Evolução do processo fermentativo

**Fonte:** Souza et al.(2020).

Com relação a umidade das sementes do fruto do cacau esta tende a aumentar devido à elevação da temperatura da massa, causado pela absorção e retenção de umidade da polpa, ou ainda, pela oxidação do etanol a ácido acético, culminando com a liberação de gás carbônico e água (Schwan & Wheals, 2004).

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas, classificados em diversos grupos que vão desde os mais simples, como os ácidos fenólicos, até os mais complexos, como os flavonoides, e são eles que conferem cor, sabor e adstringência em alimentos. Ademais, eles servem como substratos para algumas reações enzimáticas que culminam com o escurecimento do alimento (Cheynier, 2012) e, no cupuaçu, também estão relacionados com atividade antioxidante (Yang et al., 2003).

As sementes de cacau *in natura* apresentam maiores concentrações de compostos fenólicos e, ao longo da fermentação, sofrem oxidação e diminuem consideravelmente (Pugliese et al., 2013; Chagas Junior et al., 2020).

A perda de compostos fenólicos está associada à atividade da polifenoloxidase (PPO) formando compostos denominados quinonas, atuante nas reações enzimáticas de escurecimento dos grãos e que possui atividade ótima entre 42 e 45 °C, além de ser influenciada por outros fatores como a polimerização e exsudação do líquido liberado

durante a fermentação (Nazaruddin et al., 2006) Na fermentação de cacau, Chagas Junior et al (2020) observou essa perda entre 30% e 60%, de forma semelhante aos estudos de do Carmo Brito et al. (2017).

As mudanças causadas pela fermentação também são observadas no aspecto visual das sementes. A sementes *in natura* apresentam coloração amarelo-creme e sem compartimentação, com o decorrer dos dias mudanças sutis vão acontecendo na coloração das bordas das sementes e, por fim, a cor marrom-avermelhada preenche todo o espaço, indicando boa fermentação (Figura 4) (Souza et al., 2020).

Por sua semelhança química e morfológica com o cacau, e o começo da exploração econômica, de forma alimentícia ou no ramo de cosméticos, e a inexistência de dados sobre o cupuaçu, pode-se considerar como fonte de comparação as pesquisas realizadas com o cacau. Além disso, a fermentação das sementes de cupuaçu é um processo espontâneo que, mesmo com a utilização de inóculos que objetivam colaborar com a qualidade das amêndoas geradas, é um processo com uma enorme diversidade microbiana atuante, com reações e compostos sendo formados em maior ou menor intensidade. Identificar esses microorganismos, bem como compreender as possíveis mudanças que eles promovem durante esta etapa, afim de viabilizar medidas que assegurem uma alta qualidade e uniformidade do produto final.

#### **4 COMPOSTOS VOLÁTEIS FORMADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO**

Inúmeros compostos voláteis são formados durante a fermentação por meio de reações microbianas e enzimáticas e contribuem para a formação do perfil de aroma e sabor do produto final (Aprotosoie et al., 2016). Aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos orgânicos, ésteres, pirazinas, hidrocarbonetos são alguns dos compostos heterocíclicos presentes nas sementes fermentadas, e as quantidades e variedades podem ser afetadas pelo ambiente de fermentação (meio externo e interno), bem como pela variedade da espécie, composição do solo e condições climáticas (De Vuyst & Weckx, 2016).

Para o cacau, as pirazinas são consideradas o grupo mais importante de odorantes responsáveis pelo aroma de chocolate e são indicadores da qualidade do processo de fermentação, especialmente para a tetrametilpirazina que atinge valores de 5g/mg de cacau ao final da fermentação (Rottiers et al., 2019).

Os ésteres, compostos orgânicos derivados dos ácidos carboxílicos, também apresentam função significativa na formação de aroma e sabor dos alimentos. Em amêndoas de cacau fermentado, o fenil acetato (29,86 mg/kg) e o acetato de octila (12,74 mg/kg) foram os ésteres predominantes de acordo com estudo recente de Godociková et al. (2020). Com relação ao cupuaçu, o acetato de etila, é encontrado normalmente na polpa (Quijano & Pino, 2007) e foi confirmado nas primeiras 48 hs do processo fermentativo do cupuaçu conforme Ramos et al. (2016), bem como o acetato de 3- metilbutila, éster de baixo peso molecular, que confere notas frutadas, chocolate e malte (Rodriguez-Campos et al., 2012).

Os aldeídos são encontrados com bastante frequência nos alimentos fermentados e apresentam características aromáticas de acordo com o tamanho da cadeia carbônica. Aldeídos com 3 a 5 carbonos, como o propanal, butanal e pentanal, apresentam notas maltadas/herbáceas.

O benzaldeído e benzenoacetaldeído estão presentes no início da fermentação de cupuaçu se mantendo elevados até o final do processo (Ramos et al., 2016). Por meio da degradação de Strecker, etapa intermediária da reação de Maillard, o 3-metilbutanal

(0,008 mg/kg<sup>-1</sup>) foi quantificado fermentação de sementes de cacau (Frauendorfer & Schieberle, 2008). Este composto é proveniente do aminoácido leucina, com notas marcantes de malte e chocolate (Schwab et al., 2008; Frauendorfer & Schieberle, 2006).

O grupo hidroxila dos álcoois é responsável e determinante nas propriedades exercidas por esses compostos. Os álcoois são amplamente distribuídos na natureza, abundante em aromas relacionados à alta aceitação de alimentos (Parker, 2015).

Na polpa de cacau é encontrado o 2-metil-3-buten-2-ol (Kadow et al., 2013), enquanto o 3-metil-2-buten-1-ol está presente na polpa de cupuaçu (Quijano & Pino, 2007). Os álcoois 2-pentanol e 2-heptanol foram identificados nas últimas horas de fermentação de cupuaçu (Ramos et al., 2016), assim há a possibilidade de estender o tempo de fermentação com o intuito de otimizar a formação de outros compostos interessantes para o sabor do produto final (Strohalm et al., 2007).

Acredita-se que a polpa exerça um papel na formação de compostos de sabor devido a presença de algumas moléculas, como o linalol, 3-metil-2-buten-1-ol, 3-metilbutanol e etanol (Quijano & Pino, 2007). Na fermentação de cupuaçu com 15% de polpa foi observado um ligeiro aumento do 3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol em comparação com o experimento sem a polpa (Ramos et al., 2016). Isso pode ser explicado, devido ao linalol ser um composto naturalmente presente na polpa de cupuaçu e com elevado impacto no aroma característico do fruto (Quijano & Pino, 2007).

As cetonas são compostos orgânicos pertencentes ao grupo das funções oxigenadas, formadas através de oxidação e descarboxilação de ácidos graxos e bem conhecidas como odorantes de alimentos devido ao seu aroma semelhante a frutos secos (Guichard, 2016).

O composto 3-hidroxi-2-butanona, da classe das acetóinas, é encontrado em quantidades significativas no momento em que a temperatura da massa fermentativa está mais elevada (Ramos et al., 2016). Rodriguez-Campos et al. (2012) explicou que a produção deste composto também é elevada durante a secagem, pois é resultante da ação de microrganismos sobre o ácido cítrico.

Diversos ácidos monocarboxílicos, como o ácido butanoico, o ácido 3-metilbutanoico, o ácido 2-metilpropanóico, são originados pela ação coordenada de bactérias acéticas do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter* durante a fermentação e são de suma importância pelo aroma intenso, principalmente de chocolate (Schwab et al., 2008; Rodriguez-Campos et al., 2012). Este último foi encontrado no último dia de fermentação das sementes de cupuaçu sem a polpa e no terceiro dia de fermentação das sementes com 15% da polpa, atingindo um pico próximo das 90 horas do processo (Ramos et al., 2016).

## **5 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO**

### **5.1 Leveduras**

As classes de microrganismos envolvidos na fermentação de cacau já são bem elucidadas por meio de várias técnicas moleculares e convencionais (Illegghems et al., 2012; Romero-Cortes et al., 2012; Meersman et al., 2013), comprovando o domínio de bactérias e leveduras com atuação específica sobre substratos dos frutos para formação de precursores de aroma e sabor.

Leveduras são seres eucariontes pertencentes ao grupo de microfungos do Reino Fungi, e apresentam um crescimento vegetativo essencialmente unicelular (Walker & White, 2005). *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie que tem sido mais recorrente no curso inicial da fermentação de cacau e cupuaçu, seguida de outras espécies, tais como, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliemondii*, *Candida krusei* e *Pichia*



*kudriavzevii*, pois possuem boa tolerância ao calor e a presença de ácidos, além de excelente atividade pectinolítica (Hamdouche et al. 2015; Vuyst & Weckx, 2016; Ramos et al., 2020). Essas espécies também foram consideradas as maiores produtoras de compostos voláteis na fermentação de cacau (Schwan e Wheals, 2004; Chagas Júnior et al., 2021).

A diversidade das espécies de leveduras é muito maior do que a das espécies bacterianas, dessa forma elas possuem efeitos mais significativos na eficiência da fermentação e na qualidade final da amêndoa de cacau e cupuaçu (Meersman et al., 2013; Chagas Junior et al., 2020).

A metabolismo da população de leveduras no ambiente fermentativo é responsável pelo desenvolvimento de diversas moléculas sensoriais no cacau (Bastos et al., 2019, Koné et al., 2016) e na literatura existem diversos trabalhos demonstrando o uso de cultura *starter*, como *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *Torulaspota delbrueckii*, que fomentam a formação desses compostos que conferem aromas frutados, florais, herbáceos e doces ao longo da fermentação (Batista et al., 2016; Visintin et al., 2017)

Recentemente, Chagas Júnior et al. (2021), ao fermentar cacau na Amazônia, documentaram a formação a formação de compostos aromáticos, como isoamil benzoato, benzaldeído e tetrametilpirazina, utilizando culturas de *S. cerevisiae* e *P. kudrivzevii*. Este estudo foi capaz de relatar a importância da presença de leveduras no ambiente fermentativo.

O uso de inóculo misto de *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbrueckii* foram responsáveis pela formação de quantidades significativas de álcoois e ésteres (Visintin et al., 2017) e os mesmos resultados significativos foram relatados ao utilizar

inóculo misto de *S. cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter pasteurianus* também na fermentação de cacau por Moreira et al. (2018).

Estas pesquisas comprovam os benefícios e a relevância da presença de culturas de leveduras para a obtenção de sementes de cacau de qualidade que irá refletir nas características sensorial dos produtos alimentícios, como aromas frutados, baixos níveis de acidez e manutenção dos níveis de compostos antioxidantes. Além disso, esses microorganismos ainda possuem a capacidade de diminuir o tempo de fermentação que, ao aplicado em escala industrial, pode contribuir para maior produtividade e redução de custos (Chagas Júnior et al., 2020; Sandhya et al., 2016; Ooi et al., 2020).

## **5.2 Bactérias lácticas**

As bactérias do ácido láctico também estão presentes no ambiente fermentativo e são responsáveis por formar ácido láctico por meio do ácido cítrico e dos açúcares presentes na polpa, que, em excesso, o ácido láctico pode conferir uma acidez indesejável ao produto final (Afoakwa, 2011; Schwan & Wheals, 2004). No entanto este grupo de microorganismos é muito importante pois também são produtoras de compostos de sabor (Lefeber et al., 2011).

Após a atuação das leveduras, as bactérias lácticas tornam-se dominantes e estudos demonstram que a presença destas permitem a produção de sementes bem fermentadas (Mai et al., 2014). O gênero *Weissella* é encontrado no início do processo fermentativo de cacau e diminui ao longo dos dias devido o surgimento de condições adversas, pois este gênero não é capaz de suportar altas temperaturas e concentrações de etanol (Pereira et al., 2012).

As bactérias do gênero *Weissella* também foram encontradas em abundância no início da fermentação de sementes de cupuaçu com diferentes porcentagens da polpa

mucilaginosa e, assim como acontece com o cacau, sofreram diminuição após as 48 horas (Ramos et al., 2020).

As espécies do gênero *Lactobacillus* também estão presentes na fermentação de cupuaçu, atingindo número máximos em 36 horas de fermentação, e apresentaram um pequeno declínio na fase final do processo (Ramos et al., 2020). As espécies do gênero *Lactobacillus*, tais como, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* são relatadas com bastante frequência e possuem função de metabolizar os açúcares e ácido cítrico para produção de ácido láctico, ácido acético e etanol (Meersman et al., 2013).

Diversos estudos afirmam que esse gênero é dominante no ambiente fermentativo de cacau, pois é bastante tolerante à presença de ácidos, temperaturas elevadas e eficiente capacidade de metabolização do ácido cítrico presente nos resquícios da polpa mucilaginosa do fruto (Camu et al, 2007; Papalexandratou et al., 2011; Meersman et al., 2013).

Além disso, as bactérias lácticas *L. plantarum* 89 e *L. plantarum* 90 isoladas de sementes de cupuaçu fermentadas e aplicadas em estudos *in vivo* e *in vitro* exibiram propriedades probióticas, como resistência ao ambiente gastrointestinal, resposta anti-inflamatória e maior sobrevivência após contágio com patógenos, mostrando que estas cepas bacterianas apresentam capacidade de aplicação em matriz alimentar (Ornellas et al., 2017).

Outra atividade associada ao metabolismo das bactérias do ácido láctico, especificamente as *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum*, foi o método metabólico da produção de fenilacetaldéido a partir da aplicação de enzimas aromáticas que podem converter aminoácidos, como a tirosina e o triptofano na fase final de

transaminação (Agyirifo et al., 2019). Ambas espécies são amplamente encontradas na fermentação de sementes de cacau amazônico (Serra et al., 2019).

### 5.3 Bactérias acéticas

O revolvimento da massa a partir das 48 horas é importante para a entrada de ar e homogeneização da temperatura, essas condições favorecem o crescimento e estabilidade das bactérias do ácido acético que também são fundamentais na formação de compostos de sabor. Dessa forma, acredita-se que a aplicação do revolvimento diária na massa fermentativa também está consideravelmente ligada à produção de compostos de sabor (Fowler, 2009; Hamdouche et al., 2019).

Com relação ao grupo de bactérias do ácido acético, o gênero *Gluconobacter* foi abundante nos primeiros dias de fermentação de cupuaçu, diferentemente do gênero *Acetobacter* que apresentou quantidades significativas nas últimas horas do processo (Ramos et al., 2020).

Pesquisas já realizadas acerca da fermentação do cacau, apontaram que as bactérias acéticas do gênero *Acetobacter*, são as responsáveis pela oxidação do etanol em ácido acético, estas bactérias ocorrem com maior frequência em relação as do gênero *Gluconobacter*, isso pode ser explicado pela preferência e disponibilidade no meio de substratos, como etanol e açúcar (Schwan & Wheals, 2004; De Vuyst et al., 2008).

Em fermentações de cacau realizadas na África, as espécies *Acetobacter ghanensis* e *Aetobacter senegalensis* são as mais comumentes encontradas no início do processo e no decorrer dos dias são sucedidas pelas *Acetobacter pasteurianus*, ilustrando a diversidade microbiana limitada presente na fermentação do cacau (Camu et al., 2007).

As diferentes fontes de contaminação espontânea presentes no ambiente de fermentação também resultam na presença de enterobactérias, como *Escherichia* e *Shigella* (Ramos et al., 2020). No entanto, os mesmos autores não identificaram outras espécies de enterobactérias como *Tatumella* e *Pantoea*, que costumam estar presentes na fase inicial da fermentação do cacau, mesmo em baixas concentrações (Papalexandratou et al., 2013), talvez pela influência da composição da polpa do cupuaçu.

#### **5.4 Fungos filamentosos**

Como citado anteriormente, muitos agentes estão envolvidos no desenvolvimento dos atributos sensoriais das amêndoas, os quais podem ser abióticos e/ou bióticos (Camu et al., 2008). Dentre estes, destaca-se a presença de microrganismos durante a fermentação, como as leveduras, bactérias e os fungos filamentosos (Schwan, 1998).

Majoritariamente, a presença de fungos filamentosos é relacionada à perda da qualidade das sementes, pois estes fungos produzem toxinas que podem causar a degradação do sabor e/ou podem ser maléficas a saúde humana (Mounjouenpou et al., 2008). No entanto, essas características estão atreladas à espécie presente no meio.

São microorganismos que possuem capacidade de absorver uma grande variedade de substratos para produzir enzimas (Chan et al., 2018), algumas mais tecnologicamente relevantes para a indústria de processamento de alimentos, a citar a indústria cervejeira, como a amilase, celulase, xilase e as pectinases, uma vez que possuem a função de hidrolisar polissacarídeos do meio em açúcares simples (Reddy & Sreeramulu 2012).

Os fungos filamentosos podem contribuir na fermentação das sementes de cacau, e Ardhana & Fleet (2003) mostraram que cepas desses microrganismos foram detectadas e associadas à reação enzimática de poligalacturonase, um grupo de enzimas que decompõem a pectina, através da hidrólise das ligações glicosídicas. Dessa maneira,

acredita-se que esses fungos podem contribuir com as transformações bioquímicas da polpa e, conseqüentemente, das sementes.

Os fungos fazem parte do ecossistema aerobiológico e apresentam-se em grandes quantidades, devido a sua grande facilidade em colonizar diferentes substratos e crescer em condições ambientais extremas. Entre os vários táxons existentes, destaca-se *Cladosporium* spp, que é considerado um dos mais universais, heterogêneos, de maior concentração na atmosfera, particularmente em regiões temperadas (Zoppas et al., 2011) e mais comumente isolados do ambiente em quase todo lugar do mundo, a partir de praticamente qualquer fonte ambiental e localização geográfica (Bensch et al., 2012).

#### ***5.4.1 Cladosporium cladosporioides***

O gênero *Cladosporium* pertence à família Mycosphaerellaceae, é considerado um dos gêneros maiores e mais heterogêneos, apresenta, aproximadamente, 500 espécies que podem ser facilmente encontradas em diversos ambientes internos e externos como, matéria orgânica estragada, superfícies de vidro, canos de água, alimentos, solo, palha, plantas lenhosas, caules de plantas herbáceas, entre outros, caracterizando-se como um contaminante importante para os alimentos (De Hoog et al., 2000; San-Martin et al., 2005; Al Matar & Makky, 2016).

Dentre as espécies mais isoladas comercialmente, encontram-se o *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum* e *Cladosporium elatum* e são frequentemente isoladas do ar, solo, alimentos e materiais têxteis (El-Morsy, 2000; Al Matar & Makky, 2016). Além disso, algumas espécies possuem importância médica e são capazes de produzir antibióticos que funcionam como inibitórios para diversas bactérias, a citar *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (Gallo et al. 2004).

A espécie *Cladosporium cladosporioides* tem melhores condições de crescimento em meio de agar de batata-dextrose (PDA) gerando conídios unicelulares (esporos). Este microrganismo é reconhecido pela formação de colônias de 3 cm de diâmetro com superfície plana e aveludada, apresentando coloração verde-oliva ou marrom devido a presença do pigmento melânico (hidroxinaftalenomelanina) em sua parede celular (Pereira et al., 2005; Miladinovic´-Tasic´ 2007).

O fungo *Cladosporium cladosporioides* é capaz de secretar diversas enzimas e por isso possui interesse biotecnológico para uso como cultura *starter*. Bastos et al. (2013) relataram que este fungo é capaz de excretar a pectinase, uma importante enzima presente em material vegetal, fungos e bactérias e com aplicação industrial no processamento de alimentos. As pectinases são responsáveis pela degradação da pectina por meio da desmetoxilação da cadeia de homogalacturonana da pectina, liberando metanol e pectina ácida.

Estes microorganismos que tem a capacidade pectinolítica também são interessantes para o uso na fermentação de grãos de café, auxiliando na remoção da camada mucilaginosa que envolve os grãos, reduzindo consideravelmente o tempo de fermentação (Avallone et al., 2002; Pasha et al., 2013) e a sua presença tem sido relacionada com a obtenção de um café de qualidade (Pasin et al., 2011; Silva et al., 2008). Com relação ao uso na fermentação das sementes de cacau, a ação de enzimas pectinolíticas também colaboram para o desenvolvimento do sabor final do chocolate (Schwan & Wheals, 2004; Outtara et al., 2010).

Além disso, as enzimas de origem fúngica que degradam pectina são grandes facilitadores do processo fermentativo das uvas para a obtenção do vinho de qualidade, com realce de cor e sabor (Sieiro et al. 2012). Diante dos expostos, acredita-se que o uso do inóculo de *Cladosporium cladosporioides* com capacidade de secretar enzimas

pectinolítica é de grande importância para aplicação no processo fermentativo de cupuaçu.

Araujo et al. (2019) ao estudar a diversidade de fungos filamentosos presentes na fermentação natural das sementes de cacau, encontrou que a espécie *C. cladosporioides* apresentou o melhor índice enzimático para a atividade das pectinases (2,1) e, também, de celulases (4) e xilases (2,5). Sendo assim, a presença desse fungo pode contribuir de forma benéfica na fermentação, principalmente no que diz respeito a elevada presença de celulase, uma vez que a polpa de cacau e cupuaçu são ricas em celulose que precisa ser quebrada em moléculas menores de glicose, desencadeando as reações necessárias para o desenvolvimento da fermentação.

Ji et al. (2014) e Vázquez-Montoya et al. (2019) relataram que o *C. cladosporioides* é uma espécie altamente produtora de celulose que utiliza mecanismos de degradação baseado na secreção de celulases individuais que agem pontualmente sobre a celulose presente no material vegetal.

Araujo et al. (2019) também demonstrou a presença de atividade xilanolítica de *C. cladosporioides*, corroborando a pesquisa de Hong et al. (2011) que documentou que este fungo exige grande potencial para a rápida secreção de xilanasas. A lacase é outra enzima típica do *Cladosporium cladosporioides* que catalisa a oxidação de substratos orgânicos e inorgânicos (Halaburgi et al., 2011),

Estudos realizados em *Cladosporium cladosporioides* documentaram a presença de compostos bioativos, como o ácido p-metilbenzóico, que estimula a produção de 1,5-benzodiazepina, um importante composto ativo com aplicações na indústria farmacêutica e que apresenta benefícios à saúde humana. Do mesmo modo, a calfoestina C foi relatada em *C. cladosporioides*, que funciona como um excelente agente anticâncer pois inibe a



proliferação de metástase e induz a apoptose ao causar estresse nas células cancerígenas por meio de terapia fotodinâmica (Al Mattar & Makky, 2016).

Um grupo de pesquisa da China estuda a alguns anos produtos naturais bioativos provenientes de microorganismos halotolerantes, ou seja, aqueles que são capazes de viver em condições ambientes de alta salinidade, como o *Cladosporium cladosporioides* e relataram que o fungo produz lactonas, compostos derivados de benzeno, cladosporina, cladospólido e novos ácidos graxos que não apresentam atividade citotóxica e podem apresentar potencial atividade antimicrobiana e anticâncer (Zheng et al., 2010; Lu et al., 2009; Peng et al., 2017).

Demais estudos sugerem que o uso do *C. cladosporioides* na forma de extrato pode ser uma possível fonte de compostos antioxidantes e moduladores antiogênicos. Manjunath et al. (2016) observaram que o isolado fúngico apresenta uma alta capacidade antioxidante baseado na eliminação do radical DPPH, além disso o extrato apresentou poder redutor do íon férrico ( $Fe^{+3}$ ) (Gulcin, 2006). Também foi analisado o extrato de acetato de etila de *C. cladosporioides* submetido à atividade angiossupressora e as regiões avasculares tratadas com esse extrato apresentaram uma supressão significativa da angiogênese

Apesar de muito está sendo estudando sobre a capacidade enzimática, antioxidante, citotóxica e farmacológica do fungo filamentoso *C. cladosporioides*, além da sua capacidade de produzir diversos metabólitos como fenóis, quinonas e terpenóides (Miller et al. 2012; Qadri et al. 2013) e estabilidade em altas temperaturas e extensas faixas de pH, presença de compostos bioativos, tornando-se ainda mais interessante para o uso no ambiente fermentativo (Damaso et al. 2012), ainda não existem dados suficientes para correlacionar a presença do fungo com a fermentação de cupuaçu de boa qualidade.

E no que diz respeito ao processamento de sementes de cacau na presença dos fungos, esta espécie tem sido relacionada com um grão de qualidade, uma vez que consomem a mucilagem da polpa, impedindo o desenvolvimento de outros microrganismos patogênicos (Oliveira et al. 2011), mas a sua atividade total capacidade durante a fermentação dessas sementes ainda não é totalmente esclarecida (Copetti et al., 2011).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullahi, G., Muhamad, R., Dzalkhifli, S. U. R., Sinniah, U. R. (2018) Analysis of quality retentions in cocoa beans exposed to solar heat treatment in cardboard solar heater box. *Cogent Food Agriculture*, 4,1483061 <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1483061>
- Afoakwa, E. O., Peterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical. Review Food Science Nutrition*, 48,840– 57.
- Agostini, J. S., Biasi, R. P., Tanssini, K. K., Bocca, M. F. (2021). Physical, chemical and microbiological characterization of cupuassu seed during fermentation. *Scientific electronic archives*, 14 (3), 36-45.
- Agyirifo, D. S., Wamalwa, M., Otwe, P., Galyuon, I., Runo. S., Takrama. J., & Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02170>
- Al Mattar, M., & Makky, E. A. (2016). *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. *Biotech*, 6, 4. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0323-4>
- Álvarez, L., Álvarez, N., García, P., Carlos, J., & Salazar, S., (2017). Effect of fermentation time on phenolic content and antioxidant potential in Cupuassu

(*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) beans. *Agroindustria y Ciencia de los Alimentos/Agroindustry and Food Science*, 66, 473–479.

<https://doi.org/10.15446/acag.v66n4.61821>

Alves R. M, Sebbenn A. M, Artero A. S, Clement C, & Figueira A. (2007). High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Tree Genetic Genomics*, 3, 289–298.

Alves. F.M, Resende. M. D.V., Bandeira. B. S, Pinheiro. T. M., & Farias. D.C. (2010) Avaliação e seleção de progênies de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em Pará. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (10), 204- 212.

Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products An Overview: Flavor chemistry of cocoa. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 73–91.

Araujo, E. C. G., Silva, T. C., Chagas, K. P. T. das, Cunha Neto, E. M. da, Bezerra, J. C. F., Borges, C. H. A. ., Martins, V. C., Sanquetta, C. R., & Lima, T. V. de. (2020). Soil macrofauna in Brazil: a bibliometric review and state of the art. *Scientific Electronic Archives*, 14(3), 14–29. Recuperado de <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1296>

Araújo, J. A., Ferreira, N. R., Silva, S. H. M., Oliveira, G., Monteiro, R. C., Alves, Y. F. M. & Lopes, A. S. (2019). Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. *Annals of Microbiology*, 69, 975-987. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01488-1>

Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 87-99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)

Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M, Chaparro, C., Legavre, T., & Maximova, S. N. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet*, 43:101-108.

- Argout, X., Martin, G., Droc, G., Fouet, O., Labadie, K., Rivals E, Aury J. M., & Lanaud C. (2017). The cacao Criollo genome v2.0: an improved version of the genome for genetic and functional genomic studies. *BMC Genomics*, 18,1-10. 15.
- Ayad, E., Verheul, A., Engels, W., Wouters, J., & Smit, G. (2001). Enhanced flavour formation by combination of selected Lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology*, 90(1), 59–67. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01219>.
- Arroyo-Lopez, F., Medina, E., Ruiz-Bellido, M., Romero-Gil, V., Montes-Borrego, M., Landa, B. (2016). Enhancement of the knowledge on fungal communities in directly brined alorena de Malaga green olive fermentations by metabarcoding analysis. *PLoS One*, 11 (9), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163135>.
- Baffi, M. A., Dos Santos Bezerra, C., Arévalo-Villena, M., Isabel Briones-Pérez, A., Gomes, E., & Da Silva, R. (2011). Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Annals of Microbiology*, 61(1), 75–78. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0099-z>.
- Bastos, S. C., Pimenta, C. J., Dias, D. R., Chalfoun, S. M., Angélico, C. L., & Tavares, L. S. (2013). Pectinases from a new strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de vries isolated from coffee bean. *World Journal of Agricultural Sciences*,9(2), 167-172. <https://doi: 10.5829/idosi.wjas.2013.9.2.1713>
- Bastos, V.S.; Uekane, T.M.; Bello, N.A.; de Rezende, C.M.; Flosi Paschoalin, V.M.; Del Aguila, E.M. (2019). Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. *Journal Food Science Technology*, 56, 2874–2887.
- Batista, N.N.; Ramos, C.L.; Dias, D.R.; Pinheiro, A.C.M.; & Schwan, R.F. (2016).The impact of yeast *starter* cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal Food Science Technology*, 53, 1101–1110.

- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72(1), 401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Biehl, B., & Ziegler, G. (2003). Cocoa Chemistry of processing in encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. *Elsevier Science*, 3(2), 1436–1448.
- Borrone, J. W., Meerow, A. W., Kuhn, D. N., Whitlock, B. A., Schnell, R. (2007). The potential of the WRKY gene family for phylogenetic reconstruction: an example from the Malvaceae. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 44:1141–1154.
- Calzavara, B. B. G., Miller, C. H., Kahnage, O. N. C. (1984). Fruticultura tropical: O cupuacuzeiro. Belém: EMBRAPA CPATU, 99p.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (6), 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>.
- Camu, N., González, Á., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., ... & De Vuyst, L. (2008). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 86–98. <http://doi.org/10.1128/AEM.01512-07>
- Carvalho, A. V., Pezoa-García, N. H., Amaya-Farfán, J., & Wada, J. K. A. (2009). Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). *Brazilian Journal of Food Technology*, 12(1), 01-08.
- Clement, C. R.; Cristo-Araújo, M.; Eeckenbrugge, G. C.; Pereira, A. A.; Rodrigues, D. P. (2010). Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. *Diversity*, 2, 72-106. <https://doi:10.3390/d2010072>
- Chagas Junior, G. C. A., Ferreira, N. R., Gloria, M. B. A., Martins, L. H. da S. & Lopes,

- A. S. (2020). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*, 338, 127834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127834>
- Chagas Junior, G.C. A., Ferreira, N. R., Andrade, E. H. D. A., Nascimento, L. D. D., Siqueira, F. C., & Lopes, A. S. (2021). Profile of Volatile Compounds of On-Farm Fermented and Dried Cocoa Beans Inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* KY794742 and *Pichia kudriavzevii* KY794725. *Molecules*, 26, 344. <https://doi.org/10.3390/molecules26020344>
- Chan, L.G., Cohen, J.L., & Bell, J. M. (2018) Conversion of agricultural streams and food-processing by-products to value-added compounds using filamentous fungi. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 503– 523. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012626>
- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11, 153–177. <http://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J. L., Frisvad, J. C., & Taniwaki, M.H. (2011a) Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28, 1499–1504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.005>
- Damaso, M. C. T.; Terzi, S. C.; Farias, A. X.; Oliveira, A. C. P.; Fraga, M. E.; & Couri, S. (2012). Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4):513–520. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400005>
- De Hoog, G. S., Queiroz-Telles, F., Haase, G., Fernandez-Zeppenfeldt, G., Attili Angelis, D., Gerrits Van Den Ende, A. H., Matos, T., PeltrocheLlacsahuanga, H., Pizzirani-Kleiner, A. A., Rainer, J., Richard Yegres, N., Vicente, V., & Yegres F. (2000). Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medicinal Mycology*, 38, 243–250
- De Oliveira, T.B. and Genovese, M.I. (2013) Chemical Composition of Cupuaçu

- (Theobroma grandiflorum) and Cocoa (Theobroma cacao) Liquors and Their Effects on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Food Research International*, 51, 929-935. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.019>
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., & Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG)<sub>5</sub>-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 79–90. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.030>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to *starter* culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 5-17. <https://doi:10.1111/jam.13045>
- Do Carmo Brito, B. de N., Chisté, C. R., da Silva Pena, R., Abreu Gloria, M. B., & Santos Lopes, A. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>.
- Efraim, P., Alvez, A. B., & Jardim, D. C. P. (2011). Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14, 181-201. <http://dx.doi:10.4260/BJFT2011140300023>
- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., & Ferrocino, I. (2019). The challenges and perspectives of the selection of *starter* cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>
- Fouet O, Allegre M, Argout X, Jeanneau M, Lemainque A, Pavék S, Boland A, Risterucci AM, Looor G, Tahiri M. (2011). Structural characterization and mapping of functional EST-SSR markers in Theobroma cacao. *Tree Genet Genomes*, 7, 799-817.

- Frauendorfer, F., & Schieberle, P. (2006). Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5521–5529.
- Frauendorfer, F., & Schieberle, P. (2008). Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10244–10251 <http://doi.org/10.1021/jf802098f>
- Gallo, M. L., Seldes, A. M., & Cabrera, G. M. (2004). Antibiotic long-chain and a, b-unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 545–551
- Godociková, L., Ivanisová, E., Noguera-Artiaga, L., Carbonell-Barrachina, Á. A., Kowalczewski, P. L., Kacaniova, M. (2020). Antioxidant Activities and Volatile Flavor Components of Selected Single-Origin and Blend Chocolates. *Molecules*, 25, 3648. <http://doi:10.3390/molecules25163648>
- Guehi, S., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D., Zahouli, G. (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science Technology*, 2 (3), 163–171.
- Gulcin I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Science*, 78, 803–811.
- Halaburgi, V. M., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T. P., & Karegoudar, T. B. (2011). Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry*, 46, 1146-1152. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.002>
- Hamdouche, Y., Guechi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., & Meile, J. (2014). Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying:



- Towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117–122.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.031>
- Hamdouche, Y., Christophe, J., Lebrun, M., Guehi, T., Boulanger, R., Teysier, C., Montet, D. (2019). Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. *Food Research International*, 119, 477–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.001>
- He, Q., Lv, Y., Zhou, L., & Shi, B. (2010). Simultaneous determination of caffeine and catechins in tea extracts by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(4), 491–498.  
<https://doi.org/10.1080/10826070903574469>.
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P. A., Ramírez-Guillermo, M. A., Guerra Ramírez, D., & Caballero Pérez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 690–695. <https://doi.org/10.1002/fsn3.333>.
- Hong, J.Y., Kim, Y. H., Jung, M. H., Jo, C. W., & Choi, J. E. (2011) Characterization of xylanase of *Cladosporium cladosporioides* H1 isolated from Janggyeong Panjeon in Haeinsa Temple. *Mycobiolog*, 306–309.  
<https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.4.306>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Brazilian Institute of Geography and Statistics] (IBGE) (2017). Agricultural Census. Number of Agricultural Establishments, Quantity Produced and Area Harvested, by Products from Temporary Crops.  
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censoagropecuario.html?=&t=resultados>
- Illegghems, K., Vuyst, L., Papalexandratou, Z., & Weckx, S. (2012). Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *Plos One*, 7(5).
- Illegghems, K., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2014). Metagenomic analysis of a spontaneous

- cocoa bean fermentation process sheds light on the metabolic capacity and functional properties of the bacterial communities of this ecosystem. *Food Microbiology*, 50, 54–63.
- Ji, L., Yang, J., Fan, H., Yang, Y., Li, B., Yu, X., Zhu, N., & Yuan H. (2014). Synergy of crude enzyme cocktail from cold-adapted *Cladosporium cladosporioides* Ch2-2 with commercial xylanase achieving high sugars yield at low cost. *Biotechnol Biofuels*, 7, 130.
- Kadow, D., Bohlmann, J., Phillips, W., & Lieberei, R. (2013). Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86, 90–98. <http://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.013>.
- Koné, M.K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A.F., Brou, K., Boulanger, R., & Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>
- Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — a review. *Food Research International*, 82, 44-52.
- Kumar, S., Krishnani, K. K., Brushan, B., & Brahmane, M. P. (2015). Metagenomics: retrospect and prospects in high throughput age. *Biotechnology Research International*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2015/121735>
- Lannes, S. C. S., & Gioielli, L. A. (2004). Rheological properties of cupuassu and cocoa fats. *Grasas y aceites*, 55(2), 115-121.
- Lannes, S. C. S., Medeiros, M. L., & Amaral, R. L. (2006). Bolo de “chocolate” produzido com pó de cupuaçu e kefir. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 3.
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., & De Vuyst, L. (2011). Interesting

- starter* culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (18), 6694–6698.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00594-11>
- Lim, T. (2012). *Theobroma grandiflorum*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants (3<sup>o</sup>)*, Springer Science Business Media (pp. 252–258). <http://doi.org/10.1007/978-94-007-2534-8>
- Lorenzi, H. (2002). *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas nativas do Brasil*. São Paulo: Nova Odessa.
- Lu, Z., Wang, Y., Miao, C., Liu, P., Hong, K., & Zhu, W. (2009). *Journal of Natural Products*, 72, 1761.
- Manjunath, M., Hulikere, Chandrashekhar, G. Joshi, D., Ananda, Jagadeesh Poyya & T. Nivya. (2016). Antiangiogenic, wound healing and antioxidant activity of *Cladosporium cladosporioides* (Endophytic Fungus) isolated from seaweed (*Sargassum wightii*), *Mycology*, 7(4), 203-211,  
<https://doi:10.1080/21501203.2016.1263688>
- Mai, Ho, Tran. (2014). Fermentation of cocoa with addition of lactic acid bacteria. In *International Science, Social Sciences, Engineering and Energy Conference*. Udon Thani, Thailand, 1–8.
- Martini, M. H.; Tavares, D. de Q. (2005). Reservas das sementes de sete espécies de *Theobroma*: revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 64(1),10-9.
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittcox, P. J., Saels, V., Struyf, N., & Verstrepen, K. J. (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *Plos One*, 8(12). <https://doi:10.1371 / journal.pone.0081559>
- Miller, K. I., Qing, C., Sze, D. M., & Neilan, B. A. (2012). Investigation of the biosynthetic potential of endophytes in traditional Chinese anticancer herbs. *Plos*

*ONE*, 7, 35953.

- Moreira, I. M. V., Vilela, L. F., Miguel, M. G. C. P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2017). Impact of a microbial cocktail used as a *starter* culture on cocoa fermentation and chocolate flavor. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5), 766. <https://doi.org/10.3390/molecules22050766>.
- Moreira, I.M.V.; Vilela, L.F.; Santos, C.; Lima, N.; Schwan, R.F. Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. *Food Res. Int.* 2018, 109, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.012>
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P. R., & Guiraud, J. (2008). Filamentous fungi producing ochratoxina during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 234-241. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.017>
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop>.
- Nesme, J., Achouak, W., Agathos, S. N., Bailey, M., Baldrian, P., Brunel, D., Frostegard, A., Heulin, T., Jansson, J. K., Jurkevitch, E., Kruus, K. L., Kowalchuk, G. A., Lagares, A., Lappin-Scott, H. M., Lemaceau, P., Le Paslier, D., Mandic-Mulec, I., Murrell, J. C., Myrold, D. D., Nalin, ... & Simonet, P. (2016). Back to the Future of Soil Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00073>
- Nielsen, D.S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K. and Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22, 271–284.
- Oliveira, T. O.; Pimenta, C. J.; Cardoso, P. G.; Souza, S. M. C.; Fabrício, L. F. F.; Leal,

- R. S. (2011) Production of pectin lyase by isolates *Cladosporium cladosporioides* using submerged fermentation and grape skin as substrate. *Higiene Alimentar*, 25:217–218.
- Ooi, T.S., Ting, A.S.Y., & Siow, L.F. (2020). Influence of selected native yeast *starter* cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *LWT Food Science Technology*, 122, 108977. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108977>
- Ornellas, R., Santos, T., Arcucio, L., Sandes, S., Oliveira, M., Dias, C., Carvalho, S., Uetabanaro, A., Vinderol, G., & Nicoli, J. R. (2017). Selection of lactic acid bacteria with probiotic potential isolated from the fermentation process of “Cupuaçu” (*Theobroma grandiflorum*). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 973, 1–16. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2017\\_5](https://doi.org/10.1007/5584_2017_5)
- Padalia, R., Verma, R., Chauhan, A., Goswami, P., Singh, V., Verma, S., Darokar, M. Kurmi, A. Singh, N., Saikia, D., Chanotyia, C. (2017). Essential oil composition na antimicrobial activity of methyl cinnamate-linalool chemovariant of *Ocimum basilicum* L. from India. *Records of Natural Products*, 11 (2), 193–204.
- Pammenter, N. W., Berjak, P. (2000). Evolutionary and ecological of recalcitrant seed biology. *Seed Science Research*, 10: 301-6.
- Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G. and De Vuyst, L. (2011). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28, 964–973.
- Pará. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e da Pesca do estado do Pará – SEDAP. (2020). Área plantada, área colhida, quantidade produzida e rendimento médio do cupuaçu. Governo do Estado do Pará, Pará.
- Pasin, L. A. A. P., Abreu, M. S., & Souza, I. P. (2011). Influence of the fungi population on the physicochemical and chemical composition on coffee (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 681-687.

<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300020>

- Peng, X., Wang, Y., Zhu, G., & Zhu W. (2018). Fatty acid derivatives from the halotolerant fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 56, 18–24. <https://doi.org/10.1002/mrc.4659>
- Pereira, R. T. G., Pfenning, L. H., & Castro, H. A. (2005). Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, 29(6), 1112-1116. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542005000600002>
- Pereira, G., Miguel, M., Ramos, C., Schwan, R. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined *starter* culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (15), 5395–5405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>.
- Pereira, M., Alvarez, J., Neto, D., Soccol, V., Tanobe, V., Rogez, H., Goes-Neto, A., Soccol, C. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *Food Science Technology*, 84, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017>.
- Pereira, A.L.F.; Abreu, V.K.G.; Rodrigues, S. Cupuassu—*Theobroma grandiflorum*. In *Exotic Fruits*; Rodrigues, S., de Oliveira Silva, E., de Brito, E.S., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 159–162, ISBN 978-0-12-803138-4.
- Pugliese, A. G., Tomas-Barberan, F. A., Truchado, P., Genovese, M. I. (2013). Flavonoides, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) Pulp and Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2720-2728. <https://dx.doi.org/10.1021/jf304349u>
- Qadri, M., Johri, S., Shah, B. A., Khajuria, A., Sidiq, T., Lattoo, S. K., Abdin, M. Z., & Riyaz-Ul-Hassan S. (2013). Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus*, 2, 1–

14.

Quast, L. B., Luccas, V., Roth, T. C. W., & Kieckbusch, T. G. (2007). Influência da incorporação de gordura de cupuaçu na temperagem da manteiga de Cacau. *Brazilian Journal Food Technology*, 10(2), 130-136.

Quijano, C., & Pino, J., (2007). Volatile compounds of copoazu (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. *Food Chemistry*, 104, 1123–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem>.

Ramos, S., Danzl, W., Ziegler, G., & Efraim, P. (2016). Formation of volatile compounds during cupuassu fermentation: influence of pulp concentration. *Food Res. Int.* 87,161–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.025>.

Ramos, S., Salazar, M., Nascimento, L., Carazzolle, M., Pereira, G., Delforno, T., Nascimento, M., De Aleluia, T., Celeghini, R., & Efraim, P. (2020). Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108465>

Rebouças, A. M., Costa, D. M., Priulli, E., Teles, J., Pires, C. R. F. (2020). Aproveitamento tecnológico das sementes de cupuaçu e de okara na obtenção de cupualte. *Revista Desafios*, 7, 59-64. <https://doi.org/10.20873/uftsupl2020-8614>

Reddy, P. L., & Sreeramulu, A. (2012) Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. *Internacional Journal of Life Sciences Biotechnology Pharma Research*, 1(3), 186–193

Richardson, J. E., Whitlock, B. A., Meerow, A. W & Madriñán, S. (2015). The age of chocolate: a diversification history of *Theobroma* and *Malvaceae*. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 3, 120. <https://doi:10.3389/fevo.2015.00120>

Rodriguez-Campos, J.; Escalona-Buendía, H.B.; Contreras-Ramos, S.M.; Orozco-Avila, I. Jaramillo-Flores, E.; Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132, 277–

288.

- Romero-Cortes, T., Robles-Olvera, V., Rodriguez-Jimenes, G., & Ramírez-Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2), 339–347.
- Rottiers, H.; Tzompa Sosa, D.A.; DeWinne, A.; Ruales, J.; De Clippeleer, J.; De Leersnyder, DeWever, J.; Everaert, H.; Messens, K.; Dewettinck, K. (2019). Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research Technology*, 245, 1917–1937.
- Salgado, J. M., Rodrigues, B. S., Donado-Pestana, C. M., Dias, C. T. dos S., & Morzelle, M. C. (2011). Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) peel as potential source of dietary fiber and phytochemicals in whole-bread preparations. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 384–390. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0254-0>
- San-Martin A, Painemal K, D'az Y, Martinez, C., & Rovirosa J (2005) Metabolites from the marine fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of the Argentine Chemical Society*, 93:247–251
- Sandhya, M.V.S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L.J., Janardhan, P., & Murthy, P.S. (2016). Inoculum of the *starter* consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT Food Science Technology*, 65, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>
- Sato, K. (2001). Crystallization behaviour of fats and lipids a review. *Chemical Engineer Science*, 56, 2255–2265.
- Serra, J. L., Moura, F. G., Pereira, G. V. M., Soccol, C. R., Rogez, H., & Darnet, S. (2019). Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. *LWT Food Science Technology*, 106, 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.038>



- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 712–732. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x>
- Schwan, R. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1477–1483.
- Schwan, R., & Wheals, A. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi:10.1080/10408690490464104>
- Silva, S., and Figueira, A. (2005). Phylogenetic analysis of Theobroma (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Syst. Evol.* 250, 93–104. <https://doi:10.1007/s00606-004-0223-2>
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25, 951-957. <https://doi:10.1016/j.fm.2008.07.003>
- Silva, A. do S. S., & Farias, L. F. (2018). Elaboração da farinha à base da amêndoa do cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum. *Revista Arquivos Científicos*, 1(1), 36-42. <https://doi.org/10.5935/2595-4407/rac.immes.v1n1p36-42>
- Simon, C., Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153–1161. <https://doi:10.1128/AEM.02345-10>
- Souza, A. G. C.; Resende, M. D. V.; Silva, S. E. L.; Sousa, N. R. (2002). The cupuaçu genetic improvement program at Embrapa Amazônia Ocidental. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2(3), 471-478.
- Souza, A. G. C. (2007). Boas Práticas Agrícolas da Cultura do Cupuaçuzeiro. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 56p
- Souza, A. G. C., Souza, M. G., Pamplona, A. M. S. R., & Wolff, A. C. S. (2011). Boas práticas na colheita e pós-colheita do cupuaçu. Manaus, AM: Embrapa

Amazônia Ocidental, Circular técnico.

- Souza, J. M. L., Rocha, J. M., Cartaxo, C. B. C., Vasconcelos, V. S. A., Nascimento, M. M., Yomura, R. T. B., Kaefer, S. (2020). Monitoring and Optimization of Cupuaçu Seed Fermentation, Drying and Storage Processes. *Microorganisms*, 8, 1314. [Doi:10.3390/microorganisms8091314](https://doi.org/10.3390/microorganisms8091314).
- Strohalm, H., Dregus, M., Wahl, A., & Engel, K. (2007). Enantioselective analysis of secondary alcohols and their esters in purple and yellow passion fruits. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 55, 10339–10344.
- Sukha, D. A., Bharath, S. M., Ali, N. A., & Umaharan P. (2014). An assessment of the quality attributes of the Imperial College Selections (ICS) Cacao (*Theobroma cacao* L.) clones. *Acta Horticulturae*, 1047:237- 243.
- Tasic, S, Miladinovic´-Tasic, N. (2007). *Cladosporium* spp.—cause of opportunistic mycoses. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 24:15–19.
- Toxopeus, H. (2001). Botany, Types and Populations. In *Cocoa*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 11–37.
- Vázquez-Montoya, E. L., Castro-Ochoaa, L. D., Maldonado-Mendonza, I. E., Luna-Suárez, S., & Castro-Martínez, C. (2019). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista Argentina de Microbiologia*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.005>
- Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., & Cocolin, L. (2017) Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>
- Vriesmann, L. C., Silveira, J. L. M., & Petkowicz, C. L. (2009). Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. *Carbohydrate Polymers*, 77, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.007>

- Yang, H., Protiva, P., Cui, B., Ma, C., Baggett, S., Hequet, V., Mori, S., Weinstein, B., & Kennelly, E. J. (2003) New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçu”). *Journal of Natural Products* , 66(11), 1501-150. <https://doi:101021/np034002>
- Walker, G. M., & White, N. A. (2005). Introduction to Fungal Physiology. In: Fungi: biology and applications. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 293p.
- Whitlock, B. A., Bayer, C., & Baum, D. A. (2001). Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae (Sterculiaceae or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Systematic Botany*, 26, 420–437. <https://doi:10.1043/0363-6445-26.2.420>
- Zheng, J., Xu, Z., Wang, Y., Hong, K., Liu, P., & Zhu, W. (2010). Cyclic Tripeptides from the Halotolerant fungus *Aspergillus sclerotiorum* PT06-1. *Journal Natural Products*, 73, 1133. <https://doi.org/10.1021/np100198h>
- Zoppas, B. C. A., Valencia-Barrera, R. M., & Fernández-González, D. (2011). Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 34(2), 55-58. <https://doi: 0103-2259/11/34-02/55>

## CAPÍTULO 2

### ARTIGO

# INFLUÊNCIA DO FUNGO *Cladosporium cladosporioides* EM PARÂMETROS DE QUALIDADE E PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS DE CUPUAÇU

(*Theobroma grandiflorum* SCHUM)

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do inóculo fúngico de *Cladosporium cladosporioides* na fermentação das sementes de cupuaçu. Foi realizada a fermentação sem a presença do inóculo (controle) e com a presença da suspensão de esporos, utilizando cochos de madeira recobertos com saco de aniagem e folhas de bananeira, em triplicata. Foram realizadas análises de temperatura, pH, acidez, umidade, cinza, proteínas, lipídeos, fenólicos totais, açúcares redutores, contagem total de leveduras e bactérias acéticas e perfil aromático. Foram observadas variações significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre ambas fermentações nos resultados de temperatura, pH, acidez total e compostos fenólicos totais. Houve diferença significativa na contagem de leveduras entre a fermentação controle (5,21 log/g) e com inóculo (5,45 log/g) apenas no tempo 96 h. A atividade enzimática do fungo filamentososo contribuiu para a manutenção dos teores de compostos fenólicos totais e concentração final de açúcares redutores. A análise de PCA evidenciou a formação dos mesmos grupos para ambas as fermentações.

Palavras-chave: cupuaçu, fermentação, inóculo fúngico, compostos fenólicos.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of the fungal inoculum of *Cladosporium cladosporioides* on the fermentation of cupuassu seeds. Fermentation was carried out without the presence of the inoculum (control) and with the presence of the spore suspension, using wooden troughs covered with burlap sack and banana leaves, in triplicate. Analyzes of temperature, pH, acidity, humidity, ash, proteins, lipids, total phenolics, reducing sugars, total yeast and acetic bacteria count and aromatic profile were carried out. Significant variations ( $p \leq 0.05$ ) were observed between both fermentations in the results of temperature, pH, total acidity and total phenolic compounds. There was a significant difference in yeast counts between control fermentation (5.21 log/g) and inoculum fermentation (5.45 log/g) only at 96 h. The enzymatic activity of the filamentous fungus contributed to the maintenance of total phenolic compounds and final concentration of reducing sugars. The PCA analysis evidenced the formation of the same groups for both fermentations.

Keywords: cupuassu, fermentation, filamentous fungal, phenolic compounds.

## 1 INTRODUÇÃO

O cupuaçu é um fruto nativo da região amazônica, com expressão econômica baseada principalmente na polpa rica em carboidratos, ácidos graxos e micronutrientes (Ramos et al., 2020). No entanto, o interesse nas sementes do fruto está em ascensão em razão da possibilidade de produção de um produto alimentício, sensorialmente análogo ao chocolate.

O chocolate é um produto de alta palatabilidade, apreciação e consumo, obtido a partir das sementes beneficiadas do cacau, que movimenta grande parte da economia mundial. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas (ABICAB), em 2020 o Brasil exportou cerca de 30 mil toneladas de chocolate para 145 países.

A demanda por chocolates de alta qualidade tem crescido exponencialmente e os consumidores estão mais seletivos, buscando produtos inovadores com alto valor sensorial e nutricional agregado. Dessa forma, o cupulate, produto análogo ao chocolate, apresenta-se como um produto interessante, inovador, saudável, além de ser uma alternativa para aplicação das sementes beneficiadas e fomento da cadeia produtiva da região.

Assim como ocorre com o cacau a fermentação das sementes do cupuaçu é feita de forma espontânea, com o objetivo de transformação dos substratos presentes na polpa, como os açúcares e ácido cítrico, em compostos desejáveis para a formação do perfil sensorial do produto, como álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres. O metabolismo microbiano do ambiente fermentativo também possibilita a elevação da temperatura e mudanças de pH importantes para o desenvolvimento satisfatório (Schwan & Wheals, 2004; Vuyst & Weckx, 2016).

Tradicionalmente, sabe-se que cada microrganismo presente no ambiente

fermentativo, tais como leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, desempenham um papel primordial no desenvolvimento de condições favoráveis para o desenvolvimento do processo (Camu et al., 2007). Nesse cenário, as leveduras apresentam maior número de pesquisas sobre seu uso como inóculo em fermentações de cacau e cupuaçu, bem como seu efeito sobre a qualidade final das amêndoas (Ramos et al., 2020; Chagas Junior et al., 2020).

Além das leveduras, existe uma diversidade muito grande de agentes abióticos e bióticos presentes no meio que podem colaborar com a fermentação, e os fungos filamentosos surgem como uma alternativa inovadora (Schwan, 1998; Camu et al., 2008).

Os fungos filamentosos são capazes de tolerar altas temperaturas e mudanças de pH, são possíveis de serem isolados de diversos ambientes e por isso são relevantes para aplicação industrial. A espécie *Cladosporium cladosporioides* possui a vantagem de sintetizar diversas enzimas importantes como a amilase, celulase, pectinase, xilanase e lacase, mas também apresenta capacidade de produzir compostos bioativos com interesse para a medicina e compostos aromáticos para agregar o perfil sensorial de produtos (Araujo et al., 2019; Chan et al., 2018; Miller et al., 2012; Reddy & Sreeramulu, 2012).

Existem inúmeros trabalhos que relatam a ação do fungo *Cladosporium cladosporioides* como inóculo em fermentação de grãos de café. (Pasin et al., 2011; Pereira et al., 2005; Silva et al., 2008). Essa espécie de *Cladosporium* é constantemente associado ao fruto do café e a população aumenta na medida que o fruto amadurece, coincidindo com a conversão dos compostos fenólicos em açúcares facilitando a colonização interna do fruto (Pereira et al., 2005).

Ainda, diferente de outras espécies de fungos como *Aspergillus* que possuem uma influencia negativa em relação a qualidade dos grãos de café, a espécie *Cladosporium* está associada a produção de grãos de boa qualidade, no entanto, assim como em outros grãos e sementes, faltam informações exatas sobre a dinâmica do fungo (Silva et al.,

2008).

Araújo et al. (2019) investigou a diversidade de fungos filamentosos e o potencial hidrolíticos de suas enzimas nas características sensoriais das sementes de cacau e, entre outras espécies, concluiu que o *Cladosporium cladosporioides* possui capacidade de secretar enzimas, em especial amilases, pectinases, xilases e celulases, além de demonstrar uma diversidade de fungos filamentosos em fermentação de semente de cacau. Porém ainda não há relatos do uso da cultura *starter* desse fungo na fermentação de sementes de cupuaçu, dessa forma o objetivo é avaliar o efeito do *Cladosporium cladosporioides* sob parâmetros químicos, microbiológicos e perfil aromático de sementes de cupuaçu.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Foi utilizado o fungo *Cladosporium cladosporioides* (código de isolamento no Genbank: KU1799495) pertencente ao Banco de Fungos Filamentosos e Leveduras do Laboratório de Processos Biotecnológicos do PPGCTA.

### **2.2 Produção de inóculo fúngico**

O fungo foi cultivado no meio PDA em tubo inclinado, incubado em temperatura ambiente por 10 dias. Depois do tempo de incubação, uma suspensão de esporos foi obtida com solução salina de tween estéril (0,05% Tween 80 e 0,8 g/L cloreto de sódio) (Gifford & Schoustra, 2013), onde foi adicionado quantidade suficiente de solução para cobrir os micélios cultivados e, depois, feita uma raspagem de forma branda para não obter fragmentos de micélio ou do meio de cultivo, com o auxílio de uma pipeta volumétrica. A suspensão de esporos obtida em cada tubo foi, então, transferida a um Erlenmeyer de 250 ml estéril, onde uma alíquota de 1ml foi retirada para contagem em Câmara de *Neubauer*. A partir dessa contagem, foi feita a diluição em solução salina de Tween para obtenção de uma suspensão de esporos na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/mL (Kumar et



al., 2013), onde foi preparado 500mL de suspensão de esporos.

### **2.3 Fermentação das sementes de cupuaçu**

O processo fermentativo das sementes de cupuaçu foi realizado na segunda quinzena do mês de junho de 2020 na Universidade Federal do Pará (Belém – PA) (latitude: -1.4557794, longitude: -48.4901968). A fermentação foi conduzida de acordo com o descrito por CEPLAC (2011), onde foram realizados dois tipos de fermentações: uma sem a adição de inóculo do fungo *C. cladosporioides* (controle) e outra contendo sementes inoculadas com a suspensão de esporos preparada previamente. Os dois experimentos de fermentação foram realizados em triplicata, totalizando seis cochos de fermentação, cada um contendo em torno de 15 kg de sementes, os quais foram cobertos com folhas de bananeira e sacos de aniagem.

Para a inoculação da suspensão de esporos ( $1 \times 10^7$  esporos/mL), foi utilizado um borrifador (500ml), onde foi disposta uma camada de sementes e a suspensão foi borrifada. Esse processo foi repetido até que toda a massa de sementes e todo o conteúdo da suspensão de esporos fosse utilizado.

Com o intuito de favorecer a oxigenação, propiciando assim a adaptação do meio à proliferação de bactérias acéticas, após 48h de início do processo, realizou-se revolvimentos nas sementes de cupuaçu. A fermentação ocorreu durante 7 dias (168h), onde foi realizado o acompanhamento da temperatura ao longo de todos os dias do processo fermentativo e a medição foi feita em cinco pontos na superfície, meio e fundo do cocho de fermentação. As alíquotas das amostras foram coletadas nos pontos de medição da temperatura até totalizarem aproximadamente 250 g de amostra, sendo estas, armazenadas em sacos estéreis e mantidos sob congelamento ( $-18 \pm 2$  °C) até a realização das análises.

### **2.4 Contagem de leveduras e bactérias acéticas**

Foram homogeneizadas em saco estéril (colocar capacidade em volume do saco)

10 g de sementes de cupuaçu e em 90 mL de água peptonada (0,1% w / v), fornecendo diluições de  $10^{-1}$ . Posteriormente, foram obtidas diluições decimais em série para a quantificação das leveduras em ágar YPD com cloranfenicol (100 mg/L) para inibição do crescimento bacteriano. Foi utilizada a técnica de espalhamento por superfície e as placas foram incubadas a 28°C por 72 h (Baffi et al., 2011).

Para bactérias de ácido acético (AAB), foram preparadas diluições decimais em série em ágar GYC com 0,2 ml de nistatina, para a inibição do crescimento fúngico. Foi utilizada a técnica de espalhamento de placas, e as placas foram incubadas a 30°C por 96 h (Ho et al., 2014).

## **2.5 Análises físicas e químicas das sementes**

Após descongeladas, retirou-se a testa e o embrião das amêndoas de cupuaçu e analisou-se os cotilédones previamente triturados em moinho de amostras (Ika®, mod. A11B). Segundo métodos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006) para amêndoas de cupuaçu e seus derivados, foram realizadas as análises de acidez total titulável (31.06.06, AOAC), pH (970.21, AOAC), umidade (931.04, AOAC), cinzas (972.15, AOAC), lipídios (963.15, AOAC) e proteínas (970.22, AOAC). Todas as análises foram realizadas em triplicata (n=3).

## **2.6 Fenólicos totais**

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada nas amêndoas de cupuaçu conforme o método descrito por Singleton & Rossi (1965).

Os valores obtidos foram expressos em miligramas de equivalentes em catequina por grama de amêndoa seca (mgEC/g). Para a análise utilizou-se 1 grama de cupuaçu seco, triturado em moinho (Ika® modelo A11B) e desengordurado. Foi feita a maceração das amostras em 3 mL da solução extratora (70% acetona/29,5% água/0,5% ácido acético), em seguida foi filtrada em balão de 10 mL âmbar e aferido com solução extratora. Em novos tubos, foram adicionados 250 µL do extrato e 1250 µL da solução de Folin-

Ciocalteau (10%) para homogeneização por 2 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%) e, novamente, foi homogeneizado em vórtex. Após 90 minutos de reação, protegidos da luz, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro (Bel Photonics modelo UV-M51) a 760 nm ( $y=0,0597x+ 0,0858$ ,  $R^2 = 0,9926$ ).

### **2.7 Quantificação de açúcares redutores por DNS**

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método espectrofotométrico do 3,5 dinitrossalicílico (DNS), sendo feito uma curva padrão de glicose em diferentes concentrações ( $y= 0,387x + 0,0091$ ;  $R^2= 0,993$ ). As amostras foram previamente preparadas e lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm, seguindo a metodologia de Maldonade et al. (2008).

### **2.8 Extração e identificação dos compostos voláteis das sementes de cupuaçu fermentadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM)**

A composição química foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em sistema Shimadzu QP 2010 ultra com a injeção de 1  $\mu\text{L}$  de solução 3:500 de óleo em hexano (Auto injetor AOC-20i), foi usado uma coluna capilar de sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno revestido com 5%-difenil/95%-dimetil-polisiloxano (0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme).

A temperatura do forno do CG foi programa de 60°C a 240°C (10 min) a 3°C/min, as temperaturas do injetor (split 1:20), linha de transferência e câmara de ionização foram de 250, 250 e 200°C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste a com fluxo de 1mL/min.

Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV com *scans* automáticos (varredura) na faixa de 35 a 400 daltons a 0,30 *scans/s*. A identificação dos

componentes foi baseada no tempo e índice de retenção linear (série de *n*-alcanos C8-C40), na interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas Adams 2006, Nist 2011 e FFNSC 2.

As amêndoas de cupuaçu dos tempos 0, 96, 168 (controle e inóculo) foram moídas em moinho (Ika® modelo A11B) e submetidas à destilação/extração simultânea por duas horas utilizando 4 mL de pentano como solvente, no Laboratório de Química, na Universidade Estadual do Pará (UEPA – CCSE). O concentrado volátil (CV) foi armazenado a uma temperatura de 5 °C.

## **2.9 Análise Estatística**

As análises foram realizadas em triplicata (média ± desvio padrão). Para obtenção das médias e desvio-padrão dos resultados das temperaturas e das análises físico-químicas, será utilizado o *software* Microsoft Office Excel 2013. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, com o auxílio do *software* programa Statistica versão 7.0 (STATSOFT INC., 2004) empregando as seguintes metodologias estatísticas: Análise de variância (ANOVA) a 5% de significância e Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A análise multivariada foi usada para analisar os dados posteriormente.

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para agrupar os compostos voláteis identificados e quantificados nas amostras de cupuaçu em todas as fermentações (controle e com o inóculo fúngico). A soma dos compostos de cada classe química foi considerada como as variáveis ativas. Para a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), a árvore hierárquica foi obtida levando em consideração os mesmos grupos de variáveis ativas da PCA, com base nas distâncias euclidianas (método de Ward) para o agrupamento.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Análises físicas e químicas**

Os resultados das análises físico-químicas são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Durante a fermentação houve uma evolução da temperatura típica do processo fermentativo, alcançando valor máximo no tempo 48 h (41°C) de fermentação espontânea (controle), seguido de um decréscimo contínuo após o tempo de 72 horas. Para a temperatura, foram observadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre a fermentação realizada com o inóculo fúngico e a fermentação controle apenas no tempo 48 horas e no final do processo (Tabela 1).

**Tabela 1:** Parâmetros físico químicos, compostos fenólicos e contagem de leveduras e bactérias acéticas durante a fermentação controle e com inóculo.

Parâmetros	Tempo de fermentação (h)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
<b>Temperatura (°C)</b>								
Controle	25,33±1,20 <sup>d</sup> <sub>A</sub>	35,67±0,88 <sup>bcA</sup>	41,00±0,33 <sup>aA</sup>	36,44±1,92 <sup>Ab</sup>	34,11±1,07 <sup>bc</sup> <sub>A</sub>	34,11±0,38 <sup>bc</sup> <sub>A</sub>	33,22±1,01 <sup>ca</sup> <sub>A</sub>	33,00±0,58 <sup>ca</sup> <sub>A</sub>
Inoculado	25,22±0,38 <sup>d</sup> <sub>A</sub>	33,44±1,07 <sup>bcA</sup>	38,33±0,58 <sup>aB</sup>	34,78±1,71 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	33,33±0,33 <sup>bc</sup> <sub>A</sub>	33,67±0,58 <sup>bc</sup> <sub>A</sub>	32,56±0,38 <sup>bc</sup> <sub>A</sub>	31,78±0,19 <sup>bc</sup> <sub>B</sub>
<b>pH</b>								
Controle	4,91±0,13 <sup>cdA</sup>	4,81±0,14 <sup>cdA</sup>	4,78±0,13 <sup>dA</sup>	4,89±0,06 <sup>cdA</sup>	4,94±0,13 <sup>cdA</sup>	5,12±0,15 <sup>bcA</sup>	5,32±0,10 <sup>abA</sup>	5,50±0,01 <sup>aA</sup>
Inoculado	4,92±0,07 <sup>bcA</sup>	4,82±0,16 <sup>bcA</sup>	4,75±0,17 <sup>aC</sup>	4,80±0,14 <sup>bcA</sup>	4,96±0,06 <sup>dbcA</sup>	5,10±0,28 <sup>abcA</sup>	5,20±0,16 <sup>abA</sup>	5,50±0,02 <sup>aA</sup>
<b>Acidez Total Titulável (mEq NaOH/100g)</b>								
Controle	9,19±0,08 <sup>eA</sup>	12,96±0,89 <sup>bcd</sup> <sub>A</sub>	17,36±0,46 <sup>aA</sup>	14,73±0,49 <sup>bA</sup>	14,67±0,94 <sup>bA</sup>	13,20±0,19 <sup>bcB</sup>	11,53±0,50 <sup>cdA</sup>	11,25±1,00 <sup>dA</sup>
Inoculado	9,22±0,01 <sup>eA</sup>	13,75±0,35 <sup>abA</sup>	14,48±1,13 <sup>abB</sup>	15,36±0,19 <sup>aA</sup>	14,49±0,78 <sup>abA</sup>	14,36±0,26 <sup>abA</sup>	12,66±0,55 <sup>bA</sup>	13,29±1,09 <sup>bA</sup>
<b>Compostos Fenólicos Totais (mg CAT/g)</b>								
Controle	0,50±0,00 <sup>aA</sup>	0,27±0,03 <sup>bA</sup>	0,27±0,01 <sup>bB</sup>	0,21±0,01 <sup>cB</sup>	0,21±0,01 <sup>cB</sup>	0,16±0,01 <sup>cdB</sup>	0,15±0,01 <sup>dB</sup>	0,15±0,02 <sup>bB</sup>
Inoculado	0,50±0,00 <sup>aA</sup>	0,40±0,03 <sup>aA</sup>	0,38±0,01 <sup>bcA</sup>	0,36±0,01 <sup>bcA</sup>	0,34±0,05 <sup>bcA</sup>	0,33±0,01 <sup>bcA</sup>	0,33±0,00 <sup>bcA</sup>	0,30±0,03 <sup>cA</sup>

<b>Leveduras (log/g)</b>								
Controle	5,26±0,04 <sup>cbA</sup>	5,90±0,54 <sup>baA</sup>	6,40±0,06 <sup>aA</sup>	6,32±0,02 <sup>aA</sup>	5,21±0,01 <sup>bcdB</sup>	4,40±0,15 <sup>cdA</sup>	4,24±0,54 <sup>dA</sup>	3,04±0,37 <sup>eA</sup>
Inoculado	5,27±0,11 <sup>cbA</sup>	6,20±0,12 <sup>aA</sup>	6,57±0,31 <sup>aA</sup>	6,30±0,10 <sup>aA</sup>	5,45±0,12 <sup>ba</sup>	4,57±0,02 <sup>cdA</sup>	4,32±0,05 <sup>dA</sup>	3,18±0,42 <sup>eA</sup>
<b>Bactérias Acéticas (log/g)</b>								
Controle	4,16±0,05 <sup>bcA</sup>	4,14±0,19 <sup>bcA</sup>	4,76±0,38 <sup>abc A</sup>	5,24±0,03 <sup>abA</sup>	5,97±0,36 <sup>aA</sup>	4,46±0,07 <sup>abcA</sup>	4,24±0,87 <sup>bcA</sup>	3,34±0,09 <sup>cA</sup>
Inoculado	4,19±0,04 <sup>abA</sup>	4,36±0,10 <sup>abA</sup>	5,08±0,04 <sup>aA</sup>	5,22±0,03 <sup>aA</sup>	5,31±0,01 <sup>aA</sup>	4,40±0,23 <sup>abA</sup>	4,41±0,11 <sup>abA</sup>	3,18±0,34 <sup>ba</sup>

\*Médias±desvio-padrão com letras maiúsculas diferentes (tratamentos) e com letras minúsculas diferentes (tempos de fermentação) se diferenciam estatisticamente entre si (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ )

Interessante pontuar que apenas no tempo 48 horas houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre a fermentação controle e a fermentação com o inóculo para a temperatura (controle – 41° C, inoculado – 38,3 °C) e em 72 h para a acidez total (controle - 17,36 mEq NaOH/100g, inoculado – 14,48 mEq NaOH/100g).

Foi observado que as temperaturas de fermentadas atingidas no inoculado foram menores que as temperaturas obtidas na fermentação controle. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar o ocorrido, e uma delas pode ser uma possível competição do fungo filamentosos com as leveduras iniciais, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*.

As leveduras são iniciadores do processo fermentativo, tolerantes a grande quantidade de etanol e geradoras de energia (Do Carmo Brito et al., 2017), na presença do fungo filamentosos as temperaturas de fermentação foram menores e embora as leveduras, em especial a *S. cerevisiae*, sejam tolerantes ao etanol, esse composto acumulado na célula durante a fermentação apresenta efeitos nocivos para a levedura uma vez que alteram o transporte de glicose feito por essas enzimas. O etanol prejudica o fluxo de prótons e faz com que decresça as concentrações de nutrientes no interior da célula (Udomsaksakul et al. 2018).

Trabalhos recentes indicam que fermentação de sementes de cacau utilizando culturas iniciadoras de *Saccharomyces* atingiram temperaturas mais altas do que as fermentações controle (Chagas Júnior et al., 2021). Além do mais, tendências semelhantes foram observadas ao utilizar uma combinação de *S. cerevisiae* e *Torulasporea delbrueckii* durante a fermentação de cacau (Visintin et al., 2017).

Ainda segundo Chagas Júnior et al. (2021) a temperatura de fermentação permaneceu elevada por mais tempo na presença das culturas de leveduras, favorecendo diversas reações químicas necessárias para a qualidade do cacau (Ho et al., 2014). Dessa maneira, o metabolismo das leveduras pode ter sido alterado na presença do inóculo de *Cladosporium cladosporioides*.



A temperatura atingida na fermentação é um fator que influi diretamente na qualidade final das amêndoas e diversas pesquisas consideram que temperaturas inferiores a 45°C seriam prejudiciais para o desenvolvimento de reações bioquímicas e, conseqüentemente, a formação de precursores do aroma e sabor de análogo ao chocolate (Schwan & Wheals, 2004). Em fermentação espontânea das sementes de cupuaçu despulpadas, Cohen & Jackix (2005), registraram temperaturas máximas entre 47°C e 49°C, utilizando 160 kg de sementes por cocho, no entanto Ramos et al. (2020) e Souza et al. (2020) obtiveram temperaturas máximas de fermentação próximas a 43°C e 44,29°C, respectivamente, nas mesmas condições do trabalho anterior. No presente trabalho foi utilizado 15kg de sementes por cocho, o que afetou diretamente a elevação de temperatura.

Muitas condições intrínsecas e extrínsecas são determinantes para a evolução da temperatura e proliferação microbiana efetiva na fermentação, tais como localidade geográfica, variedade do fruto, quantidade da massa fermentativa, temperatura ambiente, presença da polpa mucilaginosa, formas de revolvimento (Cohen & Jackix, 2005; Ramos et al., 2020). Esta afirmação indica que o processo fermentativo precisa ser acompanhado pelo produtor e as condições ideais desta etapa e das etapas posteriores de beneficiamento devem ser dominadas a fim de controlar as variáveis (Souza et al., 2020).

Além disso, é importante avaliar uma combinação de parâmetros químicos, como teor de lipídios, acidez, pH, compostos fenólicos, para concluir a eficiência do processo fermentativo (Araújo et al., 2014). Dessa forma, este estudo considerou outros componentes de qualidade para refletir de forma mais completa a realidade do processo fermentativo.

Além do mais, o aumento da temperatura na fermentação de cacau é associado ao metabolismo do etanol, um subproduto produzido pelas leveduras, por meio de reações exotérmicas, segundo Do Carmo Brito et al. (2017). Isso ocorre devido à aeração promovida pelo uso de sementes despulpadas, pelo revolvimento diário (feito a partir do

segundo dia de fermentação) e pela liquefação dos resíduos da polpa.

Embora o tempo de fermentação das sementes de cupuaçu seja em torno de 6 a 7 dias, a temperatura máxima da massa fermentativa foi medida no dia 2, conforme outros autores que mediram valores máximos entre 48 e 60 horas (Souza et al., 2020). Ramos et al. (2016) concluíram que 60 horas parece ser o período ideal de fermentação, ao utilizar cochos com 4kg de sementes.

Sabendo que as reações bioquímicas e estruturais aconteceram de maneira concomitante com a elevação da temperatura, também houve o incremento da atividade de enzimas microbianas como as celulasas, poligalacturonases, invertases, polifenoloxidasas, peroxidases e lipases, que normalmente expressam atividade ótima até 72 horas de fermentação. A atividade enzimática é fundamental para o desenvolvimento dos aromas e sabores tão característicos do chocolate (Souza et al., 2020), então acredita-se que o mesmo ocorra com as amêndoas de cupuaçu fermentadas na presença do fungo filamentosos.

Por outro lado, com o decorrer dos dias de fermentação é observado a queda progressiva dos valores de temperatura, estabilizando-se no dia 7 a 33°C (controle) e 31,78°C (com inóculo), sinalizando o fim do processo. O motivo da queda deve-se ao esgotamento de substratos para as atividades microbianas (metabolismo exotérmico) (Souza et al., 2020).

No processo fermentativo ocorre uma migração dos ácidos orgânicos resultantes da atividade de bactérias lácticas e acéticas, isso explica a diminuição dos valores de pH e aumento da acidez observados nas primeiras 48 horas do processo (Tabela 1) (Afoakwa et al., 2008). Acredita-se que as mudanças de pH que ocorrem durante a fermentação não interferem no crescimento de fungos, uma vez que, em geral, fungos filamentosos podem tolerar os baixos valores de pH encontrados neste estudo, corroborando com a pesquisa de Araujo et al. (2019).

O aumento do pH e a simultânea diminuição da acidez total no final da fermentação

podem decorrer da evaporação dos ácidos voláteis, principalmente do ácido acético, que ocorre pela agitação da massa de cacau (Lima et al., 2011). O pH entre 5 a 5,5 encontra-se na faixa de maior atividade enzimática das proteases, enzimas essenciais para a degradação das proteínas e formação de aminoácidos livres, fundamentais para a composição do sabor e aroma do produto final (Ho et al., 2014). Além disso, a referida faixa de pH também é ideal para a ação das lacases, uma das enzimas excretadas pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* responsáveis, entre outras coisas, pela catálise da oxidação de compostos fenólicos (Baldrian, 2006). Essa e outras enzimas possuem estabilidade em uma extensa faixa de pH (3-7) e temperatura (30°C - 70°C) (Halaburgi et al., 2011; Araújo et al., 2019), possibilitando o uso do inóculo em processos industriais.

Os elevados valores de acidez nas primeiras 48 h pode ser explicado pela presença de resquícios da polpa do cupuaçu, rica em ácidos orgânicos, como o ácido cítrico (Gondim et al., 2001). Por outro lado, a redução da acidez ao final do processo fermentativo pode ser resultado da evaporação de ácidos voláteis, principalmente do ácido acético e lático quando a massa fermentativa sofre revolvimento (Efraim et al., 2010; Lima et al., 2011).

A composição centesimal das sementes *in natura* é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição centesimal das sementes de cupuaçu *in natura* em base úmida.

COMPOSTO	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (%)
<b>Umidade<sup>1</sup></b>	40,63±0,61
<b>Cinzas<sup>1</sup></b>	1,39±0,04
<b>Proteínas<sup>1</sup></b>	33,13±0,69
<b>Lipídeos<sup>1</sup></b>	134,20±1,62

Média±desvio padrão

<sup>1</sup>base úmida

O teor de umidade da semente foi de 40,63%, valor este abaixo do encontrado por Ramos et al. (2020) de 55,2%, esta diferença pode ser explicada por fatores climáticos,

técnicas de colheita e variedade do fruto.

O teor de proteínas totais encontrados neste trabalho (33,13%, b.u.) foi maior ao encontrado por Carvalho et al. (2008) (26,17% b.s.) após testarem a farinha, o concentrado proteico e o isolado proteico das sementes de cupuaçu.

Além disso, as sementes de cupuaçu apresentam uma quantidade superior de proteínas quando comparadas com as sementes de cacau que, Bertazzo et al. (2011) encontraram um valor médio de proteínas baseado nos cotilédones de sementes de cacau de 10,4%, em base úmida.

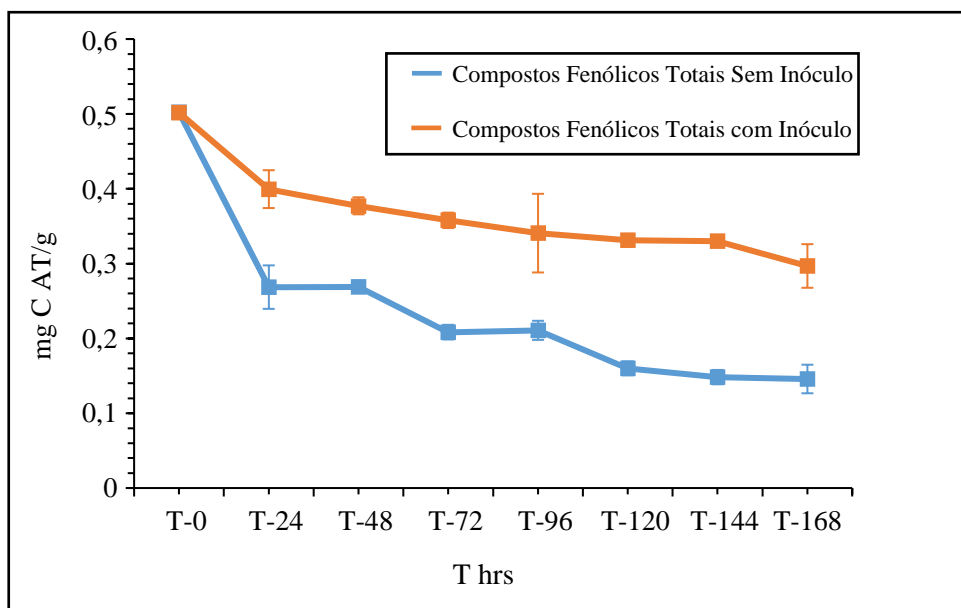
As sementes do cupuaçu são ricas em lipídeos, cerca de 60%, e possuem diversa aplicabilidade na indústria, caracterizando-se como uma alternativa a manteiga de cacau no desenvolvimento de produtos análogos ao chocolate e cosméticos (Luccas, 2001; Oliveira et al., 2004; Quast et al., 2007). Devido a semelhança no ponto de fusão da manteiga de cacau (35,2%) e da manteiga de cupuaçu (36,1%) (Ayres, 2019), é possível produzir chocolates com até 10% de manteiga de cupuaçu sem alterar as características físicas e sensoriais do produto (Cohen & Jackix, 2005).

A gordura presente nas sementes de cupuaçu possuem uma textura mais macia que o cacau, devido o perfil de ácidos graxos insaturados monoinsaturados (38,15%) e poliinsaturados (2,55%) , como o ácido linoleico, essencial para a síntese do ácido araquidônico, precursor da biossíntese de prostaglandinas (Lannes et al.,2003; Cohen & Jackix, 2005). Além disso, enquanto as sementes de cacau possuem maiores quantidades de ácidos graxos saturados, as sementes de cupuaçu apresentam um perfil majoritariamente insaturado (Pugliese, 2013).

Fato interessante do ponto de vista comercial para a indústria de chocolate e alimentícia, além da possibilidade de desenvolver produtos com a adição parcial da gordura do cupuaçu.

### **3.2 Compostos fenólicos totais**

Na Figura 1 e na Tabela 1 são apresentados os teores médios de fenólicos totais nas amêndoas de cupuaçu fermentadas sem o inóculo fúngico e com a presença do inóculo.



**Figura 1:** Teores médios de fenólicos (mg CAT/g) totais em todos os tempos de fermentação espontânea e com a presença do inóculo fúngico.

Observa-se que o teor fenólico na fermentação controle e na fermentação com inóculo decaiu significativamente em 70% e 40%, respectivamente. Esses resultados foram próximos aos encontrados por Efraim et al. (2010) que, ao fermentar cacau na Bahia, verificaram redução de 60% de fenólicos totais, expressos em ácido tânico. Houve diferença significativa entre as amêndoas fermentadas de forma espontânea e as amêndoas fermentadas com o inóculo fúngico ( $p \leq 0,05$ ).

Pugliese (2010) também documentou a redução de compostos fenólicos em sementes de cupuaçu fermentadas em relação as sementes *in natura*, corroborando que, mesmo as etapas pós-colheita sendo necessárias para o desenvolvimento de características sensoriais, também comprometem o conteúdo fenólico.

Naturalmente, os teores de compostos fenólicos totais encontrados nas sementes de cupuaçu são inferiores quando comparados com polpas de frutas nativas da região, como o camu-camu, araçá-boi e cacau (Genovese et al., 2008) Ainda, os valores fenólicos dos frutos são mais expressivos nas sementes e cascas, uma vez que estes compostos se

acumulam nos tecidos dérmicos da planta atuando contra as radiações ultravioletas e possíveis patógenos (Contreras-Calderón et al., 2011).

Dessa forma, a redução fenólica deve-se ao fato das complexas reações enzimáticas de oxidação, catalisadas por diversas enzimas, em especial a polifenoloxidase, que são iniciadas a partir da quebra das membranas celulares das sementes, ocasionado também a morte do embrião, assim como acontece com as sementes de cacau (Do Carmo Brito et al., 2017).

Foi observado que a perda do teor de fenólicos totais na fermentação realizada com o inóculo foi menor (40%) em comparação com a perda elevada no grupo fermentado de forma espontânea (70%). Do ponto de vista nutricional, a menor redução dos compostos fenólicos provavelmente ocasionado pela presença do fungo filamentoso é bastante interessante, uma vez que esses compostos são conhecidos pelas suas intensas características antioxidantes com alegação de saúde (Gallo et al., 2004; Al Mattar & Makky, 2016).

### 3.3 Açúcares redutores

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos das concentrações de açúcares redutores e é possível observar uma diminuição significativa da concentração nos três tempos analisados em ambas as fermentações.

**Tabela 3.** Valores médios dos açúcares redutores expressos em g/100g

Tempo (h)	ARg/100g	
	SEM INÓCULO	COM INÓCULO
0	1,44±0,00 <sup>aA</sup>	1,45±0,02 <sup>aA</sup>
96	0,79±0,07 <sup>bA</sup>	0,87±0,04 <sup>bA</sup>
168	0,39±0,03 <sup>cB</sup>	0,55±0,03 <sup>cA</sup>

\*Médias±desvio-padrão com diferentes letras em uma mesma linha (maiúsculas) ou em uma mesma coluna (minúscula) diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ , Teste de Tukey), base úmida.

Houve diferença significativa ao final do processo entre a fermentação espontânea (0,39 g/100g) e a fermentação com o inóculo (0,55 g/100g). Segundo Robayo,

(2010), esta diminuição é característica do processo fermentativo, uma vez que acontece o consumo dos açúcares fermentescíveis pelos microrganismos e, naturalmente, essa concentração inicial tende a reduções significativas.

Os fungos filamentosos possuem intensa atividade enzimáticas e algumas enzimas possuem relevância tecnológica, uma vez que são usadas para quebrar polissacarídeos complexos em moléculas de açúcares simples, como por exemplo a celulase e xilanase (Araújo et al., 2019).

Dessa forma, pode-se inferir que os fungos filamentosos, quando presentes nas fermentações, podem auxiliar na quebra de moléculas de celulose presente na semente, gerando como um dos produtos dessa metabolização as moléculas de açúcares, ocasionando as concentrações maiores de açúcares no final do processo quando comparados a fermentação espontânea. Esses açúcares tornam-se substrato para demais reações microbianas necessárias no processo fermentativo ou, ainda, podem participar da reação de Maillard (Araujo et al., 2019; Vázquez-Montoya et al., 2019).

### **3.4 Contagem de leveduras e bactérias acéticas**

A evolução das unidades formadoras de colônias de leveduras e bactérias do ácido acético estão apresentadas na Tabela 1. O comportamento de leveduras neste trabalho mostra o crescimento durante as primeiras 72 horas do processo e decréscimo até o final da fermentação.

No tempo 48 horas foi observado o pico de leveduras tanto para a fermentação controle (6,40 log/g) quanto para a fermentação com o inóculo fúngico (6,55 log/g). Houve diferença significativa na contagem de leveduras entre as fermentações apenas no tempo 96 h, registrando 5,21 log/g na fermentação controle e 5,45 log/g na fermentação com a presença do inóculo de *Cladosporium cladosporioides*.

Diversos autores (Ardhana & Fleet, 2003; Ramos et al., 2020, Chagas Júnior et al., 2020) relataram que o início do processo fermentativo é o ambiente propício para a

atividade destes microorganismos, uma vez que os açúcares presentes nos resquícios da polpa são substrato para a produção de etanol. Além disso, a manutenção da atividade de leveduras ainda nas 72 horas do processo, mesmo após o primeiro revolvimento, pode ser explicada pela atividade enzimática das invertases, comumente encontradas nas leveduras, que irão converter a sacarose em glicose e frutose (Vuyst & Weckx, 2016).

A ação das pectinases sintetizadas pelo fungo pode explicar o prosseguimento da atividade das leveduras, uma vez que essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos presentes na parede celular de células vegetais, proporcionam maior biodisponibilidade de açúcares redutores e aprimoram a aeração da massa ao degradar a pectina (Araujo et al., 2019). O processo de entrada de ar eficaz na massa fermentativa possibilita a continuação do processo e desenvolvimento dos microorganismos aeróbicos.

Ho, Zhao & Fleet (2004), indicaram que mesmo após as 48 horas de fermentação do cacau, a espécie *Hanseniaspora quilliermondii* ainda está presente em quantidades consideráveis no ambiente fermentativo e as espécies *Pichia kudriavzevii* e *Isaatchenkia orientalis* atingiram taxas máximas ( $10^6 - 10^7$  UFC/g) nas 72 horas e 96 horas de fermentação, respectivamente. Corroborando, Chagas Júnior et al. (2020) comprovou que espécies de *Saccharomyces cerevisiae* foram encontradas também nas 96 horas do processo, sendo a que mais prevalece e colabora com o aprimoramento das características sensoriais de produtos à base de cacau (Arana-Sánchez et al., 2015; Magalhães et al., 2010) e, possivelmente, de produtos obtidos a partir das sementes do cupuaçu.

Comparativamente, durante a fermentação de cacau na Bahia e na República Dominicana, Papalexandratou et al. (2011) e Lagunes Galvez et al. (2007) também reportaram intenso crescimento de leveduras nas primeiras 24h ( $3,2 \cdot 10^5$  UFC/g e  $1,5 \cdot 10^6$  UFC/g, respectivamente), reduzindo até o último dia de fermentação.

A entrada de ar na massa fermentativa após as 48 horas é importante para homogeneização da temperatura e criação de condições favoráveis para essa classe de microorganismos, que são imprescindíveis para a formação de compostos de sabor, como



o ácido acético a partir do etanol anteriormente sintetizado (Fowler, 2009; Hamdouche et al., 2019).

Dessa forma, foi possível observar que houve um aumento de colônias de bactérias acéticas a partir das 48 horas, atingindo valores máximos de 5,97 log/g e 5,31 log/g para a fermentação controle e com inóculo, respectivamente, em 96 horas do processo. É importante salientar que esta classe de microorganismos pode sobreviver e, possivelmente, crescer em condições anaeróbicas, uma vez que foi observado uma quantidade significativa delas desde o início do processo.

As bactérias do ácido acético são capazes de converter álcoois em outros tipos de ácidos, além do ácido acético, como o ácido 2-metilbutanóico e o 2-metilpropanóico e, também, aldeídos e cetonas, potentes compostos aromáticos no chocolate (Schrader, 2007). Para o cupuaçu esta informação também é válida, pois Ramos et (2016) documentaram que de acordo com a população de bactérias acéticas, importantes álcoois e ácidos também aumentavam, principalmente do meio para o final da fermentação.

Neste trabalho, não houve diferenças significativas nas colônias de bactérias acéticas na fermentação controle e com o inóculo de *C. cladosporioides*, porém novas quantidades de inóculo e formas de aplicação poderão ser testadas em trabalhos futuros. Esta espécie fúngica também conhecida por ser um agente de biocontrole, deve estar em contato com o material vegetal em quantidades e tempo que permitam sua ação completa.

Assim como acontece com o café e o cacau, as sementes de cupuaçu também passam por processos para reduzir umidade e substâncias indesejáveis, então a associação deste fungo em demais etapas de processamento também podem contribuir positivamente e a presença do fungo também dificultaria de outras comunidades de micróbios e patógenos (Chalfoun et al., 2009).

A inoculação de *Cladosporium cladosporioides* no ambiente fermentativa de sementes de cupuaçu, caracteriza-se como um recurso genético para aplicação na biotecnologia, pois além de funcionar como uma nova fonte de enzimas extracelulares,

ainda apresenta características altamente desejáveis, como estabilidade em diversos ambientes, temperaturas e faixas de pH (Damaso et al., 2012; Chalfoun, 2010), no entanto há de se aprofundar em novos estudos para este fungo como inóculo para a fermentação de sementes de cupuaçu.

### 3.5 Perfil aromático

A Tabela 4 mostra os 36 compostos voláteis detectados e suas respectivas concentrações em porcentagem identificadas nas frações voláteis no início, meio e fim da fermentação das sementes de cupuaçu com e sem inóculo fúngico.

O cupuaçu é um fruto conhecido pela sua polpa ácida, de sabor e aroma intenso e exótico e alguns compostos já identificados na polpa do fruto tem participação importante na formação de sabor do produto final após o processo de beneficiamento das amêndoas, uma vez que, assim como acontece com o cacau, diversos compostos migram para a amêndoa durante a fermentação (Kadow et al., 2013).

Korpi et al. (2009) e Ortiz-Castro et al. (2009) relataram que os fungos são capazes de produzir vários compostos orgânicos voláteis, como os encontrados nesse trabalho: hidrocarbonetos simples, aldeídos, cetonas, ésteres e derivados de benzeno e o fungo *Cladosporium cladosporioides*, ao ser inoculado como agente promotor de crescimento em plantas, induz a formação de compostos voláteis (Paul & Park, 2013).

Paul & Park relataram a formação de  $\alpha$ -pinene e trans-cariofileno, compostos da classe dos terpenos que funcionam como componentes de muitos óleos essenciais e temperos. De maneira semelhante, no presente trabalho houve a formação de linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) em quantidades maiores na fermentação com o inóculo nos tempos 96 h e 168 h, atingindo um valor máximo de 2,80% no fim da fermentação com o inóculo. O linalol é um terpeno, com importante papel na inibição microbiana, bastante relatado na polpa do cupuaçu e também em cacau fino, contribuindo com um aroma verde e floral (Oliveira et al., 2004; Lima et al., 2012; Padalia et al., 2017).

O citronelal (3,7-dimetiloct-6-en-1-al), terpeno ainda não identificado em amêndoas de cupuaçu fermentadas, foi detectado em todos os tempos analisados, com excesso do último dia de fermentação controle e apresentou uma concentração de 0,18% na fermentação com o inóculo. Esse composto de aroma rosáceo, participa da síntese de importantes compostos químicos precursores e sintéticos para a obtenção da vitamina A, além disso pode apresentar efeitos anti-inflamatórios (Trongtokit et al., 2005; Wong et al., 2005).

Estes compostos orgânicos voláteis provenientes do metabolismo fúngico também possuem a capacidade protetora contra herbívoros e patógenos microbianos (Ryu et al., 2003), função interessante para a incorporação de inóculos fúngicos em processos fermentativos de sementes com potencial aplicação na indústria alimentícia.

Com relação aos ésteres, em diversos trabalhos com o cupuaçu já foram relatados compostos desta classe, como o pentanoato de etila e acetato de etila (Quijano & Pino, 2007; Ramos et al., 2016), e são compostos interessantes formados a partir da condensação de ácidos carboxílicos e álcool. Neste trabalho foi documentado a presença de pentanoato de etila na concentração de 45,08% nas sementes fermentadas sem o inóculo e 47,22% nas sementes com o inóculo de *Cladosporium cladosporioides*.

Até o presente momento este composto ainda não tinha sido detectado na fermentação de sementes de cupuaçu, e apresenta notas de frutas, especialmente de maçã, amanteigado, caramelo e baunilha (Pugliese, 2010).

**Tabela 4:** Compostos voláteis (CG-SM) em amêndoas de cupuaçu fermentadas sem o inóculo fúngico e com o inóculo fúngico

IR*	Composto	Controle			Inoculado			Atributo Aromático**
		0h	96h	168h	0h	96h	168h	
<b>Ácidos</b>								
850	Ácido propanoico	-	0,89±0,01 <sup>a</sup>	0,99±0,07 <sup>a</sup>	-	0,74±0,33 <sup>a</sup>	1,03±0,13 <sup>aA</sup>	Pungente, vinagre
983	Ácido hexanóico	-	0,15±0,00 <sup>A</sup>	-	0,91±0,11 <sup>a</sup>	1,10±0,01 <sup>bB</sup>	-	<i>Off-flavor</i>
1021	2-Ácido oxopentanoico	-	-	-	-	0,08±0,02	-	Gordura
1040	Ácido 2-metil-2-butenóico	-	-	-	-	0,08±0,01	-	Herbáceo
1095	Ácido benzoico	-	0,08±0,00 <sup>a</sup>	-	-	0,11±0,00 <sup>a</sup>	-	Doce
	<b>Total Ácidos (%)</b>	<b>0</b>	<b>1,12</b>	<b>0,99</b>	<b>0,91</b>	<b>2,11</b>	<b>1,03</b>	
<b>Álcoois</b>								
903	4,5-dimetil-2-hepten-3-ol	-	-	0,13±0,03 <sup>A</sup>	-	-	0,34±0,04 <sup>B</sup>	-
1027	5-Norbonene-2-metanol	-	-	-	-	0,25±0,04 <sup>a</sup>	0,37±0,03 <sup>a</sup>	-
1113	Benzenoetanol	-	-	0,09±0,00 <sup>a</sup>	-	-	0,13±0,01 <sup>a</sup>	Doce
1191	Terpineol	-	-	-	-	-	0,07±0,04	Floral, verde, herbáceo
	<b>Total Álcoois (%)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,22</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,91</b>	
<b>Aldeídos</b>								
1042	Fenilacetaldeído	0,31±0,00 <sup>aA</sup>	0,37±0,02 <sup>aA</sup>	0,52±0,00 <sup>aA</sup>	0,24±0,04 <sup>bB</sup>	0,47±0,04 <sup>aA</sup>	1,33±0,04 <sup>bB</sup>	Floral, chocolate
	<b>Total Aldeídos (%)</b>	<b>0,31</b>	<b>0,37</b>	<b>0,52</b>	<b>0,24</b>	<b>0,47</b>	<b>1,33</b>	
<b>Cetonas</b>								
859	2- Heptanona	6,36±0,21 <sup>A</sup>	-	-	5,66±0,33 <sup>A</sup>	-	-	Frutado, adstringente
915	4 - metil – 5,6-heptanona	-	-	-	-	-	0,66±0,00	Frutado, adstringente
1065	Acetofenona	-	-	-	-	-	0,11±0,01	Frutado, doce, amêndoa
	<b>Total Cetonas (%)</b>	<b>6,36</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5,66</b>	<b>0</b>	<b>0,77</b>	
<b>Ésteres</b>								
889	4-sec-butil-2,3-dihidrofurano	-	1,56±0,01 <sup>bA</sup>	1,83±0,08 <sup>aA</sup>	-	1,35±0,64 <sup>aA</sup>	2,15±0,41 <sup>aA</sup>	<i>Off-flavor</i>
2370	Pentanoato de Etila	-	-	45,08±0,94 <sup>A</sup>	-	-	47,22±1,06 <sup>A</sup>	Frutado, doce, baunilha

	<b>Total Ésteres (%)</b>	<b>0</b>	<b>1,56</b>	<b>46,91</b>	<b>0</b>	<b>1,35</b>	<b>49,37</b>	
<b>Hidrocarbonetos</b>								
795	1,1,3-trimetilciclopentano	-	2,03±0,01 <sup>aA</sup>	2,15±0,35 <sup>aA</sup>	-	1,74±0,82 <sup>aA</sup>	2,87±0,34 <sup>aA</sup>	-
808	3,4,4-trimetil-2-hexeno	-	1,61±0,03 <sup>aA</sup>	1,96±0,09 <sup>bA</sup>	-	1,96±0,34 <sup>aA</sup>	2,40±0,81 <sup>aA</sup>	-
815	2,3,6-trimetil-heptano	-	0,55±0,00 <sup>aA</sup>	0,68±0,08 <sup>aA</sup>	-	0,45±0,21 <sup>aA</sup>	0,63±0,03 <sup>aA</sup>	-
819	1-etil-1-metil ciclopentano	-	-	7,23±1,87 <sup>aA</sup>	-	6,41±0,03 <sup>A</sup>	8,80±0,11 <sup>a</sup>	-
824	2,2-dimetil-3-hepteno trans	-	4,82±0,01 <sup>aA</sup>	3,76±0,12 <sup>bA</sup>	-	3,35±0,00 <sup>ab</sup>	3,40±0,39 <sup>aA</sup>	-
835	ciclopentano,1,1,3,4-tetrametil trans	-	2,27±0,02 <sup>bB</sup>	2,65±0,01 <sup>aA</sup>	-	2,57±0,02 <sup>aA</sup>	2,50±0,07 <sup>aA</sup>	-
839	4-etil-heptano	-	0,81±0,01 <sup>bA</sup>	0,92±0,04 <sup>a</sup>	-	0,88±0,04 <sup>A</sup>	-	-
846	Isononano	-	-	7,63±0,16 <sup>A</sup>	-	7,22±0,35 <sup>aA</sup>	7,57±0,12 <sup>a</sup>	<i>Off-flavor</i>
885	Isobutilciclopentano	-	0,76±0,01 <sup>aA</sup>	0,96±0,01 <sup>aA</sup>	-	0,74±0,04 <sup>aA</sup>	0,84±0,35 <sup>bA</sup>	-
890	3-etil-3-heptano	-	-	-	-	0,56±0,04 <sup>a</sup>	0,67±0,08 <sup>a</sup>	-
896	Etilbenzeno	-	-	-	-	-	2,20±0,06	<i>Off-flavor</i>
897	1,4-dimetil benzeno	-	-	2,34±0,36 <sup>A</sup>	-	1,27±0,2 <sup>bB</sup>	2,26±0,26 <sup>a</sup>	Floral, doce
907	Ciclohexano, 1,2,3-trimetil	-	-	-	-	-	0,43±0,02	-
909	1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano	-	0,75±0,01 <sup>aB</sup>	0,78±0,02 <sup>aA</sup>	-	0,66±0,28 <sup>aA</sup>	0,87±0,03 <sup>aA</sup>	-
921	Cumeno	-	1,53±0,00 <sup>aA</sup>	-	-	1,02±0,47 <sup>aA</sup>	1,53±0,03 <sup>aA</sup>	Doce
929	2,2-dimetil-3-octano	-	1,88±0,03 <sup>aA</sup>	-	-	1,57±0,64 <sup>aA</sup>	2,01±0,31 <sup>a</sup>	<i>Off-flavor</i>
956	5-metilnonano	-	-	0,31±0,01 <sup>aA</sup>	-	0,22±0,08 <sup>a</sup>	0,40±0,14 <sup>aA</sup>	<i>Off-flavor</i>
965	2,3,6,7-tetrametil octano	-	0,05±0,01 <sup>b</sup>	0,60±0,06 <sup>aA</sup>	-	-	0,05±0,03 <sup>aA</sup>	<i>Off-flavor</i>
1000	Decano	0,90±0,00 <sup>abB</sup>	0,82±0,04 <sup>bA</sup>	0,94±0,00 <sup>aA</sup>	0,50±0,28 <sup>aA</sup>	1,02±0,01 <sup>aA</sup>	0,86±0,30 <sup>aA</sup>	<i>Off-flavor</i>
1024	Benzeno	-	0,26±0,01	-	-	-	-	Doce
1178	Naftaleno	0,38±0,09 <sup>aA</sup>	0,40±0,00 <sup>aA</sup>	0,48±0,14 <sup>aA</sup>	0,67±0,45 <sup>aA</sup>	0,52±0,05 <sup>aA</sup>	0,35±0,09 <sup>aA</sup>	Floral
	<b>Total Hidrocarbonetos (%)</b>	<b>1,28</b>	<b>18,53</b>	<b>33,39</b>	<b>1,17</b>	<b>32,16</b>	<b>40,64</b>	
<b>Terpenos</b>								
936	Citronelal	0,17±0,04 <sup>aA</sup>	0,17±0,01 <sup>aA</sup>	-	0,09±0,02 <sup>aA</sup>	0,14±0,00 <sup>aA</sup>	0,18±0,04 <sup>A</sup>	Floral
1101	Linalol	0,49±0,08 <sup>abA</sup>	0,90±0,01 <sup>bA</sup>	1,06±0,06 <sup>abB</sup>	0,51±0,56 <sup>bA</sup>	0,96±0,32 <sup>bA</sup>	2,80±0,45 <sup>aA</sup>	Floral, lavanda
	<b>Total Terpenos (%)</b>	<b>0,66</b>	<b>1,07</b>	<b>1,06</b>	<b>0,60</b>	<b>1,1</b>	<b>2,98</b>	
	<b>Total (todas as classes)</b>	<b>8,31</b>	<b>22,65</b>	<b>83,09</b>	<b>13,98</b>	<b>37,44</b>	<b>97,03</b>	

\*Índice de retenção calculado a partir de uma série de n-alcanos (C8-C40) na coluna Rtx-5MS.

\*Médias±desvio-padrão com letras maiúsculas diferentes (tratamentos) e com letras minúsculas diferentes (tempos de fermentação) se diferenciam estatisticamente entre si (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). \*\*\*Atributos aromáticos retirados da literatura (Bastos et al., 2019; Rodriguez-Campos et al., 2011; Moreira et al., 2015)

O fungo *C. cladosporioides* possui uma alta capacidade de formar compostos voláteis de acordo com diversas literaturas (Matysik et al., 2008; Matysik et al., 2009; Sunesson et al., 1995), e, recentemente, Micheluz et al. (2016), investigaram esta capacidade do *C. cladosporioides* em comparação com demais fungos, como o *Aspergillus penicillioides*, *Eurotium chevalieri*, *Penicillium brevicompactum*, e documentaram a formação de 2-pentanona, 3-octanona, 2-butanona e acetona pelo *C. cladosporioides* tanto na fase de desenvolvimento quanto na fase vegetativo.

No presente estudo também foi observado a presença de cetonas, a 2-heptanona (6,36%) nas sementes *in natura* inoculadas com o inóculo fúngico, 4-metil-5,6-heptanona (0,66%) e acetofenona (0,11%) nas sementes fermentadas com o inóculo, proporcionando aromas florais e frutados, semelhantes a banana madura no material vegetal. Rodriguez-Campos et al. (2012) também detectaram esses compostos ao fermentar e secar cacau no México.

Conforme Matysik et al. (2008, 2009) e Micheluz et al. (2016) o fungo *Cladosporium cladosporioides* produz compostos da classe dos álcoois que, quando apresentam um anel aromático na sua cadeia, podem apresentar aromas doces.

Entre os álcoois detectados neste trabalho, os resultados mostram que alguns foram quantificados nas sementes fermentadas com o inóculo, corroborando com a informação da potencialidade do fungo em produzir compostos orgânicos, são eles: 4,5-dimetil-2-hepten-3-ol (0,34%) no final da fermentação, 5-norbonene-2-metanol na concentração de 0,37% e 0,25% nas sementes fermentada com o inóculo nos tempos 96 e 168 h, respectivamente.

O terpineol, álcool monoterpeneo encontrado naturalmente em flores e ervas como orégano, alecrim e casca de limão, além de ser objeto de estudo por apresentar potencial

antioxidante, anticâncer e anti-hipertensivo (Khaleel et al., 2018), também foi identificado apenas nas sementes fermentadas com o inóculo fúngico (0,07%).

Aldeídos também são uma classe de compostos comumente encontrados em fermentação de espécies do Gênero *Theobroma*. Chagas Júnior et al. (2021) ao fermentar cacau amazônico encontraram 36,50% de fenilacetaldeído, da mesma forma que Gaspar et al. (2021) encontraram um valor de 25,45% deste composto ao fermentar e secar cacau no verão amazônico. Neste trabalho, observou-se que houve um ligeiro aumento deste composto ao longo da fermentação, apresentando valores finais de 0,52% na fermentação controle e uma concentração maior para a fermentação com inóculo de 1,33% ( $p > 0,05$ ).

Este composto ainda não tinha sido relatado nas amêndoas de cupuaçu, é originado a partir do catabolismo de aminoácidos (Afoakwa et al., 2008) e apresenta aromas de mel, frutas e chocolate (Bastos et al., 2018), sendo bastante interesse para o perfil sensorial dos produtos obtidos a partir das amêndoas beneficiadas de cupuaçu.

A presença deste composto nas amêndoas fermentadas com o inóculo, mesmo em pequenas quantidades, demonstra a necessidade da continuação de pesquisas utilizando inóculos fúngicos para esclarecer e definir protocolos e resultados satisfatórios, uma vez que a capacidade de sintetizar compostos orgânicos aromáticos já é bem esclarecida para essa espécie de fungo filamentosos.

Na classe dos hidrocarbonetos aromáticos, o cumeno, nome comum do composto isopropilbenzeno, foi detectado neste trabalho na concentração de 1,53% no tempo 168 horas da fermentação realizada na presença do inóculo e não foi detectada nas amêndoas fermentadas sem o inóculo, o que pode indicar que o fungo *Cladosporium cladosporioides* foi capaz de expressar atividade secretora de compostos orgânicos voláteis no sistema de fermentação estudado.

O etil benzeno, outro hidrocarboneto aromático, foi quantificado nas sementes fermentadas na presença do inóculo (2,20% - 110mg/g), porém a presença deste composto é indesejável para as amêndoas fermentadas, uma vez que é um composto lipossolúvel e tóxico mesmo abaixo das concentrações estabelecidas pela legislação (340mg.m<sup>-3</sup>) (Costa-Amaral et al., 2017). Este composto é formado a partir do mecanismo de alquilação do benzeno, ou seja, a substituição de um dos átomos de hidrogênio ligados ao anel benzênico por um grupo alquila (-R) catalisada pela presença de ácidos no meio (Perego e Ingalina, 2002).

Os ácidos carboxílicos são frequentemente encontrados em sementes de cacau fermentadas (Rodriguez-Campos et al., 2012; Chagas Júnior et al., 2021). Neste trabalho foi detectado a presença do ácido propanoico em ambas as fermentações no tempo 96 e 168 h, apresentando um valor máximo de 1,03% no fim da fermentação com o inóculo, Rodriguez-Campos et al. (2012) e Aculey et al. (2010) também detectaram a presença destes composto em cacau fermentado e seco. Este composto que apresenta odor pungente semelhante ao vinagre e também é responsável pelo aroma característico do queijo suíço.

Ao fermentar sementes de cupuaçu, Ramos et al. (2016) detectaram esses compostos em pequenas quantidades (0,01% – 0,04%) no *nibs* triturado e no cupulate. No entanto, esse achado pode representar um diferencial quanto a qualidade aromática das amêndoas, uma vez que o cupuaçu, mesmo fazendo parte da família *Theobroma*, possui características sensoriais únicas que irão refletir no cupulate e demais produtos obtidos a partir das amêndoas beneficiadas.

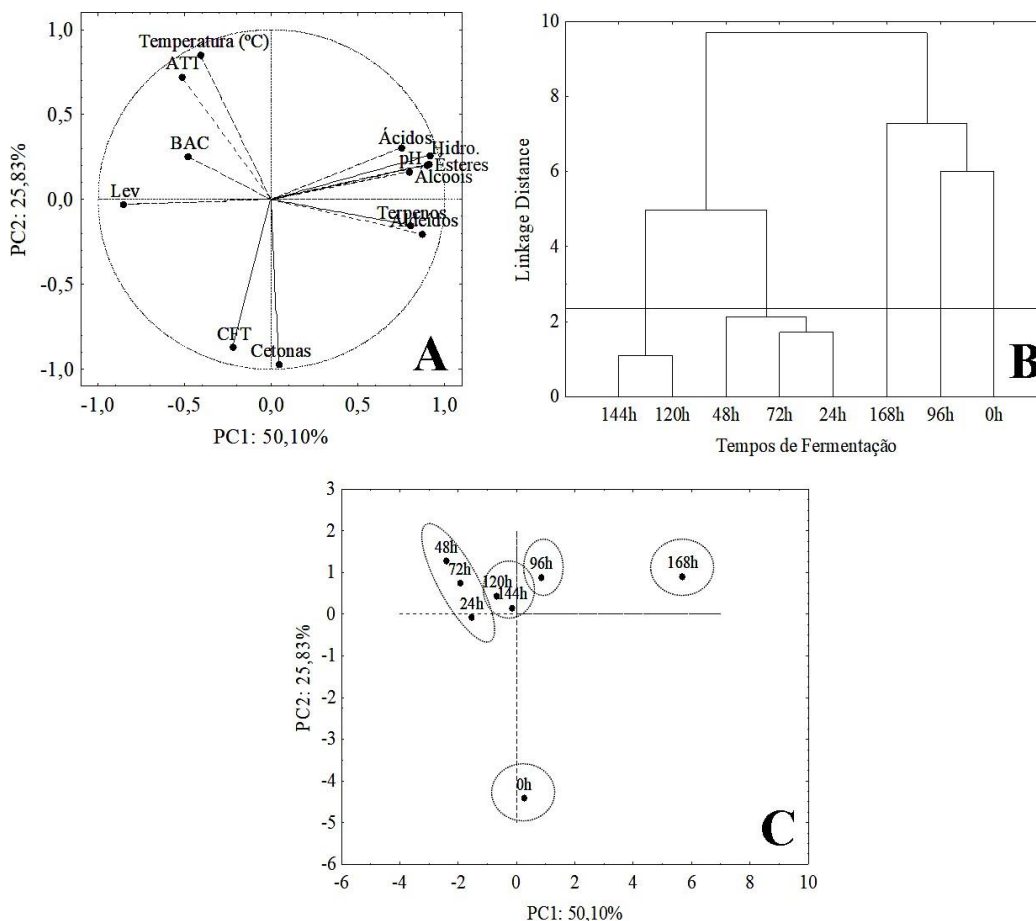


Por ser um processo espontâneo, diversos fatores influenciam na formação dos compostos aromáticos, seja pela reação de Maillard, seja pelo metabolismo microbiano, além de fatores referentes a variabilidade genética do fruto, presença da polpa mucilaginosa, *terroir* e ambiente fermentativo (Camu et al., 2008; Ho et al., 2014; Ramos et al., 2016). O uso de inóculos fúngicos no ambiente fermentativos de sementes com potencial alimentício é uma possibilidade interessante para otimizar os resultados, uma vez que os fungos filamentosos possuem expressiva aplicação biotecnológica e vantagens em relação aos demais microorganismos.

Da mesma forma que alguns compostos são formados ao longo do processo, outros são degradados, volatilizados ou, ainda, colaboram com reações químicas posteriores nas fases de secagem ou torração (Chagas Júnior et al., 2021; De Vuyst & Leroy, 2020).

### **3.6 Diferenciação de cupuaçu fermentado com e sem o uso do inóculo fúngico por análise multivariada**

As Figura 2 e 3 expressam a análise dos Componentes Principais (A, C) e dos Grupamentos Hierárquicos (B) na fermentação de sementes de cupuaçu conduzidas sem a inoculação de *C. cladosporioides* e na presença do inóculo, respectivamente. O objetivo da realização das análises multivariadas de Componentes Principais (ACP) e dos Grupamentos Hierárquicos (HCA) foi agrupar as análises realizadas e verificar a caracterização das sementes de cupuaçu fermentadas.



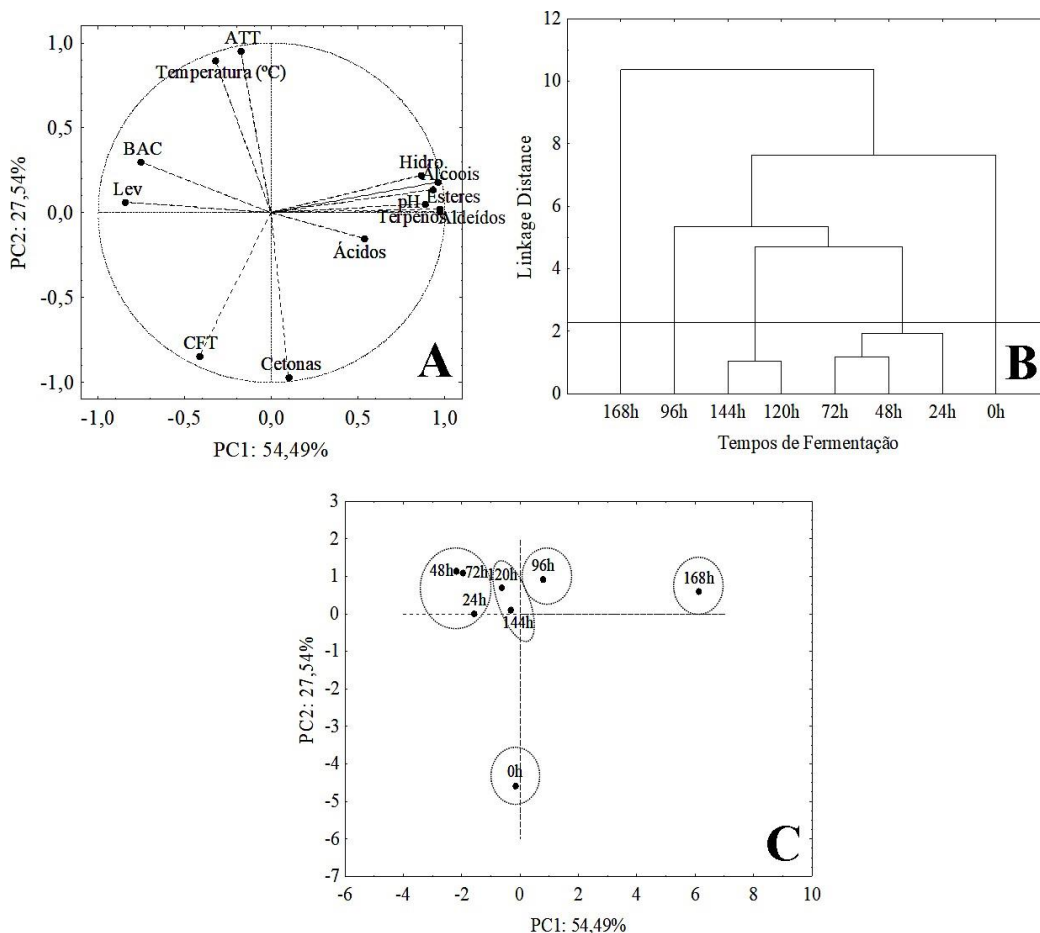
**Figura 2:** Análise dos Componentes Principais (A, C) e dos Grupamentos Hierárquicos (B) na fermentação de sementes de cupuaçu conduzidas sem a inoculação de *C. Cladosporioides*.

A somatória dos componentes PC1 + PC2 na fermentação controle foi de 75,93% (Figura 2<sup>a</sup>). Já a análise de HCA foi capaz de segregar os tempos de fermentação em grupos de acordo com as variáveis ativas estabelecidas: Grupo 1 – 0h, caracterizado por menores valores de temperatura e acidez, ou seja, o início do processo de fermentação, além de maiores taxas de compostos fenólicos totais que ainda não sofreram oxidação; Grupo 2 – 24, 48, 72 h, e Grupo 3 – 96 h, tempos intermediários da fermentação, caracterizado por maiores temperaturas e acidez, menor pH e aumento na contagem de leveduras e bactérias acéticas; Grupo 4 – 120 e 144 h, caracterizado por aumento do pH e, conseqüentemente, diminuição nas taxas de acidez, além de diminuição nos valores de compostos fenólicos

totais e por fim, o Grupo 5 – 168 h, caracterizado por concentração de compostos orgânicos aromáticos formados durante o processo fermentativo.

Na Figura 2A, foram observadas correlações positivas entre a temperatura e acidez total titulável ( $r=0,91$ ). De fato, quanto maior a temperatura dos processos fermentativos de cupuaçu, maiores são as taxas microbianas, favorecendo a acidificação do meio em razão do metabolismo destes microorganismos, especialmente das bactérias atuantes após as primeiras 48 hrs de fermentação, assim como ocorre com as sementes de cacau (Abdullahi et al., 2018; Figueroa-Hernández et al., 2019).

Também foi observado uma relação positiva entre os ésteres e álcoois ( $r=0,99$ ) formados durante a fermentação. Ao longo da fermentação, reações de Maillard acontecem e são responsáveis pela formação de diversos compostos interessantes para o perfil de aroma e sabor das sementes, compostos estes presentes em grande maioria no final da fermentação (Aprotosoiaie et al., 2016; Ramos et al., 2016).



**Figura 3:** Análise dos Componentes Principais (A, C) e dos Grupamentos Hierárquicos (B) na fermentação de sementes de cupuaçu conduzidas com a inoculação de *C. cladosporioides*.

Já para a fermentação inoculada com o fungo *C. cladosporioides*, a somatória de PC1+PC2 foi de 82,03% (Figura 3A). A análise de HCA foi capaz de segregar os tempos de fermentação em 5 grupos com características semelhantes a fermentação controle de acordo com as variáveis ativas estabelecidas.

Assim como aconteceu na fermentação controle, na figura 3A foi possível observar uma relação positiva entre a temperatura e acidez total titulável ( $r=0,88$ ), corroborando a influência da temperatura no metabolismo das bactérias atuantes no ambiente fermentativo, favorecendo a acidificação do meio (Abdullahi et al., 2018; Figueroa-Hernández et al., 2019).

Com relação aos compostos aromáticos formados, foi observado uma relação fortemente positiva entre duas classes, álcoois e aldeídos ( $r=0,98$ ). De fato, para a fermentação na presença do inóculo fúngico, estes compostos apresentaram maiores quantidades quando comparados a fermentação controle. Ambos são funções orgânicas oxigenadas que conferem aromas florais e doces, e podem ser originadas pelo metabolismo de espécies microbianas ao longo da fermentação, pelo metabolismo da semente após a morte do embrião e pela reação de Maillard (Camu et al., 2008; Ho et al., 2014).

#### 4 CONCLUSÃO

Pela primeira vez a influência da inoculação com fungo filamentoso na fermentação de sementes de cupuaçu foi avaliado. As amêndoas fermentadas na presença do inóculo apresentaram a maior formação de compostos aromáticos quando comparados com as sementes controle, no entanto ainda apresentou concentrações baixas para compostos de interesse, com aldeídos, álcoois e terpenos.

A análise de PCA evidenciou a formação dos mesmos grupos para ambas as fermentações e esses resultados mostram que nas condições estudadas o uso do inóculo de *Cladosporium cladosporioides* reduziu a temperatura de fermentação, e consequentemente produziu amêndoas com maior acidez e fenólicos totais por sua ação inibitória ou competitiva em relação às leveduras fermentativas, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullahi, G., Muhamad, R., Dzalkhifli, S. U. R., Sinniah, U. R. (2018) Analysis of quality retentions in cocoa beans exposed to solar heat treatment in cardboard solar heater box. *Cogent Food Agriculture*, 4,1483061 <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1483061>

Aculey, P. C., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompierre, M., Takrama, J., Norgaard, L., Petersen, M. A., Nielsen, D. S. (2010). Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics. *Journal of Food Science*, 75, 6.

Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840–857. <http://doi.org/10.1080/10408390701719272>.

Al Mattar, M., & Makky, E. A. (2016). *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. *Biotech*, 6, 4. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0323-4>

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Official Methods of Analysis of the AOAC International*, 16.

Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products An Overview: Flavor chemistry of cocoa. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 73–91.

Arana-Sanchez, A., Segura-Garcia, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Gschaedler-Mathis, A. (2015). Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and

culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 359–369. <http://doi.org/10.1007/s11274-014-1788-8>

Araujo, Q. R., Fernandes, C. A. F., Ribeiro, D. O., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R. & R. Araujo, T. G. (2014). Cocoa Quality Index - A proposal. *Food Control*, 46, 49–54. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003>.

Araújo, J. A.; Ferreira, N. R.; Silva, S. H. M.; Oliveira, G.; Monteiro, R. C.; Alves, Y. F. M. & Lopes, A. S. (2019). Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. *Annals of Microbiology*, 69, 975-987. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01488-1>

Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 87-99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3).

Ayres, W. B. Modificações estruturais e reológicas em chocolate amargo devido à alteração do tipo de gordura utilizada. 2019. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Baffi, M. A., Bezerra, C. S., Arévalo-Villena, M., Briones-Péres, A. I.; Gomes, E. & Silva, R. (2011). Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Annals of Microbiology*, 61, 75-78. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0099-z>.

Baldrian, P. (2006). Fungal laccases: occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242.

Bastos, S. C., Pimenta, C. J., Dias, D. R., Chalfoun, S. M., Angélico, C. L., & Tavares, L. S. (2013). Pectinases from a new strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de vries isolated from coffee bean. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9(2), 167-172. <https://doi: 10.5829/idosi.wjas.2013.9.2.1713>.

Bastos, V.S., Uekane, T. M., Bello, N.A., de Rezende, C.M., Flosi Paschoalin, V.M., Del Aguila, E. M. Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone

fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. *Journal of Food Science Technology*, 56, 2874–2887.

Bertazzo, A.; Comai, S.; Brunato, I.; Zancato, M.; Costa, C.V.L. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. *Food Chem.* 2011, 124, 93–96. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.110>

Biehl, B. & Ziegleder, G. (2003). *Cocoa Chemistry of processing*. Elsevier *Science*, 3 (2), 1436–1443. [10.1016 / B0-12-227055-X / 00261-3](https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00261-3).

Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M. & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (6), 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>.

Camu, N., González, Á., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., ... & De Vuyst, L. (2008). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 86–98. <http://doi.org/10.1128/AEM.01512-07>.

Carvalho, A. V., García, N. H. P., & Amaya-Farfán, J. (2006). Physico-chemical properties of the flour, protein concentrate, and protein isolate of the cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum). *Journal of Food Science*, 71, 8. <https://doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00156>

Carvalho, A. V., García, N. H. P. & Farfán, J. A. (2008). Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas a fermentação e torração. *Ciência, Tecnologia de Alimentos*, 28(4). <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400035>



Chagas Junior, G. C. A.; Ferreira, N.R.; Andrade, E.H.D.A.; Nascimento, L.D.D.; Siqueira, F.C. D., & Lopes, A. S. (2021). Profile of Volatile Compounds of On-Farm Fermented and Dried Cocoa Beans Inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* KY794742 and *Pichia kudriavzevii* KY794725. *Molecules*, 26, 344.

Chalfoun, S.M., Souza, L.P., Pereira, M.C., Pimenta, C. J.; Botelho, D.M.S. (2009). Antifungal potential of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.)de Vries metabolites in reduction of coffee contamination by toxigenic *Aspergillus* genera. *BioMicroWorld*, 259.

Chalfoun, S. M. (2010). Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(5), 1071-1085.

Chan, L. G, Cohen, J. L. & Bell, J. M. L. N. M. (2018). Conversion of agricultural streams and food-processing by-products to value-added compounds using filamentous fungi. *Annual Review of Food Science Technology*, 9, 503–523. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012626>

Cohen, K. O. & Jackix, M. N. H. (2005). Estudo do liquor de cupuaçu. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(1), 182-190. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000100030>.

Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44, 2047-2053. <https://doi:10.1016/j.foodres.2010.11.003>

Costa-Amaral, I. C., Carvalho, L. V. B., Pimentel, J. N. S., Pereira, A. C., Vieira, J. A., Castro, V. S., Borges, R. M., Alves, S. R., Nogueira, S. M., Tabalipa, M. M., Otero, U. B., Oliveira, K. M. P. G., Corrêa, S. M., Fonseca, A. S. A., Moreira, J. C., Peres, F., Teixeira, L. R., Menezes, M. A. C., Costa-Mattos, R. C. O., Larentis, A. L., & Sarcinelli,

P. N. (2017). Avaliação Ambiental De Btex (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xilenos) E Biomarcadores De Genotoxicidade Em Trabalhadores De Postos De Combustíveis. *Revista Brasileira De Saúde Ocupacional*.

Damaso, M. C. T.; Terzi, S. C.; Farias, A. X.; Oliveira, A. C. P.; Fraga, M. E.; & Couri, S. (2012). Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates. *Brazilian Archives of Biology and Techonolgy*, 55(4):513–520. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400005>

De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to *starter* culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 5-17. <https://doi:10.1111/jam.13045>.

De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Review*, 44. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>

Do Carmo Brito, B. de N., Chisté, R. C, Pena, R. S., Gloria, M. B. A. & Lopes, A. S. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>.

Efraim, P., Alvez, A. B. & Jardim, D. C. P. (2010). Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14, 181-201. <http://dx.doi:10.4260/BJFT2011140300023>.

Figuroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., & Ferrocino, I. (2019). The challenges and perspectives of the selection of *starter* cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>

- Fowler, M. (2016). Cocoa beans: from tree to factory. *Industrial chocolate manufacture and use*, 4. <https://doi.org/10.1002/9781444301588.ch2>.
- Gallo, M. L., Seldes, A. M., & Cabrera, G. M. (2004). Antibiotic long-chain and a, b-unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 545–551
- Gaspar, D. P., Chagas Júnior, G. C. A., Andrade, E. H. A., Nascimento, L. D., Chisté, R. C., Ferreira, N. R., Martins, L. H. S., & Lopes, A. S. (2021). How climatic seasons of the Amazon Biome affect the aromatic and bioactive profiles of fermented and dried cocoa beans?. *Molecules*, 36, 2759. <https://doi.org/10.3390/molecules26133759>
- Genovese, M. I., Pinto, M. S., Gonçalves, A. E. S. S., Lajolo, F. M. (2008). Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14(3), 207-2014. <https://doi.org/10.1177/1082013208092151>
- Gifford, D. R. & Schoustra, S. E. (2013). Modelling colony population growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Theoretical Biology*, 320, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.12.003>.
- Gondim, T. M. S., Thomazini, M. J., Cavalcante, M. J. B., & Souza, J. M. L. (2001). Aspectos da Produção de Cupuaçu. Rio Branco: Embrapa Acre, 43, (Embrapa Acre. Documentos.
- Gulcin I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Science*, 78, 803–811.
- Halaburgi, V. M., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T. P., & Karegoudar, T. B. (2011). Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry*, 46, 1146-1152. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.002>.

He, Q., Lv, Y., Zhou, L., & Shi, B. (2010). Simultaneous determination of caffeine and catechins in tea extracts by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(4), 491–498. <https://doi.org/10.1080/10826070903574469>.

Ho, V., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87.

Khaleel, C., Tabanca, N., & Buchbauer, G. (2018). Terpineol, a natural monoterpene: a review of its biological properties. *Open chemistry*, 16, 349-361. <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0040>

Korpi, A., Jarnberg, J., & Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 39, 139–193.

Kumar, N. S. M.; Ramasamy, R. & Manonmani, H. K. (2013). Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 43, 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.023>.

Lagunes Galvez, S. Kouame, L.M.; Goualie, B.G.; Adom, J.N.; Koua, G.; Ouattara, H.G.; Doue, G.; Niamke, S. L. (2015) Diversity of microbial strains involved in cocoa fermentations from Sud-comoe (Cote D'Ivoire) based on biochemical properties, *European Scientific Journal*, 11 (18), 69-85.

Lannes, S. C. S., Medeiros, M. L. & Gioielli, L. A. (2003). Physical interactions between cupuassu and cocoa fats. *Grasas y Aceites*, 54 (3), 253-258.

Lima, L., Kamphuis, H., Nout, M., & Zwietering, M. (2011). Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food Microbiology*, 28(3), 573–582. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.011>.

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

Maldonado, I. R., Rodriguez-Amaya, A. D. & Scamparini, A. R. P. (2008). Carotenoids yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107 (1), 145-150.

Magalhaes, K. T., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J. A., & Schwan, R. F. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as *starter* culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, 101(22), 8843–8850.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.083>

Matysik, S., Herbarth, O., & Mueller, A. (2008). Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 182–187.

Matysik, S., Herbarth, O., & Mueller, A. (2009). Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents. *Chemosphere*, 76, 114–119.

Micheluz, A., Manente, S., Rovea, M., Slanzi, D., Varese, G. C., Ravagnan, G., & Formenton, G. (2016). Detection of volatile metabolites of moulds isolated from a contaminated library. *Journal of Microbiological Methods*, 128, 36-41.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.004>

Miller, K. I., Qing, C., Sze, D. M., & Neilan, B. A. (2012). Investigation of the biosynthetic potential of endophytes in traditional Chinese anticancer herbs. *Plos ONE*, 7, 35953.

Miguel, M. G. C. P.; Reis, L. V. C.; Efraim, P.; Santos, C.; Lima, N.; Schwan, R. F. Cocoa fermentation: microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *Food Science and Technology*, 77, 362-369.

Oliveira, A. M.; Pereira, R. N.; Marsaioli, A.; Augusto, F. (2004). Studies on the aroma of cupuassu liquor by headspace solid-phase microextraction and gás chromatography. *Journal of Chromatography*, 1025, 115-124.

<https://doi:10.1016/j.chroma.2003.08.06>

Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H., Macias-Rodriguez, L., & Lopez-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 701–712.

Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G. and De Vuyst, L. (2011). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28, 964–973.

Pasin, L. A. A. P., Abreu, M. S., & Souza, I. P. (2011). Influence of the fungi population on the physicochemical and chemical composition on coffee (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 681-687. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300020>.

Paul, D., & Park, K. S. (2013). Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth. *Sensors*, 13, 13969-13977. <https://doi:10.3390/s131013969>

Perego, C., & Ingalina, P. (2002). *Catalysis today*, 73, 3.

Pereira, R. T. G., Pfenning, L. H., & Castro, H. A. (2005). Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, 29(6), 1112-1116. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542005000600002>.

Pugliese, A. G., Tomas-Barberan, F. A, Truchado, P., Genovese, M. I. (2013). Flavonoides, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of *Theobroma*

*grandiflorum* (Cupuassu) Pulp and Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2720-2728. <https://dx.doi.org/10.1021/jf304349u>

Pugliese, A. G. (2010). Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: composição e possíveis benefícios. Dissertação de Mestrado – São Paulo.

Quast, L. B., Luccas, V., Roth, T. C. W., & Kieckbusch, T. G. (2007). Influência da incorporação de gordura de cupuaçu na temperagem da manteiga de Cacau. *Brazilian Journal Food Technology*, 10(2), 130-136

Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G.C. P. & Schwan, R. F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908-918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>

Ramos, S., Danzl, W., Ziegleder, G. & Efraim, P. (2016). Formation of volatile compounds during cupuassu fermentation: influence of pulp concentration. *Food Res. Int.* 87,161–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.025>.

Ramos, S., Salazar, M., Nascimento, L., Carazzolle, M., Pereira, G., Delforno, T., Nascimento, M., De Aleluia, T., Celeghini, R., & Efraim, P. (2020). Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108465>

Reddy, P. L., & Sreeramulu, A. (2012) Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. *Internacional Journal of Life Sciences Biotechnology Pharma Research*, 1(3), 186–193

Robayo, Z. (2010). Caracterización del proceso de fermentación del grano de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex spreng). Especialización em Ciencia y Tecnologia de Alimento. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Rodriguez-Campos, J.; Escalona-Buendía, H.B.; Contreras-Ramos, S.M.; Orozco-Avila, I. Jaramillo-Flores, E.; Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132, 277–288.

Romero-Cortes, T., Robles-Olvera, V., Rodriguez-Jimenes, G., & Ramírez-Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2), 339–347. <https://www.researchgate.net/publication/259625443>

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P.W., & Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4927–4932

Schwan, R. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (4), 1477–1483

Schwan, R., & Wheals, A. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi:10.1080/10408690490464104>

Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25, 951-957. <https://doi:10.1016/j.fm.2008.07.003>

Silva, A. do S. S., & Farias, L. F. (2018). Elaboração da farinha à base da amêndoa do cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum. *Revista Arquivos Científicos*, 1(1), 36-42. <https://doi.org/10.5935/2595-4407/rac.immes.v1n1p36-42>

Singleton, V. L. & Rossi, J. (1965). A Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.



Souza, J. M. L., Rocha, J. M., Cartaxo, C. B. C., Vasconcelos, V. S. A., Nascimento, M. M., Yomura, R. T. B., Kaefer, S. (2020). Monitoring and Optimization of Cupuaçu Seed Fermentation, Drying and Storage Processes. *Microorganisms*, 8, 1314. [Doi:10.3390/microorganisms8091314](https://doi.org/10.3390/microorganisms8091314).

Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., & Apiwathnasorn, C. (2005). Comparative Repellency Of 38 Essential Oils Against Mosquito Bites. *Phytotherapy Research*, 19, 303-309.

Vázquez-Montoya, E. L., Castro-Ochoaa, L. D., Maldonado-Mendoza, I. E., Luna-Suárez, S., & Castro-Martínez, C. (2019). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista Argentina de Microbiologia*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.005>

Wong, K.K.Y., Signal, F.A., Campion, S. H., & Motion, R. L. (2005). Citronella As An Insect Repellent In Food Packaging. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53, 4633-4636.